الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية وزارة التعليم العالي و البحث العلمي جامعة وهران للعلوم و التكنولوجيا محمد بوضياف





Présentée par : ZEMMOUR Assia.

Intitulé: Epidémiologie et caractérisation moléculaire de souches cliniques de *Klebsiella pneumoniae* productrices de β-Lactamases à Spectre Elargie, isolées de l'Etablissement Hospitalo-Universitaire d'Oran, Algérie.

Faculté	: Sciences de la Nature et la Vie.
Département	: Génétique Moléculaire Appliquée.
Domaine	: Sciences de la Nature et la Vie.
Filière	: Biologie.
Intitulé de la Formation	: Génétique Moléculaire et Cellulaire.

Soutenue le 03 Février 2022 à 10:00.

Devant le Jury Composé de :

Membres de Jury	Grade	Qualité	Domiciliation
Pr. ALIOUA-BERREBBAH Amel	Professeur	Présidente	USTO
Pr. RAHMANI Bouabdallah	Professeur	Encadreur	USTO
Pr. SAIDI-OUAHRANI Nadjia	Professeur	Co-Encadreur	USTO
Pr. DIB Soulef	Professeur	Examinateur	Université Oran 1
Dr. SELAMI Nawel	МСА	Examinateur	USTO

Année Universitaire : 2021-2022

Remerciements

Que le chemin fût long, tortueux et semé d'embûches pour arriver à ce manuscrit. On en retire néanmoins une expérience professionnelle et humaine exceptionnelle. Je tiens donc à remercier les personnes qui m'ont permis de réaliser ce travail et accompagnées tout au long de ce chemin.

*J*e remercie les membres de jury pour avoir accepté de se déplacer et venir examiner et juger le contenu de ma thèse de Doctorat.

Madame la présidente, Pr. Alioua-Berrebbah, merci d'avoir accepté de présider mon mémoire de thèse, avec mes respects les plus sincères.

Merci a madame la Pr. Dib d'examiner ma thèse, avec mes respects les plus sincères.

Je remercie également Dr. Selami, pour toute l'attention dont elle à fait preuve en examinant mon travail de recherche et pour l'honneur qu'elle me fait.

Je remercie mon directeur de thèse Pr. Rahmani, qui m'a encadré tout au long de cette thèse et qui m'a fait partager ses brillantes intuitions. Qu'il soit aussi remercié pour sa gentillesse, sa disponibilité permanente et pour les nombreux encouragements qu'il m'a prodigué.

Un grand remerciement au Pr. Saidi-Ouahrani pour la précieuse contribution et la patience à gérer les difficultés scientifiques et administratives durant mon travail de préparation de thèse.

Jexprime ma profonde reconnaissance au Pr. Giske ainsi qu'à son équipe de recherche ce qui ma permis de faire toute la partie expérimentale au sein du laboratoire de recherche microbiologie clinique, Hopital Universitaire Karolinska, Stockholm, Suède.

Je remercier la maître assistante, Benhamouche et Docteur Louhibi pour leurs conseils scientifiquse dans le choix de ma thématique de thèse et engagements.

Je remercie les ingénieurs du service réseau de notre université de m'avoir accepté de m'aider.



Je dédie cette thèse à

La mémoire de maman et mon petit frère.

Toute personne qui a aidé de loin ou de près pour la réalisation de ce travail...

Assia.

Liste des figures

Figure 1. Paroi des bactéries à Gram négatif6
Figure 2. Mécanismes de résistances des bactéries Gram-négatives et les antibiotiques touchés. 13
Figure 3. Représentation schématique du mécanisme de transfert de matériel génétique chez les bactéries
Figure 4. Taxonomie de <i>Klebsiella pneumoniae</i> et l'appartenance à la famille des entérobactéries.
Figure 5. Photographies d'une culture de <i>Klebsiella pneumoniae</i> et une observation au microscope éléctronique
Figure 6. Emergence et probagation de <i>Klebsiella pneuoniae</i> à divers environements
Figure 7. Représentation schématique de deux <i>K. pneumoniae</i> « classique » et « hyper-virulente »
Figure 8. Représentation schématique du rôle de la capsule dans la virulence chez <i>K. penumoniae</i>
Figure 9. Organisation de r <i>fb</i> cluster
Figure 10. Rôle de lipopolysaccharide dans la virulence de <i>K. pneumoniae</i>
Figure 11. Représentation schématique des rôles de fimbriae de type 3 dans la virulence chez <i>K. pneumoniae</i>
Figure 12. Représentation schématique des rôles de fimbriae de type 3 dans la virulence chez <i>K. pneumoniae</i>
Figure 13. Représentation schématique du rôle des sidérophores dans la virulence chez <i>K</i> pneumoniae
Figure 14. Carte métabolique de la voie de dégradation de l'allantoïne
Figure 15. Organisation caractéristique d'un locus CRISPR
Figure 16. Architecture des locus et organisation des gènes des systèmes CRISPR et les différents DRs et leurs structures secondaires chez KP
Figure 17. Différentes étapes du séquençage d'un génome bactérien
Figure 18. Analyse du génome complet (WGS)61
Figure 19. Etapes de l'identification bactérienne par spectrométrie de masse (MALDI-TOP-MS)66

Figure 20. Etapes de l'utilisation de Xpert Carba-R	68
Figure 21. Quantité de la fluoresence généré du logitiel Rotor Gene Real Time Analysis Soft V 6.1.	ware 69
Figure 22. Courbes de fusion générée du logitiel Rotor Gene Real Time Analysis Software V	7 6.1. 69
Figure 23. Photo du kit Check-MDR CT101, le tube CP array (TA) et le lecteur	71
Figure 24. Images typiques de puces à ADN obtenues avec la configuration «Check-MDR CT101».	71
Figure 25. Etapes de l'analyse des gels PFGE en utilisant GelCompare II.	76
Figure 26. Photographie du résultat du kit de confirmation KPC/MBL et OXA-48, ROSCO DIAGNOSTICA.	83
Figure 27. Minimum Spanning Tree basé sur la matrices de similarité (coefficients de Dic profiles PFGE en détails	e) des 85
Figure 28. Minimum Spanning Tree basé sur la matrices de similarité (coefficients de Dice profiles PFGE	e) des 86
Figure 29. Gènes de résistance des 19 souches séquencées	89
Figure 30. Array des autres gènes de résistance	90
Figure 31. Séquences consensus des DR I-E et I-E* et leurs structures secondaires en ARN	95
Figure 32. Alignement des séquences leaders 1 du système CRISPR-Cas sous-type I-E.	96
Figure 33. Aligements des séquences leaders 2 et 3 du système CRISPR-Cas sous-type I-E*.	97
Figure 34. Organisation et architecture des CRISPR-Cas systèmes des souches séquencées	98
Figure 35. Distribution des spacers dans les CRISPR loci avec les résultats du Blasting	99
Figure 36. Arbre K-mer	102
Figure 37. Arbre Core SNP des 19 génomes.	103
Figure 38. MST cgMLST. Les cerles en couleurs montrent les souches qui ont les mêmes ST	ſs. 105
Figure 39. Quatre MSTs selon la source de prélèvement et les profiles de virulence et résista	nce. 106
Figure 40. Heatmap annotation des résultats génomique associés à l'arbre de core SNPs	108

Liste des tableaux

Tableau 1. Caractères biochimiques de Klebsiella pneumoniae.	. 19
Tableau 2. Tableau résumant les classifications des β -lactamases d'après Amber et Bush <i>et al</i> .	. 27
Tableau 3. Réplicons portant les gènes de résistance aux β-lactamines chez KP	. 29
Tableau 4. Épidémiologie moléculaire des β-lactamases dans le monde chez KP	. 51
Tableau 5. Epidémiologie moléculaire des gènes de résistance aux antibiotiques en Algérie	. 56
Tableau 6. Tableau comparatif de différentes technologies de séquençage à haut débit	. 58
Tableau 7. Tableau de l'interprétation des scores de corrélation	. 67
Tableau 8. Résultats du kit de confirmation KPC/MBL et OXA-48	. 82
Tableau 9. Résultats de la caractérisation moléculaire par PCRs SYBR Green, PCR-RFLP et puces d'ADN.	. 84
Tableau 10. Tableau de la qualité des séquences.	. 87
Tableau 11. MLST des 19 souches séquences et ses sept gènes de ménages	. 91
Tableau 12. Résultats des gènes de pompes d'efflux	. 92
Tableau 13. Résultats de la virulence et les sérotypes (K-types).	. 93
Tableau 14. Distribution des différents éléments du système CRISPR-Cas	. 95
Tableau 15. Tableau des éléments mobiles réplicons et prophages.	101
Tableau 16. Tableau des nombres de SNP entre les souches séquencées (Matrix SNPs)	103

Liste des annexes

Annexe 1. Structure chimique de quelque β -lactamines et leurs inhibiteurs	144
Annexe 2. Structure chimique de quelques aminoglycosides	144
Annexe 3. Structures chimiques de quelques quinolones.	145
Annexe 4. Structure chimique d'une sulfonamide et le trimthoprim	145
Annexe 5. Structure chimique de la nitrofurantoine	145
Annexe 6. Structures chimique de deux polymyxines	146
Annexe 7. Structure chimique des tétracyclines	146
Annexe 8. Stucture chimique du Chloramphénicol	147
Annexe 9. Liste des isolats	147
Annexe 10. Milieu gélose au sang frais.	152
Annexe 11. Tableau des couples d'amorces utilisés dans la thèse	153
Annexe 12. Conditions de la ligation	153
Annexe 13. Mélange des solutions B et C	154
Annexe 14. Conditions de la PCR	154
Annexe 15. Préparation de la dilution de la solution conjugée.	154
Annexe 16. Liste des solutions, tampons et enzymes utilisés pour la PFGE.	155
Annexe 17. Marqueurs de taille avec bandes respectives (14 pièces) pour l'isolat de référence G5244 (<i>Escherichia coli</i> EHEC)	156
Annexe 18. Photographie prise par GelDoc d'un gel de PFGE	156
Annexe 19. Tableau de l'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS	157
Annexe 20. Photographie de gel montrant les bandes après digestion enzymatique par BtsCl	162
Annexe 21. Électrophorèse sur gel en champ pulsé après digestion par XbaI	163

Liste des abréviations

ADH : Arginine DiHydrolase.

- ADN: Acide DésoxyriboNucléique.
- ADNr : ADN ribosomique.
- ARG: Antibiotic Resistance Genes.
- ARN: Acide RiboNucléique.
- ARNr : ARN ribosomique.
- ATB : Antibiotique.
- BGN : Bacille à Gram Négatif.
- BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.
- BLSE: Bêta-Lactamases à Spectre Étendu ou Élargi.
- BRE BOX: B recognition element.
- BTS : Bacterial Test Standard.
- cgMLST: core genome Multi Locus Sequence Typing.
- CLED: Cystine Lactose Electrolyt Deficient.
- CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats.
- CTX-M: Céfotaximase-Munich.
- DR: Direct repeated.
- DRs: Directs repeated.
- EHUO : Établissement hospitallo-Universitaire d'Oran.
- FOX : Céphalosporinase.
- HGT: Horizontal gene transfer.
- HIV : Virus de l'immunodéficience humaine.
- HV: Hyper-Virulent.
- IMP : Enzyme qui hydrolyse imipèneme.
- Kb: Kilo base.
- KCN : Cyanure de potassium.

KP: Klebsiella pneumoniae.

KPC : Klebsiella pneumoniae productrice de carbapenemase.

LDC : Lysine décarboxylase.

LPS: Lipo-PolySaccharide.

MALDI-TOF/MS: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization- Time-Of-Flight/ Mass Spectrometry.

MDR: Multidrug resistance.

MH: Mueller-Hinton.

ML Tree: Maximum Likelihood tree.

MLST: Multi Locus Sequence Typing.

MST: Minimum Spanning Tree.

NCBI: National Center for Biotechnology Information.

NDM: New Delhi metallo-β-lactamase.

NJ: Neighbor-Joining.

NTS : Nouvelles Technologies de séquençage.

ODC : Ornithine décarboxylase.

OMP : Outer Membrane Protein (Protéines de membrane externe).

ONPG: Orthonitrophényl-β-D-galactopyranoside.

ONT : Oxford Nanopre Technologie.

OXA : Oxacillinase.

PAM: Protospacers Adjacent Motifs.

Pb: paire de base.

PCR: Polymerase Chain Reaction.

PFGE: Pulsed-Field Gel Electrophoresis.

PMQR: Plasmid-mediated quinolone resistance.

RM: Rouge de Méthyle.

SHV: Sulfhydryl variable.

SMRT: Single Molecule Real Time Sequencing.

- SNP: Single Nucleotide Polymorphism.
- SRA: Sequence Read Archive.
- ST: Sequence Type.
- TA : Tube CP Array.
- TEM : Temoniera : nom du malade chez qui la première souche a été isolée.
- UPGMA: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean.
- VIM: Verona Integron-encoded metallo- β -lactamases.
- VP : Voges-Proskauer.
- WGS: Whole Genome Sequencing.
- α -CHCA : Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique.

Résumé

Les infections à *Klebsiella pneumoniae* (KP) sont généralement nosocomiales. Les antibiotiques sont de moins en moins efficace dues à leurs utilisations abusives dont la conséquence est l'augmentation de la résistance des bactéries aux antibiotiques. En Algérie, KP est la première productrice de β -lactamases à spectre étendu (BLSE). Nous avons fait la caractérisation moléculaire et génomique de 219 souches de KP-BLSE isolées entre 2011 et 2012 provenant de l'Etablissement Hospitalier Universitaire d'Oran, 1^{er} novembre 1954. Nous avons étudié, le résistome, le virulome, les systèmes CRISPR-Cas, les prophages, la phylogénétique et les relations entre les différents clones.

La confirmation du phénotype de résistance BLSE et l'identification des 219 souches a été réalisé par le test de synergie et MALDI-TOF/MS. 193 souches de KP ont fait objet pour la caractérisation moléculaire par PCR en temps réel (SYBR-Green) pour différents gènes de résistances aux antibiotiques. Le typage génomique par électrophorèse en champ pulsé (PFGE) a permis de sélectionner les souches pour le séquençage de leurs génomes. Après trimming et assemblage des contigs, une caractérisation *in silico* a été effectuée pour le résistome, le virulome, les systèmes CRISPR, les prophages, la phylogénétique et les relations entre les différents clones.

Sur un total de 193, 191 souches comportaient des enzymes du groupe CTX-M-1 (99,96%); dont 19 souches séquencées sont confirmées comme $bla_{CTX-M-15}$. Une prévalence élevée de *qnrB1* (63,21%) et *acc(6')Ib-cr* (71,5%) a également été observée. Une souche avait bla_{OXA-48} . Une résistance à la céfoxitine a été observée dans six souches, dont quatre avaient CMYII. L'analyse de séquençage de trois souches a révélé deux variantes de pAmpC (bla_{CMY-2} et bla_{CMY-16}). La PFGE a permis d'identifier les clones dominants faisait partie du groupe C 11 (n= 31). Le typage moléculaire a révélé 16 types de séquences distincts, parmi lesquels les clones pandémiques ST147 (n = 2), ST23 (n = 1) et ST14 (n = 1). ST147 était le clone le plus répandu entre 2011 et 2012. La prévalence du système CRISPR-Cas était de 52,6%, deux sous-types sont trouvés I-E et I-E*. Deux souches avaient $bla_{CTX-M-15}$ et hébergées un prophage, mettant en évidence le rôle des phages dans la transmission des gènes de résistance. Il serait intéressant de séquencer plus de souches de KP dans le but est la surviellance de la résistance aux antibiotiques et l'hygiène dans les hôpitaux.

Mots clés : *Klebsiella pneumoniae*, antibiotiques, résistome, virulome, infection nosocomiale, génome, Oran, Algérie.

Abstract

Klebsiella pneumoniae (KP) infections are generally nosocomial. Antibiotics are less and less effective due to their misuse, which results in increased resistance of bacteria to antibiotics. In Algeria, KP is the leading producer of extended spectrum β -lactamases (ESBL). We carried out the molecular and genomic characterization of 219 KP-ESBL strains isolated between 2011 and 2012 from the University Hospital of Oran, 1st November, 1954. We studied the resistome, the viruloma, the CRISPR-Cas systems, the prophages, phylogenetics, and the relationships between different clones.

Confirmation of the resistance phenotype and identification of the 219 strains was performed by MALDI-TOF/MS and the synergy test. 193 strains of KP were subjected for molecular characterization by real-time PCR (SYBR-Green) for different antibiotic resistance genes. Pulsedfield electrophoresis (PFGE) genomic typing has made it possible to select strains for sequencing their genomes. After trimming and assembly of the contigs, an *in silico* characterization was carried out for the resistome, the virulome, the CRISPR systems, the prophages, the phylogenetics, and the relationships between the different clones.

Out of a total of 193, 191 strains contained enzymes from the CTX-M-1 group (99.96%); of which 19 strains sequenced are confirmed as $bla_{CTX-M-15}$. A high prevalence of qnrB1 (63.21%) and acc(6')lb-cr (71.5%) was also observed. One strain had bla_{OXA-48} . Resistance to cefoxitin was observed in six strains, four of which had CMYII. Sequencing analysis of three strains revealed two variants of pAmpC (bla_{CMY-2} and bla_{CMY-16}). PFGE allowed the identification of dominant group C11 (n =31). Molecular typing revealed 16 distinct sequence types, including the pandemic clones ST147 (n = 2), ST23 (n = 1) and ST14 (n = 1). ST147 was the most prevalent clone between 2011 and 2012. The prevalence of the CRISPR-Cas system was 52.6%, two subtypes are found I-E and I-E*. In two strains carrying $bla_{CTX-M-15}$ was hosted in a prophage, demonstrating the role of phages in the transmission of resistance genes. It would be interesting to sequence more strains of KP for the purpose of antibiotic resistance survival, and hygiene in hospitals.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, antibiotics, resistome, virulome, nosocomial infection, genomes, Oran, Algeria.

الملخص

الإصابات الكليبسيلة الرئوية Klebsiella pneumoniae هي عموما عبارة عن عدوى مستشفيات. أصبحت المضادات الحيوية. في الجزائر، KP الحيوية ذات فعالية أقل بسبب سوء استعمالها وهو ما يؤدي إلى مقاومة أكبر من البكتيريا للمضادات الحيوية. في الجزائر، KP هي أهم منتج لأنزيم بيتا لاكتاماز ممتد الطيف (ESBL). قمنا بإجراء التوصيف الجزيئي والجينومي للسلالات -219 KP هي أهم منتج لأنزيم بيتا لاكتاماز ممتد الطيف (ESBL). قمنا بإجراء التوصيف الجزيئي والجينومي للسلالات -219 KP هي أهم منتج لأنزيم بيتا لاكتاماز ممتد الطيف (ESBL). قمنا بإجراء التوصيف الجزيئي والجينومي للسلالات -219 KP هي أهم منتج لأنزيم بيتا لاكتاماز ممتد الطيف (ESBL). قمنا بإجراء التوصيف الجزيئي والجينومي للسلالات -219 KP هي أهم منتج لأنزيم بيتا لاكتاماز ممتد الطيف (ESBL). قمنا بإجراء التوصيف الجزيئي والجينومي السلالات -219 KP العالاتي تم عزلها خلال الفترة الممتدة بين 2011 و2012 بالمستشفى الجامعي لوهران أول نوفمبر 1954. قمنا بدراسة قدرات المقاومة، قدرات الفوعة (الأذى)، منظومات CRISPR-Cas، الطلائع العائية (prophages) ، تطور السلالات، والعلاقات بين مختلف المستنسخات.

أجرينا تأكيد النمط الظاهري للمقاومة وتحديد 219 سلالة باستعمال طريقة الطيف الكتلي MALDI-TOF/MS واختبار التآزر. تم إخضاع 193 سلالة من KP للتوصيف الجزيئي بتفاعل البوليميراز المتسلسل PCR في زمن حقيقي (SYBR-Green) لمختلف جينات المقاومة للمضادات الحيوية. سمحت عملية الكتابة الجينومية بالرحلان الكهربائي للمجال التبضي (PFGE) من انتقاء سلالات لتسلسل الجينومات الخاصة بها. بعد تشذيب وتجميع المتجاورات (contigs) أجرينا توصيف في السليكيون (in silico) من أجل تحديد قدرات المقاومة، قدرات الفوعة (الأذى)، منظومات CRISPR-Cas، الطلائع العاثية، تطور السلالات، والعلاقات بين مختلف المستنسخات.

من بين عدد إجمالي مقدر بـ 193 سلالة، احتوت 191 سلالة على إنزيمات من مجموعة 1-M-XTX (99.96%)، من بينها 19 من بينها 19 متسلطة تأكد على أنها جينات *bla_{CTX-M-15}.* كما لوحظ أيضا تقشي جينات *qnrB1 (6*.63.21) وجينات 19 معالية متسلطة تأكد على أنها جينات *bla_{CTX-M-15}.* كما لوحظ أيضا تقشي جينات *qnrB1 (6*.63.21) وجينات *bla_{CTX-M-15}.* الحظن مقاومة لسيفوكسيتين في ستة سلالات، احتوت *bla_{CXX-48}. لوحظن مقاومة لسيفوكسيتين في ستة سلالات، احتوت على جين bla_{OXA-48}. لوحظن مقاومة لسيفوكسيتين في ستة سلالات، احتوت <i>bla_{CXY-0}. مدر (6*.71.5%). سلالة واحدة احتوت على جين *bla_{OXA-48}. لوحظن مقاومة لسيفوكسيتين في ستة سلالات، احتوت على حين bla_{OXA-48}. لوحظن مقاومة لسيفوكسيتين في ستة سلالات، احتوت <i>bla_{CXY-1}. المحرر (6*.71.5%). سلالة *واحدي من 10 محروبا المحرم 10 محروبا على جين من 11 محروبا المحرم 20.0* من تحديد المجموعة المهيمنة 20.1 (*ن = 31.1). كشفت الكتابة الجريئية على 16 أنواع من التسلسل المختلفة، بما فيها مستنسخات الجائحة 147 محروبعة المهيمنة 20.1 (ن = 31.1). كشفت الكتابة الجريئية على 16 أنواع من التسلسل المختلفة، بما فيها مستنسخات الجائحة 147 (<i>ن = 2)، 2013 (ن = 1) و 2014 وروبينية على 16 أنواع من التسلسل المختلفة، بما فيها مستنسخات الجائحة 147 (ن = 2)، 2013 (ن = 1) و 2014 (ن = 1). كان المستنسخ 1477 هو الأكثر انتشارا بين سنتي 2011 و 2012. ارتفاع انتشار منظومة 2015 (<i>ن = 1) و 2014 و 2015. و 2015 رو 2015 (ن = 2) و 2014 و 2015 رو 200 ر*

الكلمات المفتاح: الكليبسيلة الرئوية Klebsiella pneumoniae ، مضادات حيوية، قدرات المقاومة، قدرات الفوعة (الأذى)، عدوى المستشفيات، جينومات، و هران، الجزائر.

Productions scientifiques

1. Articles

Le premier article fait l'objet de mon thème de recherche concernant les infections nosocomiales dues à *Klebsiella pneumoniae* au sien de l'Etablissement Hospitalier Universitaire d'Oran, 1^{er} novembre 1954. Le deuxieme article n'est pas inclus dans cette thèse.

1-1 Article 1

Assia Zemmour, Radia Dali-Yahia, Makaoui Maatallah, Nadjia Saidi-Ouahrani, Bouabdallah Rahmani, Nora Benhamouche, Hissa M Al-Farsi, Christian G Giske. High-risk clones of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from the University Hospital Establishment of Oran, Algeria (2011-2012). PLoS One. 2021 Jul 26;16(7):e0254805. doi: 10.1371/journal.pone.0254805. eCollection 2021. Voir à la fin de la thèse Article 1.

1-2 Article 2

Malika Talhi-Mekhici, Bertrand Cornu, Rahma Talhi– Mehaya, Djemaia Sahraoui, Wafaa Dib, Assia Zemmour, Leila Amel Yazi, Saidi-Ouahrani Nadjia, Mourad Kacem, Corinne Vander Wauven. Phenotypic and genotypic identification of bacteria from women breast-milkand the feces of their childs in the western region of Algeria. December 2017. Journal of Pure and Applied Microbiology. 11(4):1767-1776. Voir à la fin de la thèse Article 2.

2. Participtations par affiches aux congrés internationnals

2.1 Poster 1

Journées internationales de la biotechnologie 2014, Hammamet, Tunisie. Épidémiologie moléculaire d'isolats cliniques de *Klebsiella pneumoniae* productrices de CTX-M à l'EHU d'Oran, Algérie. Zemmour A, Dali Yahia R, Benhammouche N, Humaun Kabir M, Rahmani B, Mehtar Saidi N, Giske CG.

2.2 Poster 2

25th ECCMID 2015, Amsterdam, Netherland. Prevalence of *qnr* in Extended Spectrum β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* from the University Hospital Establishment of Oran-Algeria. Zemmour A, Abi-Ayad R, Saidi-Ouahrani N, Rahmani B, Giske C G.

2.3 Poster 3

29th ECCMID 2019, Amsterdam, Netherland. 13-16 April 2019. Molecular epidemiology of extended-spectrum β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from Oran, Algeria. Zemmour A, Maatallah M, Dali-Yahia R, Saidi-Ouahrani N, Rahmani B, Al-Farsi H, Camporeale A,Giske G C. P1314.

2.4 Poster 4

2eme Workshop International Gestion et Amélioration Génétique Des Ressources Végétales Et Microbiennes GRPM 2017, Mars 19-22, Tlemcen, Algérie. Molecular characterization of different resistance genes in Extended Spectrum β -lactamase-producing Klebsiella pneumonia from the University Hospital Establishment of Oran, Algeria. Zemmour A, Abi-Ayad R, Saidi-Ouahrani N, Rahmani B, Giske C G.

2.5 Poster 5

1st ASI and 5th FASCMID congress from 27/10/2018 to 29/10/2018, the El Aurassi Hotel. Algiers, Algeria. Zemmour A, Abi-Ayad R, Saidi-Ouahrani N, Rahmani B, Giske C G. Molecular characterization and epidemiology of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in Extended Spectrum Beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* from the University Hospital Establishment of Oran-Algeria. Poster 24.

2.6 Poster 6

35e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, PALAIS DES CONGRÈS DE PARIS, FRANCE 14-15 DÉCEMBRE 2015. Isolats cliniques de *Klesbsiella pneumoniae* producteurs de BLSE et CTX-M à l'Établissement Hospitalier et Universitaire d'Oran, Algérie. Dali-Yahia R, Zemmour A, Rahmani B, Saidi-Ouahrani N, Mehtar N, Yazi L, Giske C G. Poster numéro 339.

3. Participtaion par présentations orales aux congrés internationals

3.1 Présentation orale 1

Journées Internationales De La Biotechnologie 2016. Sousse-Tunisie. Prevalence of plasmidmediated quinolone resistance and 16S rRNA methylases in Extended Spectrum β -lactamaseproducing *Klebsiella pneumoniae* from the University Hospital Establishment of Oran, Algeria. Zemmour A, Abi-Ayad R, Saidi-Ouahrani N, Rahmani B, Giske C G. BSO19.

3.2 Présentation orale 2

MEEGID2018. Sitges, Spain. Core Genome MLST versus Single Nucleotid Polymorphism Phylogenetic Analysis for Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from Oran, Algeria. Zemmour A, Maatallah M, Abi-Ayad R, Saidi-Ouahrani N, Rahmani B, Camporeale A, Giske G C.

4. Participation par affiche aux congrés nationaux

4.1 Poster 1

10eme congrès national de la Société Française de la Microbiologie à l'Institut de Pasteur (31 Mars et le 1 Avril 2013). Épidémiologie moléculaire de CTX-M produit par *Klebsiella pneumoniae* isolées à l'hôpital universitaire d'Oran, en Algérie. Zemmour A, Dali Yahia R., Benhammouche N, Humaun K M, Rahmani B, Mehtar Saidi N, Giske C G.

4.2 **Poster 2**

IV congrés national de biochimie et de génétique médicale, 29 et 30 avril 2019, Hotel Sheraton Oran, Algérie. Core genome MLST versus Single Nucleotid Polymorphism phylogenetic analysis for Extended-Spectrum β-Lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from Oran, Algeria. Zemmour A, Maatallah M, Dali-Yahia R, Saidi-Ouahrani N, Rahmani B, Al-Farsi H, Camporeale A, Giske C G. Poster 105BM.

5. Formations et ateliers

5-1 Ecole d'automne de spectrométrie de masse, 20 au 23 Novembre 2011, Oran. (Atelier)

5-2 Clonage moléculaire et expression des gènes chez les bactéries, juin 2012 Monastir-Tunisie (Atelier).

5-3 SPSS.

Table des matières

Liste des figures	I
Liste des tableaux	III
Liste des annexes	IV
Liste des abréviations	V
Résumé	VIII
Abstract	IX
الملخص	XIII
Introduction	
1. Problématique	
2. But du travail	
I. Recherche bibliographique	4
Chapitre 1 : Généralités	5
1. Structure générale des bacilles à Gram négatif	6
1.1 Paroi	6
1.2 Cytoplasme	
1.3 Composants externes de la paroi bactérienne	9
2. Antibiotiques	
2.1 Critères de classification des antibiotiques	
2.2 Principales familles des antibiotiques actifs sur les BGNs	
3. Types de résistance aux antibiotiques	
3.1 Résistance naturelle (transfert vertical)	
3.2 Résistance acquise (transfert horizontal)	
4. Mécanismes d'action des antibiotiques et la résistance aux antibiotiques	
4.1 Mécanismes d'action des antibiotiques	
4.2 Mécanismes de la résistance aux antibiotiques	
5. Supports génétiques de la résistance	14

6	. Mé	canismes de transfert horizontal de gènes	14
Cha	pitre 2	2 : Klebsiella pneumoniae	16
1	. Tax	konomie	17
2	. Hal	bitat	18
3	. Car	ractères bactériologiques	18
	3.1	Caractères morphologiques	
	3.2	Caractères culturaux	19
	3.3	Caractères biochimiques	19
	3.4	Caractères antigéniques	
4	. Poi	avoir pathogène de Klebsiella pneumoniae	
	4.1	Pneumonies	
	4.2	Infections urinaires	21
	4.3	Bactériémies	21
	4.4	Infections hépatiques, méningite	21
	4.5	Autres types d'infections	
5	. Fac	cteurs de risques	
6	. Em	ergence et dissémination des KP résistantes	
	6.1	Propagation d'origine médicale	
	6.2	Réservoir animal	
	6.3	Propagation internationale	
Cha	pitre 3	3 : Résistance aux antibiotiques chez Klebsiella pneumoniae	25
L a	e résis ntibioti	stome est défini comme l'ensemble de tous les gènes qui confèrent une résis iques	stance aux 26
1	. Rés	sistance de KP aux β-lactamines	
	1.1	Classification des β-lactamases	
	1.2	Résistance de <i>K. pneumoniae</i> aux β-lactamines à Spectre Élargi (BLSE)	

	1.3 plasn	Résistance de <i>K. pneumoniae</i> aux céphalosporinases, β-lactamases à mé midique (AmpC)	diation 27
	1.4	Résistance de K. pneumoniae aux carbapénèmes	28
	1.5	Plasmides portant les gènes BLSE et carbapénèmases chez KP	28
2.	Ré	ésistance de K. pneumoniae aux aminosides	29
3.	Ré	ésistance de <i>K. pneumoniae</i> aux quinolones	30
4.	Ré	ésistance de <i>K. pneumoniae</i> aux tétracyclines	30
5.	Mı	ulti-résistance de <i>K. pneumoniae</i> (MRKP)	31
Chaj	pitre 4	4 : Virulence chez Klebsiella pneumoniae	32
1.	Ca	apsule	33
	1.1	Rôle de la capsule	34
2.	Lip	popolysaccharides	35
	2.1	Rôles des LPS	36
3.	Fir	mbriae de type 1	37
	3.1	Rôle de fimbriae type 1	37
4.	Fir	mbriae de type 3	38
	4.1	Rôle de fimbriae type 3	38
5.	Sic	dérophores et transporteurs du fer	39
	5.1	Sidérophores	39
	5.2	Transporteurs du fer	41
6.	Au	utres facteurs de virulence	41
	6.1	Outer Membrane Proteins (OMPs)	41
	6.2	Pompes d'efflux	41
	6.3	Métabolisme de l'allantoïne, facteurs de nutrition	42
Chaj	pitre :	5 : Système de défense immunitaire chez Klebsiella pneumoniae	43
1.	Or	ganisation de CRISPR locus chez les procaryotes	44
2.	Sy	vstème CRISPR-Cas chez KP	45

Chapitre	6 : Epidémiologie moléculaire de Klebsiella pneumoniae	47
1. Ép	pidémiologie moléculaire des β-lactamases chez KP dans le monde	
1.1	Europe	
1.2	Asie et Océanie	
1.3	Amérique	50
1.4	Afrique	50
2. É _l	pidémiologie moléculaire de la résistance aux aminosides chez KP	
3. É _l	pidémiologie moléculaire de la résistance aux quinolones chez KP	
4. É _l	pidémiologie moléculaire de la résistance à la polymyxine chez KP	54
5. É _l	pidémiologie moléculaire de la résistance à la tétracycline chez KP	54
6. É _l	pidémiologie moléculaire des gènes de résistance chez KP en Algérie	54
Chapitre	7 : Génomique et phylogénétique	
1. Sé	équençage du génome complet « Whole genome sequencing »	
2. M	léthodes de construction des arbres phylogénétiques	60
2.1	Les méthodes fondées sur les caractères	60
2.2	Les méthodes fondées sur les distances	60
3. A	pplications de la génomique en microbiologie clinique	
3.1	Caractérisation génomique	
3.2	Phylogénétique	
3.3	Avantages et limites des technologies WGS en clinique	63
II. Mate	ériel et méthodes	64
1. M	latériel	65
1.1	Matériel biologique	65
2. M	léthodes	65
2.1	Identification par spectrométrie de masse	65
2.2 carb	Mise en évidence des souches carbapénèmases et les gènes de rés apénèmes	istance aux 67

	2.3 Green	Caractérisation moléculaire des gènes de résistance par PCR en temps réel SYBR- 68
	2.4	Puces d'ADN "Check MDR CT101"
	2.5	Typage moléculaire par analyse de profils
	2.6	Séquençage du génome complet « Whole Genome Sequencing » (WGS)
	2.7	Analyses bioinformatiques des séquences « short raw reads »
III.	Rés	ultats
1.	Ider	ntification moléculaire des isolats et les tests de sensibilité aux antibiotiques
2. A	. Car DN et	actérisation moléculaire des gènes de résistance par PCR-SYBR Green, de puces à PCR-RFLP

3	. T	vpage génomiques (PFGE)	84
4	. C	aractérisation moléculaire par séquençage du génome complet	87
	4.1	Qualité des séquences et bio Project	87
	4.2	Analyses génomiques	88
	4.3	Comparative génomique et analyse phylogénétique	. 102
	4.4	Annotation des résultats et superposition à l'arbre des SNPs	. 107
IV.	Disc	ussion des résultats	. 109
V.	Con	clusions et perspectives	. 117
Réf	Références bibliographiques		
An	Annexes		. 143
Art	Articles		

Introduction

La découverte des antibiotiques a permis de faire considérablement reculer la mortalité associée aux maladies infectieuses au cours du 20_{ème} siècle. Cependant face à l'utilisation abusive des antibiotiques les bactéries ont rapidement développé des mécanismes de résistance.

Les β -lactames sont les antibiotiques les plus utilisés dans le traitement des infections bactériennes. Les β -lactamines ont été largement utilisés depuis 1980 pour le traitement des infections graves causées par des bactéries Gram négatives, mais la résistance contre ces groupes antibiotiques s'est produite rapidement dans le monde entier. La production des enzymes β lactamases est le principal mécanisme de la résistance bactérienne contre divers antibiotiques de cette classe. Plus de 200 types de Spectre Étendu des β -Lactamases (BLSE) différents ont été rapportés dans le monde entier à ce jour; ils étaient souvent identifiés dans la famille des entérobactéries. *Klebsiella pneumoniae* est la productrice de BLSE; après *E. coli*.

Les infections à *Klebsiella pneumoniae* sont généralement nosocomiales et surviennent principalement chez des patients avec des défenses de l'hôte affaiblies. L'efficacité des antibiotiques utilisés actuellement est moindre et les infections sont de plus en plus difficiles à traiter. Ceci entraîne un surcoût dans les traitements, une difficulté à maîtriser les épidémies et des durées d'hospitalisation prolongées. Une meilleure connaissance des mécanismes moléculaire de résistance de souches clinique de KP pourrait améliorer le pronostic des patients et diminuer la pression de sélection des antibiotiques.

1. Problématique

Dans le monde Klebsiella pneumoniae est la deuxième productrice de BLSE; après E. coli.

En Algérie, le Réseau de la Surveillance de la Résistance des bactéries aux Antibiotiques (AARN) rapporte qu'entre 2011 et 2013 *Klebsiella pneumoniae* est la 1ere productrice de BLSE.

Au sein de l'Etablissement Hospitalier Universitaire 1^{er} novembre 1954, Oran, Algérie (EHUO), les données du les pourcentages de *Klebsiella pneumoniae* productrice de BLSE sont élevés (79,37% et 64%, entre 2011 et 2012 respectivement), ce qui l'a rend la première entérobactérie productrice de BLSE à EHUO responsable d'infection nosocomial.

Due à ce haut pourcentage de résistance inhabituelle à EHUO, le laboratoire était intéressé de faire une étude moléculaire de la résistance de *Klebsiella pneumoniae* pour mieux comprendre ce problème de santé publique.

2. But du travail

Le but de ce présent travail de recherche est de faire une caractérisation moléculaire de souches cliniques de *Klebsiella pneumoniae* productrice de BLSE isolées à l'Établissement Hospitalier d'Oran 1^{er} novembre 1954 ; par différentes méthodes de biologie moléculaire.

Ainsi les objectifs fixés sont :

 Le typage et la caractérisation de quelques gènes de résistance aux antibiotiques de touts les isolats ;

✤ Le typage génomique par électrophorèse en champ pulsé (PFGE) de tous les isolats et sélection des isolats présentatifs ;

Le séquençage du génome complet des isolats représentatifs ;

✤ La caractérisation *in silico* pour le « Multi-Locus Sequence Typing » (MLST), tous les gènes de résistance aux antibiotiques, les réplicons, les gènes de virulence et du système immunitaire CRISPR-Cas des isolats séquencés ;

La phylogénétique des isolats séquencés, par deux approches le « core genome MLST » (cgMLST) et les Single Nucleotid Polymorphism (SNP) du génome complet.

I. Recherche bibliographique

Chapitre 1 : Généralités

Les entérobactéries sont en général des hôtes normaux ou pathologiques du tube digestif de l'homme et des animaux.

En 1937, Rahn propose de les rassembler au sein d'une seule grande famille : les *Enterobacteriaceae*. Les entérobactéries regroupent les bactéries à Gram négatif de plusieurs genres de bactéries tels qu'*Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Shigella*, présentant de fortes similitudes.

La découverte des antibiotiques au milieu du 20ème siècle a permis de lutter contre les infections bactériennes.

1. Structure générale des bacilles à Gram négatif

1.1 Paroi

La paroi des bacilles à Gram négatif (BGN) est composée de la membrane externe, l'espace périplasmique et la de membrane périplasmique. Cette paroi donne leur forme aux bactéries ; elle constitue une interface d'échanges avec le milieu extérieur et surtout les protège contre toute agression extérieure (Figure 1) (Prescott *et al.*, 2003).



Figure 1. Paroi des bactéries à Gram négatif (Prescott et al., 2003).

1.1.1 Membrane externe

La membrane externe sert de barrière de protection, régule le passage des sels biliaires, des antibiotiques et autres substances toxiques susceptibles de lyser ou d'endommager la bactérie. Elle empêche la perte des constituants comme les enzymes périplasmiques. La membrane externe se compose de : porines, lipopolysaccharide et lipoproteine de Braun (Figure 1) (Prescott *et al.*, 2003).

1.1.1.1 Porines

Les porines sont constituées de 3 protéines formant ainsi des canaux étroits. De nombreux antibiotiques actifs sur les entérobactéries, comme les fluoroquinolones, utilisent la voie des porines pour aller jusqu'à leur site d'action (Prescott *et al.*, 2003).

1.1.1.2 Lipopolysaccharides (LPS)

Les Lipopolysaccharides sont constitués par trois éléments : le lipide A, le polysaccharide central et la chaîne latérale O. Le lipide A s'insère dans la membrane externe et à partir de ce lipide se projettent, vers l'extérieur, le polysaccharide central et la chaine latérale O. Le polysaccharide central est constitué par un enchainement de sucres ; sa composition varie en fonction des bactéries. La chaine latérale O est dans le prolongement du polysaccharide central. Elle correspond à la partie terminale du LPS et est composée par un ensemble de sucres qui varient en fonction de la souche bactérienne (Figure 1) (Prescott *et al.*, 2003).

1.1.1.3 Lipoprotéine de Braun

La lipoprotéine de Braun est insérée dans la membrane externe par son extrémité hydrophobe, et dans le peptidoglycane par liaison covalente (Prescott *et al.*, 2003).

1.1.2 Espace périplasmique

L'espace périplasmique correspond à la zone située entre la membrane externe et la membrane plasmique. Il comprend notamment le peptidoglycane et les Proteines Liant les Pénicillines (PLP) (Figure 1) (Prescott *et al.*, 2003).

1.1.2.1 Peptidoglycane

Les bacilles à Gram négatif comme les entérobactéries possèdent une couche mince de peptidoglycane, contrairement aux bactéries Gram positif comme les staphylococcus. Il représente 5 à 10% du poids de la paroi (Prescott *et al.*, 2003).

Le peptidoglycane, appelé encore mureine, est un polymere constitué de plusieurs sousunités reliées entre elles. Chaque sous-unité est composée de 2 sucres, la N-acétylglucosamine (NAG) et la N-acétylmuramique (NAM), et d'une chaîne tétrapeptidique. La chaine est composée par la L-Alanine, l'acide D-glutamique, l'acide mésodiaminopimélique et la D-Alanine. Ce tétrapeptide est ensuite relié à la NAM. La liaison des tétrapeptides entre eux par un pont interpeptide permet d'obtenir un réseau dense de polymères. Les bactéries à Gram négatif possèdent moins de ponts interpeptidiques que les bactéries à Gram positif (Figure 1) (Prescott *et al.*, 2003).

1.1.2.2 Protéines Liant les Pénicillines (PLP)

Les protéines liant les pénicillines sont des enzymes (transpeptidases et carboxypeptidases) associées à la face externe de la membrane cytoplamique. Leur rôle est d'assurer la synthèse du peptidoglycane. Ces enzymes sont la cible des antibiotiques comme les β -lactamines (Figure 1) (Prescott *et al.*, 2003).

1.1.3 Membrane plasmique

La membrane plasmique représente la partie la plus interne de l'enveloppe bactérienne (Figure 1). Elle est composée de protéines, qui sont en proportions plus abondantes, et de lipides. Au sein de la bicouche lipidique coexistent deux types de protéines:

- Les protéines « intrinsèques » représentent 70 à 80 % des protéines de cette membrane. Leurs régions hydrophobes sont enfouies dans la bicouche lipidique et leurs régions hydrophiles se situent à l'extérieur. Ces protéines peuvent être transmembranaires avec la région hydrophile qui traverse toute la bicouche lipidique.
- Les protéines « extrinsèques » représentent 20 à 30 % des protéines. Elles sont hydrophiles et se situent à l'extérieur de la membrane, elles sont faiblement reliées à celle-ci.

Cette membrane est une barrière perméable sélective : elle régule l'entrée et la sortie des substances nécessaires à la vie bactérienne. Des systèmes de transports permettent le rejet de déchets, les sécrétions et le passage des substances qui ne peuvent traverser directement la membrane plasmique (Prescott *et al.*, 2003).

1.2 Cytoplasme

Le cytoplasme est la zone située entre la membrane plasmique et le matériel génétique. Il contient environ 15000 ribosomes représentant 90 % de l'ARN bactérien. Ce sont des organites de 20 à 30 μ m de diamètre. Leur constante de sédimentation est de 70 unités Svedberg [S] ; ils sont composés de 2 sous-unités de 50 et 30S. Ils sont le lieu de la synthèse protéique. De nombreuses inclusions de réserves énergétiques comme les granules de glycogène ou de poly- β -hydroxybutyrate se retrouvent également dans le cytoplasme (Prescott *et al.*, 2003).

1.2.1 Nucléoïde

Le nucleoïde est le support de l'information génétique, il représente le chromosome bactérien. Le plus souvent, il s'agit d'un cercle unique d'acide désoxyribonucléique double brin, sur-enroulé grâce aux topo-isomérases (Prescott *et al.*, 2003).

1.2.2 Plasmides

Les plasmides sont de l'ADN extra-chromosomique bi-caténaire généralement circulaire. Ils représentent 1 à 3 % de l'ADN total. Ils peuvent s'intégrer au chromosome ou se répliquer de façon indépendante à celui-ci. Ces plasmides peuvent porter des gènes de résistances aux antibiotiques. Étant transmissibles, ils peuvent disséminer cette résistance dans toute une population bactérienne (Prescott *et al.*, 2003).

1.3 Composants externes de la paroi bactérienne

Les bactéries possèdent à leur surface externe un grand nombre de structures tels que les flagelles, les fimbriae et les pilis.

1.3.1 Flagelles

Les flagelles sont responsables de la mobilité. Ce sont des structures minces qui mesurent de 15 à 20 µm avec un diamètre moyen de 20 nm. Ils s'étendent à l'extérieur de la paroi cellulaire. Cette structure n'est pas visible en microscopie photonique par la coloration de Gram. La disposition de ces flagelles varie selon l'espèce bactérienne. Par exemple, chez *Proteus vulgaris*, les flagelles sont distribués sur toute la surface bactérienne, on parle de ciliature péritriche (Prescott *et al.*, 2003).

1.3.2 Fimbriae

Les fimbriaes sont de minces appendices protéiques fins de plusieurs μ m de long et 3 à 10 nm de diamètre. Ils ne sont visibles qu'en microscopie électronique. Une bactérie peut être couverte de 1000 fimbriae. Certains de ces fimbriae ont un rôle d'adhérence sur les tissus de l'hôte. Les défenses antibactériennes reconnaissent ces fimbriae comme des antigènes majeurs (Prescott *et al.*, 2003).

1.3.3 Pilis

Pilis sont les organes sexuels des bactéries. De 9 à 10 nm d'épaisseur et plus longs que les fimbriae, ils ont un rôle majeur dans les échanges génétiques entre les bactéries. Leur nombre peut varier de 1 à 10 par cellule (Prescott *et al.*, 2003).

2. Antibiotiques

Les antibiotiques sont considérés comme la révolution médicale de la deuxième moitié du 20^{ième} siècle car ils ont permis de faire considérablement reculer la mortalité associée aux infections bactériennes apportant ainsi un immense bénéfice à l'humanité. Le début de l'ère moderne des antibiotiques a été intimement associé à deux sommités : Sir Alexander Fleming et Paul Ehrlich (Aminov, 2012).

2.1 Critères de classification des antibiotiques

La classification des antibiotiques peut se faire selon:

- L'origine : un antibiotique est élaboré par un organisme (naturel) ou produit de synthèse (synthétique ou semi-synthétique) (Courvalin *et al.*, 2001; Walsh, 2003);
- Le mode d'action sur : la paroi bactérienne, la membrane cytoplasmique, la synthèse des protéines ou, la synthèse des acides nucléiques (Neuman, 1990);
- Le spectre d'activité : liste des espèces sur lesquelles les antibiotiques sont actifs (spectre étroit ou large) (Neuman, 1990);
- La nature chimique : très variable, elle est basée sur une structure de base par exemple un cycle β-lactame sur laquelle il y a ensuite une hémi-synthèse. Cette dernière permet de les classer en familles (β-lactamines, aminosides, tétracyclines... etc.) (Neuman, 1990).

2.2 Principales familles des antibiotiques actifs sur les BGNs

2.2.1 β-lactamines

Les β -lactamines ont en commun un noyau β -lactame, elles présentent une analogie structurale avec la terminaison D-Ala-D-Ala du précurseur du peptidoglycane. Elles se fixent de manière covalente sur des protéines membranaires, appelées protéines de liaison à la pénicilline (PLP) (Cavallo *et al.*, 2004)

Parmi les β -lactamines on distingue: Les pénicillines, les céphalosporines. Il existe également des associations avec les inhibiteurs « acide clavulanique », les carbapénèmes et les monobactames (Cavallo *et al.*, 2004), (Annexe 1).

2.2.2 Aminosides ou aminoglycosides

La streptomycine et la kanamicine étaient les premiers antibiotiques de la famille des aminosides qui n'est plus utilisée en clinique. Actuellement les plus utilisés sont la gentamicine, la tobramicine, l'amikacine, et la netilmicine (Sekhri-Arafa, 2010), (Annexe 2).

2.2.3 Quinolones

Les quinolones de première génération dont le chef de file est l'acide nalidixique, n'agissent que sur les bacilles à Gram négatif et ne sont utilisées que dans le traitement des infections urinaires. Les quinolones de 2^{ème} génération ou fluoroquinolones comprennent principalement la pefloxacine, l'ofloxacine et la ciprofloxacine. Elles sont bactéricides et sont 100 fois plus actives que celles de la 1ère génération (Sekhri-Arafa, 2010), (Annexe 3).

2.2.4 Sulfamides et triméthoprime

Les sulfamides sont des analogues de l'acide para-aminobenzoïque. Le triméthoprime est un agent à large spectre, utilisé essentiellement en association avec un sulfamide (effet synergique) (Annexe 4).

2.2.5 Nitrofuranes

Les nitrofuranes sont des antibiotiques à large spectre. Ils sont utilisés exclusivement dans les infections urinaires (Singleton, 2005), (Annexe 5).

2.2.6 Polymyxines

Les polymyxines appartiennent à la classe des polypeptides cyclique. La colistine est l'antibiotique le plus utilisé (Nauciel et Vildé, 2001), (Annexe 6).

2.2.7 Tétracyclines

Les tétracyclines sont des antibiotiques à large spectre. Actuellement elles sont considérées comme simple marqueur phénotypique pour les Enterobactéries (Bergogne-Bérézin et Dellamonica, 1995), (Annexe 7).

2.2.8 Chloramphenicol

Le chloramphénicol est un antibiotique hydrophile à large spectre. Il est utilisé seulement comme marqueur phénotypique pour les BGN, sauf les Salmonelles et les Shigelles (Epaulard et Brion, 2009).

Il est très actif pour le traitement de la fièvre thyphoïde, actuellement il est peu commercialisé en raison de sa toxicité (Epaulard et Brion, 2009), (Annexe 8).

3. Types de résistance aux antibiotiques

Les résistances bactériennes aux antibiotiques peuvent être naturelles ou acquises.

3.1 Résistance naturelle (transfert vertical)

La résistance naturelle aux antibiotiques, appelée aussi résistance intrinsèque est due aux gènes de résistance qui font partie du patrimoine génétique de la bactérie. La résistance naturelle c'est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce. Elle est fixe et constante à l'intérieur du taxon et transmise à la descendance. Elle constitue un critère d'identification des bactéries et détermine le phénotype « sauvage » des bactéries (Doublet, 2004).

3.2 Résistance acquise (transfert horizontal)

La résistance acquise ne concerne que quelques souches d'une même espèce ou bien d'un même genre, originellement sensible à un antibiotique donné (Mathur et Singh, 2005; Singleton, 2005; Courvalin, 2008).

- Elle est due à des modifications génétiques chromosomiques ou extra chromosomique;
- Incorporation de nouveaux gènes codants pour des mécanismes de résistance.

4. Mécanismes d'action des antibiotiques et la résistance aux antibiotiques

4.1 Mécanismes d'action des antibiotiques

Chaque antibiotique a une cible spécifique dans la cellule bactérienne. De ce fait, pour que l'antibiotique soit actif il cible les fonctions essentielles, par inhibition de la croissance (bactériostatique) ou qui entraine la mort de la cellule bactérienne (bactéricide). Les antibiotiques ont différentes cibles dans la bactérie (Figure 2. A). Les antibiotiques agissent sur :

- La synthèse du peptidoglycane ; les β-lactames et les céphalosporines se fixent de manière covalente sur les PLP des bactéries en voie de croissance et donc sur la synthèse du peptidoglycane. Il en résulte une altération de la paroi ayant un effet létal pour la bactérie (bactéricide) (Livermore, 1987).
- La synthèse d'ARN et ADN ; par inhibition des topoisomérases, enzymes intervenant dans la conformation de l'ADN, en particulier la topoisomérase II (ou ADNgyrase) et la topoisomérase IV. L'antibiotique se fixe sur le complexe formé par la topoisomérase et l'ADN (Drlica et Zhao, 1997).
- La synthèse de protéines ; par inhibition en agissent préférentiellement sur la sous-unité 30S et/ou la sous-unité 50S des ribosomes et cela au niveau des trois étapes principales de la traduction : initiation, élongation ou la terminaison (Drlica et Zhao, 1997).
- Le métabolisme du folate ; en inhibant la dihydroptérate synthétase, d'où leur action sur la synthèse d'acides nucléiques (Kapoor *et al.*, 2017).



Figure 2. Mécanismes de résistances des bactéries Gram-négatifs et les antibiotiques touchés (Ganewatta et Tang, 2015).

4.2 Mécanismes de la résistance aux antibiotiques

Huit mécanismes de résistance sont impliqués chez les bactéries à Gram négatif. Ces mécanismes comprennent, certains sont schématisés dans la Figure 2, A et B:

- La perte de porines, qui réduit le mouvement de l'antibiotique à travers la membrane cellulaire (Poole, 2004);
- \succ La présence de β-lactamases dans l'espace périplasmique, ce qui dégrade les β-lactamines;
- Une surexpression de la pompe d'efflux transmembranaire, ce qui expulse l'ATB à partir de la bactérie avant qu'il puisse avoir un effet;
- La présence des enzymes de modification des antibiotiques, ce qui rend l'ATB incapable d'interagir avec sa cible;
- > Des mutations de la cible, qui empêchent l'ATB de se lier à son site d'action;
- Des mutations ou des modifications ribosomales qui empêchent l'ATB de se lier et d'inhiber la synthèse des protéines ;
- Des mécanismes de contournement métabolique, qui utilisent une enzyme alternative résistante pour contourner l'effet inhibiteur de l'antibiotique ;
- Une mutation dans le lipopolysaccharide (LPS), qui rend la classe des polymyxines incapable de se lier à cette cible (Davies et Davies, 2010; Ganewatta et Tang, 2015).

5. Supports génétiques de la résistance

Les entérobactéries sont particulièrement efficaces pour échanger de l'information génétique et la résistance aux antibiotiques de ces espèces est souvent due à l'acquisition de gènes étrangers. Ces gènes ont été capturés à partir du chromosome d'espèces différentes. Ces mobilisations impliquent deux types différents d'éléments génétiques mobiles. Ceux qui sont capables de transférer ou de capter des gènes entre les molécules d'ADN tels d'insertion, les transposons, ou les cassettes des intégrons, et ceux qui permettent le transfert d'ADN entre cellules, tels que les plasmides conjugatifs et mobilisables ou les éléments intégratifs conjugatifs (ICE) (Furuya et Lowy, 2006).

6. Mécanismes de transfert horizontal de gènes

Il existe trois mécanismes bien connus de transfert d'ADN : la transduction, la transformation et la conjugaison. Un autre mécanisme, proposé récemment, permettrait également l'échange d'information génétique par des prolongements cytoplasmiques ou nanotubes (Figure 3) (Furuya et Lowy, 2006).

Le support de l'information échangée peut être chromosomique ou extra-chromosomique. Les fonctions nécessaires au transfert peuvent être codées par la cellule donatrice, la cellule réceptrice ou l'ADN transféré (éléments génétiques mobiles) (Furuya et Lowy, 2006).



Figure 3. Représentation schématique du mécanisme de transfert de matériel génétique chez les bactéries (Furuya et Lowy, 2006).
Chapitre 2 : *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae (KP) est une entérobactérie du genre *Klebsiella*. C'est un bacille Gram-négatif, germe opportuniste et responsable d'infections nosocomiales (Brisse *et al.*, 2006).

1. Taxonomie

Le genre *Klebsiella* a été nommé par Trevisan (1885) pour honorer le microbiologiste allemand Edwin Klebs (1834-1913) (Brisse *et al.*, 2006).

Le genre *Klebsiella* comporte six espèces ; deux espèces pricipales: *Klebsiella oxytoca* et *Klebsiella pneumoniae* auxquels s'ajoutent des espèces moins fréquentes *K. granulomatis, K. variicola, K. singaporensis* et *K. michiganensis* (Brisse *et al.*, 2006).

L'espèce de *Klebsiella pneumoniae* est subdivisée en 3 sous espèces ; *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* et *Klebsiella pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* (Figure 4) (Brisse *et al.*, 2006; Brisse *et al.*, 2013; Saha *et al.*, 2013).



Figure 4. Taxonomie de *Klebsiella pneumoniae* et l'appartenance à la famille des entérobactéries.

2. Habitat

KP est une espèce ubiquitaire. Elle peut être isolée de l'environnement (sols, eaux de surface, eaux usées, végétaux) ainsi que des flores commensales de l'homme et des animaux (Podschun et Ullmann, 1998; Brisse *et al.*, 2006).

3. Caractères bactériologiques

3.1 Caractères morphologiques

Les colonies de *Klebsiella pneumoniae* sont d'un diamètre de 3 à 4 mm, lisses, bombées, brillantes, muqueuses, parfois filantes à l'anse de platine (Figure 5.A) (*Avril et al., 2000; Brisse et al., 2006*).

Ce sont des bacilles à Gram négatif de $0.5 \,\mu\text{m}$ sur $3 \,\mu\text{m}$ environ, à extrémités arrondies, se présentant de manière isolée, groupés en diplo-bacilles ou en courtes chaînettes généralement capsulées. Cette bactérie se distingue par son immobilité constante, elle est asporogène, capsulée mais cette dernière peut être absente chez 5% des souches (Figure 5.B) (Avril *et al.*, 2000; Brisse *et al.*, 2006).



Figure 5. Photographies d'une culture de *Klebsiella pneumoniae* et une observation au microscope éléctronique.

Photographie A : Aspect macroscopique des colonies de *Klebsiella pneumoniae* après une culture de 18 heures, milieu CLED. Photographie B : Observation colorée (coloration de Gram) au microscope électronique de *Klebsiella pneumoniae* (Alamy, 2021).

3.2 Caractères culturaux

K.pneumoniae se développe en aéro-anaérobiose. Sur les milieux classiques d'isolement pour entérobactéries (Drigalski, Hektoen, Mac Conkey, EMB) après une incubation de 18 à 24 h à 30 ou à 37 °C. En milieu liquide (bouillon nutritif, eau peptonée), la culture est rapide (quelques heures) à 30° et 37 °C pour *K. pneumoniae* avec parfois dépôt muqueux et collerette visqueuse en surface (Avril *et al.*, 2000; Brisse *et al.*, 2006).

3.3 Caractères biochimiques

K. pneumoniae présente les caractères généraux des entérobactéries : c'est une bactérie aéro-anaérobie facultative, fermentant le glucose et le lactose avec production de gaz, oxydase négative, catalase positive (Tableau 1) (Brisse *et al.*, 2006).

Test	Resultat attendu
ONPG, KCN	+
H ₂ S, desaminase, indole	-
Mobilité	-
VP	+
RM	-
Uréase	+/-
Citrate de Simmons	+
LDC	+
ODC	-
ADH	-
Production de gaz/ fermentation	+
Rhamnose	+
Arabinose	+
Sorbitol	+
Raffinose	+
Gélatinase	-
DNase, lipase	-

Tableau 1. Caractères biochimiques de Klebsiella pneumoniae (Brisse et al., 2006).

Les abreviations : ADH : Arginine DiHydrolase. KCN : Cyanure de potassium. LDC : Lysine décarboxylase. ODC : Ornithine décarboxylase. ONPG: Orthonitrophényl-β-D-galactopyranoside. RM: Rouge de Méthyle. VP : Voges-Proskauer.

3.4 Caractères antigéniques

K. pneumoniae possède des antigènes communs avec ceux portés par les autres entérobactéries excepté l'antigène flagellaire du fait de son immobilité (Le Minor et Véron, 1989; Avril *et al.*, 2000; Freney *et al.*, 2000):

- Antigène O : partie terminale du LPS ;
- Antigène K : il existe au moins 77 antigènes K décrits chez K. pneumoniae, K1 à K72, K74, K79 à K82 ;
- Antigène de Kunin ou ECA (*Enterobacteriaceae* Common Antigen) : intérêt taxonomique ;
- Antigènes d'adhésines (pili, fimbriae).

4. Pouvoir pathogène de Klebsiella pneumoniae

K. pneumoniae est l'agent causal de plusieurs types d'infections ; la pneumonie, la septicémie, l'infection urinaire, la bactériémie, la méningite et les abcès hépatiques pyogènes (Brisse *et al.*, 2006).

A l'hôpital, les infections dues à *K. pneumoniae* sont plus difficiles car elles prolongent la période d'hospitalisation des patients. Ces infections prolongées sont difficiles à traiter et pourraient également augmenter la fréquence de la mortalité (Podschun et Ullmann, 1998).

4.1 Pneumonies

Les pneumonies à *K. pneumoniae* peuvent être des pneumonies acquises en communauté ou en milieu hospitalier (nosocomiales). Elle est souvent une infection primaire. Les pneumonies nosocomiales à *Klebsiella pneumoniae* sont plus répandues que les pneumonies acquises en communautaire. Dans l'ensemble, les pneumonies nosocomiales sont parmi les types les plus fréquents d'infections nosocomiales et sont la principale cause de mortalité parmi les infections nosocomiales (Magill *et al.*, 2014; Paczosa et Mecsas, 2016).

Bien que les pneumonies acquises en communauté soient assez courantes, ce sont des infections potentiellement graves qui peuvent progresser rapidement et mener à l'hospitalisation, soins intensifs, et des taux élevés de morbidité et de mortalité (Liam *et al.*, 2001).

4.2 Infections urinaires

Les symptômes des infections urinaires sont similaires à ceux provoquées par d'autres agents pathogènes bactériens notamment la dysurie, l'augmentation de la fréquence et de l'urgence de la miction et l'hématurie (Jacobsen *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2014).

Ces infections urinaires peuvent généralement être traitées avec des antibiotiques. On s'inquiète car il y a de plus en plus de personnes porteuses de KP résistantes de type BLSE et carbapénèmase dans leur tractus gastro-intestinal entraînant une augmentation de la morbidité et des séjours prolongés à l'hôpital (Brisse *et al.*, 2006; Paczosa et Mecsas, 2016).

4.3 Bactériémies

Les KP provoquent également des bactériémies ; C'est la présence de bactérie pathogène dans le sang, ils peuvent être des bactériémies primaires ou des bactériémies secondaires résultant d'une propagation secondaire d'une infection primaire dans les poumons ou la vessie. De manière alarmante, les bactériémies à KP ont un taux de mortalité élevé entre 27,4 et 37% (Meatherall *et al.*, 2009; Paczosa et Mecsas, 2016).

4.4 Infections hépatiques, méningite

Les KP hyper-virulentes causent des abcès hépatiques primaires dans les populations de patients qui ne semblent pas avoir de maladie hépatique (Podschun et Ullmann, 1998). Les infections hépatiques sont probablement déclenchées par une brèche dans les défenses de l'hôte dans le tractus gastro-intestinal qui permet au microbiote intestinal de dépasser la barrière gastrique et pénétrer aux tissus avoisinants. Ces infections peuvent provoquer d'autres infections secondaires à la suite d'une propagation hématogène ; les bactéries seront transportées dans le corps par le sang qui passe par le foie et provoquer par la suite de la méningite (Brisse *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2018).

4.5 Autres types d'infections (la peau et les tissus mous)

Les infections à KP peuvent également entraîner de graves infections de la peau et des tissus mous (tels que cellulite « cellulitis », fasciite nécrosante et myosite), une endophtalmie et des abcès dans un certain nombre d'autres tissus (par exemple, cou, poumons et reins) (Keller *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2015; Paczosa et Mecsas, 2016).

5. Facteurs de risques

Les facteurs de risque d'acquisition d'une nfection à KP en milieu hospitalier et communautaire sont nombreux (Paczosa et Mecsas, 2016) :

- Les personnes immunodéprimées ou immuno-déficientes (les personnes âgées de plus de 65 ans, cancéreux, nouveaux nés et les porteurs du virus HIV);
- Les diabétiques ;
- Les alcooliques ;
- A l'hôpital : les patients nécessitant une ventilation mécanique ou des sondes urinaires (les transplantés, dialysés, les patients qui ont une pneumonie... etc.) ;
- L'augmentation de l'utilisation anarchique des antibiotiques.

6. Emergence et dissémination des KP résistantes

La propagation de clones à haut risque est un processus complexe qui comprend des événements locaux, nationaux et internationaux. Bien que les voies de transmission puissent être énigmatiques, la littérature met en évidence de nombreuses voies de transmission présentées schématiquement dans la figure 6 (Navon-Venezia *et al.*, 2017).

Les modes de transmission peuvent impliquer une propagation de patient à patient en milieu hospitalier, une acquisition suite à des contacts avec des colonisateurs positifs, ainsi qu'une transmission via un voyage médical, et éventuellement à travers la chaîne alimentaire, les animaux de compagnie et les sources environnementales (Figure 6) (Navon-Venezia *et al.*, 2017).

6.1 Propagation d'origine médicale

K. penumoniae est considéré comme le pathogène principal des infections nosocomiaux (Pitout *et al.*, 2015). Elle se propage d'une personne à l'autre. La colonisation peut durer jusqu'à 2 à 4 ans (Conlan *et al.*, 2016). Les porteurs ne développent pas toujours la maladie. *K. pneumoniae* peut survivre sur les surfaces des équipements hospitaliers. Les mesures de sécurité en cours d'une épidémie sont la surveillance active, l'isolement strict des porteurs de *K. pneumoniae* et la division du personnel en un groupe soignant ; un groupe s'occupant des patients infectés et l'autre travaillant uniquement avec des non-porteurs. *K. pneumoniae* responsable d'infection nosocomiale peut avoir le potentiel d'émergence en communauté (Navon-Venezia *et al.*, 2017).

6.2 Réservoir animal

Les réservoirs possibles pour les clones de *K. pneumoniae* productrice de Carbapénèmase (KPC) en circulation sont des animaux qui peuvent échanger des agents pathogènes avec les humains via la chaîne alimentaire, un contact étroit ou une transmission professionnelle. Des KPC humains à haut risque ont été signalés chez divers animaux de compagnie dans la communauté: par exemple chez des chiens ou des animaux sauvages (Poirel *et al.*, 2013; Coque *et al.*, 2016; Navon-Venezia *et al.*, 2017). Le rôle des animaux en tant que réservoir de clones de *K. pneumoniae* à haut risque et son impact sur la santé humaine restent encore flous et devraient être étudiés (Navon-Venezia *et al.*, 2017).

6.3 **Propagation internationale**

La propagation mondiale des clones à haut risque peut se produire en raison des voyages et du tourisme internationaux (Van Der Bij et Pitout, 2012). Cela peut inclure des déplacements pour raisons médicales, lors de voyages au cours desquels des personnes sont occasionnellement en contact avec des établissements de santé ou en visite dans un pays d'endémie. Les patients peuvent être transférés des régions épidémiques et propager un nouveau pathogène; ou un patient peut être soumis à une infection lors d'une hospitalisation dans un pays d'endémie (Zurfluh *et al.*, 2015).

Une surveillance active des patients de retour hospitalisés dans des zones d'endémie et des actions de contrôle des infections sont recommandées pour éliminer toute propagation supplémentaire et éviter de nouvelles acquisitions. Le transfert de clones à haut risque producteurs de BLSE peut être lié à la chaîne alimentaire et aux relations commerciales internationales comme la consommation d'aliments porteurs de plusieurs gènes de résistance. Une surveillance active doit être mise en place dans tous les établissements de santé; des mesures pour arrêter la contamination de l'environnement devraient être développées et utilisées de façon routinière (Navon-Venezia *et al.*, 2017).



Figure 6. Emergence et probagation de *Klebsiella pneuoniae* à divers environements (Navon-Venezia *et al.*, 2017).

Chapitre 3 : Résistance aux antibiotiques chez *Klebsiella pneumoniae*

Chez les entérobactéries y compris *Klebsiella pneumoniae*, les principaux mécanismes de résistance sont:

- Résistance aux β-lactamines par inactivation enzymatique par les β-lactamases;
- Résistance aux fluoroquinolones par modification de la cible;
- Résistance aux aminosides par inactivation enzymatique (Fauchère, 1997).

Klebsiella pneumoniae possède différents variants du gène codant pour une pénicillinase chromosomique, qui confère la résistance naturelle aux pénicillines (amoxicilline, ticarcilline) (Stock et Wiedemann, 2001).

Le résistome est défini comme l'ensemble de tous les gènes qui confèrent une résistance aux antibiotiques (D'Costa *et al.*, 2006). KP joue également un rôle majeur dans la dissémination des mécanismes de résistance acquise notamment aux β -lactamines, les aminosides, les quinolones, la tigécycline et les polymyxines (Navon-Venezia *et al.*, 2017).

1. Résistance de KP aux β-lactamines

1.1 Classification des β-lactamases

La première classification d'Amber dite structurale permet de classer les β -lactamases en quatre classes (A, B, C et D) (Ambler, 1980). La seconde est la plus récente et la plus utilisée classification de Bush et Jacoby, qui les classe selon leurs caractères fonctionnels et leurs substrats (antibiotique). Les enzymes de résistance sont classées en trois groupes:

- Groupe 1 : les céphalosporinases qui ne peuvent pas être inhibé par l'acide clavulanique ;
- Groupe 2 : le groupe d'enzymes qui peuvent être inhibées par l'acide clavulanique (sauf les groupes 2d et 2f) ;
- Groupe 3 : les metallo- β -lactamases (Tableau 2) (Bush et Jacoby, 2010).

Bush et al.	Ambler	Substrats/Antibiotique	Enzymes	Acide
Classes	groupes	Substrats/Antibiotique	représentatives	clavulanique
1	С	Céphalosporines	AmpC	résistante
2b	A	Pénicillines, céphalosporines	TEM, SHV	Sensible
2be	А	Pénicillines, les céphalosporines à spectre élargi, monobactames	TEM, SHV	Sensible
2d	D	Pénicillines, cloxacilline	OXA	Résistante
2 ^e	A	Céphalosporines	Céphalosporinases <i>proteus vulgaris</i>	Sensible
2f	А	Pénicillines, les céphalosporines et carbapénèmes	NMC-A enterobacter cloacae	Résistante
3	В	La majorité des β-lactames, y compris carbapénèmes.	L1 stenotrophomonas maltophilia	Résistante

Tableau 2. Tableau résumant les classifications des β -lactamases d'après Amber (1980) et Bush *et al.*, (2010).

1.2 Résistance de *K. pneumoniae* aux β-lactamines à Spectre Élargi (BLSE)

Le terme BLSE a été proposé pour la première fois en 1988 (Jarlier *et al.*, 1988). *Klebsiella pneumoniae* productrice de BLSE est capables d'hydrolyser les céphalosporines à large spectre, y compris les pénicillines autrement dites, une BLSE est une β -lactamase appartenant au groupe fonctionnel 2be (Classe A d'après Amber) et inhibée par l'acide clavulanique et qui peut hydrolyser les céphalosporines (Giske *et al.*, 2009). Généralement, Les BLSE sont transmissible par plasmide entres les BGNs. Les enzymes BLSE les plus répandues sont CTX-M, TEM et OXA et leurs gènes sont *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}* et *bla_{OXA}*, *bla* pour β -lactamasase (Lahlaoui *et al.*, 2014).

1.3 Résistance de *K. pneumoniae* aux céphalosporinases, β-lactamases à médiation plasmidique (AmpC)

La classe C correspond aux céphalosporinases d'après la classification de Bush et Jacoby., (2010) (Tableau 2). Les AmpC sont des β -lactamases plasmidiques, hydrolysent préférentiellement les céphalosporines et les céphamycines à spectre étroit, large et élargi et résistent à l'inhibition par le clavulanate (acide clavulanique), le sulbactame et le tazobactam (Livermore, 1995; Philippon *et al.*, 2002).

Les AmpC, β -lactamases médiées par plasmide les plus couramment rencontrées appartiennent aux familles CMY, FOX, DHA et MOX codées par les gènes bla_{CMY} , bla_{FOX} , bla_{DHA}

et bla_{MOX} . Leurs prévalences ne sont pas exactes mais elles semblent moins courantes que les BLSE (Philippon *et al.*, 2002).

1.4 Résistance de K. pneumoniae aux carbapénèmes

La résistance de *K. pneumoniae* est due à la production des carbapénèmases qui sont des enzymes capables d'hydrolyser les carbapénèmes. Ils ont émergé dans 3 des 4 classes moléculaires de Ambler : la classe A comprend notamment les enzymes de type KPC, la classe B, les métallo- β -lactamases comme VIM ou plus récemment NDM-1 et enfin la classe D comprend des enzymes OXA (Queenan et Bush, 2007).

1.5 Plasmides portant les gènes BLSE et carbapénèmases chez KP

Peu d'études ont déterminé le type de réplicon des plasmides porteurs des gènes de résistance aux β -lactamine chez KP, elle peut avoir plusieurs plasmides en plus de son chromosome et 52 différents plasmides était rapporté, les réplicons les plus communs sont IncFII et IncL/M, IncFI, IncR et IncA/C (Navon-Venezia *et al.*, 2017). Montrant ainsi la diversité des supports plasmidiques de la résistance aux antibiotiques chez KP (Tableau 3).

	Gène de résistance	Réplicons
	bla _{KPC-2}	FIIk, FIBpkpQIL, R, N1(A/C2, R), X3(U), FIBpkpN3
KPC	bla _{KPC-3}	FIIk, FIBpkpQIL, R, N1, FIA-HI1 (X3), FIBpkpN3, I2, ColE
	bla _{KPC-4}	N1
	bla _{KPC-5}	X5
NDM	bla _{NDM-1}	A/C2(R), FIIK, X3, N2, ColE, FIBpkpN3
	bla _{NDM-7}	X3
OXA	bla _{OXA-48}	L
	bla _{OXA-181}	X3
VIM	bla _{VIM-1}	N1(R)
IMP	bla _{IMP}	N1, N3, A/C2
GES	bla _{GES-5}	N
CTX-M	bla _{CTX-M-3}	M, HI2
	bla _{CTX-M-14}	FII
	bla _{CTX-M-15}	FIIk, FIBpkpN3, Rep3, HI1, FII, Y, FII, FIA
	bla _{CTX-M-17}	ColE
	bla _{CTX-M-55}	I1
	bla _{CTX-M-62}	N3
SHV	bla _{SHV-7}	A/C2
	bla _{SHV-12}	N1, L, R, HI2
	bla _{KPC-3} , bla _{SHV-12}	X3
ons	bla _{NDM-1} , bla _{CTX-M-15}	FIIk, FIBpkpQil, HIB-FIB
Associati	bla _{NDM-1} , bla _{CTX-M-24}	N1
	$bla_{NDM-1}, bla_{CTX-M-15},$	HI1, R
	bla bland	ColE
	DIUIMP-8, DIUGES-5	

Tableau 3. Réplicons portant les gènes de résistance aux β -lactamines chez KP (Navon-Venezia *et al.*, 2017).

2. Résistance de *K. pneumoniae* aux aminosides

Les aminosides ont un large spectre antibactérien qui comprend les bactéries à Gram négatif et positif. Elle peut être chromosomique ou à mediation plasmidique.

La résistance chromosomique aux aminosides chez KP touche la perméabilité cellulaire due à des altérations des systèmes de pompe à efflux (AcrAB-TolC et KpnEF) et à la perte de la porine putative, KpnO (Padilla *et al.*, 2010).

La résistance à médiation plasmidique est essentiellement due au groupe de gènes, les ARNr 16S méthyltransférases, conférent à une résistance aux aminosides, en modifiant par méthylation des sites de fixation de l'aminoside à l'ARNr 16S (Skeggs, Thompson et Cundliffe, 1985). Dix gènes ont été décrits *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC* et *rmtD*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG*, *rmtH et npmA* avec prédominance du genre *armA et rmtB* (Wachino et Arakawa, 2012).

3. Résistance de K. pneumoniae aux quinolones

La résistance des entérobactéries aux quinolones de première génération (acide nalidixique, acide pipémidique) et aux fluoroquinolones (péfloxacine, norfloxacine, ofloxacine et ciprofloxacine) est due principalement à des modifications de leur cible: l'ADN gyrase. Cette résistance est croisée entre toutes les quinolones. Elle est progressive par accumulation des effets de mutations chromosomiques successives, l'acide nalidixique sera le premier touché puis la péfloxacine et la norfloxacine, ensuite l'ofloxacine et enfin la ciprofloxacine (Fauchère, 1997).

Dans le cas de la résistance aux quinolones à médiation chromosomique, il y a une diminution de l'afflux de l'antibiotique dans la cellule (Poole, 2004). Cette résistance est due à des mutations chromosomiques dans les cibles de liaison des quinolones, l'ADN gyrase (sous-unités gyrA-gyrB) et la topoisomérase IV (sous-unités parC-parE) donc les mutations touchent les gènes *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE* (Drlica et Zhao, 1997; Nam *et al.*, 2013).

Dans la résistance à médiation plasmidique, l'efflux de quinolones est augmenté avec une diminution de l'interaction du médicament avec la gyrase (topoisomérase IV) (Naeem *et al.*, 2016). La résistance aux quinolones médiés par des gènes nouvellement acquis à localisation plasmidique ont été décrits. Dans l'ordre chronologique de leur description, il s'agit des gènes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC*, *qnrD* et *aac(6')-Ib-cr* (Strahilevitz *et al.*, 2009). Il s'y ajoute *qepA* et *oqxAB* sont aussi des gènes codant pour la pompe à efflux spécifiques qui expulsent les quinolones à partir de la cellule bactérienne, contribuant ainsi à la résistance.

4. Résistance de K. pneumoniae aux tétracyclines

Le gène *tetA* code pour la pompe d'efflux contre les tétracyclines a été enregistrés dans des isolats de KP résistantes à la tétracyclines, la contribution de cette résistance n'est pas encore claire (Ahn *et al.*, 2016). *RarA, RamA, RamR* et *AcrR* interviennent dans la régulation positive de transcription des pompes efflux : AcrAB-TolC et OqxAB (Sekyere *et al.*, 2016).

D'autres gènes sont impliqués dans la résistance à haut niveau mais leurs rôles restent non connus telque l'expression diminuée d'une porine codé par le gène *ompK35* (Branas *et al.*, 2015).

5. Multi-résistance de *K. pneumoniae* (MRKP)

La multi résistance aux antibiotiques c'est une résistance simultanée à plusieurs familles d'antibiotiques. Chez *K. pneumoniae*, MRKP peut englober des combinaisons de gènes de BLSE et/ou de carbapénémases avec des enzymes modifiant les aminosides, ou une association de carbapénémases CTX-M ou NDM avec des méthylases d'ARNr 16S (Krausse *et al.*, 2016).

Ces souches MRKP peuvent être pratiquement résistantes à toutes les classes d'antibiotiques disponibles, ce qui pose un grand défi aux cliniciens en raison des options de traitement disponibles limitées (Fair et Yitzhak, 2014; Nordmann et Poirel, 2014).

Chapitre 4 : Virulence chez *Klebsiella pneumoniae*

KP utilise de nombreuses stratégies pour se développer et se protéger de la réponse immunitaire de l'hôte. Les facteurs de virulence chez *K. pneumoniae* constituent la capsule, qui sont : le lipopolysaccharide (LPS), les sidérophores, et les fimbriae, également connus sous le nom de pilis (Figure 7) (Paczosa et Mecsas, 2016).



Figure 7. Représentation schématique de deux *K. pneumoniae* « classique » et « hypervirulente » (Paczosa et Mecsas, 2016). Illustrant les quatre facteurs de virulence bien caractérisés : capsule, LPS, fimbriae (type 1 et type 3) et sidérophores.

1. Capsule

Pour se protéger contre la réponse immunitaire de l'hôte, KP échappe à la phagocytose grâce à la capsule qui la rend plus difficile à être phagocytée. La capsule est une matrice polysaccharidique qui recouvre la cellule (Domenico *et al.*, 1994).

Les *K. pneumoniae* ont des antigènes K qui sont de polysaccharides capsulaires. L'hypercapsule est associée avec l'hyper virulence et donc la pathogénicité de *K.pneumoniae* (Fang *et al.*, 2004 ; Yu *et al.*, 2006). K1 et K2 sont associés à des souches hypervirulentes qu'on retrouve couramment en communautaire (Paczosa et Mecsas, 2016).

Le locus *cps* est un opéron chromosomique regroupant les gènes: *wzi, wza, wzb, wzc, gnd, wca, cpsB, cpsG* et *galF* (Arakawa *et al.*, 1995 ; Pan *et al.*, 2013). Les gènes *rmpA* et *rmpA2* sont plasmidiques et régulent positivement la transcription des gènes de synthèse de la capsule (*rcsA* et *rcsB*) peut tous augmenter la production de la capsule (Hsu *et al.*, 2011). Les gènes de la mucoviscosité; *rcsA*, *rcsB* et *magA* sont chromosomiques et peuvent augmenter l'épaisseur de la capsule (Yu *et al.*, 2006).

1.1 Rôle de la capsule

La capsule à quatre rôles définis pour la virulence et la défense de K. pneumoniae (Figure 8):

- 1- Empêche la phagocytose et l'opsonophagocytose de la bactérie par les cellules immunitaires ;
- 2- Entrave l'action bactéricide de peptides antimicrobiens tels que les β-défensines humaines
 1 à 3 et la lactoferrine en liant ces molécules à distance de la membrane externe (Llobet *et al.*, 2011);
- 3- Empêche les composants du complément, tels que C3, d'interagir avec la membrane, empêchant ainsi la lyse et l'opsonisation induites par le complément (Merino *et al.*, 1992; Stover *et al.*, 2015);
- 4- Elimine l'activation fulminante de la réponse immunitaire, mesurée par la diminution de la production du « Reactives Oxygen Species» (ROS), d'IL-8, d'IL-6 et de TNF, en aidant à l'activation d'une voie dépendante de la NOD et en protégeant le LPS de la reconnaissance par les récepteurs des cellules immunitaires (Regueiro *et al.*, 2010).



Figure 8. Représentation schématique du rôle de la capsule dans la virulence chez *K. penumoniae* (Paczosa et Mecsas, 2016).

2. Lipopolysaccharides

Le Lipopolysaccharide (LPS) est connu sous le nom d'endotoxine, est un composant majeur et nécessaire du feuillet externe de la membrane cellulaire de toutes les BGN (Figure 9). Bien qu'il existe une variation considérable des structures de LPS parmi les espèces bactériennes, il est typiquement composé d'un antigène O, d'un oligosaccharide central et d'un lipide A. Ces composants sont codés par des gènes dans les groupes de gènes *wb, waa* et *lpx*, respectivement (Merino *et al.*, 1992; Majumdar *et al.*, 2015).

Chez *K. pneumoniae*, il existe neuf sérotypes O principaux dont O1, O2 et O3, sont responsables de près de 80% de toutes les infections. Étonnamment, le nombre de sérotypes O signalés est faible, Les enzymes de biosynthèse de l'antigène O sont codées sur le locus *rfb* (Figure 9) (Merino *et al.*, 1992; Follador *et al.*, 2016).

Les gènes impliqués sont *glf*, *kfoC*, *wbbM*, *wbbN* et *wbbO* ce sont des gènes chromosomiques codant pour des glycosyltranferase proteines. *wzm* et *wzt* sont des gènes chromosomiques qui codent pour ABC transport systèmes transmembranaires (Paczosa et Mecsas, 2016).



Figure 9. Organisation de rfb cluster (Follador et al., 2016).

2.1 Rôles des LPS

Les LPS (antigène O et lipide A) ont quatre rôles principaux (Figure 10) :

- 1- Résistance au complément sérique : les souches qui ont l'antigène O complet « LPS lisse » résistent à la destruction par le complément (Merino *et al.*, 1992).
- 2- Antigène O se lie à C3b par complémentarité médiée, empêchant ainsi la liaison à la membrane de KP et par la suite la formation de pores (Marque *et al.*, 1996).
- 3- Lipide A protège KP contre les peptides antimicrobiens (telque les polymyxines) (Llobet *et al.*, 2015).
- 4- Activation de la réponse inflammatoire par le lipide A (Llobet et al., 2015)..

Le système du complément joue un rôle crucial dans la défense humorale contre les agents pathogènes microbiens (Murphy *et al.*, 2012).



Figure 10. Rôle de lipopolysaccharide dans la virulence de *K. pneumoniae* (Paczosa et Mecsas, 2016).

3. Fimbriae de type 1

Les fimbriae de type I sont les principales structures adhésives, exprimés dans 90% des isolats cliniques et environnementaux de KP. Ils sont considérés comme facteurs de pathogénicité grâce à leurs structures adhésives filamenteuses pour se lier à la membrane des cellules (Struve *et al.*, 2008; Stahlhut *et al.*, 2009).

Les gènes des fimbriae type 1 sont *fimA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G*, *H*, *I* et *K* (Struve *et al.*, 2008; Rosen *et al.*, 2015).

3.1 Rôle de fimbriae type 1

Le rôle est l'adhérence aux surfaces muqueuses ou épithéliales humaines qui se fait en trois étapes :

- Augmentation de lectinophagocytose des macrophages et les neutrophiles par la sous-unité FimH (Stahlhut *et al.*, 2009).
- Invasion des cellules par sous-unités FimA (Struve et al., 2008).
- Formation de biofilm sur les surfaces abiotiques par la sous-unité FimA (Struve *et al.*, 2008) (Figure 11).



Figure 11. Représentation schématique des rôles de fimbriae de type 3 dans la virulence chez *K. pneumoniae* (Paczosa et Mecsas, 2016).

4. Fimbriae de type 3

Les fimbriae de type 3 sont des filaments semblables à des hélices. Les fimbriae de type 3 sont sensibles au mannose et ne lient donc pas le mannose. Les gènes qui code pour les fimbriae de type 3 sont *mrkA; mrkB; mrkC; mrkD; mrkF; mrkH; mrkI; mrkJ*. (Schurtz Sebghati *et al.*, 1998; Tarkkanen *et al.*, 1998; Paczosa et Mecsas, 2016)

4.1 Rôle de fimbriae type 3

La fonction de fimbriae de type 3 au cours de l'infection à KP est la formation de biofilm. Les fimbriae de type 3 sont des structures adhésives en forme d'hélice qui liées KP à la membrane de la cellule a infecté et même des dispositifs médicaux. Ils sont composés principalement de sous-unités MrkA, avec la sous-unité MrkD sur la pointe.

- MrkD se lie à la membrane extra-cellulaire et augmente la production du (ROS) par les neutrophiles.
- MrkA lie des surfaces abiotiques et biotiques c'est-à-dire avant l'utilisation des dispositions médicales et après lorsqu'elle rencontre l'hôte (Figure 12).
- MrkB, -C et -E sont impliqués dans l'assemblage et la régulation de l'expression, tandis que MrkF est impliqué dans la stabilité de surface des fimbriae (Allen *et al*, 1991; Tarkkanen *et al.*, 1998; Jagnow et Clegg, 2003).



Figure 12. Représentation schématique des rôles de fimbriae de type 3 dans la virulence chez *K. pneumoniae* (Paczosa et Mecsas, 2016).

5. Sidérophores et transporteurs du fer

Pendant l'infection KP a besoin du fer, qui est un élément indispensable pour qu'elle puisse être invasive et doit être puisé de l'hôte. Cependant pendant la réponse immunitaire non spécifique, l'hôte le séquestre pour restreindre la croissance des pathogènes. Pour contourner ce problème KP produit les sidérophores et les transporteurs du fer (Bullen *et al.*, 1972; Carniel, 2001; Miethke et Marahiel, 2007).

5.1 Sidérophores

Les sidérophores, qui sont des molécules qui possèdent une plus grande affinité pour le fer que les protéines de transport de l'hôte ou le piéger dans l'environnement (Brock *et al.*, 1991; Perry *et al.*, 1999). KP codent plusieurs sidérophores : les entérobactine, les yersiniabactine, la salmochéline et l'aérobactine (Paczosa et Mecsas, 2016).

5.1.1 Entérobactines

L'expression des entérobactines est omniprésente chez les KP classiques et hypervirulentes. Ce sont des sidérophores, catécholates, prototypiques et ils ont la plus haute affinité pour le fer de toutes les siderophores (El Fertas-Aissani *et al.*, 2013).

Lors de l'inflammation, les mammifères (hôtes) produisent de la lipocaline-2 qui lie l'entérobactine pour former le complexe lipocaline-2/entérobactine empêchant ainsi la recapture par les récepteurs FepA sur la paroi de KP (Figure 13). Les entérobactines aident à la colonisation et à la dissémination de l'infection (Fischbach *et al.*, 2006).

Les gènes chromosomiques, *entA*, *B*, *C*, *D*, *E* et *F* codent les entérobactines et les gènes *fepB*, *C*, *D* et *G* codent les protéines de son transport. *fepA* codant pour son récepteur (Lai *et al.*, 2001; Lawlor *et al.*, 2007; Hsieh *et al.*, 2008; Müller *et al.*, 2009).

5.1.2 Salmochélines

La salmochéline est une forme glucosylée de l'entérobactine. Cette modification est effectuée par des gènes trouvés sur le chromosome ou un plasmide dans le groupe de gènes *iroB*, *C*, *D et E*. Le transport de la forme chargée en fer est médié par IroN. Cette modification empêche la liaison de la salmochéline par la lipocaline-2, empêchant ainsi la neutralisation des sidérophores et l'induction de l'inflammation par la lipocaline-2. Il est un déclencheur majeur de l'inflammation et de la dissémination bactérienne induite lors de l'infection à KP (Figure 13) (Hantke *et al.*, 2003; Fischbach *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2009).

5.1.3 Yérsiniabactines

Le yérsiniabactine est un sidérophore structurellement distincte de l'entérobactine et de la salmochéline et le facteur de virulence le plus courant associé aux infections pulmonaires humaines à KP (Lawlor *et al.*, 2007).

Contrairement aux entérobactines et les salmochélines, les yersiniabactines ne sont pas inhibés par la lipocaline-2 mais leurs fonctions sont réduites en présence de la molécule hôte transferrine (Figure 13) (Bachman *et al.*, 2011; Paczosa et Mecsas, 2016).

Les protéines nécessaires à la synthèse de la versiniabactine sont codées par les gènes *irp*, et il est prédit que les transporteurs nécessaires à la sécrétion de ce sidérophore sont codés par les gènes *ybt* et *fyu*, et le récepteur de capture est codé par *ybtQ* (Bach *et al.*, 2000; Lawlor *et al.*, 2007; Hsieh *et al.*, 2008).

5.1.4 Aérobactines

L'aérobactine est le sidérophore le plus commun sécrété par des KP hypervirulentes et associé à l'hypercapsulation. La fonction d'aérobactine sidérophorique est nécessaire pour réussir une infection par KP hypervirulente dans les infections (Figure 13) (Vernet *et al.*, 1995; Miethke et Marahiel, 2007; Yu *et al.*, 2008).

Aérobactine cluster de gènes ; *iucA, B, C et D*, avec le transporteur d'aérobactine *iutA* sont transportés sur le même plasmide de virulence portant le gène *rmpA* responsable du phénotype mucoide (Nassif et Sansonetti, 1986; Hsieh *et al.*, 2008; Russo *et al.*, 2014).



Figure 13. Représentation schématique du rôle des sidérophores dans la virulence chez *K pneumoniae* (Paczosa et Mecsas, 2016).

5.2 Transporteurs du fer

Chez KP, le système de transport du fer est impliqué dans son acquisition. Le système est codé par un groupe de gènes *KfuA*, *B et C* (Fang *et al.*, 2007; Hsieh *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2013).

6. Autres facteurs de virulence

De nouveaux facteurs de virulence ont été identifiés. Ces facteurs comprennent les OMPs, pompes à efflux et les gènes impliqués dans le métabolisme de l'allantoïne.

6.1 Outer Membrane Proteins (OMPs)

Les OMPs sont importantes pour la virulence de KP.

La lipoprotéine associée au peptidoglycane (Pal), la lipoprotéine muréine (LppA) et la protéine de la membrane externe A (OmpA) sont des protéines de la membrane externe (OMPs) dominantes sont importantes pour la virulence de KP, s'y ajoute les porines.

- Les lipoprotéines Pal et LppA, jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité de l'enveloppe cellulaire et à l'imperméabilité sélective de la membrane cellulaire d'une manière indépendante des LPS et de la capsule, offrant à KP un pouvoir contre les détergents anioniques et certains antibiotiques (Hsieh *et al.*, 2013; Paczosa et Mecsas, 2016).
- OmpA favorise la virulence de KP en jouant un rôle contre la réponse immunitaire innée de l'hôte (Jeannin *et al.*, 2002; Gosset *et al.*, 2003).
- Les porines servent comme canal permettant l'entrée d'antibiotiques dans les bactéries. OmpK35 et OmpK36 sont des porines qui sont souvent mal ou pas exprimées dans les souches de *K. pneumoniae* résistantes aux antibiotiques donc c'est leurs pertes qui rendent la bactérie résistante aux antibiotiques (Hernández-Allés *et al.*, 2000).

6.2 **Pompes d'efflux**

AcrA et *B* est une pompe d'efflux qui a été impliquée à la fois dans la virulence et dans la résistance aux antibiotiques chez KP, leurs fonctions sont probablement médiées par l'exportation de molécules hôtes nuisibles ou d'antibiotiques hors de la cellule bactérienne (Padilla *et al.*, 2010; Bialek-Davenet *et al.*, 2015).

6.3 Métabolisme de l'allantoïne, facteurs de nutrition

Le métabolisme de l'allantoïne est une méthode par laquelle les bactéries peuvent obtenir du carbone et de l'azote de leur environnement. L'allantoïne est un intermédiaire métabolique de la dégradation des purines par divers organismes et c'est une source d'azote et source de carbone chez KP. Le rôle du métabolisme de l'allantoïne est de fournir une source d'azote pour augmenter la virulence de KP. Le groupe de gènes impliqué de ce métabolisme est : *allA, B, C, D, R* et *S* (Figure 14) (Chou *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2008).



Figure 14. Carte métabolique de la voie de dégradation de l'allantoïne (Cusa et al., 1999).

Chapitre 5 : Système de défense immunitaire chez *Klebsiella pneumoniae*.

Un système de défense immunitaire a été découvert chez les archées contre les autres microorganismes. Il est présenté sous forme de séquences de Clustered, Regularly Interspaced Short Palindromic Regions (CRISPR) arrays. Chez les procaryotes, prés de 47 % des bactéries et 80 % des archées portent des CRISPR-Cas systèmes dans leurs génomes (McDonald *et al.*, 2019).

Le système CRISPR-Cas fait l'objet de plusieurs travaux de recherche comme traitement contre le cancer, les maladies génétiques et comme substitution aux antibiotiques et donc une avancées pour la pharmacogénétique.

1. Organisation de CRISPR locus chez les procaryotes

Les séquences d'un system CRISPR-Cas actif dans les génomes procaryotes sont abondantes et variables. Ils comprennent le locus CRISPR non codant (array), contenant des séquences répétées et identiques (direct repeats) en alternance avec séquences uniques (spacers), accompagné de deux déterminants: les gènes *cas* et la séquence leader (Figure 15) (Szczepankowska, 2012). Par ailleurs, les spacers ont des motifs conservés de trois nucléotides aux extrémités 5' ou 3' appelées Protospacers Adjacent Motifs (PAM)(Aklujkar et Lovley, 2010).



Figure 15. Organisation caractéristique d'un locus CRISPR (Szczepankowska, 2012).

2. Système CRISPR-Cas chez KP

Deux soustypes du système CRISPR-Cas ont été détectés chez KP ; I-E et I-E* (Figure 16), qui sont chromosomiques (Shen *et al.*, 2017).

Le soustype I-E est compris dans la région iap - cysH et le sousbype I-E* a en aval du système de transport ABC et en amont du gène de la glyoxalase (Shen *et al.*, 2017; Mackow *et al.*, 2019).

L'opéron *cas* pour les deux soustypes sont les mêmes huit gènes *cas* à la différence de l'emplacement relatif du gène *cas6*, qui s'est déplacé de l'aval de *cas7–cas5* vers l'amont (Figure 16). I-E a un seul locus alors que I-E* a deux loci de part et d'autre de l'opéron *cas* (Shen *et al.*, 2017).

Chaque locus a son propre leader qui vient juste avant le premier DR. Le leader est une séquence promotrice (entre 20 à 500 pb) qui initie et régule la transcription du locus. Comme chez tous les procaryotes, le promoteur une boite TATA (-10) et une boite BRE (-50).

Chez KP, les DRs forment une structure en boucle car elles ont une séquence semi palindromique (voir figure) et constitue le soit. Par ailleurs, les spacers codent pour l'ADN étranger tel que les phages, plasmides et les chromosomes pour reconnaitre le non soit et déclencher une réaction immunitaire (Shen *et al.*, 2017).

Chez *Klebsiella pneumoniae*, les PAMs sont à l'extrimité 5': 5'-AAG-3' ou 5'-ATG-3' pour le sous-type I-E et 5'-NAA-3' pour le sous-type I-E* (Shen *et al.*, 2017).



Figure 16. Architecture des locus et organisation des gènes des systèmes CRISPR et les différents DRs et leurs structures secondaires chez KP. Les losanges blancs représentent les locus CRISPR, et les flèches bleues représentent le gène *cas* sauf *cas6* (flèches rouges). Les flèches grises et noires représentent les gènes en amont et en aval des loci CRISPR, respectivement. Les flèches jaunes représentent les transpositions (Shen *et al.*, 2017)..

Chapitre 6 : Epidémiologie moléculaire de *Klebsiella pneumoniae*

Il s'agit de l'épidemiologie moléculaire des gènes de la résistance aux antibiotiques : les β -lactamines, les aminosides, les quinolones... etc. La résistance de *K. pneumoniae* est un probleme de santé publique partout dans le monde et dans les pays du tièrs monde telque Algérie.

1. Épidémiologie moléculaire des β-lactamases chez KP dans le monde

Epidémiologie moléculaire β -lactamases chez *Klebsiella pneumoniae* dans le monde est basée sur plusieurs articles scientifiques publiés entre 2000 et 2018.

KP est très diversifiée et dans certains cas, des souches résistantes semblent s'être répandues dans tous les pays au fil du temps. De plus, certaines souches ont acquis indépendamment des gènes de résistance aux antibiotiques, probablement en réponse à un antibiotique (Moradigaravand *et al.*, 2017).

Le spèctre des infections et l'épidémiologie de KP ont radicalement changé à partir des années 1970, lorsque ce micro-organisme a été identifié en milieu hospitalier. En plus de l'efficacité de colonisation considérable, la résistance aux antimicrobiens a permis à KP de se propager rapidement dans les établissements de soins de santé (Tzouvelekis *et al.*, 2012). La fréquence de l'association de la bactérie avec les cas d'infections hospitalières, ainsi que les taux de mortalité élevés dus à KP justifient la surveillance dans les milieux hospitaliers (Landman *et al.*, 2007). Les données d'une enquête publiée en 2005 ont montré que le nombre de souches positives BLSE augmente dans le monde de 30% à 60% des souches de *Klebsiella* (Paterson et Bonomo, 2005).

1.1 Europe

Le gène $bla_{CTX-M-15}$ est majoritairement présent sur le continent européen (da Silva *et al.*, 2019). L'origine du gène $bla_{CTX-M-15}$ identifié chez KP au Portugal puis en France chez les clones ST336 et ST11, respectivement (Rodrigues *et al.*, 2014; Jayol *et al.*, 2016). Dans un hôpital portugais, l'augmentation de l'incidence du CTX-M-15 et SHV et de plusieurs autres types de BLSE sont associées à l'augmentation des clones épidémiques MDR-KP. bla_{OXA-48} et $bla_{CTX-M-15}$ étaient responsables d'une épidémie majeure impliquant 44 patients dans un hôpital de Madrid, Espagne, 2009 à 2014 (Tableau 4) (Rodrigues *et al.*, 2014; Branas *et al.*, 2015).

Au Royaume-Uni et en Suède, ST14 était le type le plus fréquemment observé et les seuls gènes de résistance identifiés étaient de type NDM, avec bla_{NDM-I} ; le ST231 était le type le plus courant avec ST147 et ST273 au Royaume-Uni. En Suède, les isolats appartenaient à quatres STs

differents, car ils étaient importés de diverses régions du monde telles que l'Inde et l'Irak (Woodford *et al.*, 2008; Giske *et al.*, 2012)..

L'Espagne avait le plus grand nombre de gènes différents (un total de 15 gènes) a été identifié, ce qui montre la diversité génétique en relation avec l'apparition de KP avec résistance aux antibiotiques β -lactames (Tableau 4). Cette caractéristique, du point de vue thérapeutique de l'infection, est un facteur difficile, étant donné que la variation des gènes de résistance diminue les options de traitement antimicrobien (da Silva *et al.*, 2019). Le pays où la diversité génétique était la plus faible était la Grèce, où le seul gène isolé était *bla_{KPC-2}* dans deux cas d'épidémie. Considérant que les foyers étaient d'origine monoclonale et qu'il n'y avait pas d'identification d'une source commune ou d'un réservoir environnemental, le principal mécanisme de dissémination du *bla_{KPC-2}* dans ces cas était la transmission de patient à patient (Maltezou *et al.*, 2009; Souli *et al.*, 2010). La plus petite diversité génétique peut être liée à un faible nombre de publications en Grèce (Tableau 4).

1.2 Asie et Océanie

Un total de 41 types de gènes de résistance différents a été identifié dans la littérature. Parmi ceux-ci, la plus grande diversité s'est produite en Chine, où 14 des 41 gènes ont été décrits, ce qui correspond à 41% du total des gènes apparentés dans le tableau 4. La variété des gènes en Chine peut être justifiée par sa forte densité de population, associée à des migrations intenses (da Silva *et al.*, 2019). La Turquie a également une grande diversité de gènes (11 gènes) et de l'Iran (10 gènes). La plus faible variété de gènes de résistance aux β -lactamines s'est produite au Pakistan (2 gènes) (tableau 4) (da Silva *et al.*, 2019).

Dans la plupart des pays d'Asie et d'Océanie, le gène bla_{CTX-M} , en particulier $bla_{CTX-M-15}$, a été détecté chez KP. La β -lactamase CTX-M-15, détectée pour la première fois en 1999 en Inde, est actuellement reconnue comme la β -lactamase CTX-M la plus largement distribuée au monde (Tableau 4) (Feizabadi *et al.*, 2010; Castanheira *et al.*, 2011; Ginn *et al.*, 2014; Tokajian *et al.*, 2015; da Silva *et al.*, 2019)..

Malgré la moindre diversité, les gènes identifiés au Pakistan, bla_{KPC} et bla_{NDM-1} , sont d'une grande importance pour le suivi du contrôle de résistance microbienne (Sattar *et al.*, 2016). La première identification du gène bla_{OXA-48} dans un isolat de KP a eu lieu en Turquie, isolée en 2001, (Tableau 4) (Poirel *et al.*, 2004).

1.3 Amérique

La plus grande diversité de gènes de résistance aux β -lactamines s'est produite au Brésil, où 12 des 25 types différents de gènes identifiés sur le continent ont été signalés, représentant 48% du total des gènes présents sur ce continent (Tableau 4). Deuxièmement, dans la diversité des gènes de résistance, les États-Unis d'Amérique (USA) ont présenté 10 des 25 gènes identifiés; suivi du Canada (9 gènes différents) et de l'Argentine (6 gènes différents). La plus faible diversité de gènes de résistance est observée au Mexique (3 gènes différents). La plus petite variété de gènes au Mexique peut être justifiée par le faible nombre de publications sur le sujet dans ce pays (Tableau 4) (da Silva *et al.*, 2019).

Parmi les gènes de résistance identifiés sur le continent américain, $bla_{CTX-M-2}$, bla_{SHV-1} , bla_{SHV-5} et bla_{SHV-2} ont été isolés de KP dans 60% des pays américains répertoriés dans cette étude. Les gènes $bla_{CTX-M-15}$, $bla_{CTX-M-1}$, bla_{SHV-11} , bla_{SHV-12} , bla_{TEM-1} , bla_{TEM-10} et bla_{KPC-2} étaient les deuxièmes plus fréquents dans les Amériques, étant trouvés dans 40% des cas (Tableau 4) (da Silva *et al.*, 2019). TEM-10 est le plus fréquemment détecté dans les isolats de KP, étant trouvé aux États-Unis et en Argentine, le premier rapport a été en Argentine en 2003 (Paterson *et al.*, 2003). Au Brésil, le premier cas signalé de KPC était en 2009 (Tableau 4) (Peirano *et al.*, 2009).

1.4 Afrique

Les données de la littérature ont rapporté le problème des BLSE produites par *K. pneumoniae* en Afrique sont rares, en particulier en Afrique subsaharienne (Blomberg *et al.*, 2005). La présence de KP présentant le gène de résistance bla_{NDM-1} a été identifiée au Kenya et en Afrique du Sud (Poirel *et al.*, 2011; Brink *et al.*, 2012). En plus de la NDM-1 β -lactamase, d'autres gènes de résistance ont été identifiés en Afrique du Sud, à savoir: bla_{SHV-5} , bla_{SHV-2} , bla_{TEM-10} , bla_{TEM12} , $bla_{CTX-M-2}$ et bla_{KPC-2} . En 2012, le gène $bla_{CTX-M-2}$ a été identifié en Afrique du Sud (tableau 4) (Paterson *et al.*, 2003; Brink *et al.*, 2012).

Le pays	Gènes	Références			
Europe					
France	bla _{CTX-M-15} , bla _{CTX-M-1} , bla _{SHV-5} , bla _{SHV-2} , bla _{SHV-12} , bla _{TEM-3} , bla _{CMY-2} , bla _{OXA-48} .	Denomials of al. 2012			
Italie	bla _{CTX-M-15} , bla _{CTX-M-2} , bla _{CTX-M-1} , bla _{TEM-3} , bla _{SHV-5} .	– Baraniak <i>et al.</i> , 2013			
Espagne	bla _{CTX-M-15} , bla _{CTX-M-1} , bla _{CTX-M-3} , bla _{CTX-M-9} , bla _{CTX-M-10} , bla _{SHV-2} , bla _{SHV-2a} , bla _{SHV-5} , bla _{SHV-12} , bla _{DHA-1} , bla _{TEM-3} , bla _{TEM-4} , bla _{TEM-25} , bla _{TEM-133} , bla _{OXA-48} , bla _{VIM-1} .	Hernández <i>et al.</i> , 2005; Baraniak <i>et al.</i> , 2013; Branas <i>et al.</i> , 2015			
Grèce	bla _{KPC-2} .	Maltezou <i>et al.</i> , 2009; Souli <i>et al.</i> , 2010; Van Der Bij et Pitout, 2012			
Royaume-Uni	bla _{NDM} , bla _{NDM-1} .	Giske <i>et al.</i> , 2012; Jain <i>et al.</i> , 2014			
Portugal	bla _{CTX-M-15} , bla _{SHV-2} , bla _{SHV-12} , bla _{SHV-5} , bla _{SHV-106} , bla _{SHV-28} , bla _{SHV-55} .	Rodrigues et al., 2014			
Suède	bla _{KPC} , bla _{NDM-1} .	Giske et al., 2012			
Asie et oceanie					
Singapour	bla _{CTX-M-1} , bla _{CTX-M-9} , bla _{SHV-5} , bla _{SHV-12} , bla _{TEM-3} , bla _{CMY-2} , bla _{DHA} .	Ginn et al., 2014			
Australie	bla _{CTX-M-3} , bla _{SHV-2} , bla _{TEM-1B} .	Paterson et al., 2003			
Turquie	bla _{CTX-M-15} , bla _{CTX-M-2} , bla _{SHV-5} , bla _{SHV-2} , bla _{SHV-12} , bla _{TEM-1B} , bla _{TEM-1} , bla _{TEM-2} , bla _{OXA-1} , bla _{OXA-9} , bla _{OXA-48} .	Paterson <i>et al.</i> , 2003; Bali, Açık et Sultan, 2010; Carrër <i>et al.</i> , 2010			
Taiwan	bla _{CTX-M-15} , bla _{CTX-M-3} , bla _{CTX-M-14} , bla _{TEM-31} , bla _{SHV-1} , bla _{SHV-11} , bla _{SHV-12} .	Ma et al., 2009			
Iran	bla _{CTX-M-15} , bla _{SHV-1} , bla _{SHV-12} , bla _{SHV-31} , bla _{TEM-1} , bla _{TEM-79} , bla _{PER} .	Feizabadi <i>et al.</i> , 2010; Nasehi <i>et al.</i> , 2010			
Liban	bla _{CTX-M-15} , bla _{SHV-11} , bla _{TEM-1B} , bla _{OXA-1} .	Tokajian et al., 2015			
Pakistan	bla _{KPC-2} , bla _{NDM-1} .	Sattar et al., 2016			
Chine	bla _{CTX-M-15} , bla _{CTX-M-1} , bla _{CTX-M-9} , bla _{SHV-5} , bla _{SHV-12} , bla _{TEM-1B} , bla _{TEM-1} , bla _{TEM-2} , bla _{OXA-10} , bla _{KPC-2} , bla _{IMP-4} , bla _{NDM-1} , bla _{DHA} , bla _{CMY-2} .	Qi et al., 2011; Giske et al., 2012; Ginn et al., 2014			
Inde	bla_{NDM-1} , $bla_{OXA-181}$, bla_{VIM-5} .	Castanheira et al., 2011			

Tableau 4. Épidémiologie moléculaire des β-lactamases dans le monde chez KP d'après Yone da Silva *et al.*, (2019).
		1
Le pays	Gènes	Références
Amérique		
Argentine	bla _{CTX-M-2} , bla _{TEM-10} , bla _{TEM-12} , bla _{SHV-2} , bla _{SHV-5} , bla _{KPC-2} .	Paterson <i>et al.</i> , 2003; Pasteran <i>et al.</i> , 2008
Brésil	bla _{CTX-M-15} , bla _{CTX-M-1} , bla _{CTX-M-1} , bla _{CTX-M-2} , bla _{CTX-M-8} , bla _{TEM-31} , bla _{SHV-1} , bla _{SHV-11} , bla _{SHV-12} , bla _{SHV-31} , bla _{SHV-31} , bla _{SHV-31} , bla _{SHV-31} , bla _{SHV-2} , bla _{OXA-9} .	Peirano <i>et al.</i> , 2009; Tollentino <i>et al.</i> , 2011; Polyana <i>et al.</i> , 2013; Andrade <i>et al.</i> , 2014
Canada	$bla_{CTX-M-15}$, $bla_{CTX-M-2}$, $bla_{CTX-M-3}$, $bla_{CTX-M-14}$, bla_{TEM-1} , bla_{SHV-1} , bla_{SHV-2} , bla_{SHV-11} , bla_{OXA-1} .	Denisuik et al., 2013
Mexique	bla _{SHV-1} , bla _{SHV-2} , bla _{SHV-5} .	Miranda et al., 2004
Etats unis	bla _{CTX-M-1} , bla _{CTX-M-9} , bla _{TEM-10} , bla _{SHV-5} , bla _{SHV-12} , bla _{OXA-10} , bla _{OXA-48} , bla _{OXA-181} .	Mathers <i>et al.</i> , 2013; Ginn <i>et al.</i> , 2014
Afrique		
Kenya	bla _{NDM-1} .	Poirel et al., 2011
Afrique du sud	bla _{CTX-M-2} , bla _{TEM-10} , bla _{TEM-12} , bla _{SHV-5} , bla _{SHV-2} , bla _{NDM-1} , bla _{KPC-2} .	Paterson <i>et al.</i> , 2003; Brink <i>et al.</i> , 2012
Tanzanie	<i>bla_{CTX-M-15}, bla_{SHV-11}, bla_{TEM-104}, bla_{TEM-176}.</i>	Mshana et al., 2013

2. Épidémiologie moléculaire de la résistance aux aminosides chez KP

Les gènes de résistance à médiation plasmidique de toutes les classes, les familles de gènes *aac*, *aad* et *aph*, ont été identifiés chez KP. La famille des 16S rRNA MethylTransferases (RMTs) à médiation plasmidique connues c'est le groupe de gènes *rmtA* à *H*), et le gène *armA* (Navon-Venezia, Kondratyeva et Carattoli, 2017). En Asie, les gènes *armA* et *rmtB* sont le plus souvent retrouvés chez *Klebsiella pneumoniae* (Ma *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2010). *armA* est retrouvé souvent sur le même plasmide qui porte le gène de résistance aux carbapènemes (KPC) en Italie, chine, Pologne et en Iran (Zacharczuk *et al.*, 2011; Frasson *et al.*, 2012; Saadatian Farivar *et al.*, 2018).

3. Épidémiologie moléculaire de la résistance aux quinolones chez KP

La résistance chromosomique de KP aux quinolones est probablement les mutations de *gyrA* et *parC* sont plus fréquentes que *gyrB* et *parE* (Nam *et al.*, 2013).

La résistance aux quinolones est due à des gènes plasmidiques. En premier, le plus répandu géne de résistance retrouvé chez KP est *aac(6')-Ib-cr*, suivi par le groupe de gènes *qnr's* (Eftekhar et Seyedpour, 2015). Le variant de *aac(6')-Ib, aac(6')-Ib-cr* est retrouvé partout dans le monde (Pasom *et al.*, 2013; Silva-Sánchez *et al.*, 2013; Tokajian *et al.*, 2015; Venkataramana Geetha *et al.*, 2020).

Les gènes *qnr* les plus décrits sont *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* dans le monde entier, leurs distribitions géographifique et leurs prévalences sont diversent (Alshammari et Ali Al-Skhattat, 2015). La découverte du gène *qnrA* était décrit chez une souche de KP au etats unis en 1994 et depuis *qnrA* est retrouvé partout dans le monde sauf aux pays de l'Amerique du sud chez les entérobactéries (Martinez-Martinez *et al.*, 1998; Robicsek *et al.*, 2006).

Par ailleurs, depuis les années 2000, le gène *qnrB* est associé au genre *klebsiella* et à KP en paticulier dans différentes régions du monde telque à l'excpetion de la Thailande où le *qnrS* est plus prévalent (Karah *et al.*, 2010; Pasom *et al.*, 2013; Silva-Sánchez *et al.*, 2013; Machuca *et al.*, 2014; Tokajian *et al.*, 2015) et en Portugal où une étude recente à rapporté seulement *qnr* (Carvalho *et al.*, 2021). Lors de cette dernière décénie, des etudes ont rapporté *qnrS* et en faible prévalence que *qnrB* chez *Klebsiella pneumoniae* dans differents pays de l'Asie (Wang *et al.*, 2008; Al-Marzooq *et al.*, 2014; Izadi *et al.*, 2017; Venkataramana *et al.*, 2020).

Un effet intéressant concernat l'évolution des gènes de résistance qnr's dans le temps. En Inde, en 2012, les gènes qnrB et qnrA étaient retrouvés avec une dominace de qnrB mais en 2020 une étude a rapporté la présence de qnrB et qnrS et pas qnrA (Tripathi *et al.*, 2012; Venkataramana *et al.*, 2020).

Chez *Klebsiella pneumoniae*, *qepA* est peu commun des PMQR mais des études récentes ont rapporté sa présence en Iraq et en Iran (Khoshnood *et al.*, 2020; Kareem *et al.*, 2021).

4. Épidémiologie moléculaire de la résistance à la polymyxine chez KP

Le premier isolat clinique de *Klebsiella aerogenesa* résistant à la colistine (maintenant classé comme KP) a été isolé au cours de la première période d'utilisation (Davis, Lilly et Lowbury, 1969). La première flambée hospitalière de MDR-KP résistantes à la colistine a été signalée en 2004 en Grèce et depuis lors, un nombre croissant de rapports sur la récupération de souches résistantes à la colistine ont émergé du milieu clinique (Antoniadou *et al.*, 2007). Dans un récent programme de surveillance mondiale, Bradford et *al.* (2016) ont rapporté que bien que les taux de résistance à la colistine, parmi les bactéries produisant des carbapènemases étaient de 12%, KP représentait 95% de tous ces isolats.

Des taux élevés de résistance à la colistine (jusqu'à 36%) ont été trouvés chez KP résistants aux carbapénèmes dans des zones d'endémie comme l'Italie, liés à une mortalité plus élevée (Capone *et al.*, 2012). La description des isolats porteurs de *mcr-1* vient tout juste de commencer, mais la propagation de ce gène est déjà considérée comme une menace sérieuse (Karaiskos *et al.*, 2017).

5. Épidémiologie moléculaire de la résistance à la tétracycline chez KP

Les gènes *tetA* codant pour la pompe d'efflux contre les tétracyclines ont été enregistrés dans des isolats de KP résistantes à la tétracyclines, la contribution de cette résistance n'est pas encore claire, il était décrit en Chine et en Portugal (Morita *et al.*, 2018; Carvalho *et al.*, 2021). *RarA, RamA, RamR* et *AcrR* interviennent dans la régulation positive de transcription des pompes efflux : AcrAB-TolC et OqxAB (Sekyere *et al.*, 2016). Une résistance à haut niveau est observée quand il y a une transcription réduite du gène *ompK35* (une porine) (Kä Llman *et al.*, 2008).

6. Épidémiologie moléculaire des gènes de résistance chez KP en Algérie

La caractérisation moléculaire des gènes de résistance en Algérie sur KP est rapportée sur quelques publications concentrées au nord ; le centre et l'est du pays (Touati et Mairi, 2020).

Les gènes de la β -lactamases les plus répandus en Algérie sont $bla_{CTX-M-15}$, $bla_{CTX-M-3}$, bla_{SHV-12} . bla_{OXA-1} .et bla_{TEM-1} . Loucif et *al.*, (2016) ont décrit une épidemie à KP productrice de carbapénemase à l'hopital de Batna, les souches avaient le ST101 et les gènes suivants bla_{OXA-48} , $bla_{CTX-M-15}$, bla_{SHV-1} , et bla_{TEM-1D} . Ils ont trouvé que le gène bla_{OXA-48} est porté sur un plasmide

conjugative IncL/M-type (Tableau 5). Une étude récente a rapporté que parmis les entérobactéries, *Klebsiella pneumoniae* est la plus productrice de carbapènemases en Algérie (Touati et Mairi, 2020).

Concernant les autres types de résistances aux antibiotiques, les gènes trouvés en Algérie sont *aac(6')-Ib-cr, qnrB, armA, aadA1, aadA2, tetA, sul2, dfrA5* et *merA* (Tableau 5).

	1/ 1 / 1	\ 1 / • /	
Tableau 5 Endemidiogie	moleculaire des g	énes de résistance ai	iv antihiotiques en Algèrie
I abicau 5. Epiaciniologic	monecularite des g	ches ut resistance a	an annoionques en mgerie.

Wilaya	Enzymes et gènes de B-lactamases	Gènes de résistance aux quinolones	Gène de résistance	Autres gènes de	Références
vv naya	Lizymes et genes de p- lactamases	Genes de resistance aux quinorones	aminoglycosides	résistance	Kererences
NP	bla _{CTX-M-15}	/	/	/	Touati et al., 2007
NP	bla _{CTX-M-15}	/	/	/	Touati et al., 2012
Alger	bla _{CTX-M-3} , bla _{CTX-M-15}	1	/	/	Messai et al., 2008
NP	bla _{CTX-M-15}	/	/	/	Touati et al., 2010
Alger	bla _{CTX-M-3} , bla _{CTX-M-15} , bla _{SHV-98} , bla _{SHV-99} , bla _{SHV-100}	/	/	/	Ramdani et al., 2011
Tlemcen	bla _{CTX-M-15}	/	1	/	Baba Ahmed <i>et al.</i> , 2012
Annaba	bla _{CTX-M-3} , bla _{CTX-M-15} , bla _{SHV-12} , bla _{DHA-1}	/	1	1	Nedjai et al., 2012
Béjaia	bla _{CTX-M-15} , bla _{CTX-M-3} , bla _{TEM-1} , bla _{OXA-1}	aac(6')-Ib-cr	/	/	Gharout-Sait et al., 2012
Tlemcen	bla _{CTX-M-3} , bla _{CTX-M-15}	aac(3')-II, aac(6')-Ib-cr, qnrB2	1	/	Baba Ahmed <i>et al.</i> , 2013
NP	$bla_{CTX-M-15}$, bla_{SHV-11} , bla_{SHV-12} , $bla_{SHV-110}$, bla_{OXA-23} , bla_{OXA-24} , bla_{NDM-1}	/	1	1	Berrazeg et al., 2013
Annaba	$bla_{CTX-M-15}$, bla_{TEM-1} , bla_{SHV-1a} , bla_{SHV-2a} , bla_{SHV-12} , bla_{SHV-32} , bla_{SHV-33} , $bla_{SHV-133}$	qnrB42	armA, aadA1 aadA2	/	Belbel et al., 2014
Laghouat	<i>bla</i> _{CTX-M-15} DHA1	/	/	1	Bonnet <i>et al.</i> , 2014
Alger	VIM19	/	/	1	Robin <i>et al.</i> , 2010
Alger	CTXM-15 et OXA-1	aac(6')Ib-cr	aac(3)II	tetA, sul2, dfrA5, merA	Lynda Anssour <i>et al.</i> , 2015
Batna	bla _{CTX-M-15} , bla _{OXA-48} , bla _{SHV-1} , bla _{TEM-1D}	/	/	/	Loucif et al., 2016

NP : non précisé.

Chapitre 7 : Génomique et phylogénétique

Le séquençage permet de déterminer la succession des bases nucléotidiques de l'ADN ; il a révolutionné la recherche scientifique. Sanger *et al.*, (1997) séquençaient le premier génome d'un virus bactérien par synthèse enzymatique. Depuis lors, des améliorations techniques considérables ont permis l'émergence de nouvelles technologies de séquençage (NTS) dites «à haut débit» (Tableau 6). Ces NTS ont massivement accéléré la vitesse de séquençage et ont simultanément réduit son coût. L'utilisation des séquenceurs à haut débit a conduit à une augmentation exponentielle du nombre de génomes bactériens séquencés (Diene *et al.*, 2014).

Tableau 6. Tableau comparatif de différent	es technologies de séquençage à haut débit
(Diene <i>et al.</i> , 2014).	

	Sanger	Roche		Illumina		Life Technologies		Pacific Biosciences
	Sanger	454 Junior Titanium	454 GS FLX+	MiSeq	HiSeq 2000/2500	Ion torrent PGM	5500x1 SOLiD	PacBIO RS
Sortie	1977	20	05	2006				2010
Méthode			Sy	nthèse			Ligation	SMRT
Reads	1.1 Kb	400 pb	700 pb	300 pb	150 pb	400 pb	2*60 pb	5 à 20 Kb
Durée	3 h	10 h	23 h	27 h	11 J	4 h	6 J	2 J
Cout par Mpb	2400 \$	20 \$	10 \$	0.26 \$	0.07 \$	0.5 \$	0.13 \$	0.14 \$

SMRT: Single molecule real time sequencing. Pb: paire de base, Kb: kilo base, h: heures et J: jours.

La phylogénie moléculaire a pour but de reconstruire les relations de parenté entre des séquences de nucléotides ou d'acides aminés ; on peut ainsi étudier les relations de parenté entre les espèces qui les portent mais, aussi, l'évolution du génome. Comme l'a si bien exprimé Dobzhansky (1900-1975), « rien n'a de sens en biologie, si ce n'est à la lumière de l'évolution» (Lopez, Casane et Philippe, 2002).

1. Séquençage du génome complet « Whole genome sequencing »

La génomique bactérienne, permettant l'étude des génomes bactériens (leur structure, leur évolution, la fonction des gènes codés et leur régulation), est principalement basée sur l'isolement et la culture d'une bactérie donnée. L'obtention d'une culture pure est une étape essentielle pour relier le phénotype particulier d'une souche bactérienne à son contenu en gènes, notamment pour étudier spécifiquement sa virulence, sa pathogénicité ou sa résistance. Comme illustré dans la figure 17, le séquençage du génome complet d'une bactérie s'effectue en quatre étapes principales :

- a. Extraction de l'ADN génomique, soit à partir d'une culture bactérienne pure, soit directement à partir d'un échantillon;
- b. Séquençage de l'ADN avec ou sans amplification préalable ;
- c. Assemblage bio-informatique du ou des génomes séquencés ;
- d. Analyse des séquences obtenues (Figure 18) (Diene et al., 2014).





NTS : nouvelles technologies de séquençage.

2. Méthodes de construction des arbres phylogénétiques

La construction des arbres phylogénétiques moléculaires utilise deux groupes de méthodes; les méthodes fondées sur les caractères et les méthodes fondées sur les distances.

2.1 Les méthodes fondées sur les caractères

Les méthodes fondées sur les caractères sont le maximum de parcimonie (MP) (Farris, 1970; Fitch, 1971) et la vraisemblance « Maximum Likelihood » (ML) (Felsenstein, 1981). Elles se basent toutes les deux sur le nombre de mutations (substitutions, insertions et délétions) qui affectent chacune des séquences étudiées (Hasegawa et Fujiwara, 1993).

2.2 Les méthodes fondées sur les distances

Les méthodes fondées sur les distances se basent sur la mesure des distances entre les séquences, c'est à dire le nombre de substitutions de nucléotides ou d'acides aminés entre chaque paire de séquences. Elles peuvent reconstruire des arbres enracinés ou non-enracinés. Pour ces méthodes, plus la ressemblance entre deux unités est importante, plus leurs liens de parenté sont étroits. Parmi ces méthodes, on distingue :

2.2.1 La méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)

La méthode UPGMA de Sokal et Michener (Sokal et Michener, 1958), qui, par itérations successives, réduit progressivement la taille de la matrice fournissant l'ensemble des distances entre toutes les paires de séquences, et produit un arbre enraciné (Michaud, 2012).

2.2.2 La méthode Neighbor-Joining

La méthode Neighbor-Joining (NJ) est la plus utilisée ; elle a été développée en 1987 par Saitou et Nei (Saitou et Nei, 1987; Hasegawa et Fujiwara, 1993). Cette méthode à la différence avec la méthode UPGMA, effectue la recherche séquentielle des voisins en minimisant la longueur totale de l'arbre, et produit des arbres non enracinés (Michaud, 2012).



Figure 18. Analyse du génome complet (WGS) (Quainoo et al., 2017).

Les différentes étapes de l'analyse des données WGS sont indiquées en orange (assemblage, caractérisation génomique, génomique comparative et phylogénie). Les outils d'analyse sont regroupés en fonction de l'étape d'analyse qu'ils effectuent et sont séparés par l'interface utilisateur dans les tons de bleu (suites logicielles d'analyse complètes, basées sur le Web et ligne de commande.

3. Applications de la génomique en microbiologie clinique

3.1 Caractérisation génomique

De nouvelles applications des NTS émergent dans le domaine médical telles que : le développement d'outils moléculaires de diagnostic plus performants, l'investigation approfondie d'épidémies, l'étude de la pathogénicité d'une souche bactérienne, ainsi que la détection des facteurs de virulence (virulome) ou des gènes codant pour la résistance aux antibiotiques (résistome). Les approches NTS permettent d'analyser de manière exhaustive le micro-organisme en question et permettra, dans le futur, de fournir ces résultats aussi rapidement que les méthodes conventionnelles. Bien que les téchnologies génomiques évoluent rapidement, leur mise en œuvre généralisée dans les laboratoires de microbiologie clinique et de santé publique est limitée par le besoin de pipelines semi-automatisés efficaces, d'un contrôle de la qualité et d'une interprétation des données normalisés, d'une expertise et d'une infrastructure en bio-informatique (Diene *et al.*, 2014; Quainoo *et al.*, 2017).

3.2 Phylogénétique

La caractérisation du génome et les outils de comparaison peuvent être utilisées pour estimer la phylogénie des isolats pathogènes. Les phylogénies estimées permettent aux cliniciens d'établir des réseaux détaillés de transmission des souches épidémiques entre différents patients et d'informer les protocoles d'isolement des patients appropriés. Les cliniciens voudront savoir :

a) Si les isolats bactériens provenant de différents patients sont-ils presque identiques ou seulement éloignés?

b) Différents isolats pathogènes proviennent-ils du même groupe d'épidémies ou d'événements de transmission distincts?

c) Quel patient héberge la souche source initiale de l'épidémie?

Plusieurs algorithmes de phylogénie qui répondent à ces questions en calculant des estimations de phylogénie via des méthodes bayésiennes ou des méthodes ML sont disponibles (Felsenstein, 1981). Ces algorithmes de phylogénie sont capables de modéliser le signal évolutif mieux que les méthodes de NJ et de MP mais sont moins adaptés à un grand nombre de souches en raison des coûts de calcul (Hasegawa et Fujiwara, 1993; Quainoo *et al.*, 2017). Un certain nombre de modèles de substitution de nucléotides doivent être appliqués pour inférer la phylogénie aussi précisément que possible. Le modèle le plus fréquemment

utilisé est d'utiliser les données nucléotidiques et les Single Nucleotid Polymorphisms (SNPs) (Posada et Crandall, 2001).

3.3 Avantages et limites des technologies WGS en clinique

La téchnologie de séquençage par synthèse Illumina est toujours la solution WGS la plus largement utilisée à ce jour et semble être la mieux adaptée aux protocoles d'épidémie où la haute précision et la fiabilité sont prioritaires. En raison de sa position bien établie sur le marché du séquençage, Illumina a développé une gamme d'instruments qui cherchent à répondre à une variété de demandes et de capacités de séquençage (Quainoo *et al.*, 2017).

Les inconvénients de cette technologie sont les lectures relativement courtes, qui interdisent la résolution des régions à grande répétition / faible complexité, et la possibilité d'extensions de base incomplètes (mise en phase et pré-phasage), qui, ensemble, augmentent les taux d'erreur finaux. Le rendement élevé de la plupart des instruments Illumina augmente en outre la durée totale des analyses, un inconvénient particulièrement important pour l'analyse des pathogènes, où l'acquisition rapide des résultats affecte directement le succès de la lutte contre les épidémies. Enfin, les coûts par exécution relativement élevés des séquenceurs Illumina impliquent que si une exécution de séquençage échoue, elle peut coûter plusieurs milliers de dollars et potentiellement compromettre les budgets du projet (Quainoo *et al.*, 2017).

Eventuellement, Pacific Biosciences fournit une solution WGS avec une vitesse de séquençage élevée et est la mieux adaptée lorsque la confirmation rapide de l'identité d'un pathogène est prioritaire (Loman, Quick et Simpson, 2015). Pour les hôpitaux aux capacités financières et spatiales limitées ou simplement dans des situations où un séquençage rapide est souhaité pour être proche du lit du patient, Oxford « Nanopore Technologies » présente une alternative prometteuse MinION car il est mobile donc plus accessible avec les coûts d'instrument et de consommables les plus bas. MinION est une solution rentable pour les environnements hospitaliers (Magi *et al.*, 2018).

II. Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1 Matériel biologique

Les souches utilisées dans ce travail font partie d'une collection de souches du laboratoire de Bactériologie de l'Etablissement Hospitalier Universitaire d'Oran « EHUO ». Ce laboratoire réalise les analyses bactériologiques de tous les services de cet hôpital. Un total de 219 souches cliniques de *Klebsiella sp.* productrices de BLSE prises au hasard ont fait l'objet de cette étude, (Annexe 9). Ces souches ont été isolées, à partir de différent types de prélèvement (sang, urine, prélèvement distal protégé, cathéter centraux, liquide abdominaux...etc.), entre 2011 et 2012. Le transport des souches en Suède était effectué par le biais de notre université.

2. Méthodes

La partie exeprimentale et analyses de biologie moléculaire ont été faites au laboratoire du Pr. Christian G. Giske, Clinical Microbiology, Karolinska University Hospital Solna, Stockholm, Sweden.

2.1 Identification par spectrométrie de masse

Les 219 souches ont été identifiées par la spectrométrie de masse, basée sur le MALDI-TOF/MS à l'aide du Microflex® (Bruker Daltonics, USA), il s'agit d'une désorption-ionisation laser assistée par matrice (ou MALDI: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization). L'échantillon à analyser est déposé sur une cible et est traité par une matrice appropriée. Après introduction de la cible dans le système, elle est bombardée par un laser. Les ions ainsi générés dans la chambre d'ionisation sont accélérés dans un champ électrique qui les dirige dans un tube de vol vers l'analyseur. Ce dernier permet de séparer et de classer les ions accélérés selon leur temps de vol (TOF : Time-Of-Flight) et de produire un spectre de masse. Le spectre de masse obtenu est une sorte d'empreinte digitale spécifique et unique de la composition en protéines du micro-organisme analysé, qui peut être comparé à une banque de données de spectres.



Figure 19. Etapes de l'identification bactérienne par spectrométrie de masse (MALDI-TOP-MS). (<u>https://www.mdpi.com/2309-608X/5/1/4/htm</u>)

Concernant les étapes d'identification par spectrométrie de masse, une culture de la souche à identifier est préparée sur gélose au sang (Annexe 10), incubée pendant 18h à 37°C. Les souches sont déposées à l'aide d'un objet stérile, sous la forme d'un fin frottis sur les puits successifs, recouvert par 1 μ L de matrice qui est l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (α -CHCA). Après séchage, la plaque est introduite dans l'appareil pour analyse. Un contrôle de qualité BTS constitué d'une souche d'*Escherichia coli* doit être déposé à chaque projet (Figures 19).

Le logiciel BIOTYPER RTC® compare le spectre obtenu avec les spectres de références de la base de données. Le résultat de l'identification apparait sous la forme d'un score de corrélation entre le spectre obtenu et le spectre de référence le plus proche identifié. L'analyse nécessite l'acquisition de 240 spectres minimum pour obtenir un résultat (Figure 19). La lecture des résultats fait intervenir deux paramètres, le score et la couleur (Tableau 7).

Score	Description	Symbole	couleur
3.000 à 2.300	Bonne identification	+++	Vert
2.229 à 2.000	Identification probable de l'espèce	++	Vert
1.999 à 1.700	Identification probable du genre	+	Jaune
1.699 à 0.000	Degré de confiance insuffissant pour l'identification	-	Rouge

Tableau 7. Tableau de l'interprétation des scores de corrélation.

2.2 Mise en évidence des souches carbapénèmases et les gènes de résistance aux carbapénèmes

Le kit de confirmation KPC/MBL et OXA-48 (ROSCO DIAGNOSTICA®, Danemark) a été utilisé selon les recommandations de EUCAST pour la détection des mécanismes de résistance V2.0 (Juillet, 2017) ; les souches qui présentaient un diamètre inférieur de 27 mm avec le méropénème doivent être tésté. Sur la gélose du milieu Mueller-Hinton (MH) qui est préalablement ensemencé de la suspension bactérienne à 0,5 McFarland, les disques sont posés puis icubation pendant 18 heures à 37°C et lecture des résultats selon le manuel.

2.2.1 Identification des gènes carbapenemase avec GeneXpert® Carba-R

Les systèmes GeneXpert sont automatisés ; de la purification des échantillons, amplification à la détection des gènes pour des échantillons simples ou complexes en utilisant la PCR ou la PCR en temps réel (RT-PCR).

Les systèmes nécessitent l'utilisation de cartouches jetables Xpert Carba R Assay contant les réactifs de PCR et hébergent le processus de la PCR. Puisque les cartouches sont autonomes, la contamination croisée est minimisée entre les cartouches pendant le processus de test. Ce système intègre la purification des échantillons, l'amplification d'acide nucléique et détection de la bla_{KPC} , bla_{NDM} , blaVIM et bla_{OXA-48} gènes de résistance aux carbapénèmes dans les échantillons. Les résultats sont obtenus dans environ 48 minutes.

Une deuxième confirmation avec GeneXpert® et Carba-R kit-assay (USA) pour les souches qui ont l'enzyme OXA-48 seulement après le test ROSCO. Après culture des souches à tester sur une gélose au sang à 37°C pendant 18 heures. A l'aide d'un écouvillon une colonie est prélevée et mélangeé à une solution. Le mélange est transféré à l'aide d'une pipette dans le kit Carba-R qu'on insert dans l'appareil GeneXpert (Figure 20).



Figure 20. Etapes de l'utilisation de Xpert Carba-R. (https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-95111-9_6)

2.3 Caractérisation moléculaire des gènes de résistance par PCR en temps réel SYBR-Green

2.3.1 Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN a été effectuée par méthode choc thermique sur toutes les souches ; 4 à 5 grandes colonies ont été prélevées, mise en suspension dans un eppendorf contenant 200µL d'eau qualité biologie moléculaire (Sigma Aldrich), après homogénéisation (vortex) suivie d'un chauffage à 95°C pendant 5 minutes puis d'une centrifugation pendant 2 minutes; l'ADN total est conservé dans le surnageant.

2.3.2 PCR en temps réel SYBR Green

La caractérisation pour tous les gènes de résistances a été effectuée par PCR en temps réel SYBR Green, à l'aide du système Rotor Gene 3000 apparatus (Corbett Research, Australie). L'analyse des résultats a été faite avec le logiciel Rotor Gene Real Time Analysis Software V 6.1. L'interprétion se fait à l'aide de deux courbes, du melting (la fusion) et la quantitative, en comparaison avec le contrôle positif (Figures 21 et 22).

La même composition a été utilisée pour le mix réactionnel pour toutes les PCR-SYBR Green. Un volume total de 25 μ l du reaction mixture contient 12.5 μ l QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Germany), 1.25 μ l de chaque amorces (10 μ M), 7.5 μ l d'eau RNase-free et 2.5 μ l DNA à tester. Les couples d'amorces sont en Annexe 11.



Figure 21. Quantité de la fluoresence généré du logitiel Rotor Gene Real Time Analysis Software V 6.1. La courbe bleu est la souche à testé (557), la courbe verte est le contrôle positif et le courbe rouge est le contrôle négatif. Le threshold est 0.1.



Figure 22. Courbes de fusion générée du logitiel Rotor Gene Real Time Analysis Software V
6.1. La courbe bleu est la souche à testé (557), la courbe verte est le contrôle positif et le courbe rouge est le contrôle négatif. Le threshold est 1.5.

2.3.2.1 Amplification des groupes de gènes bla_{CTX-M}

L'amplification du bla_{CTX-M} a été effectuée comme décrit précédemment pour tous les isolats (Tofteland *et al.*, 2007). Les isolats positifs au CTX-M ont été criblés pour les groupes CTX-M-1, CTX-M-2 et CTX-M-9 (Woodford *et al.*, 2006). Les conditions thermiques étaient les suivantes : dénaturation à 95°C pendant 15 min, puis 40 cycles de 30 secondes à 95°C, 1 minute à 52°C et 1 minute à 72°C, et une extension finale de 65°C pendant 30 secondes. Toutes les PCR ont été réalisées en présence d'un contrôle positif approprié. Les couples d'amorces sont en Annexe 11.

2.3.2.2 Amplification des gènes de résistance aux quinolones et les fluoro-quinolones

L'amplification de sept gènes de résistance plasmidiques, aux quinolones et les flueroquinolones (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qepA* et *aac*(6)-*Ib*) a été réalisé pour toutes les souches, les couples d'amorces sont en Annexe 9. Les conditions thermiques pour l'amplification des gènes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qepA* étaient les suivantes: dénaturation à 95 ° C pendant 15 minutes, puis 30 répétitions de 30 s à 95 ° C, 1 minute à 52 ° C et 1 minute à 72 ° C, et une extension finale de 65 ° C pendant 30 secondes. Un témoin positif de PCR a été utilisé pour tester toute défaillance d'amplification pour les groupes CTX-M. Par ailleurs, les conditions de la PCR pour *aac*(6)-*Ib* était comme suite : dénaturation à 95 °C pendant 15 minutes, puis 45 cycles, 20 secondes à 95 °C, 40 secondes à 59 °C et 20 secondes à 70 °C, et une extension finale de 65 ° C

2.3.2.2.1 PCR-RFLP

Pour les produits de PCR positives pour le gène aac(6)-Ib, nous avons réalisé une digestion enzymatique par *BtsCl* (New England Biolabs, Ipswich, USA) après une incubation à 50°C pendant 2 heures. La séparation du produit de digestion est faite par une électrophorèse à l'aide d'un gel d'agarose 2% commercialisé prêt à l'utilisation E-Gel® (Invitrogen, USA) pendant 15 minutes.

2.3.2.3 Amplification des gènes de résistance aux aminosides (16S rRNA méthylases)

Les souches résistantes à l'amikacine ont été testées pour la présence des gènes de 16S rRNA méthylases ; *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC* et *rmtD*, en utilisant les conditions d'amplification suivantes : une dénaturation à 95 °C pendant 15 minutes et 35 répétitions du cycle : 30 s à 95 °C et 1 min à 58 °C et 1 minutes à 72 °C, et une extension finale à 65 °C pendant 30 secondes (Castanheira *et al.*, 2008). Les couples d'amorces sont en Annexe 11.

2.3.2.4 Amplification du gène de résistance à la coléstine

Une amplification du gène *mcr1* est réalisée uniquement pour les souches présentant un profile intermédiaire ou résistante à la colistine. Les conditions de cette PCR étaient : une dénaturation à 94°C pendant 15 minutes, à 25 répétitions ; 94°C durant 30 secondes, 30 secondes à 58°C, 90 secondes à 58°C et 60 secondes à 72°C, et une étape d'élongation finale à 72°C pendant 10 minutes (Liu *et al.*, 2016). Les couples d'amorces sont en Annexe 11.

2.4 Puces d'ADN "Check MDR CT101"

Pour les souches négatives au screening de tous les groupes CTX-M mais aussi pour les souches qui étaient résistantes à la cefoxitine nous avons fait une extraction de l'ADN par automate (QIAGEN, Germany) et dosage par le Nanodrop®. Le kit Check MDR CT101 (Checkpoints®, The Netherlands) était utilisé (Figure 23). L'analyse des résultats est faite par Check-Point Software V 1.2 (Figure 24).

2.4.1 Le principe du kit Check MDR CT101

Le principe du système de diagnostic Check-Points est basé sur la reconnaissance moléculaire spécifique des séquences cibles d'ADN et l'amplification ultérieure avec des amorces universelles.



Figure 23. Photo du kit Check-MDR CT101, le tube CP array (TA) et le lecteur.



Figure 24. Images typiques de puces à ADN obtenues avec la configuration «Check-MDR CT101».

La puce de l'ADN a de micro-réaction fixée en rangées ordonnées. Le microréseau se compose d'oligonucléotides complémentaires uniques (cZIP) ciblant des sondes individuelles. Quand l'hybridation des produits de ligature amplifiés par PCR au microréseau est terminée, la détection colorimétrique des réactions positives est initiée. Les polygones délimitent les panneaux

dans le réseau. Chaque panneau définit les résultats de typage pour une souche et se compose de points de contrôle et de points marqueurs spécifiques, numérotés de 1 à 96. Les résultats sont automatiquement interprétés par le logiciel fourni par le constructeur (Figure 24).

(A) Affichage théorique des sondes matricielles pour la souche 1 (I), la souche 2 (II) et la souche 3 (III); les points noirs se réfèrent aux cibles détectées dans le panneau B. (B) Résultats du tableau pour *E.coli CP157* (TEM-1, FOX-3; panneau I), *E. coli CP27* (NDM-1, TEM-1, CTX-M-15 et CMY-58; panneau II) et *K. pneumoniae* CP07 (SHV -11,DHA-1; panneau III).

C'est pour une détection moléculaire rapide et identification des carbapénèmases (KPC et NDM), ESBL (CTX-M, TEM et SHV) et AmpC (CMY, DHA, FOX, MOX, ACC, MIR et ACT).

Le Check-MDR CT101 est un test de diagnostic à base de Microarrays qui identifie la présence de gènes TEM, SHV, CTX-M, KPC, NDM et AmpC ainsi que des mutations conduisant à des types de spectre étendu d'enzymes TEM et SHV. Check-MDR CT101 détecte les mutations TEM aux positions E104K, R164S / H et G238S et les mutations SHV aux positions G238S / A et E240K couvrant les ESBL cliniquement les plus pertinents TEM et SHV.

2.4.2 Mode l'utilisation du kit Check MDR CT101

L'extraction de l'ADN et le dosage sont fait à partir d'une suspension bactériennes à 0,5 McFarland en utilisant une extraction par automate (QIAGEN, Germany) et dosage par le Nanodrop®;

La ligature est une étape de la reconnaissance de l'ADN (5 à 50 ng/ μ L d'ADN) qui dure 2.5 heures. 5 μ L de la solution A est ajoutée aux tubes (fournis dans le kit), 10 μ L d'ADN (1/100 élution) et jusqu'à 10 μ L d'eau ultrapure ou le tampon TE 0.1. Les tubes sont fermés et le mélange se fait à l'aide d'un minifuge. Le mélange doit virer au bleu (Annexe 12).

L'amplification de l'ADN par PCR est réalisée après avoir mélangé deux solutions B et C dans un tube en suivant l'Annexe 13. 30 μ L de la solution B et C sont ajoutés à chaque tube et bien mélangé. Suivi d'une PCR qui dure 1.5 heures, le programme selon l'Annexe 14. Une fois le programme terminé, les tubes peuvent être conservés à 4°C.

Pour la détection et lecture des résultats, les produits de PCR ont ensuite été hybridés au réseau et révélés par colorimétrie qui prendra en tout 90 minutes.

L'arraytube (AT) est préparé en raison d'un AT pour 3 tubes (échantillons). L'AT est chauffé à 50°C. 300 μ L du tampon de détection sont ajoutés à chaque AT et incubé pendant 2 minutes puis mixer à 400 rpm à l'aide d'un thermomixer. Le tampon est enlevé et répété l'étape précédente. Les amplicons sont récupérés et chauffés à 98°C pendant 2 minutes. 10 μ L de chaque tube à AT sont transférés (au total de 30 μ L par AT, enfin l'AT devrait contenir 330 μ L) pour Incubation à 50°C

pendant 30 minutes à 400 rpm à l'aide d'un thermomixer. Le tampon de détection est remplacé par 300μ L de tampon de blocage. l'AT est incubé à 50°C pendant 5 minutes à 400 rpm. Le tampon de blocage est remplacé à nouveau par 300 μ L tampon de blocage. La température est ajustée à 30°C et incubation pendant 10 minutes. Une dilution est préparée composée de la solution conjugée avec le tampon de détection, (Annexe 15). La solution tampon de blocage est enlevée et 150 μ L de la solution conjugée diluée est ajoutée puis incubation à 30°C, pendant 15 minutes et 400 rpm. La solution tampon de blocage et éliminée et 600 μ L du tampon de détection sont ajoutés et incuber à 30°C, pendant 2 minutes et 400 rpm. Le tampon de détection est enlevé et par 600 μ L du tampon de détection sont à nouveau ajoutés, suivi d'une incubation à 30°C, pendant 2 minutes et 400 rpm. Le tampon de détection est retiré et 150 μ L de la solution Staining sont ajoutés puis laisser 15 minutes à température ambiante. L'AT est mis dans l'appareil pour lecture des résultats.

Les résultats sont lus dans un lecteur de tube à matrice monocanal (Alere, Cologne, Allemagne) et automatiquement interprétés par le logiciel.

L'ensemble du processus de détection des puces à ADN nécessite 7 heures d'effort selon les instructions du fabricant.

2.5 Typage moléculaire par analyse de profils

2.5.1 Principe du PFGE

L'électrophorèse sur gel pulsée est souvent citée sous l'acronyme anglais PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis). Le principe est de choisir une enzyme qui coupe l'ADN génomique en très peu de sites; on a suivi le protocole PulseNet pour non-O157 *E.coli* et la digestion de l'ADN génomique était faite par *XbaI* (BioLabs®, New England) pour tous les isolats en présence d'une souche de référence *E. Coli* EHEC G5244 (Ribot *et al.*, 2006).

L'analyse des résultats (gels) se fait par le programme GelComparII V 5.10 (Applied Math, Belgium) ; ce dernier permet de regrouper les souches en groupes « clusters » sous forme de dendrogramme ; c'est un diagramme de branchement qui représente les relations de similarité entre un groupe d'entités. Le dendrogramme est généré selon « the Dice similiraty » et « the Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Average (UPGMA) ». Le coefficient de Dice utilisé est ≥ 0.80 selon Tenover *et al.* (1995).

2.5.2 Mode opératoire

Cette technique est longue et se fait sur plusieurs étapes qui durent cinq jours. Une culture préable doit se faire la veille des souches sur une gélose au sang et incubation à 37°C pendant 18 heures. La liste des produits chimiques et solutions tampons (Annexe 16).

2.5.2.1 Premier jour

L'ADN est préparé dans des bouchons d'agarose. Un gel de Seakem Gold agarose à 0,8% est préparé et chauffé. A l'aide d'un écouvillon, 5 grandes colonies fraîches sont prélevées et mises en suspension dans un tube eppendorf avec 250 μ L du tampon SE. Les tubes sont chauffés au bainmarie à 54°C. 250 μ L de Seakem Gold Agarose fondu à chaque suspension bactérienne préchauffée sont ajoutés dans chaque eppendorf. Le mélange se fait doucement avec une pipette. 85 μ L/puits sont pipetés immédiatement, 4 puits par échantillon. Les gels sont solidifiés pendant 10 à 15 minutes au réfrigérateur à 4°C.

Les tubes à essai par chaque échantillon sont mélangés avec 5 mL de CLB et 25 μ L de protéinase K (1 mg/ml).

- Retirez le ruban adhésif des peignes. Appuyez sur les gels de la face inférieure du peigne dans chaque tube. Mélanger en retournant doucement le tube.
- les échantillons sont incubés dans un bain-marie à 54°C pendant une nuit.
- Chauffer l'eau ultra-pure et le tampon TE à environ 50°C (environ 30 ml pour chaque échantillon).

2.5.2.2 Deuxieme jour

La digestion enzymatique est stoppée suivi de lavages. En utilisant un tamis en plastique est utilisé pour éliminer les solutions et récupérer les gels. Les gels sont lavés 3 x 10 ml d'eau ultrapure et 2 x 10 ml de TE. Les échantillons sont sous agitation pendant environ 15 min après chaque lavage. Les gels sont conservés dans 5 ml de TE au réfrigérateur à 4°C.

2.5.2.3 Troisieme jour

La digestion de l'ADN génomique par l'enzyme *XbaI*. Les tubes eppendorf sont numérotés selon le protocole complété.La souche témoin doit être présente dans un puits sur six, soit 3x sur un gel à 15 puits. La solution OPA est dilué 10 x dans de l'eau Sigma à raison de 100 μ L par tube. Les gels sont divisé à raison de ¹/₄ par échantillon avec un scalpel / lamelle et placer dans le tampon OPA. L'incubation dure 15 minutes à 36 ± 1°C. Le tampon OPA est aspiré. 100 μ L de tampon de restriction (10 μ L de NEB 10x, 1 μ L de BSA 100x, 88,6 μ L d'H₂O pure, 0,4 μ L l'enzyme *Xba*I) est

ajoutée dans chaque échantillon. L'incubation dure une nuit (16 heures) à $36 \pm 1^{\circ}$ C. Le clivage est arrêté en aspirant le tampon et en ajoutant 250 µL tampon TE 1x. Les gels avec de l'ADN clivés peuvent être conservés pendant quelques semaines à 4°C en attendant l'électrophorèse.

2.5.2.4 Le quatrième jour

L'électrophorèse de l'ADN génomique en champ pulsé est réalisée dans un tampon TBE 0,5x L'appareil d'électrophorèse est mis en marche (Chef DR-III, BioRad) ainsi que la pompe et lorsqu'il n'y a plus de bulles dans les tuyaux, l'unité de refroidissement démarre et est réglée à 14 °C. La vitesse de la pompe doit être d'environ 1 L / min. L'agarose Ultra Pure est préparé à 1% dans TBE 0,5 x et Conservé à 55 °C. d'autre part le tampon des échantillons est aspiré et les ¼ des gels sont placé sur le peigne à gel de sorte que l'échantillon 1 se termine à l'extrême gauche et l'échantillon 2 à droite de l'échantillon 1 et ainsi de suite. L'excès de liquide est aspiré en ajustant la position des disques sur le peigne. Les ¼ des gels sont fixés avec une goutte d'agarose et laissé reposer. Le peigne est placé dans le moule de façon à ce que l'échantillon 1 se retrouve à l'extrême gauche. 80 ml du gel d'agarose sont versés délicatement dans le moule. Les bulles sont repoussées avec une pipette pasteur en plastique. Le dispositif est laissé au repos environ 20 minutes. Le peigne est retiré l'agarose est versé à nouveau dans tous les puits. Le gel polymérise pendant encore 20 minutes.

Le moule est démonté. Le gel et la plaque sont placés dans l'appareil d'électrophorèse et le disque est inséré dans le cadre. Le programme est sélectionné suivant le gradient de tension: 6 V/cm, Angle: 120°, Temps de commutation initial: 2,2 secondes, Temps de commutation final: 54,2 secondes. Rampe linéaire, Temps de conduite: 22 heures.

2.5.2.5 Cinquième jour

Le cinquième jour est le jour de la coloration et visualisation du gel. Une fois l'électrophorèse terminée, arrêtez l'unité de refroidissement et la pompe lorsque l'électrophorèse est terminée. Prenez la plaque avec le gel pour la coloration.

Pour la coloration avec GelRed, préparez la solution GelRed 3x dans un récipient sombre dans le compartiment de gel: mélanger 20 mL de NaCl 1 M avec 180 mL d'eau ultrapure et ajouter 60 μ L GelRed (10 000x). Laisser la coloration du gel se faire pendant 30 minutes. Puis laver le gel à l'eau courante pendant environ 5 minutes.

Visualisation du gel avec GelDoc 2000 et prendre une photo pour l'analyse et normalisation en utilisant les marqueurs de tailles (Annexes 17 et 18) avec le GelComparII (Figure 25).



Figure 25. Etapes de l'analyse des gels PFGE en utilisant GelCompare II.

2.6 Séquençage du génome complet « Whole Genome Sequencing » (WGS)

Le séquençage du génome complet des bactéries pathogènes représente relativement un nouveau moyen de plus en plus accessible de suivre les épidémies de maladie, qui a obtenu le succès dans de multiples contextes appliqués. En utilisant des technologies de séquençage d'ADN massivement parallèles (ou "nouvelle génération"), il est maintenant possible d'examiner les génomes complets ou presque complets des isolats bactériens.

A partir des résultats obtenus de la PFGE, nous avons pris une souche de chaque grand cluster qu'on appelle « un représentant » et les souches qui étaient impossible de les typer par la PFGE. 19 souches ont été sélectionnées pour être séquencées après extraction de l'ADN total en utilisant MagNApure 96 system (Roche Diagnostics, Nederland, Netherlands). La quantification de l'ADN extrait est effectué par l'appareil Qubit 3.0 fluometer (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc.) et le QubitDs DNA HS Kit (High Sensivity) selon les recommandations de la plateforme SciLifeLab à Stockholm, Suède.

Dans cette étude, le génome complet de 19 souches ont été séquencées au niveau du SciLifLab par HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, USA); c'est une technique de "séquençage par synthèse", où des molécules d'ADN individuelles sont attachées à la surface des cellules d'écoulement et une amplification isotherme de pontage est utilisée pour amplifier les signaux. Celles ci sont ensuite séquencées en utilisant des nucléotides marqués par un fluorophore réversible, qui sont lus optiquement à partir de chaque cellule d'écoulement. Bien que ceux-ci aient des précisions élevées et produisent de grandes quantités de données brutes, les longueurs de lecture individuelles ont tendance à être plus courtes, ce qui peut être problématique pour les génomes avec de grandes répétitions.

2.7 Analyses bioinformatiques des séquences « short raw reads »

L'assemblage (assembly) et le rognage (trimming) de tout le génome ont été réalisés de novo des « shorts raw reads » d'Illumina en utilisant workbech CLC V.11.0 (Qiagen®, Danemark) et le module Microbial.

2.7.1 Caractérisation génomique in silico

2.7.1.1 Confirmation de l'espèce bactérienne et la contamination

Une fois les séquences introduites dans le programme du CLC workbech V.11.0 (Qiagen, Danemark) et le module Microbial, il va nous confirmer l'espèce et si l'échantillon était contaminé avant de faire d'autres analyses poussées.

2.7.1.2 Les gènes de résistance et les élements mobiles

La base de données Centre for Genomic Epidemiology (https://cge.cbs.dtu.dk) a été utilisée pour la détection de gènes de résistance aux antibiotiques, l'identification, le typage de réplicons et leuts pMLST; *ResFinder, MLSTFinder, PlasmidFinder*, respectivement, à partir des séquences ajustées assemblées (.fasta) (Larsen *et al.*, 2012; Carattoli *et al.*, 2014; Zankari *et al.*, 2017).

Prédiction des prophages: pour identifier les prophages putatifs, nous avons utilisé PHASTER (PHAge Search Tool Enhanced Release) en utilisant les paramètres par défaults (Zhou *et al.*, 2011; Arndt *et al.*, 2016).

2.7.1.3 Système CRISPR-Cas architecture et environement

- Caractérisation et identification des gènes *cas*, CrisprCasFinder (https://crisprcas.i2bc.parissaclay.fr/CrisprCasFinder/Index) a été utilisé qui indique l'orientation du CRISPR-Cas et identifier les gènes *cas*, le type et le sous-type du système CRISPR-Cas.
- La caractérisation moléculaire des systemes CRISPR-Cas, les séquences assembées et trimmées des 19 K. pneumoniae séquencées ont été analysés à l'aide de la plateforme CRISPRFinder pour retrouver les « directe repeated » (DR) et les « spacers » ont été extraites manuellement.
- Pour identifier les spacers correspondant aux séquences protospacers des plasmides, des phages ou bien autotargeting. Les spacers ont été alignés en utilisant MAFFT V 7 (https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/) (Katoh, Rozewicki et Yamada, 2019) pour supprimer les spacers identiques, puis les spacers uniques ont été comparées aux séquences génomiques de virus (taxid: 10239) et de bactéries (taxid: 2) disponibles dans la base de données NCBI en utilisant le nucléotide BLAST et l'algorithme BLASTn.
- Les DRs étaient regroupés à l'aide du MAFFT V 7. Puis Weblogo (https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi) est utilisé pour avoir les sequences consenus des DRs I-E et I-E*. CRISPRmap (http://rna.informatik.uni-freiburg.de/CRISPRmap/) est utilisé pour avoit la structure secondaire en ARN des DRs.
- Prédiction des leaders, sont recherchés par investigation et Blasting des régions en amant et en aval du locus CRISPR (the array) (~1kb) puis BPROM (Bacterial promoter prediction program) était utilisé pour prédire tout les éléments promotionnels (-10, -35 et le promoteur) pour chaque CRISPR loci (Solovyev, 2011).

2.7.1.4 Les gènes de virulence et les determinants capsulaires

- ► Les contigs assemblés et rognés ont été téléchargés le site Web sur (http://bigsdb.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html), pour identifier automatiquement tous les loci et allèles numérotés actuellement disponibles dans BIGSdb et les gènes de virulences, K-types et gènes d'efflux en utilisant «Virulence genes sheme», «cps capsule (wzi et wzc) » et «Efflux pumps» respectivement.
- ≻ Kaptive V 0.7.0 est utilisé pour prédire le K-type (Wick *et al.*, 2018).

2.7.1.5 La détermination du gènome réference le plus proche

K-mer est aussi realisé pour déterminer le génome de référence le plus proche de nos souhes bactériennes à l'aide CLC Genomics Workbench V.11.0 (Qiagen®, Danemark) et le module Microbial.

2.7.2 Génomique comparative et phylogénétique

- Phylogénétique moléculaire: afin de mieux comprendre les relations génétiques entre les isolats de *K. pneumoniae* sequencées, le typage des SNP du génome entier a été réalisé comme suit: les lectures d'isolats séquencés ont été directement cartographiées sur le chromosome de *K. pneumoniae* CG43 (GenBank), génome référence: NC_022566 avec le CLC Genomics Workbench V.11.0 (Qiagen®, Danemark) en utilsant les paramètres par défaut. Les SNP ont été appelés par l'algorithme "Quality-based variant detection". Les SNP candidats ont été filtrés comme décrit précédemment. Des SNP de haute qualité ont été utilisés pour construire un arbre à probabilité maximale: Maximum Likelihood tree (MLTree).
- L'outil de comparaison du génome BIGSdb effectue une analyse du génome de base MLST «cgMLST sheme 632 loci».
- Le profil allélique de ce dernier a été analysé par BioNumerics 7.6.3 et la relation clonale entre isolats a été étudiée par Minimum Spanning Tree (MST). L'analyse MST a également été étendue en superposant les principales caractéristiques des isolats tels que les facteurs de virulence, les ARG et les sites d'infection. Les groupes clonaux ont été créés comme précédemment décrit (Bialek-Davenet *et al.*, 2014).

2.7.3 Annotation

L'annotation et la gestion des arbres phylogénétiques a été faite en utilisant iTOL V5 (Interactive Tree Of Life) qui est un outil en ligne (Letunic et Bork, 2021).

2.7.4 Soumission à SRA

Les séquences (double reads) ont été soumises à the National Center for Biotechnology Information (NCBI), the Sequence Read Archive (SRA).

III. Résultats

1. Identification moléculaire des isolats et les tests de sensibilité aux antibiotiques

Au total, 219 souches de *Klebsiella sp.* ont été réidentifiées par MALDI-TOF-MS, quatre souches n'étaient pas *Klebsiella pneumoniae*; les souches 673 et 682 étaient *Klebsiella oxytoca*, la souche 459 était *E. Coli* et la souche 589 était *Raoultella planticola* (Annexe 19).

215 souches ont été confirmées comme étant des *Klebsiella pneumonie*. 22 isolats ont été exclus pour les raisons suivantes: si un patient en avait deux isolats avec le même antibiogramme ou si le test de synergie était négatif, cela signifiait que les souches étaient négatives pour les BLSE. Finalement, un total de 193 isolats de *Klebsiella pneumoniae* productrices de BLSE a été sélectionné pour la caractérisation moléculaire.

Concernant les souches productricent de carbapénemases, un total de 8 souches avait d'une zone d'inhibition d'un diamètre inférieur à 27 mm avec le méropénème (10 μ g), 7 souches avaient le phénotype BLSE et la perte de la porine membranaire et une souche a été confirmée comme produisant *bla_{OXA-48}* par GeneXpert® Carba-R (Tableau 8 et Figure 26).

Tableau8. RésultatsdukitdeconfirmationKPC/MBLetOXA-48,ROSCODIAGNOSTICA.

Identifiant	MEM	IPM	ERT	MRPBO	MRPDP	MRPCX	TEM	Interprétation	
330	23	31	21	1	0	0	28	BLSE+perte de	
		51	-1	1	Ű	Ű	-0	porine	
533	26	33	30	1	1	1	0	25	BLSE+perte de
555	20	55	50	1	1	0	23	porine	
508	26	34	28	1	2	0	24	BLSE+perte de	
590	20	54	20	1	2	0	24	porine	
624	24	26	10	1	2	0	14	BLSE+perte de	
024			19	1			14	porine	
631	19	18	15	1	9	1	0	OXA-48	
644	26	20	26	2	2	2	10	BLSE+perte de	
044	20	29	20				19	porine	
676	22	20	16	n	0	1	17	BLSE+perte de	
070	25	20	10	Δ	0	1	17	porine	
605	22	27	10	0	0	0	28	BLSE+perte de	
095		21	17	U	U	U	20	porine	

MEM : méropèneme (10µg), IPM : imipèneme (10µg), ERT: értapèneme (10µg), TEM : Temociline (30µg).

MRPBO: Méropèneme $10 \mu g$ + acide phenylboronique (KPC et l'inhibiteur d'AmpC).

MRPCX: Méropèneme 10 μ g + cloxacilline (inhibiteur d'AmpC).

MRPDP: Méropèneme 10 μ g + aide dipicolinique (inhibiteur de Metallo- β -Lactamase).



- Figure 26. Photographie du résultat du kit de confirmation KPC/MBL et OXA-48, ROSCO DIAGNOSTICA. La souche N° 631 productrice de BLSE et carbapènemase OXA-48.
- 2. Caractérisation moléculaire des gènes de résistance par PCR-SYBR Green, de puces à ADN et PCR-RFLP

La prévalence des *qnr* et *aac*(6')-*Ib-cr variants* était très élevée, à 65,28% (126/193) et 71,5% (138/193), réspectivement; 63,21% (122/193) étaient des variants de *qnrB1*, alors que 4/193 (2,07 2%) étaient des *qnrS*. Pour les souches résistantes à l'amikacin. Nous avons trouvé 17/24 isolats positifs pour *armA* et 7/24 étaient négatifs pour tous les gènes de l'ARNr 16S méthylases (Tableau 9). Annexe 20, c'est une photographie du produit de PCR du gène *aac*(6')-*Ib* de la digestion par l'enzyme *BtsCl*.

L'analyse par micropuce Check-MDR CT101 a montré que les isolats résistants à la céfoxitine, 4/6 avaient le gène CMY II (bla_{CMYII}) et deux isolats étaient négatifs (Tableau 9).

		Nombre
Tot	al	193
e CT.	X-M positive	192
TD tan	X-M 1 groupe	191
SIS CT.	X-M 9 groupe	1
	3L-SHV	1
çu qnr	postive	127
$\frac{3}{2}$ qnr	В	123
es qnr	S	4
acc	(6')-Ib-cr	140
, arn	nA	17
^d CM	YII	4
CT	X-M Groupe 1 seulement	30
CT	X-M Groupe 1, acc(6')-Ib-cr	28
ou CT.	X-M Groupe 1, armA	6
ista CT.	X-M Groupe 1, CMYII	1
ý CT.	X-M Groupe 1, qnrB	10
CT.	X-M Groupe 1, qnrB, acc(6')-Ib-cr	100
δω CT.	X-M Groupe 1, qnrB, acc(6')-Ib-cr, armA	5
es CT.	X-M Groupe 1, qnrB, acc(6')-Ib-cr, armA, CMYII	2
E CT.	X-M Groupe 1, qnrB, acc(6')-Ib-cr, CMYII	1
.in CT	X-M Groupe 1, qnrB, acc(6')-Ib-cr, OXA-48	1
iqu CT.	X-M Groupe 1, qnrB, armA	4
$\overset{\overline{O}}{O}$ CT.	X-M Groupe 1, qnrS, acc(6')-Ib-cr	3
CT.	X-M groupe9, qnrS	1
SH	V_Variant seulement	1

Tableau 9. Résultats de la caractérisation moléculaire par PCRs SYBR Green, PCR-RFLPet puces d'ADN.

3. Typage génomiques (PFGE)

Les résultats de PFGE ont montré que la plupart des isolats (n = 191) étaient typables et une minorité, deux isolats étaient non typables (380 et 666). Selon le seuil de similarité de 80%, l'analyse PFGE a subdivisé les 191 isolats en 12 types de PFGE ou "Cluster". Peu de génotypes d'entre eux étaient des singletons; un ou plusieurs isolats ont un génotype unique et distinct. Les génotypes restants sont un groupe variable ou des groupes clonaux constitués de deux isolats ou plus. La PFGE a montré une similarité de 63.7% entre les isolats, ce qui indique un degré de parenté relativement plus élevé entre les membres de la population. Il est important de noter que l'analyse PFGE permet de distinguer les isolats apparentés par clonage des isolats non apparentés. Le groupe C11 en bleu était le groupe le plus prédominant (n = 35), suivi par les autres groupes de taille moyenne et mineure (Figures 27 et 28). Annexe 21, présente Électrophorèse sur gel en champ pulsé après digestion par *Xbal*, profils de macro-restriction de l'ADN génomique de 193 isolats cliniques KP productricent de BLSE.



Figure 27. Minimum Spanning Tree basé sur la matrices de similarité (coefficients de Dice) des profiles PFGE en détails. Chaque nœud unique représente un modèle PFGE distinct. La zone grise de chaque couleur représente un groupe de motifs étroitement liés; des complexes ont été créés si la distance maximale des voisins était de 10 valeurs de similitude. La taille de chaque nœud correspond au nombre d'isolats. Les nombres sur les nœuds correspondent aux ST des isolats qui ont été soumis au séquençage du génome entier.



Figure 28. Minimum Spanning Tree basé sur la matrices de similarité (coefficients de Dice) des profiles PFGE. Chaque nœud unique représente un modèle PFGE distinct. Les nœuds condensés représentent des modèles étroitement liés avec ≤ 10 valeurs de similitude. La taille de chaque nœud correspond au nombre d'isolats. Les nombres sur les nœuds colorés correspondent aux ST des isolats qui ont été soumis au séquençage du génome entier.

4. Caractérisation moléculaire par séquençage du génome complet

4.1 Qualité des séquences et bio Project

La qualité des séquences est présentée dans le tableau 10. Le contrôle de la qualité du séquençage a montré que la couverture 10x était >98% pour 19 isolats et la couverture 30x était \ge 98% pour 18 isolats. Le taux de duplication principal était \ge 9,49% et la taille médiane principale de l'insert entre 186 et 267. Bioproject PRJNA672836 (accession no. SAMN16579464 à SAMN16579482).

Identifiant	Reference Genome	Total Reads	Median Insert Size	Duplication Rate	Mapped rate	Coverage 10X
246	NC_016845.1	5 320 333	244	10,67%	81,37%	98,56%
571	NC_016845.1	5 346 336	191	10,48%	82,33%	98,49%
601	NC_016845.1	5 338 742	199	10,08%	79,97%	98,58%
631	NC_016845.1	5 258 002	186	10,12%	81,39%	98,58%
640	NC_016845.1	5 618 409	189	10,57%	79,69%	98,45%
644	NC_016845.1	4 855 854	200	10,67%	84,57%	98,56%
657	NC_016845.1	5 167 685	193	10,39%	85,67%	98,26%
660	NC_016845.1	6 258 380	190	10,83%	81,02%	98,28%
666	NC_016845.1	5 161 487	187	10,42%	84,15%	98,63%
676	NC_016845.1	5 443 767	191	10,13%	80,78%	98,67%
287	NC_016845.1	4 585 411	241	10,26%	79,71%	98,52%
687	NC_016845.1	5 438 227	188	9,79%	79,10%	98,79%
352	NC_016845.1	4 367 779	252	10,39%	80,60%	98,19%
380	NC_016845.1	4 276 198	263	10,62%	78,15%	98,53%
383	NC_016845.1	3 767 413	267	9,90%	82,69%	98,50%
440	NC_016845.1	4 559 455	254	11,34%	82,38%	98,64%
448	NC_016845.1	4 402 256	256	10,55%	81,20%	98,26%
469	NC_016845.1	5 442 132	255	10,32%	74,78%	98,36%
671	NC_016845.1	4 914 438	187	9,49%	81,05%	98,76%

Tableau 10. Tableau de la qualité des séquences.
4.2 Analyses génomiques

Gènes de résistance, MLST (type de séquence), replicons trouvés par *ResFinder*, *MLSTfinder* et *PlasmideFinder* respectivement pour les isolats séquencés.

4.2.1 Gènes de la résistance

La cartographie des gènes de β -lactamases a montré que toutes les souches séquencées avaient les enzymes CTX-M qui est $bla_{CTX-M-15}$, alors que 17/19 isolats avaient un variant bla_{SHV} et qu'une seule souche avait la présence simultanée de bla_{OXA-48} et $bla_{CTX-M-15}$. Deux variantes de bla_{CMY-2} et de bla_{CMY-16} ont également été trouvées dans des souches d'arbres (3/19). Dans deux isolats, nous notons en outre la présence de bla_{OXA-1} , une présence simultanée de bla_{OXA-10} et de bla_{CMY-16} (Figure 29).

La cartographie des gènes de résistance aux aminosides a montré que toutes les souches présentaient au moins l'un des gènes de résistance suivants: *aac(3)-IIa* (11/19), *aac(3)-IIa* (6/19), *aacA4* (1/19), *aadA2* (3/19), *aadA1* (3/19), *aph* (3'')- *Ib* (11/19), *aph* (3')- *VIb* (2/19), *aph*(3')- *la* (2 / 19) et *aph*(6)-*Id* (10/19). Deux isolats avaient *armA* (Figure 29).

Les gènes de résistance aux fluroquinolones étaient notamment aac(6')-lb-cr (11/19), qnrB1 (12/19), qnrB5 (1/19) avec 100% d'identité et la requête n'était pas bonne; les résultats de BLASTING ont montré qu'il s'agissait de qnrB19, qnrS1 (1/19), nous notons également la présence simultanée de oqxA et de oqxB. La majorité des isolats présentaient plusieurs déterminants de la résistance aux β -lactames, aux aminosides et aux fluoroquinolones qui confère un à phénotype multi-résistant (Figure 29).

		Genès de résistance aux β-lactams														Gènes de résistance aux aminoglycosides & fluoroquinolones									ies							
ID	blaCTX-M-15	blaSHV-1	blaSHV-11	blaSHV-28	blaSHV-36	blaSHV-76	blaSHV-99	blaSHV-101	blaTEM-1B	blaOXA-1	blaOXA-9	blaOXA-10	blaOXA-48	blaOXA-205	blaCMY-2	blaCMY-16	aac(3)-IIa	aac(3)-IId	aac(6')lb-cr	aacA4	aadA1	aadA2	aph(3')-Ia	aph(3'')-Ib	aph(3')-VIb	aph(6)-Id	armA	qnrB1	qnrB5	qnrSI	oqxA	oqxB
246																																
287																																
352																																
380																																
383																																
440																																<u> </u>
448																																
469																																
571																																
601																																
631																																
640																																
644																																
657																																
660																																
000 671																																
676																																
687																																
007																																

Figure 29. Gènes de résistance des 19 souches séquencées.

Les codes couleurs correspondent aux pourcentages de l'identification en vert : ID=100% et query/HSP sont identiques. En jaune: $99 \ge ID > 100$ et query/HSP identiques, en bleu: ID%=100% et query/HSP differents. En noir: $99\% > ID \ge 98\%$ et le query/HSP identiques.

En outre, nous avons détecté d'autres résistances, telles que la résistance des gènes du phénicol: catA1, catB4, cm1A1 et floR dans 16 isolats, mais avec une bonne identification; les gènes catB4, cm1A et floR étaient présents simultanément dans deux souches, des résistances aux gènes sulfonamide ont été observées dans dix-huit isolats: sul1 (8/19) et sul2 (14/19) détectés dans quatre isolats, des gènes étaient présents simultanément dans 4 isolats. Le gène de résistance à la tétracycline tet (A) a été détecté dans 10 souches sur 19 et les gènes de résistance au triméthoprime dfrA1, dfrA5, dfrA14 et dfrA12 ont également été détectés dans 17 isolats; dfrA1 (1/19), dfrA5 (2/19), dfrA14 avec une bonne identification (11/19), dfrA12 (2/19). Deux gènes de résistance aux macrolides ont été détectés ere(A) (2/19) et mph(A) dans une souche (Figure 30).



Figure 30. Array des autres gènes de résistance.

Codes couleurs. Vert: ID=100% et query/HSP identiques. Jaune: $99 \ge ID > 100$ et le query/HSP identiques, en bleu: ID%=100% et le query/HSP differents. Noir: $99\% >ID \ge 98\%$ et le query/HSP identiques. Rouge: ID%=100% et le query/HSP différents.

4.2.2 Type de séquence (ST) par MLST

Parmi les 19 génomes séquencés, 16 STs distincts ont été trouvés et la plupart d'entre eux ont été bien décrits dans la littérature. Les STs trouvés sont 16 ST: ST13, ST14, ST23, ST37, ST48, ST86, ST147, ST307, ST348, ST392, ST405, ST831, ST1111, ST1426, ST1942 et ST2108 (Tableau 11). Parmi ces STs on a quatre STs (ST14, ST23, ST37 et ST147) qui sont épidémiques (High-risk clones) (Tableau 11).

ID	A	L			- l E		4 D	ст
Strain	gapA	тув	man	pgi	pnoe	rpoD	tonB	51
246	3	4	6	1	7	4	38	ST147
287	2	1	5	1	17	4	42	ST111
352	2	3	1	1	10	1	19	ST13
380	2	1	1	1	10	1	18	ST183
383	2	1	1	1	9	4	12	ST23
440	2	1	20	1	12	15	16	ST348
448	2	1	62	3	10	4	110	ST405
469	9	4	2	1	1	1	27	ST86
571	2	5	1	1	2	1	43	ST1942
601	3	4	6	1	7	4	38	ST147
631	3	5	1	1	12	4	46	ST1426
640	3	4	6	1	7	4	40	ST392
644	3	5	1	1	12	4	46	ST1426
657	2	9	2	1	13	1	16	ST37
660	1	6	1	1	1	1	1	ST14
666	2	1	1	3	12	1	5	ST2108
669	2	1	1	1	9	4	12	ST23
671	4	1	2	52	1	1	7	ST307
676	2	9	2	1	13	1	16	ST37
687	2	5	2	2	7	1	10	ST48

Tableau 11. MLST des 19 souches séquences et ses sept gènes de ménages.

4.2.3 Gènes de la virulence et sérotypes

Les gènes contribuant à la pompe à efflux *AcrA*, B et / ou à la pompe à efflux *OqxA*, *B* ont été trouvés chez toutes les souches (Tableau 12). Les gènes de virulence et les K-types (*wzi* et *wzc*) sont rapportés dans le tableau 13.

								Pom	pe à e	fflux	•						
	arcA	arcB	arcR	envR	fis-1	marA	marR	oqxA	oqxB	oqxR	ramA	ramR	rarA	rob	sdiA	soxR	soxS
246	N1	N1	1	1	1	12	20	53	N1	4	1	1	27	3	24	1	2
287	43	N2	N1	19	1	2	4	N1	N2	4	1	4	N1	3	N1	2	N1
352	N2	N3	1	N1	1	2	2	N2	N3	3	6	2	3	3	1	1	6
380	N3	N4	1	N2	1	1	2	N3	N4	4	1	2	N2	3	23	2	14
383	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2
440	23	N6	2	9	1	2	1	N5	N6	4	2	2	20	4	1	2	2
448	N4	N5	1	15	1	2	1	N4	N5	4	6	16	N3	21	6	2	4
469	1	20	1	5	1	2	4	5	5	3	5	1	5	4	3	1	2
571	N5	N7	1	N3	1	1	N6	N7	N1	7	7	21	N4	3	1	1	5
601	N1	N1	1	2	1	12	20	53	N1	4	N1	N1	27	3	24	1	2
631	N6	N8	1	2	1	2	1	55	N8	4	1	2	21	4	1	1	2
640	N1	N1	1	2	1	12	20	53	N1	4	1	1	27	3	6	1	2
644	N6	N8	1	2	1	2	1	55	N8	4	1	N2	21	4	1	1	2
657	N7	N9	1	3	1	1	1	N7	N9	4	5	1	6	16	2	1	5
660	3	3	1	3	1	3	2	3	3	3	3	2	3	3	1	1	1
666	47	N6	1	3	1	2	2	N8	N10	4	N2	2	2	3	6	1	6
671	N8	41	1	20	1	1	1	N9	N11	4	2	1	3	3	2	1	1
676	27	33	2	3	1	2	4	24	26	N2	3	17	14	16	1	1	10
87	28	40	12	3	1	1	2	68	37	7	16	21	4	7	4	1	11

Tableau 12. Résultats des gènes de pompes d'efflux

N : nouvel allèle.

Isolats	WZC	wzi	K-Types	Virulence gènes/clusters	Hypervirulence
246	64	64	K64	mrk	Classique
287	63	63	K63	Yersiniabactines mrk	Classique
352	3	40	К3	Yersiniabactines mrk, kfu, clb	Virulente
380	19	18	K18	Yersiniabactines mrk	Classique
383	1	1	K1	Yersiniabactines Aerobactin/Récépteur Allantoinase Salmochelines kfu, mrk, clb, mce rmpA/A2	Virulente/HV
440	62	94	K62	Yersiniabactines mrk, clb	Virulente
448	937	143	K151	Yersiniabactines kfu,mce, kvg, mrk	Virulente
469	2	2	K2	Yersiniabactines Aerobactines kvg, mrk, rmpA/A2	Virulente/HV
571	61	155	K61	mrk, kvg	Classique
601	64	64	K64	mrk	Classique
631	21	177	K20	mrk	Classique
640	28	187	K27	mrk	Classique
644	21	177	K20	mrk	Classique
657	919	50	K15	mrk	Classique
660	2	2	К2	Yersiniabactines kfu, mrk	Virulente
666	32	31	K31	Yersiniabactines Allantoinases mrk	Virulente
671	939	173	K102	mrk	Classique
676	13	12	K12	mrk	Classique
687	987	167	K124	Yersiniabactines mrk	Classique

Tableau 13. Résultats de la virulence et les sérotypes (K-types).

Yersiniabactines: ybt cluster, irp1, irp2 et fyuA.

Aerobactines/récépteure: iuc cluster/iutA.

Allantoinases: all cluster, fdr, glx, ybb cluster, ylb cluster, KP1_1364, KP1_1371, hyi et gcl. Salmochelines: *iroB*, *C*, *D* et *N*.

HV : Hypervirulente.

4.2.4 Détection et identification des systèmes CRISPR-Cas

Dans cette étude, l'occurrence du système CRISPR-Cas était de 47,36% (9/19 isolats), deux groupes sont visibles; le premier est constitué de 5 isolats sous-typés I-E et le second est composé de 4 isolats sous-typés I-E *. Dans nos résultats, les isolats ayant des ST: 392, 147, 2108, 348 étaient de type I-E et ceux qui avaient des ST: 13, 23, 111 et 14 étaient de type I-E*. L'anti-CRISPR était absent dans tous les isolats ayant le système CRISPR-Cas. Les isolats ayant le sous-type I-E avaient le plus grand nombre d'entretoises.

Les systèmes CRISPR-Cas sont toujours associés à des gènes *cas* sous forme d'un opéron. En règle générale, le système se compose de huit ou sept gènes *cas* quand il s'agit de sous-type I-E les gènes *cas* identifiés étaient, de 5'à 3': *cas3, cse1, cse2, cas7, cas5, cas6, cas1* et *cas2* ou de 5'à 3' de direction: *cas3, cse1, cse2, cas6, cas7, cas5, cas1* et *cas2* (Figure 34).

Dans l'ensemble, cela suggère que l'opéron cas est conservé dans les souches contenant les systèmes CRISPR-Cas et a probablement une histoire évolutive commune pour toutes ces souches de *Klebsiella*.

Les séquences consensus des DR ont montré deux groupes avec des régions conservées de parts et d'autres. Les principaux changements ont été détectés au milieu de la séquence (positions 12, 13 et 14) pour le type I-E*. Nos résultats montrent que la séquence DR était symétrique et partiellement palindromique. Chaque sous-type a un type de DR mais les deux ont le motif 1 de la super classe B (Figure 31). Toutes les sequences des DR du type I-E étaient identiques.

Un total de 184 espaceurs non dupliqués a été trouvé; 135 espaceurs étaient uniques et 49 partagés entre les matrices CRISPR. Les résultats des espaceurs de dynamitage ont montré que 158 espaceurs avaient des espaceurs d'homologie parfaite ciblant 16 bactériophages, 18 plasmides et 155 chromosomes. Certains espaceurs correspondaient aux chromosomes, aux plasmides et / ou aux phages. Les isolats dans le même ST (ST147) avaient le même tableau et la même organisation. Le taux des spacers auto-targting était de 5% (9 sur 184) trouvé dans 5 des 9 isolats (55,55%) (Tableau 14 et Figure 35).

Trois leaders ont été trouvés: le leader 1 (96 pb), le leader 2 (252 pb) et le leader 3 (47 pb). Le premier pour le sous-type I-E et les deux derniers pour le sous-type I-E *. Les leaders1 et les leaders 3 ont été conservés mais les leaders 2 avaient 96,4% d'identité. Concernant le promoteur core (-10, -35 et promoteur) a été trouvé pour les leaders 1 et leader

2 uniquement, les leaders 3 n'avaient que le promoteur. En recherchant les leaders 2, nous avons trouvé un système de transport ABC en amont (Figures 38 et 40).

		Nombre
	Total isolats séquencés	19
ion	Total isolats avec le système CRISPR-Cas	9
ribut	Total CRISPR arrays	13
Dist	Soustype I-E	5
	Soustype I-E*	4
	Total spacers	184
rs	Le nombre des spacers partagés (shared)	49
pace	Le nombre des spacers uniques	135
ing s	Spacers avec homologie	158
3last	Sans homologie	26
I up	Homologie avec phages	16
ultat	Homologie avec chromosomes	155
Rés	Homologie avec plasmides	18
	Spacers avec self-targeting	9

Tableau 14. Distribution des différents éléments du système CRISPR-Cas.



Figure 31. Séquences consensus des DR I-E et I-E* et leurs structures secondaires en ARN. La séquence consensus de DR du type I-E: Motif 1, Famille 1, Super classe B, L'énergie libre de l'ensemble thermodynamique est de -15,73 kcal / mol. La fréquence de la structure MFE dans l'ensemble est de 42,26%. La diversité de l'ensemble est de 1,80. La sequence consensus de DR du type I-E*: Motif 1, Super classe B, 95,3% d'identité, L'énergie libre de l'ensemble thermodynamique est de -12,09 kcal / mol. La fréquence de la structure MFE dans l'ensemble est de 52,87%. La diversité d'ensemble est de 0,56.



Figure 32. Alignement des séquences leaders 1 du système CRISPR-Cas sous-type I-E.

La taille des leaders 1 est de 96 pb avec 100% d'identité.



Figure 33. Aligements des séquences leaders 2 et 3 du système CRISPR-Cas sous-type I-E*.

Les tailles sont de 252 et 47 pb avec 93% et 100% d'identité respectivement.



Figure 34. Organisation et architecture des CRISPR-Cas systèmes des souches séquencées. BRE BOX (B Recognition Element).



Figure 35. Distribution des spacers dans les CRISPR loci avec les résultats du Blasting.

Spacers sont representés sous forme de box codés d'A1 à B89 sans répitition. Les speacers identiques ont les mêmes couleurs et codes. P: plasmids, V: virus or Phage, S: Self-target, RS: the reverse self-target, les spacers colorés en rouge n'avaient pas d'homologie. +: spacer plus long.

4.2.5 Eléments génétiques mobiles

4.2.5.1 Détection et identification des phages

Les séquences analysées en utilisant Phaster ont montré que toutes les souches avaient au moins un phage ou au maximum neuf phages. La transduction médiée par les phages conduit à l'évolution bactérienne et peut transférer des éléments génétiques mobiles. Les éléments génétiques mobiles ont mis au point des stratégies sophistiquées pour détourner les machines d'emballage de l'ADN du phage. Notre analyse a montré que le *bla_{CTX-M15}* est hébergé dans la séquence incomplète du processus PHAGE_Salmon_SJ46_NC_031129 qui un phage de *Salmonella*. Il se pourrait que les phages soient responsables de transfert horizontal de gène de résistance tel que *bla_{CTX-M15}* chez KP productrice de BLSE (Tableau 15).

4.2.5.2 Réplicons plasmides

En utilisant PlasmidFinder, 17 types de réplicons de plasmides de petits et de grands plasmides ont été détectés (tableau 15).

- Réplicons des grands plasmides : le réplicon FII(K) a été trouvé dans 13/19 des isolats. Le réplicon FIB(K) a également été trouvé dans plusieurs isolats de souches 12/19. Le réplicon FIB(pQil) a été trouvé dans 3 isolats et le FIB(Mar) dans deux isolats et il était présent simultanément avec le FIB(K).
- Groupe de plasmides incompatibilité : les réplicons identifiés provenaient des groupes d'incompatibilité plasmidique IncF, IncHI1, IncL/M, IncA/C2, IncR. Le réplicon IncHI1B n'a été détecté chez trois isolats. Le plasmide IncL/M a été détecté dans deux souches et le réplicon IncL/M (pOXA-48) a été trouvé dans une souche. Cette souche avait IncL/M (Poxa-48), IncFII(K) et IncFIB(K). IncA/C2 a été trouvé dans deux isolats et le réplicon IncR est présent dans quatre isolats.
- Groupe de plasmides de petites tailles (Col) : Quatre séquences de réplicons détectées, Col(RNAI) chez trois isolats, pVC dans un isolat, 440I dans des isolats d'arbres et 440II dans une seule souche. Nous avons noté la présence de Col (RNAI) et de Col440II dans une souche. Des plasmides de la famille Q1 ont également été trouvés dans trois des isolats.

abicau	13. Labicau des ciements mobiles replicons e	r propriages.	
Isolat	Réplicons	pMLST	Prohage (nombre)
246	IncFIB(pQil), IncHI1B, IncFII(K) ^e , IncFIA(H1) ^f	K5:A22:B-	Intact (3)
287	IncFIB(K) ^{c,} IncFII(K) ^{c,} IncR ^b	K2:A-:B-	Intact (3) Incomplet (4) Douteux (2)
352	IncL/M Col440II ^{e,} ColRNAI ^d	-	Intact (2) Incomplet (1) Douteux (1)
380	IncR, IncL/M, IncFIB(K) ^c , IncQ1 ^a , IncFII(K) ^b	K8:A-:B-	Intact (4) Incomplete (2)
383	IncFIB(pQil), IncFII(K) ^e	K5:A-:B-	Intact (1)
440	IncFIB(K) ^{e,} IncFII(K) ^f	K7:A-:B-	Intact (2)
448	IncFIB(K) ^{c,} IncFII(K) ^f	K7:A-:B-	Intact (3) Incomplete (1)
469	ColRNAI ^b IncHI1B ^{b,} IncN ^b , IncFII(K) ^f	K7:A-:B- IncN ST9	Intact (2) Incomplete (2) Douteux (1)
571	IncFIB(Mar), IncFIB(K) ^c , IncHI1B ^b , IncQ1 ^a	-	Intact (3) Incomplet (2) Douteux (1)
601	IncFIB(pQil), IncHI1B, IncFII(K) ^e , IncFIA(HI1) ^f Col44I ^e	F-:A-:B-	Intact (3)
631	IncL/M(pOXA-48), IncFIB(K) ^c , IncFII(K) ^c	K5:A22:B-	Intact (5) Douteux (1)
640	IncA/C2, IncFIB(K) ^{c,} IncFII(K) ^f , IncHI1B ^{b,} IncFIB(Mar) ^b	K2:A-:B- IncA/C2 ST3†	Intact (3) Incomplet (1)
644	$IncFIB(K)^{c}$, $IncFII(K)^{c}$	K2:A-:B-	Intact (5) Douteux (1)
657	IncHI1B, IncQ1 ^a	-	Intact (1) Douteux (4)
660	ColRNAI, IncFIB(K) ^b , IncR ^b , IncFII ^d	K9:A-:B-	Intact (3) Incomplet (1) Douteux (1)
666	IncFIB(K) ^e	F-:A-:B-	Intact (1) Incomplet (1) Douteux (1)
671	IncFIB(K) ^{c,} IncFII(K) ^f , Col44I ^e	K7:A-:B-	Intact (3)
676	IncR, IncA/C2_ST3, ColpVC ^e	IncA/C2 ST3	Intact (1) Douteux (3)
687	IncA/C2, IncFIB(K) ^f , (Col44I ^{f)})×2, IncFII(K) ^c	K7:A-:B- IncA/C2 ST 3, 9†	Intact (3) Incomplet (2) Douteux (2)

Tableau 15. Tableau des éléments mobiles réplicons et prophages.

Légende Tableau 15. (a): ID%=100% et le query/HSP different. (b): $99 \ge ID > 100$ et query/HSP était identique/bon. (c): $99\% > ID \ge 98\%$ et query/HSP était identique/bon. (d): ID 100% < et query/HSP different. (e): $97\% \ge ID > 98\%$ et query/HSP était identique/bon. (f): $95\% \ge ID > 97\%$ et query/HSP était identique/bon.

4.2.6 Arbre K-mer

Le K-mer est utilisé pour déduire le génome référence le plus proche et dans notre étude c'était le génome NC_022566 qui sera utilisé pour l'arbre core SNP (Figure 36).



Figure 36. Arbre K-mer.

4.3 Comparative génomique et analyse phylogénétique

4.3.1 Core SNP

Les séquences génomiques ont été interrogées à l'aide d'une analyse phylogénétique des SNP sur l'ensemble du génome. L'analyse a été effectuée à l'aide du CLC Genomics Workbench. L'analyse phylogénétique à base de SNP a révélé une forte discontinuité au sein des isolats; des isolats non apparentés étaient apparemment groupés en branches hétérogènes bien séparées les unes des autres (Figure 37 et Tableau 16). Au total, 85 965 SNP étaient présents dans l'alignement, avec 19 701 différences moyennes de SNP sur toutes les paires de séquences. Fait intéressant, l'analyse basée sur les SNP a fourni une résolution optimale, en particulier pour les ST identiques ; les isolats qui ont le ST1426 différaient avec 27 SNPs.





Tableau 16. Tableau des nombres de SNP entre les souches séquencées (Matrix SNPs).

																			_
660	660																		
352	19451	352																	
448	19781	20169	448																
666	20291	20467	20386	666															
383	20262	20142	20330	20293	383														
644	20573	20406	20510	20682	20637	644													
631	20564	20399	20501	20675	20630	27	631												
287	20983	20913	20986	21134	20925	19853	19844	287											
469	19225	19559	19242	19667	19592	18714	18707	19024	469										
601	21056	21185	21036	21195	21064	19676	19669	20546	18973	601									
246	21046	21177	21036	21191	21054	19668	19661	20538	18973	48	246								
640	21083	21148	20963	21195	21003	19665	19658	20527	18964	2446	2436	640							
571	20566	20538	20441	20683	20772	19647	19640	20329	18615	19250	19244	19370	571						
671	20662	20551	20548	20642	20544	19715	19712	20325	18675	19528	19522	19549	19512	671					
676	20783	20897	20848	21120	20820	20041	20034	20648	19153	19872	19864	19850	19126	20190	676				
657	20836	20848	20899	21083	20909	19728	19721	20446	19045	19666	19660	19634	18714	19874	12506	657			
440	20955	21079	20899	21069	20890	19729	19722	20194	19033	19806	19798	19823	19226	19854	18638	19211	440		
380	20732	20649	20555	20802	20623	19917	19910	20109	18797	19887	19881	19976	19833	19897	20054	19833	21079	380	
687	21047	21197	21084	21065	21230	20009	20002	20593	19232	20649	20645	20717	20085	20085	20656	20288	20074	20177	687

4.3.2 Core génome MLST

La base de données BIGSdb-Kp a été utilisée pour identifier le nombre d'allèles de cgMLST provenant de WGS de chaque isolat. Nous avons utilisé un ensemble de 632 gènes, définis comme le cgMLST strict. À première vue, ces résultats indiquent une sorte de congruence entre PFGE et MLST, à quelques exceptions près. Chaque groupe PFGE s'est vu attribuer un ST distinct. Le plus grand groupe C11 a identifié deux ST liées: ST392 et son SLV ST147. Deux groupes distincts (C9 et C10) ont montré avoir le même ST37.

Afin de mieux comprendre la relation clonale entre les isolats, nous avons utilisé la méthode MST basée sur les profils alléliques de cgMLS632. Le MST a révélé le caractère apparent des isolats et clairement montré le lien entre les ST. Comme le montre la figure 30, il y avait une grande divergence parmi les isolats expliquée par le nombre élevé de mésappariements alléliques (472 à 511). Fait intéressant, les MST démontrent une congruence totale entre cgMLST632 et PFGE. Trois isolats du groupe C11 se sont avérés être liés ensemble dans le même groupe clonal (Figure 44). L'analyse MST a révélé des relations intéressantes entre les isolats et a révélé la répartition des caractéristiques principales des isolats, tels que les facteurs de virulence, la catégorie des sites de résistance aux antibiotiques et d'infections (Figures 39 et 38).



Figure 38. MST cgMLST. Les cerles en couleurs montrent les souches qui ont les mêmes STs. En rouge le ST37, en bleu ST147 et en vert le ST1426.



Figure 39. Quatre MSTs selon la source de prélèvement et les profiles de virulence et résistance.

A: MST versus gènes de virulence, B: MST versus types infection, C:MST versus profil des gènes de résistance, D: MST versus MDR et classes de virulence. MDR:Multi-Drug Resistance. UTI: Urinary Tract Infection.

4.4 Annotation des résultats et superposition à l'arbre des SNPs

Le fichier de l'arbre a été téléchargé et associés avec les autres résultats en utilisant des couleurs pour le pourcentage de l'identification (Figure 40).



Figure 40. Heatmap annotation des résultats génomique associés à l'arbre de core SNPs. Sur les branches les nombres de SNPs qui diffère entre les souches proches. Le scale est modifié.

108

352_ST13_K3

660_ST14_K2

* *

+

IV. Discussion des résultats

L'analyse de 219 *Klebsiella spp*. des isolats provenant de différents services et sources ont montré que l'identification des espèces n'était pas cohérente. La spectrométrie MALDI-TOF est de plus en plus utilisée dans les laboratoires de microbiologie médicale, son pouvoir discriminatoire dépend de la base de données sous-jacente, qui nécessite une conservation et des mises à jour continues, en particulier lorsque des taxons étroitement liés tels que *Klebsiella spp*. sont analysés. Dans ce cas, les analyses basées sur le WGS sont mieux adaptées à l'identification des espèces (Rodrigues *et al.*, 2018; Wyres *et al.*, 2020). Conformément aux études précédentes, une proportion substantielle des isolats de l'étude 215/219 (98,17 %) ont été classés comme *K. pneumoniae* avec une bonne identification.

La méthode PFGE a permis de distinguer les souches et de définir avec précision les clones dominants. Actuellement, les approches de typage basées sur le WGS sont devenues une méthodologie de référence de typage internationale. En conséquence, le motif MLST à sept gènes peut facilement être extrait des données WGS; les génomes analysés peuvent être triés en 16 ST différentes. L'analyse MLST a montré que la propagation du BLSE-KP est largement multi-clonale, en revanche, la propagation internationale de KPC-KP est limitée à des clones spécifiques. Le PFGE et le MLST ont identifié que le plus grand cluster était ST147 (n = 35), ce type de séquence pose une grave menace pour la santé publique dans le monde. Notamment, ST147, ST23 et ST14 sont des clones épidémiques. Ces ST répartis dans le monde entier sont associés à la majorité des infections nosocomiales et communautaires à *K. pneumoniae* chez l'Humain (Paczosa et Mecsas, 2016; Wyres *et al.*, 2020). Néanmoins, le ST23 était rapporté chez *K. pnuemoniae* isolées du bétail et des animaux de compagnie (Anzai *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019).

Dans ce travail, nous rapportons la diversité de la multirésistance dans les isolats cliniques BLSE-KP entre 2011 et 2012, d'un hôpital «EHUO» à Oran, en Algérie. Phylogénétiquement, les isolats étaient génomiquement diversifiés et caractérisés par de multiples combinaisons d'ARG. Les BLSE sont généralement associées à une multirésistance et sont devenues un grand défi pour le contrôle des infections en santé humaine et ont entraîné un échec du traitement (Coelho *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013). Dans notre travail, le groupe CTX-M 1 a été trouvé dans presque tous les isolats (99%) et présenté plus tard *bla_{CTX-M-15}* dans les 19 isolats séquencés, ce qui était attendu en raison de sa prédominance dans la plupart des régions du monde (Livermore *et al.*, 2007; Tokajian *et al.*, 2015; Anssour *et al.*, 2016). Rodrigues *et al.*, (2014) ont rapporté que CTX-M-15 était associé à l'augmentation des

clones épidémiques MDR-KP (ST15, ST147 et ST336). Dans notre étude, deux isolats étaient ST147 et pourraient représenter un risque plus élevé dans le cadre nosocomial, en raison de la proportion à provoquer des éclosions. Les réplicons prédominants étaient IncFIIK et IncFIBK. Il a été rapporté que bla_{CTX-M-15} est principalement hébergé sur les plasmides IncFIIK dans les isolats de BLSE-KP et il a été décrit comme dynamique, avec la capacité de disséminer les ARG parmi les entérobactéries (Coelho et al., 2010; Dolejska et al., 2012). La combinaison caractéristique bla_{CTX-M-15}, bla_{TEM-1B}, bla_{OXA-1}, qnrB et aac (6')-Ib-cr a été trouvée dans 8/19 isolats et 7/8 étaient également associés au réplicon du groupe IncF qui était auparavant décrite partiellement au Maroc; les gènes bla_{CTX-M-15}, bla_{TEM-1b}, bla_{OXA-1}, aac(6')-Ib-cr et qnrB1 ont été co-transférés et portés par un plasmide conjugatif de haut poids moléculaire (Barguigua et al., 2013). En Algérie, le premier signalement de KP producteur d'OXA-48 localisé dans le plasmide de type IncL/M, appartenant au clone pandémique ST101, a été daté d'un isolement de souche en mai 2014 (Loucif et al., 2016). Dans la présente étude, le KP producteur d'OXA-48 a été isolé chez un patient souffrant d'une infection urinaire en 2012 et appartient au clone non épidémique ST1426, au réplicon IncL/M et au bla_{OXA-48} . Cela signifie que bla_{OXA-48} était présent avant le premier rapport officiel de l'Algérie.

En ce qui concerne les enzymes pAmpC, le type CMY-2 a été trouvé, présenté comme bla_{CMY-2} et bla_{CMY-16} . Le CMY-2 est le type d'enzyme AmpC le plus répandu avec la plus grande distribution géographique, y compris l'Algérie (Koeck et al., 1997; Iabadene et al., 2009). Au cours des deux dernières décennies, le PMQR a été signalé par l'acquisition des gènes qnr, qepA et aac(6')-Ib-cr (Poirel, Cattoir et Nordmann, 2008). Il a été précédemment décrit que le gène qnrB était le prédominant parmi les souches d'Afrique (Maroc, Sénégal, Cote d'Ivoire, Cameroun et le Madagascar) tandis que le gène qnrS était principalement détectée dans les souches du Vietnam (Breurec et al., 2013). Nos résultats ont montré une prévalence élevée de PMQR; les plus trouvés étaient aac(6')Ib-cr (71,5%) et qnrB (65,3%: 63,2% étaient qnrB1), et rarement qnrS (2%) présenté comme qnrS1 par séquençage. Le premier rapport de qnrS1, qnrB1 et qnrB4 isolés à partir d'isolats cliniques d'Enterobacter cloacae provenant d'hôpitaux algériens, en 2008 (Iabadene et al., 2008). A Alger, Klebsiella oxytoca isolée de l'hôpital de traitement des eaux usées avait des gènes PMQR (anrB1 et aac(6')Ib-cr) (Anssour et al., 2016). Cette étude est le premier rapport de qnrS1 dans le BLSE-KP en Algérie. Comme décrit précédemment, les isolats cliniques porteurs de armA ont été associés aux plasmides IncL/M, avec la présence concomitante du bla_{CTX-M3} (Bercot et *al.*, 2008). De plus, *armA* a été identifié sur des plasmides IncN, chez des animaux (Anssour *et al.*, 2016). Dans la présente étude, *armA* a été trouvé dans deux isolats (352 et 469); l'un avait un réplicon IncL/M et le second réplicon IncN typé ST9. Ainsi, nous suggèrons que le contact animal et la nourriture (viande animale) représentent un réservoir potentiel et une voie de dissémination du plasmide IncN hébergeant *armA* aux humains par HGT.

Mais aussi, une séquence incomplète du phage de salmonelle a été trouvée hébergeant $bla_{CTX-M-15}$. Il a été précédemment décrit que les bactériophages pourraient contribuer à la propagation des ARG parmi les entérobactéries isolées des animaux et de la nourriture, mettant en évidence le rôle de HGT des ARG et bla_{CTX-M} en particulier (Zhang et LeJeune, 2008; Rodriguez-Lazaro *et al.*, 2017). Ainsi, les prophages pourraient être un réservoir pour propager les ARG par transduction. Cette étude est le premier rapport que la séquence incomplète d'un phage de *salmonella* (SJ46_NC_031129) hébergeant *bla_{CTX-M15}* dans la production de *K. pneumoiae* productrice de BLSE isolée à partir des isolats 469 et 571.

Dans cette étude, les outils du Centre d'épidémiologie génomique fournissent des résultats en quelques minutes, selon la réponse du serveur. Comme nous nous y attendions, tous les isolats très virulents et résistants portaient des réplicons de grands plasmides permettant la propagation horizontale de gènes de résistance et de facteurs de virulence. Pour la caractérisation précise des plasmides et la détection des gènes portés, il serait nécessaire d'isoler les plasmides et de les séquencer.

Dans la litérature, pour les souches virulentes ou hypervirulentes de *K.pneumoniae* sont plus retrouvées dans les cas d'infection communuataire que les infections nosocomiales. Certains gènes de virulence tel que les gènes d'hypermucosité sont souvent associés avec l'hypervirulence de *K.pneumoniae*. Le gène chromosomique de la « Mucoviscosity-Associated Gene A » (*magA*) était découvert en 2004 est retrouvé chez les souches qui ont le K-type, K1 (Fang *et al.*, 2004, 2010; Yu *et al.*, 2006). Ce gène n'était pas trouvé dans cette étude.

Plusieurs sérotypes d'antigènes K ont été rapportés dans le monde, les plus étudiés étaient K1 et K2 car ils étaient associés à une infection grave (Vernet *et al.*, 1995; Fang *et al.*, 2010; Jung *et al.*, 2013; Follador *et al.*, 2016). Il a été constaté que le K1 était associé à ST23 et le K2 a été trouvé dans plusieurs ST: 25, 65, 86, 380, 14, 66, 374, 493 et 1013 (Cubero *et al.*, 2019). En plus *magA* deux autres gènes plasmidiques « Regulators of Mucoid

112

Phenotype » (*rmpA* et *rmpA2*) sont connus comme des gènes de la régulatuion de la transcription de deux gènes chromosomique qui codent pour la capsule (*wzi* et *wzc*), et donc du phénotype d'hypermucosité des souches hypervirulentes (Lin *et al.*, 2019). Dans cette étude, les isolats virulents étaient K2 (ST14), K3 (ST13), K6 (ST348), K31 (ST2108) et K151 (ST405). Mais les souches HV sont les souches 383 et 469 ils ont le K-type K1 et K2 respectivement, car elles possedaient les gènes *rmpA* et *rmpA2* (Tableau 14).

L'analyse MST a donné un aperçu des différentes caractéristiques, de leur combinaison et de leur lien. La figure 2 a montré que trois isolats de CG147 étaient isolés d'origines différentes, présentaient peu de facteurs de virulence (classiques) et MDR. Concernant le CG1426, les isolats apparentés étaient également isolés d'origines distinctes, possédaient peu de facteurs de virulence et ne présentaient pas les mêmes profils ARG. Le profil MDR et Virulent a été observé dans 6 des 19 (2 sang et 4 autres prélèvements). L'association MDR et Virulent présente un risque sanitaire élevé en augmentant la mortalité et les antibiotiques moins efficaces. Il a été rapporté que la prévalence de MDR-Virulent-KP est en augmentation et ce rapport fournirait des arguments supplémentaires pour améliorer la sensibilisation clinique pour MDR-virulent-KP (Liu *et al.*, 2018).

Le système CRISPR-Cas n'est pas largement distribué dans les génomes de K. pneumoniae, typé I-E et I-E* avec peu de différences par rapport à l'arrangement des gènes. Ostria Hernandez et al., (2015) Ont rapporté que ce système était constitué de huit gènes cas dont les gènes cas identifiés étaient, de 5' à 3 ': cas3, cse1, cse2, cse3, cse4, cas5e, cas1 et cas2. Les systèmes CRISPR-Cas sont impliqués dans la limitation de l'entrée d'ADN étranger dans les bactéries et les archées et ont également été associés à l'expression de facteurs de virulence dans les bactéries. Ainsi, selon Bondy-Denomy et al, il est difficile de trouver des informations sur le contenu des spacers, le pourcentage de ceux-ci présentant une concordance avec une séquence connue ou de celles uniques à une espèce spécifique dans les publications et fournissant un point de vue fondamental sur la fonctionnalité de ce système. Ces données seront utiles pour interpréter les fonctions de ces systèmes dans les souches étudiées et amélioreront notre compréhension de l'évolution bactérienne, ainsi que de l'impact du transfert horizontal de gènes dans l'environnement et la santé humaine (Bondy-Denomy et al., 2013). Dans trois études, le système CRISPR-Cas dans les génomes de KP avait une prévalence variable comprise entre 11,5% et 54,4% (Ostria-Hernández et al., 2015; Shen et al., 2017; Sangal et al., 2018).

Une relation a pu être observée entre les ST, le type CRISPR-Cas et les types d'échantillons; concernant les infections urinaires, de 6 isolats: 4 n'avaient pas de système CRISPR-Cas et 2 avaient un système CRISPR-Cas typé IE tandis que 7 isolats isolés à partir d'échantillons de sang, 3 isolats n'avaient pas de système CRISPR-Cas, 3 isolats avaient un sous-type IE *, un isolat avait IE. Dans une autre étude, le type IE a été trouvé dans des isolats provenant principalement d'échantillons d'infection urinaire et ayant ST34, ST45, ST66, ST67, ST147, ST273, ST383, ST392 et ST941, tandis que le sous-type IE * a été trouvé dans des isolats d'échantillons sanguins présents dans ST14, ST 15, ST23, ST111, ST374, ST493 et ST505 (Ostria-Hernández et al., 2015). La longueur de la séquence leader est variable, mais doit être d'au moins 60 pb et peut aller jusqu'à 500 pb (Jansen et al., 2002; Yosef et al., 2012). Apparemment, la longueur de la séquence est relativement conservée au sein d'une espèce. Les longueurs des leaders corroborent avec les travaux antérieurs de Shen et al., (2017) paradoxalement, les leaders 3 manquaient (-10) et (-35) des sites nécessaires à la transcription du array. Yosef et al., (2012) ont suggéré que les sites (-10) et (-35) sont essentiels pour l'interférence et non pour le processus d'adaptation. Ainsi, les spacers self-target dans les loci en aval des leaders 3 ne pourraient pas avoir de fonction d'auto-immunité.

Contrairement à l'approche phylogénétique basée sur les SNP, elle a identifié des isolats étroitement apparentés qui avaient été précédemment obtenus par PFGE et cgMLST, mais avec une résolution beaucoup plus fine. En outre, l'analyse phylogénétique a révélé la congruence entre l'analyse basée sur sur le SNP et le cgMLST, en particulier au sein d'isolats étroitement apparentés. Au cours de notre étude, nous avons utilisé trois approches pour évaluer la relation génétique entre les isolats. Le PFGE, qui est une méthode basée sur la bande, a été considéré pendant les dernières décennies comme le «gold standard» pour les enquêtes sur les épidémies. En raison de son niveau de résolution élevé, la méthode PFGE a permis de distinguer les souches et de définir avec précision les clones dominants.

Parallèlement à cgMLST, nous avons utilisé tous les SNP partagés entre les isolats et nous avons construit une phylogénie profonde qui fournissait des résultats fiables et concordants. En réalité, et selon nos résultats, l'approche basée sur le SNP a fourni une résolution bien meilleure et un comportement très discriminant dans la caractérisation des isolats. Ce fait n'est pas surprenant puisque nous n'avons pas procédé à une comparaison équitable. En effet, nous avons utilisé deux approches différentes, l'une basée sur tous les SNP des génomes et l'autre sur 632 gènes strictement conservés. De nos jours, la majorité des analyses sont basées sur des approches basées sur le SNP qui ont fourni une résolution exceptionnellement élevée. Cependant, ces approches sont plus flexibles car elles ne sont pas soumises à des schémas prédéfinis. Les analyses dépendent de la qualité du séquençage, de l'assemblage et essentiellement de la sélection du génome de référence. En conséquence, de telles approches tendent à être moins normalisées et peuvent entraver la comparabilité entre différentes études, en particulier si différents paramètres sont utilisés, à savoir un génome de référence différent. L'analyse des SNP du génome complet et cgMLST, en particulier parmi les isolats étroitement apparentés.

Le cgMLST632 est plus apte à gérer les ambiguïtés et les incertitudes données par le MLST traditionnel. Le schéma cgMLST632 a permis de distinguer les souches apparentées et non apparentées, même entre celles qui avaient la même ST, par exemple. ST147 et ST1426. Plus que cela, le cgMLST632 ajoute plus de résolution sur deux isolats de ST37, qui différaient de 294 locus. Afin de vérifier ce fait, nous avons téléchargé tous les isolats de ST37 du BIGSdb-Kp. Un MST a été établie sur la base de leurs profils cgMLST; le résultat a montré une grande complexité au sein de ces isolats (Figures 38 et 39). En fait, avec cet accord, les isolats de ST37 sont hétérogènes et peuvent en théorie être membres de lignées différentes.

Zhou *et al.*, (2017) ont conçu un schéma étendu de cgMLST basé sur un total de 1143 gènes conservés de 671 génomes KP. Le nouveau cgMLST a pu distinguer les isolats épidémiques des isolats non épidémiques et a mis en évidence la possibilité de révéler plusieurs sous-clones du clone épidémique ST11. En outre, sur la base de cette cgMLST, un seuil avec une différence d'allèles <10 a été appliqué pour le regroupement des souches d'épidémie. Dans le même contexte, peu d'études ont validé ce seuil strict (<10 différence d'allèles) pour tracer des grappes locales et régionales de KPC ST512 à partir de plusieurs établissements de santé en Finlande, et pour rechercher un éventuel lien épidémiologique entre les isolats multi-resitante de KP ST348 chez les chevaux et les humains au Portugal (Giraud *et al.*, 2019; Van Beek *et al.*, 2019).

En plus de cgMLST, nous avons mené une analyse basée sur le SNP et construit une phylogénie profonde qui a fourni des résultats fiables et concordants. Premièrement, à la différence entre les isolats au sein de ST identiques; Les isolats ST1426 différaient avec 27 SNP et deuxièmement, savoir que l'occurrence des isolats 631 et 644 était sporadique malgré leur date de clôture d'isolement (1 mois); les isolats ont montré une légère différence dans leurs profils de résistance et de types de réplicon (Figures 39 et 40). En particulier, le *bla_{0XA-48}* et son type de réplicon associatif IncL/M ont été restreints uniquement dans l'isolat 631. Les mêmes caractéristiques pour les deux isolats (601 et 246 avaient tous deux ST147) à l'exception qui différait avec 48 SNP et isolés séparément dans un intervalle de temps d'un an. Ces isolats sont éloignés de leur SLV ST392 (2465 SNP). Dans le même contexte de ST identiques (ST37), l'amplitude du polymorphisme atteint 12506 SNPs (Tableau 16), en raison d'un événement de recombinaison majeur. L'analyse basée sur le SNP a fourni un aperçu de la diversité génétique des clones détectés de BLSE-KP et a prouvé sa capacité à mettre facilement à l'échelle les différences de SNP parmi les isolats non liés et étroitement liés. Cependant, on ne sait toujours pas si un seuil SNP simple ou strict est approprié pour la définition de cas d'une épidémie. Les seuils de SNP varient considérablement même pour un agent pathogène et la difficulté à définir le seuil d'allèle /SNP reste un sujet de discussion dans les simulations d'épidémie (Schürch *et al.*, 2018).

Prises ensemble, les données WGS sont de plus en plus utilisées pour caractériser et typer les isolats bactériens. Il est important de noter que ces données peuvent fournir des informations détaillées sur les génotypes, tels que les profils MLST pour la compatibilité ascendante. De plus, les informations basées sur le WGS peuvent également fournir d'autres données de sous-typage, telles que la prédiction *in silico* du résistome, du virulome, des sérotypes et du système CRISPRs-Cas.

V. Conclusions et perspectives

Les données de surveillance et d'épidémiologie de la résistance aux antimicrobiens en Afrique en général et en Algérie en particulier sont encore rares. Les rapports du système de surveillance algérien ne sont statistiquement pas représentatifs de la situation; peu de laboratoires collaborent par rapport à la taille du pays. Pour compléter les approches actuelles, la surveillance génomique sentinelle du MDR-Virulent-KP pourrait être d'une grande importance pour la santé publique en Algérie.

Cette étude a révélé la dissémination de *K. pneumoniae* productrices de BLSE dans l'EHUO et a montré que l'hôpital est un réservoir de lignées hautement pathogènes. Surtout, WGS a fourni un aperçu plus approfondi de la caractérisation épidémiologique des principaux clones, y compris le résistome, le virulome, le typage de réplicons plasmidiques, le typage de phages et le contenu CRISPR-Cas. L'analyse basée sur le cgMLST et le core SNP a pu montrer la relation phylogénétique entre les clones étudiés; notre découverte a mis en évidence une propagation polyclonale de BLSE-KP avec une grande diversité génétique. En outre, les analyses basées sur les SNP ont fourni une résolution optimale pour les isolats cliniques et ont indiqué qu'il n'y avait aucune preuve d'une épidémie classique entre 2011 et 2012 dans cet hôpital. En termes de résistome et de virulome, les souches pandémiques ont démontré un profil MDR et /ou virulent. Ces souches pandémiques posent un sérieux défi pour la prévention clinique, le diagnostic et le traitement. Sans aucun doute, il existe un besoin d'approches plus complètes pour mieux comprendre l'évolution et la transmission de ces clones à haut risque. A notre connaissance, il s'agit du premier signalement de *qnrS1*, des gènes de virulence et du système CRISPR-Cas chez *K. pneumoniae* en Algérie.

De nos jours, la majorité des analyses sont basées sur des approches basées sur SNP qui ont fourni une résolution exceptionnellement élevée. Cependant, ces approches sont en revanche plus souples car elles ne sont pas soumises à des schémas prédéfinis. Les analyses dépendent de la qualité du séquençage, de l'assemblage et essentiellement de la sélection du génome de référence. Par conséquent, ces approches ont tendance à être moins standardisées et peuvent entraver la comparabilité entre différentes études, en particulier si différents paramètres sont utilisés, c'est-à-dire un génome de référence différent.

Eventuellement, il serait intéressant de retester les souches ou d'autres pour la colistine pour determiner la concentration minimale inhibitrice par microdilution en milieu liquide et non pas par difussion milieu gélosé. Puis de séquencer plus de souches de *K. pneumoniae* et de d'autres espèces des entérobactéries sur le territoire algérien et de faire une étude unifiée dans le but de surveillance de la résistance et de l'hygiène dans les hôpitaux avec la collaboration des cliniciens. D'autre part, les infections communautaires et des personnes qui ont voyagé doivent être rapporté et étudié de plus prés. Faire des analyses poussées pour déterminer l'environoment des gènes de la résistance et la virulence surtout les élements génétique mobile telque les élements transposables et les sequences d'insertion qui ont un rôle dans la dissimination de la résistance aux antibiotiques et la virulence.

Il faudra faire des études approfondies en agroalimentaire éssentiellement, élevage des animaux d'être aussi surveiller car les éleveurs utilisent des antibiotiques pour traiter les animaux destinés à l'alimentation et donc pourrait jouer un rôle dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques.

Enfin, les isolats de BLSE-KP provoquent des infections nosocomiales et donc des problèmes de santé publique, et la surveillance génomique doit être une priorité en milieu hospitalier.

Références bibliographiques

A

Ahn C, Yoon S, Yong T, Jeong S, Lee K. The Resistance Mechanism and Clonal Distribution of Tigecycline-Nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Korea. Yonsei Med J. 2016;57(3):641-646. doi:10.3349/ymj.2016.57.3.641

Aklujkar M, Lovley DR. Interference with histidyl-tRNA synthetase by a CRISPR spacer sequence as a factor in the evolution of *Pelobacter carbinolicus*. BMC Evol Biol. 2010;10(230). doi:10.1186/1471-2148-10-230

Alamy. https://www.alamyimages.fr/photos-images/klebsiella-pneumonia.html. https://www.alamyimages.fr/photos-images/klebsiella-pneumonia.html. Published 2021.

Allen BL, Gerlach GF, Clegg S. Nucleotide sequence and functions of mrk determinants necessary for expression of type 3 fimbriae in Klebsiella pneumoniae. J Bacteriol. 1991;173(2):916-920. doi:10.1128/jb.173.2.916-920.1991

Al-Marzooq F, Yasim M, Yusof M, Tay ST. Molecular Analysis of Ciprofloxacin Resistance Mechanisms in Malaysian ESBL-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates and Development of Mismatch Amplification Mutation Assays (MAMA) for Rapid Detection of gyrA and parC Mutations. Biomed Res Int. 2014;2014:601630-601640. doi:10.1155/2014/601630

Alshammari M, Ali Al-Skhattat H. Detection of plasmid-me- diated quinolone resistance genes in clinical and environmen- tal hospital isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Al-Najaf City. Kufa J Nurs Sci. 2015;5(2):1-9.

Ambler RP. The structure of beta-lactamases. Philos Trans R Soc L B Biol Sci. 1980;289(1036):321-331. doi:10.1098/rstb.1980.0049

Aminov RI. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. Article. 2010;1(1). doi:10.3389/fmicb.2010.00134

Andrade LN, Vitali L, Gaspar GG, Bellissimo-Rodrigues F, Martinez R, Darini ALC. Expansion and evolution of a virulent, extensively drug-resistant (polymyxin B-resistant), QnrS1-, CTX-M-2-, and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 international high-risk clone. J Clin Microbiol. 2014;52(7):2530-2535. doi:10.1128/JCM.00088-14

Anssour L, Messai Y, Estepa V, Torres C, Bakour R. Characteristics of ciprofloxacin-resistant *Enterobacteriaceae* isolates recovered from wastewater of an Algerian hospital. J Infect Dev Ctries. 2016;10(7):728-734. doi:10.3855/jidc.6727

Antoniadou A, Kontopidou F, Poulakou G, et al. Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster. J Antimicrob Chemother. 2007;59:786-790. doi:10.1093/jac/dkl562

Anzai EK, de Souza Júnior JC, Peruchi AR, et al. First case report of non-human primates (Alouatta clamitans) with the hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* serotype K1 strain ST 23:

A possible emerging wildlife pathogen. J Med Primatol. 2017;46(6):337-342. doi:10.1111/jmp.12296

Arakawa, Y Wacharotayankun, R Nagatsuka T, Ito H, Kato N, Ohta M. Genomic organization of the *Klebsiella pneumoniae* cps region responsible for serotype K2 capsular polysaccharide synthesis in the virulent strain Chedid. J Bacteriol. 1995;177(7):1788-1796. doi:10.1128/jb.177.7.1788-1796.1995

Arndt D, Grant JR, Marcu A, et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. Nucleic Acids Res. 2016;44. doi:10.1093/nar/gkw387

Avril JL, Dabernat H, Denis F, Monteil H. Bactériologie Clinique. 2éme éditi. (Ellipses, ed.). Paris; 2000.

Β

Bach S, De Almeida A, Carniel E. The Yersinia high-pathogenicity island is present in dijerent members of the family *Enterobacteriaceae*. FEMS Microbiol Lett. 2000;letter 138:289-294. doi:10.1111/j.1574-6968.2000.tb08973.x

Bachman MA, Oyler JE, Burns SH, et al. *Klebsiella pneumoniae* yersiniabactin promotes respiratory tract infection through evasion of lipocalin 2. Infect Immun. 2011;79(8):3309-3316. doi:10.1128/IAI.05114-11

Bali EB, Açık L, Sultan N. Phenotypic and molecular characterization of SHV, TEM, CTX-M and extended-spectrum -lactamase produced by *Escherichia coli*, *Acinobacter baumannii* and *Klebsiella* isolates in a Turkish hospital. African J Microbiol Res. 2010;4(8):650-654.

Baraniak A, Izdebski R, Fiett J, et al. Comparative population analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum β -lactamases colonizing patients in rehabilitation centers in four countries. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(4):1992-1997. doi:10.1128/AAC.02571-12

Barguigua A, Otmani F El, Talmi M, et al. Prevalence and genotypic analysis of plasmidmediated β-lactamases among urinary *Klebsiella pneumoniae* isolates in Moroccan community. J Antibiot (Tokyo). 2013;66:11-16. doi:10.1038/ja.2012.91

Bercot B, Poirel L, Nordmann P. Plasmid-Mediated 16S rRNA Methylases among Extended-Spectrum-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* Isolates. Antimicrob Chemother. 2008;52(12):4526-4527. doi:10.1128/AAC.00882-08

Bergogne-Bérézin P, Dellamonica E. ANTIBIOTHERAPIE EN PRATIQUE CLINIQUE. (Masson, ed.). Paris; 1995.

Bialek-Davenet S, Criscuolo A, Ailloud F, et al. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. Emerg Infect Dis. 2014;20(11):1812-1820. doi:10.3201/eid2011.140206

Bialek-Davenet S, Lavigne J-P, Guyot K, et al. Differential contribution of AcrAB and OqxAB efflux pumps to multidrug resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother. 2015;70(1):81-88. doi:10.1093/jac/dku340

Blomberg B, Jureen R, Manji KP, et al. High rate of fatal cases of pediatric septicemia caused by gram-negative bacteria with extended-spectrum beta-lactamases in Dar es Salaam, Tanzania. J Clin Microbiol. 2005;43(2):745-749. doi:10.1128/JCM.43.2.745-749.2005

Bondy-Denomy J, Pawluk A, Maxwell KL, Davidson AR. Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. Nature. 2013;493(7432):429-432. doi:10.1038/nature11723

Bonomo ME, Deem MW. The physicist's guide to one of biotechnology's hottest new topics: CRISPR-Cas. Phys Biol. 2018;15:041002. doi:10.1088/1478-3975/aab6d6

Bradford PA, Kazmierczak KM, Biedenbach DJ, Wise MG, Hackel M, Sahm F. Correlation of β -Lactamase Production and Colistin Resistance among *Enterobacteriaceae* Isolates from a Global Surveillance Program. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60(3):1385-1392. doi:10.1128/AAC.01870-15.Address

Branas P, Villa J, Viedma E, Mingorance J, Orellana MA, Chaves F. Molecular epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Madrid: Successful establishment of an OXA-48 ST11 clone. Int J Antimicrob Agents. 2015;46(1):111-116. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.02.019

Breurec S, Guessennd N, Timinouni M, et al. *Klebsiella pneumoniae* resistant to thirdgeneration cephalosporins in five African and two Vietnamese major towns: Multiclonal population structure with two major international clonal groups, CG15 and CG258. Clin Microbiol Infect. 2013;19(4):349-355. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03805.x

Brink AJ, Coetzee J, Clay CG, et al. Emergence of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1) and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC-2) in South Africa. J Clin Microbiol. 2012;50(2):525-527. doi:10.1128/JCM.05956-11

Brisse S, Grimont F, Grimont PAD. The Genus *Klebsiella*. The Prokaryotes. 2006:159-196. doi:https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X_8

Brisse S, Passet V, Grimont PAD. *Klebsiella michiganensis* sp. nov., a new bacterium isolated from a tooth brush holder. Curr Microbiol. 2013;66(1):72-78. doi:10.1099/ijs.0.062737-0

Brock JH, Williams PH, Liceaga J, Wooldridge KG. Relative availability of transferrin-bound iron and cell-derived iron to aerobactin-producing and enterochelin-producing strains of *Escherichia coli* and to other microorganisms. Infect Immun. 1991;59(9):3185-3190. doi:10.1128/iai.59.9.3185-3190.1991
Bullen JJ, Rogers HJ, Griffiths E. IRON BINDING PROTEINS AND INFECTION. Br J Haematol. 1972;23:389-392. doi:Bullen, J.J., https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1972.tb07073.x

Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of-Lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(3):969-976. doi:10.1128/AAC.01009-09

С

Capone A, Giannella M, Fortini D, et al. High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality. Clin Microbiol Infect. 2012;19(1):E23-E30. doi:10.1111/1469-0691.12070

Carattoli A, Zankari E, Garciá-Fernández A, et al. In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(7):3895-3903. doi:10.1128/AAC.02412-14

Carniel E. The Yersinia high-pathogenicity island: An iron-uptake island. Microbes Infect. 2001;3(7):561-569. doi:10.1016/S1286-4579(01)01412-5

Carrër A, Poirel L, Yilmaz M, et al. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(3):1369-1373. doi:10.1128/AAC.01312-09

Carvalho I, Nadia Safia C, Paula C, et al. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring extended spectrum β -lactamase encoding genes isolated from human septicemias. PLoS One. 2021;16(5):e0250525. doi:10.1371/journal.pone.0250525

Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D, Bell JM, Jones RN, Mendes RE. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing *Enterobacteriaceae* in Indian hospitals: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(3):1274-1278. doi:10.1128/AAC.01497-10

Cavallo J-D, Fabre R, Jehl F, Rpp C, Garrabé E. Bêtalactamines. EMC-Maladies Infect. 2004.

Cheng N-C, Tai H-C, Chang S-C, Chang C-H, Lai H-S. Necrotizing fasciitis in patients with diabetes mellitus: clinical characteristics and risk factors for mortality. BMC Infect Dis. 2015. doi:10.1186/s12879-015-1144-0

Chou HC, Lee CZ, Ma LC, Fang CT, Chang SC, Wang JT. Isolation of a chromosomal region of *Klebsiella pneumoniae* associated with allantoin metabolism and liver infection. Infect Immun. 2004;72(7):3783-3792. doi:10.1128/IAI.72.7.3783-3792.2004

Coelho A, González-López JJ, Miró E, et al. Characterisation of the CTX-M-15-encoding gene in *Klebsiella pneumoniae* strains from the Barcelona metropolitan area: Plasmid diversity and chromosomal integration. Int J Antimicrob Agents. 2010;36(1):73-78. doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.03.005

Conlan S, Park M, Deming C, et al. Plasmid dynamics in KPC-positive *Klebsiella pneumoniae* during long-term patient colonization. MBio. 2016;7(3):1-9. doi:10.1128/mBio.00742-16

Coque TM, Novais A, Gonzalez-Zorn B, et al. Phenotypic and Molecular Characterization of Antimicrobial Resistance in *Klebsiella spp*. Isolates from Companion Animals in Japan: Clonal Dissemination of Multidrug-Resistant Extended-Spectrum Phenotypic and Molecular Characterization of Antimicrobial Res. Front Microbiol. 2016;7:Artical 1021. doi:10.3389/fmicb.2016.01021

Courvalin P, Denis F, Ploy M-C, Garilhe MP DE, Trieu-Cuot P. ANTIBIOTIQUES. In: Encyclopæd. ; 2001. http://www.universalisedu.com/encyclopedie/antibiotiques/.

Courvalin P. La Résistance Des Bactéries Aux Antibiotiques : Combinaisons de Mécanismes Biochimiques et Génétiques. Bulletin d. (Académie vétérinaire de France P, ed.). Paris; 2008.

Cubero M, Id SM, Ngeles Domínguez A', Gonzá Lez-Díaz A, Berbelid D, Ardanuy C. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* serotype K1 clinical isolates form robust biofilms at the air-liquid interface. PLoS One. 2019;14(9):e0222628. doi:10.1371/journal.pone.0222628

Cusa E, Obradors N, Baldomà L, Badía J, Aguilar J. Genetic analysis of a chromosomal region containing genes required for assimilation of allantoin nitrogen and linked glyoxylate metabolism in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1999;181(24):7479-7484. doi:10.1128/jb.181.24.7479-7484.1999

D

D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD. Sampling the antibiotic resistome. Science (80-). 2006;311(5759):374-377. doi:10.1126/science.1120800

da Silva Y, Ferrari R, Marin VA, Junior CAC. A Global Overview of β -lactam Resistance Genes in *Klebsiella pneumoniae*. Open Infect Dis J. 2019;11(1):22-34. doi:10.2174/1874279301911010022

Davies J, Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. Microbiol Mol Biol Rev. 2010;74(3):1092-2172. doi:10.1128/MMBR.00016-10

Davis B, Lilly HA, Lowbury EJL. Gram-negative bacilli in burns. J clin Path. 1969;22:634-641. doi:10.1136/jcp.22.6.634

Denisuik AJ, S Lagacé -Wiens PR, Pitout JD, et al. Molecular epidemiology of extendedspectrum b-lactamase-, AmpC b-lactamase-and carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Canadian hospitals over a 5 year period: CANWARD 2007-11 on behalf of the. J Antimicrob Chemother. 2013;68(1):i57-i65. doi:10.1093/jac/dkt027 Diene SM, Bertelli C, Pillonel T, Schrenzel J, Greub G. Génomique et métagénomique bactériennes : applications cliniques et importance médicale. Rev Med Suisse. 2014;10(450):2155-2161.

Dolejska M, Brhelova E, Dobiasova H, et al. Dissemination of IncFIIK-type plasmids in multiresistant CTX-M-15-producing *Enterobacteriaceae* isolates from children in hospital paediatric oncology wards. Int J Antimicrob Agents. 2012;40(6):510-515. doi:10.1016/J.IJANTIMICAG.2012.07.016

Domenico P, Salo R, Cross A, Cunha B. Polysaccharide capsule-mediated resistance to opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun. 1994;62(10):4495-4499. doi:10.1128/iai.62.10.4495-4499.1994

Doublet B. Caractérisation des éléments génétiques mobiles du gène de résistance au florfénicol floR chez *Salmonella enterica* et *Escherichia coli*. 2004.

Drlica K, Zhao X. DNA Gyrase, Topoisomerase IV, and the 4-Quinolones. Microbiol Mol Biol Rev. 1997;61(3):377-392. <u>http://mmbr.asm.org/</u>.

E

Eftekhar F, Seyedpour SM. Prevalence of qnr and aac(6')-Ib-cr Genes in Clinical Isolates of *Klebsiella Pneumoniae* from Imam Hussein Hospital in Tehran. Iran J Med Sci Novemb. 2015;40(6).

El Fertas-Aissani R, Messai Y, Alouache S, Bakour R. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. Pathol Biol. 2013;61(5):209-216. doi:10.1016/j.patbio.2012.10.004

Epaulard O, Brion Jean-P. Phénicolés (chloramphénicol et thiamphénicol). In: em-consulte, ELSEVIER MASSON; 2009. doi:10.1016/S1634-6939(09)45855-1

F

Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. Perspect Medicin Chem. 2014;6:25-64. doi:10.4137/PMc.s14459

Fang C-T, Chuang Y-P, Shun C-T, Chang S-C, Wang J-T. A Novel Virulence Gene in *Klebsiella pneumoniae* Strains Causing Primary Liver Abscess and Septic Metastatic Complications. J Exp Med J Exp Med. 2004;199(5):697-705. doi:10.1084/jem.20030857

Fang C-T, Lai S-Y, Yi W-C, Hsueh P-R, Liu K-L, Chang S-C. *Klebsiella pneumoniae* Genotype K1: An Emerging Pathogen That Causes Septic Ocular or Central Nervous System Complications from Pyogenic Liver Abscess. Clin Infect Dis. 2007;45:284–93. doi:10.1086/519262

Fang C-T, Lai S-Y, Yi W-C, Hsueh P-R, Liu K-L. The Function of wzy_K1 (magA), the Serotype K1 Polymerase Gene in *Klebsiella pneumoniae* cps Gene Cluster. J Infect Dis. 2010;201:1268-1269. doi:10.1086/652183

Farris J. Methods for computing Wagner trees. Syst Biol. 1970;19(1):83–92. doi:10.1093/sysbio/19.1.83

Fauchère JL. Bactériofiches. Techniques En Bactériologie Clinique. Ellipses.; 1997.

Feizabadi MM, Mohammadi-Yeganeh S, Mirsalehian A, et al. Genetic characterization of ESBL-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* from Tehran hospitals. J Infect Dev Ctries. 2010;4(10):609-615. www.ncbi.nlm.nih.gov=BLAST.

Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. J Mol Evol. 1981;17:368–376. doi:10.1007/BF01734359

Fischbach MA, Lin H, Liu DR, Walsh CT. How pathogenic bacteria evade mammalian sabotage in the battle for iron. Nat Chem Biol. 2006;2(3):132-138. doi:10.1038/nchembio771

Fischbach MA, Lin H, Liu DR, Walsh CT. In vitro characterization of IroB, a pathogenassociated C-glycosyltransferase. Proc Natl Acad Sci. 2005;102(3):571–576. www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0408463102.

Fischbach MA, Lin H, Zhou L, et al. The Pathogen-Associated IroA Gene Cluster Mediates Bacterial Evasion of Lipocalin 2.; 2006. www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0604636103.

Fitch W. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specified tree topology. Syst Zool. 1971;20(4):406-416. doi:10.2307/2412116

Follador R, Heinz E, Wyres KL, et al. The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides. Microb genomics. 2016;2(8):e000073. doi:10.1099/mgen.0.000073

Frasson I, Lavezzo E, Franchin E, et al. Antimicrobial treatment and containment measures for an extremely drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST101 isolate carrying pKPN101-IT, a novel fully sequenced blaKPC-2 plasmid. J Clin Microbiol. 2012;50(11):3768-3772. doi:10.1128/JCM.01892-12

Freney JRF, Hansen W, Bollet T. Précis de Bactériologie Clinique. Éditions E.; 2000.

Furuya EY, Lowy FD. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. Nat Rev Microbiol. 2006;4(11):36-45. doi:10.1038/nrmicro1325

G

GanewattaMS, TangC. Controllingmacromolecularstructurestowardseffectiveantimicrobialpolymers.Polymer(Guildf).2015;63:A1-A29.doi:10.1016/j.polymer.2015.03.007

Ginn AN, Wiklendt AM, Zong Z, et al. Prediction of major antibiotic resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Singapore, USA and China using a limited set of gene targets. Int J Antimicrob Agents. 2014;43(6):563-565. doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.02.010

Giraud E, Ruan Z, Oliveira M, et al. Commonality of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* ST348 Isolates in Horses and Humans in Portugal. Front Microbiol. 2019;10:Artical 1657. doi:10.3389/fmicb.2019.01657

Giske CG, Fröding I, Hasan CM, et al. Diverse sequence types of *Klebsiella pneumoniae* contribute to the dissemination of bla NDM-1 in India, Sweden, and the United Kingdom. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(5):2735-2738. doi:10.1128/AAC.06142-11

Giske CG, Sundsfjord AS, Kahlmeter G, et al. Redefining extended-spectrum b-lactamases: balancing science and clinical need. Antimicrob Chemother. 2009;63(1):1-4. doi:10.1093/jac/dkn444

González-Zorn B, Teshager T, Casas M, et al. armA and Aminoglycoside Resistance in *Escherichia coli*. Emerg Infect Dis. 2005;11(6):954-956. www.cdc.gov/eid.

Gosset P, Fourneau A, Brichet A-B, et al. Outer Membrane Protein A from *Klebsiella pneumoniae* Activates Bronchial Epithelial Cells: Implication in Neutrophil Recruitment Activates Bronchial Epithelial pneumoniae Klebsiella Outer Membrane Protein A from. J Immunol. 2003;171:6697-6705. doi:10.4049/jimmunol.171.12.6697

Η

Hantke K, Nicholson G, Rabsch W, Winkelmann G. Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(7):3677-3682. www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0737682100.

Hasegawa M, Fujiwara M. Relative efficiencies of the maximum likelihood, maximum parsimony, and neighbor-joining methods for estimating protein phylogeny. Mol Phylogenet Evol. 1993;2(1):1-5. doi:10.1006/mpev.1993.1001

Hernández J, Martínez-Martínez L, Cantón R, Coque T, Pascual A, Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH). Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(5):2122-2125. doi:10.1128/AAC.49.5.2122

Hernández-Allés S, Conejo M, Pascual A, Tomás J, Benedí V, Martínez-Martínez L. Relationship between outer membrane alterations and susceptibility to antimicrobial agents in isogenic strains of *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother. 2000;46(2):273-277. doi:10.1093/jac/46.2.273

Hsieh P-F, Lin T-L, Lee C-Z, Tsai S-F, Wang J-T. Serum-Induced Iron-Acquisition Systems and TonB Contribute to Virulence in *Klebsiella pneumoniae* Causing Primary Pyogenic Liver Abscess. 2008. doi:10.1086/588383

Hsieh P-F, Liu J-Y, Pan Y-J, et al. *Klebsiella pneumoniae* Peptidoglycan-Associated Lipoprotein and Murein Lipoprotein Contribute to Serum Resistance, Antiphagocytosis, and Proinflammatory Cytokine Stimulation. J Infect Dis. 2013;208(10):1580-1589. doi:10.1093/infdis/jit384

Hsu C-R, Lin T-L, Chen Y-C, Chou H-C, Wang J-T. The role of *Klebsiella pneumoniae* rmpA in capsular polysaccharide synthesis and virulence revisited. Microbiol. 2011;157(Pt 12):3446-3457. doi:10.1099/mic.0.050336-0

Ι

Iabadene H, Messai Y, Ammari H, et al. Dissemination of ESBL and Qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria. J Antimicrob Chemoth. 2008;62:133-136. doi:10.1093/jac/dkn145

Iabadene H, Messai Y, Ammari H, et al. Prevalence of plasmid-mediated AmpC β -lactamases among *Enterobacteriaceae* in Algiers hospitals. Int J Antimicrob Agents. 2009;34(4):340-342. doi:10.1016/J.IJANTIMICAG.2009.05.011

Izadi N, Nasab MN, Mood EH, Meshkat Z. The Frequency of qnr Genes in Extended-Spectrum β -lactamases and non-ESBLs *Klebsiella pneumoniae* Species Isolated from Patients in Mashhad, Iran. J Pathol Iran J Pathol. 2017;12(4):377-383

J

Jacobsen SM, Stickler DJ, Mobley HLT, Shirtliff ME. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. Clin Microbiol Rev. 2008;21(1):26-59. doi:10.1128/CMR.00019-07

Jagnow J, Clegg S. *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. Microbiology. 2003;149(9):2397-2405. doi:10.1099/mic.0.26434-0

Jain A, Hopkins KL, Turton J, et al. NDM carbapenemases in the United Kingdom: an analysis of the first 250 cases. 2014. doi:10.1093/jac/dku084

Jansen R, van Embden JDA, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. Mol Microbiol. 2002;43(6):1565-1575.

Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *enterobacteriaceae*: Hospital prevalence and susceptibility patterns. Clin Infect Dis. 1988;10(4):867-878. doi:10.1093/clinids/10.4.867

Jayol A, Poirel L, Dortet L, Nordmann P. National survey of colistin resistance among carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and outbreak caused by colistin-resistant OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*, France, 2014. Euro Surveill. 2016;21(37):30339. doi:10.2807/1560-7917

Jeannin P, Magistrelli G, Goetsch L, et al. Outer membrane protein A (OmpA): A new pathogen-associated molecular pattern that interacts with antigen presenting cells - Impact on vaccine strategies. In: Vaccine. Vol 20. Elsevier; 2002:A23-A27. doi:10.1016/S0264-410X(02)00383-3

Jung S, Chae H, Park Y, et al. Microbiological and clinical characteristics of bacteraemia caused by the hypermucoviscosity phenotype of *Klebsiella pneumoniae* in Korea. Epidemiol Infect. 2013;141:334-340. doi:10.1017/S0950268812000933

Κ

Kä Llman O, Motakefi A, Wretlind B, Olsson-Liljequist B, Giske CG. Cefuroxime nonsusceptibility in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* overexpressing ramA and acrA and expressing ompK35 at reduced levels. J Antimicrob Chemother. 2008;62(5):986-990. doi:10.1093/jac/dkn296

Kapoor G, Saigal S, Elongavan A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. J Anaesthesiol Clin Pharmacol. 2017;33(3):300-305. doi:10.4103/joacp.JOACP_349_15

Karah N, Poirel L, Bengtsson S, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and aac(6')-Ib-cr in *Escherichia coli* and *Klebsiella spp*. from Norway and Sweden. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010;66(4):425-431. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2009.12.004

Karaiskos I, Souli M, Galani I, Giamarellou H. Colistin: still a lifesaver for the 21st century? Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2017;13(1):59-71. doi:10.1080/17425255.2017.1230200

Kareem SM, Al-kadmy IM, Kazaal SS, et al. Detection of gyrA and parC Mutations and Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in *Klebsiella pneumoniae*. Infect Drug Resist. 2021;Volume 14:555-563. doi:10.2147/IDR.S275852

Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. MAFFT online service : multiple sequence alignment , interactive sequence choice and visualization. Brief Bioinform. 2019;20(July 2017):1160-1166. doi:10.1093/bib/bbx108

Keller JJ, Tsai MC, Lin CC, Lin YC, Lin HC. Risk of infections subsequent to pyogenic liver abscess: A nationwide population-based study. Clin Microbiol Infect. 2013;19(8):717-722. doi:10.1111/1469-0691.12027

Khoshnood S, Heidary M, Hashemi A, et al. Involvement of the AcrAB Efflux Pump in Ciprofloxacin Resistance in Clinical *Klebsiella Pneumoniae* Isolates. Infect Disord - Drug Targets. 2020;2. doi:https://doi.org/10.2174/1871526520999200905121220

Koeck J, Arlet G, Philippon A, et al. A plasmidmediated CMY2 lactamase from an Algerian clinical isolate of *Salmonella senftenberg*. FEMS Microbiol Lett. 1997;Letter 152:255-260. doi:10.1111/j.1574-6968.1997.tb10436.x

Krause KM, Serio AW, Kane TR, Connolly LE. Aminoglycosides: An Overview. Cold Spring Harb Perspect Med. 2016;6(6):a027029. doi:10.1101/cshperspect.a027029

L

Lahlaoui H, Ben Haj Khalifa A, Ben Moussa M. Epidemiology of *Enterobacteriaceae* producing CTX-M type extended spectrum β -lactamase (ESBL). Med Mal Infect. 2014;44(9):400-404. doi:10.1016/j.medmal.2014.03.010

Lai YC, Peng HL, Chang HY. Identification of genes induced in vivo during *Klebsiella pneumoniae* CG43 infection. Infect Immun. 2001;69(11):7140-7145. doi:10.1128/IAI.69.11.7140-7145.2001

Landman D, Bratu S, Kochar S, et al. Evolution of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY. J Antimicrob Chemother. 2007;60(1):78-88. doi:10.1093/jac/dkm129

Larsen M V, Cosentino S, Rasmussen S, et al. Multilocus Sequence Typing of Total-Genome-Sequenced Bacteria. J Clin Microbiol. 2012;50(4):1355–1361. doi:10.1128/JCM.06094-11

Lawlor MS, O'Connor C, Miller VL. Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection. Infect Immun. 2007;75(3):1463-1472. doi:10.1128/IAI.00372-06

Le Minor L, Véron M. Bactériologie Médicale. 2éme éditi. Paris; 1989.

Lee B, Yeroushalmi K, Sojitra P, et al. Case Report Community Acquired *Klebsiella Pneumoniae* Meningitis: A Case Report.; 2018. www.germs.ro.

Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. Nucleic Acids Res. 2021;49:W293-W296. doi:10.1093/nar/gkab301

Liam C, Lim K, Wong C. Community-acquired pneumonia in patients requiring hospitalization. Respirology. 2001;6(3):259-264. doi:10.1046/j.1440-1843.2001.00336.x

Lin T, Wu C, Kuo J, Chu H, Lee D, Lin C. FNR-Dependent RmpA and RmpA2 Regulation of Capsule Polysaccharide Biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae*. Front Med. 2019;10:2436. doi:10.3389/fmicb.2019.02436

Liu C, Shi J, Guo J. High prevalence of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* infection in the genetic background of elderly patients in two teaching hospitals in China. Infect Drug Resist. 2018;11:1031-1041. doi:10.2147/IDR.S161075

Liu YY, Wang Y, Walsh TR, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis. 2016;16(2):161-168. doi:10.1016/S1473-3099(15)00424-7

Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. J Antimicrob Chemother. 2007;59:165-174. doi:10.1093/jac/dkl483

Livermore DM. Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. Vol 8.; 1995.

Livermore DM. Mechanisms of resistance to cephalosporin antibiotics. Drugs. 1987;34 Suppl 2:64-88. doi:1910.2165/00003495-198700342-00007

Llobet E, Campos M, Giménez P, Moranta D, Bengoechea J. Analysis of the networks controlling the antimicrobial-peptide-dependent induction of *Klebsiella pneumoniae* virulence factors. Infect Immun. 2011;79(9):3718-3732. doi:10.1128/IAI.05226-11

Llobet E, Martínez-Moliner V, Moranta D, et al. Deciphering tissue-induced *Klebsiella pneumoniae* lipid a structure. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(46):E6369-E6378. doi:10.1073/pnas.1508820112

Loman NJ, Quick J, Simpson JT. A complete bacterial genome assembled de novo using only nanopore sequencing data. Nat Methods. 2015;12(8):733-735. doi:10.1038/nmeth.3444

Lopez P, Casane D, Philippe H. Phylogénie et évolution moléculaires. Med Sci. 2002;18(11):1146-1154. doi:10.1051/medsci/200218111146

Loucif L, Kassah-Laouar A, Saidi M, Messala A, Chelaghma W, Rolain JM. Outbreak of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* involving a sequence type 101 clone in Batna University Hospital, Algeria. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60(12):7494-7497. doi:10.1128/AAC.00525-16

Μ

Ma L, Lin CJ, Chen JH, et al. Widespread dissemination of aminoglycoside resistance genes armA and rmtB in *Klebsiella pneumoniae* isolates in Taiwan producing CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(1):104-111. doi:10.1128/AAC.00852-08

Machuca J, Briales A, Labrador G, et al. Interplay between plasmid-mediated and chromosomal-mediated fluoroquinolone resistance and bacterial fitness in *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemoth. 2014;69:3203-3215. doi:10.1093/jac/dku308

Mackow NA, Shen J, Adnan M, Id ASK, Fries C, Id ED. CRISPR-Cas influences the acquisition of antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae*. PLOSONE. 2019;14(11):1-13. doi:10.1371/journal.pone.0225131

Magi A, Semeraro R, Mingrino A, Giusti B, Aurizio RD'. Nanopore sequencing data analysis: state of the art, applications and challenges. Br Bioinform. 2018;19(6):1256-1272. doi:10.1093/bib/bbx062

Magill SS, Edwards JR, Stat M, et al. Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care-Associated Infections. N Engl J Med. 2014;13:1198-1208. doi:10.1056/NEJMoa1306801

Majumdar D, Yu S, Fookes J, Mcateer MP, Llobet SP, Finn E. Elucidation of the RamA Regulon in *Klebsiella pneumoniae* Reveals a Role in LPS Regulation. PLoS Pathog. 2015;11(1):1004627. doi:10.1371/journal.ppat.1004627

Maltezou HC, Giakkoupi P, Maragos A, et al. Outbreak of infections due to KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Crete (Greece). J Infect. 2009;58(3):213-219. doi:10.1016/j.jinf.2009.01.010

Marque G, Merino S, Toma JM, et al. Analysis of Complement C3 Deposition and Degradation on. Microbiology. 1996;64(11):4726-4732.

Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby G. Quinolone resistance from a transferable plasmid. Lancet. 1998;351(9105):797–99. doi:doi: 10.1016/S0140-6736(97)07322-4

Mathers AJ, Hazen KC, Carroll J, et al. First clinical cases of OXA-48-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the united states: The "menace" arrives in the new world. J Clin Microbiol. 2013;51(2):680-683. doi:10.1128/JCM.02580-12

Mathur S, Singh R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - A review. Int J Food Microbiol. 2005;105(3):281-295. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008

McDonald ND, Regmi A, Morreale DP, Borowski JD, Fidelma Boyd E. CRISPR-Cas systems are present predominantly on mobile genetic elements in Vibrio species. BMC Genomics. 2019;20(1):1-23. doi:10.1186/s12864-019-5439-1

Meatherall BL, Gregson D, Ross T, Pitout JDD, Laupland KB. Incidence, Risk Factors, and Outcomes of *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia. Am J Med. 2009;122(9):866-873. doi:10.1016/j.amjmed.2009.03.034

Merino S, Camprubi S, Alberti S, Benedi VJ, Tomas JM. Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. Infect Immun. 1992;60(6):2529-2535. doi:10.1128/iai.60.6.2529-2535.1992

Michaud V. DÉTECTION ET CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRES RAPIDES DU VIRUS DE LA PESTE PORCINE AFRICAINE ET UTILISATION DES RECONSTRUCTIONS PHYLOGÉNÉTIQUES POUR RECONSTITUER SON HISTOIRE ÉVOLUTIVE. 2012.

Miethke M, Marahiel MA. Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. Microbiol Mol Biol Rev. 2007;71(3):413-451. doi:10.1128/mmbr.00012-07

Miranda G, Castro N, Leaños B, et al. Clonal and Horizontal Dissemination of *Klebsiella pneumoniae* Expressing SHV-5 Extended-Spectrum β -Lactamase in a Mexican Pediatric Hospital. J Clin Microbiol. 2004;42(1):30-35. doi:10.1128/JCM.42.1.30-35.2004

Moradigaravand D, Martin V, Peacock SJ, Parkhill J. Evolution and Epidemiology of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United Kingdom and Ireland. 2017. doi:10.1128/mBio.01976-16

Morita Y, Nicoloff H, Giani T, et al. The Rapid Emergence of Tigecycline Resistance in bla KPC-2 Harboring *Klebsiella pneumoniae*, as Mediated in Vivo by Mutation in tetA During Tigecycline Treatment. 2018. doi:10.3389/fmicb.2018.00648

Mshana SE, Hain T, Domann E, Lyamuya EF, Chakraborty T, Imirzalioglu C. Predominance of *Klebsiella pneumoniae* ST14 carrying CTX-M-15 causing neonatal sepsis in Tanzania. BMC Infect Dis. 2013;13(1). doi:10.1186/1471-2334-13-466

Müller SI, Marianne AE, Ae V, Hantke K. Salmochelin, the long-overlooked catecholate siderophore of *Salmonella*. Biometals. 2009;22:691–695. doi:10.1007/s10534-009-9217-4

Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C. Janeway's Immunobiology. 8th ed. (Garland Science, ed.). New York, NY; 2012

Ν

Naeem A, Lal Badshah S, Muska M, Ahmad N, Khan K. molecules The Current Case of Quinolones: Synthetic Approaches and Antibacterial Activity. Molecules. 2016;21(4):268-287. doi:10.3390/molecules21040268

Nam YS, Cho SY, Yang HY, et al. Investigation of mutation distribution in DNA gyrase and topoisomerase IV genes in ciprofloxacin-non-susceptible *Enterobacteriaceae* isolated from blood cultures in a tertiary care university hospital in South Korea, 2005-2010. Int J Antimicrob Agents. 2013;41(2):126-129. doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.10.004

Nasehi L, Shahcheraghi F, Nikbin VS, Nematzadeh S. PER, CTX-M, TEM and SHV betalactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* isolated from Tehran, Iran. Iran J Basic Med Sci. 2010;13(3):111-118.

Nassif X, Sansonetti PJ. Correlation of the Virulence of Klebsiella pneumoniae KI and K2 with the Presence of a Plasmid Encoding Aerobactin. Infect Immun. 1986;54(3):603-608.

Nauciel C, Vildé JL. Bactériologie Médicale. (MASSON, ed.).; 2001.

Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev. 2017;41(3):252-275.doi:10.1093/femsre/fux013

Neuman M. Vade-Mecum Des Antibiotiques et Agents Chimiothérapiques Anti-Infectieux. 5ème editi. (Maloine, ed.). Paris; 1990.

Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. Clin Microbiol Infect. 2014;20(9):821-830. doi:10.1111/1469-0691.12719

Ο

Ostria-Hernández ML, Sánchez-Vallejo CJ, Ibarra JA, Castro-Escarpulli G. Survey of clustered regularly interspaced short palindromic repeats and their associated Cas proteins (CRISPR/Cas) systems in multiple sequenced strains of *Klebsiella pneumoniae*. BMC Res Notes. 2015;8:332. doi:10.1186/s13104-015-1285-7

Ρ

Paczosa MK, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. Microbiol Mol Biol Rev. 2016;80(3):629-661. doi:10.1128/MMBR.00078-15

Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Bengoechea JA, Albertí S. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(1):177-183. doi:10.1128/AAC.00715-09

Pan Y-J, Lin T-L, Chen Y-H, et al. Capsular Types of *Klebsiella pneumoniae* Revisited by wzc Sequencing. PLoS One. 2013;8(12):e80670. doi:10.1371/journal.pone.0080670

Pasom W, Chanawong A, Lulitanond A, Wilailuckana C, Kenprom S, Puang-Ngern P. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes, Aac(6')-Ib-Cr, QnrS, QnrB, and QnrA, in Urinary Isolates of Escherichia Coli and Klebsiella Pneumoniae at a Teaching Hospital, Thailand. Vol 66.; 2013. http://www.ncbi.nlm.nih.gov. Accessed June 16, 2021.

Pasteran FG, Otaegui L, Guerriero L, et al. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. Emerg Infect Dis. 2008;14(7):1178-1180. doi:10.3201/eid1407.080161

Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum Beta-Lactamases : a Clinical Update. Clin Microbiol Rev. 2005;18(4):657-686. doi:10.1128/CMR.18.4.657

Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, et al. Extended-Spectrum β -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Isolates from Seven Countries: Dominance and Widespread Prevalence of SHV- and CTX-M-Type β -Lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(11):3554-3560. doi:10.1128/AAC.47.11.3554-3560.2003

Peirano G, Seki LM, Val Passos VL, Pinto MCFG, Guerra LR, Asensi MD. Carbapenemhydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. J Antimicrob Chemother. 2009;63(2):265-268. doi:10.1093/jac/dkn484

Prescott LM, Willey JM, Sherwood LM, Christopher J Woolverton. Microbiologie de Prescott. (Boeck D, ed.). De Boeck; 2003.

Perry RD, Balbo PB, Jones HA, Fetherston JD, Demoll E. Yersiniabactin from *Yersinia pestis*: biochemical characterization of the siderophore and i t s role in iron transport and regulation. Microbiology. 1999;145:1181-1190.

Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-Determined AmpC-Type-Lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46(1):1-11. doi:10.1128/AAC.46.1.1-11.2002

Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. 2015. doi:10.1128/AAC.01019-15

Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev. 1998;11(4):589-603. doi:10.1128/cmr.11.4.589

Poirel L, Cattoir V, Nordmann P. Is plasmid-mediated quinolone resistance a clinically significant problem? Clin Microbiol Infect. 2008;14(4):295-297. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01930.x

Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(1):15-22. doi:10.1128/AAC.48.1.15-22.2004

Poirel L, Nordmann P, Ducroz S, Boulouis H-J, Arné P, Millemann Y. Extended-Spectrum-Lactamase CTX-M-15-Producing *Klebsiella pneumoniae* of Sequence Type ST274 in Companion Animals. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(5):2372–2375. doi:10.1128/AAC.02622-12

Poirel L, Revathi G, Bernabeu S, Nordmann P. Detection of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Kenya. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(2):934-936. doi:10.1128/AAC.01247-10

Polyana S, Pereira CF, Machado De Araujo LM, et al. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). J Antimicrob Chemother. 2013;68:312-316. doi:10.1093/jac/dks396

Poole K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. Clin Microbiol Infect. 2004;10(1):12-26. doi:10.1111/j.1469-0691.2004.00763.x

Posada D, Crandall K. The Effect of Branch Length Variation on the Selection of Models of Molecular Evolution. Syst Biol. 2001;50(4):580-601. doi:10.1007/s002390010173

Q

Qi Y, Wei Z, Ji S, Du X, Shen P, Yu Y. ST11, the dominant clone of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. J Antimicrob Chemother. 2011;66:307-312. doi:10.1093/jac/dkq431

Quainoo SA, Coolen JPM, van Hijum SAFT, et al. Whole-Genome Sequencing of Bacterial Pathogens : the Future of Nosocomial Outbreak Analysis. cilinal Microbiol Rev. 2017;30(4):1015-1064.

Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: The versatile β -lactamases. Clin Microbiol Rev. 2007;20(3):440-458. doi:10.1128/CMR.00001-07

R

Rahn, O. 1937. New principles for the classification of bacteria. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. II. 96: 273–286

Regueiro V, Moranta D, Frank CG, et al. *Klebsiella pneumoniae* subverts the activation of inflammatory responses in a NOD1-dependent manner. 2010. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01526.x

Ribot E, Fair M, Gautom R, et al. Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of. FOODBORNE Pathog Dis. 2006;3(1):59-67.

Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. lancet Infect Dis. 2006;6:629-640.

Rodrigues C, Machado E, Ramos H, Peixe L, Novais Â. Expansion of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in hospitalized patients: A successful story of international clones (ST15, ST147, ST336) and epidemic plasmids (IncR, IncFIIK). Int J Med Microbiol. 2014;304(8):1100-1108. doi:10.1016/j.ijmm.2014.08.003

Rodrigues C, Passet V, Rakotondrasoa A, Brisse S. Identification of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella quasipneumoniae*, *Klebsiella variicola* and Related Phylogroups by MALDI-TOF Mass Spectrometry. Front Microbiol. 2018;9:3000. doi:10.3389/fmicb.2018.03000

Rodriguez-Lazaro D, Burgess CM, Maylin Loc-Carrillo C, et al. Bacteriophages Contribute to the Spread of Antibiotic Resistance Genes among Foodborne Pathogens of the *Enterobacteriaceae* Family – A Review. Front Microbiol. 2017;8:1108. doi:10.3389/fmicb.2017.01108

Rosen DA, Hilliard JK, Tiemann KM, Todd EM, Morley SC, Hunstad DA. The Journal of Infectious Diseases *Klebsiella pneumoniae* FimK Promotes Virulence in Murine Pneumonia. 2015. doi:10.1093/infdis/jiv440

Russo TA, Olson R, Macdonald U, Metzger D, Maltese LM, Drake EJ. Aerobactin Mediates Virulence and Accounts for Increased Siderophore Production under Iron-Limiting Conditions by Hypervirulent (Hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. Am Soc Microbiol. 2014;82(22):356-2367. doi:10.1128/IAI.01667-13

S

Saadatian Farivar A, Nowroozi J, Eslami G, Sabokbar A. RAPD PCR Profile, Antibiotic Resistance, Prevalence of armA Gene, and Detection of KPC Enzyme in *Klebsiella pneumoniae* Isolates. 2018. doi:10.1155/2018/6183162

Saha R, Farrance CE, Verghese B, Hong S, Donofrio RS. *Klebsiella michiganensis* sp. nov., A New Bacterium Isolated from a Tooth Brush Holder. Curr Microbiol. 2013;66(1):72-78. doi:10.1007/s00284-012-0245-x

Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol. 1987;4(4):406–425. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454

Sangal V, Bagattini M, Karah N, et al. Characterization of CRISPR-Cas Systems in Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates Uncovers Its Potential Association With Antibiotic Susceptibility. Front Med | www.frontiersin.org. 2018;9:1595. doi:10.3389/fmicb.2018.01595

Sanger F, Air G, Barrell B, et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. Nature. 1977;265(5596):687-695. doi:10.1038/265687a0

Sattar H, Toleman M, Nahid F, Zahra R. Co-existence of blaNDM-1 and blaKPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Pakistan. J Chemother. 2016;28(4):346-349. doi:10.1179/1973947814Y.0000000223

Schürch AC, Arredondo-Alonso S, Willems RJL, Goering R V. Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches. Clin Microbiol Infect. 2018;24(4):350-354. doi:10.1016/j.cmi.2017.12.016

Schurtz Sebghati TA, Korhonen TK, Hornick DB, Clegg S. Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains. Infect Immun. 1998;66(6):2887-2894. doi:10.1128/iai.66.6.2887-2894.1998

Sekhri-Arafa N. Fréquence et marqueurs épidémiologiques de *Klebsiella pneumoniae* dans les services à haut risque infectieux au niveau du CHU Benbadis de Constantine. 2010. https://bu.umc.edu.dz/theses/biologie/SEK6124.pdf.

Sekyere JO, Govinden U, Bester LA, Essack SY. Colistin and tigecycline resistance in carbapenemase-producing Gram-negative bacteria: emerging resistance mechanisms and detection methods. 2016. doi:10.1111/jam.13169

Shen J, Lv L, Wang X, Xiu Z, Chen G. Comparative analysis of CRISPR-Cas systems in *Klebsiella* genomes. J Basic Microbiol. 2017;57(4):325-336. doi:10.1002/jobm.201600589

Silva-Sánchez J, Cruz-Trujillo E, Barrios H, Reyna-Flores F, Sánchez-Pérez A. Characterization of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance (PMQR) Genes in Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* Pediatric Clinical Isolates in Mexico. PLoS One. 2013;8(10):77968. doi:10.1371/journal.pone.0077968

Singleton P. Bactériologie Pour La Médecine, La Biologie et Les Biotechnologies. 6ème. (DUNOD, ed.).; 2005.

Skeggs PA, Thompson J, Cundliffe E. Methylation of 16S ribosomal RNA and resistance to aminoglycoside antibiotics in clones of Streptomyces lividans carrying DNA from Streptomyces tenjimariensis. Molec Gen Genet. 1985;200:415–421. doi:doi.org/10.1007/BF00425725

Sokal R, Michener AC. A statistical method for evaluating systematic relationships. Univ Kansas Sci Bull. 1958;38:1409-1438.

Solovyev V V. Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences. In Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmenta... In: Li RW, ed. Metagenomics and Its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies. Nova Science Publishers; 2011:61-78.

Souli M, Galani I, Antoniadou A, et al. An Outbreak of Infection due to b-Lactamase *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase 2-Producing *K. pneumoniae* in a Greek University Hospital: Molecular Characterization, Epidemiology, and Outcomes. Clin Infect Dis. 2010;50:364–373. doi:10.1086/649865

Stahlhut SG, Tchesnokova V, Struve C, et al. Comparative structure-function analysis of mannose-specific FimH adhesins from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. J Bacteriol. 2009;191(21):6592-6601. doi:10.1128/JB.00786-09

Stock I, Wiedemann B. Natural antibiotic susceptibility of *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola*, *K. ornithinolytica* and *K. terrigena* strains. J Med Microbiol. 2001;50(5):396-406. doi:10.1099/0022-1317-50-5-396

Stover CM, Sim RB, Reid K, et al. Complement system part II: role in immunity. Article. 2015;6:1. doi:10.3389/fimmu.2015.00257

Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: A multifaceted threat. Clin Microbiol Rev. 2009;22(4):664-689. doi:10.1128/CMR.00016-09

Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. Infect Immun. 2008;76(9):4055-4065. doi:10.1128/IAI.00494-08

Szczepankowska A. Role of CRISPR/ Cas System in the Development of Bacteriophage Resistance. Vol 82. Advances i. Elsevier Inc.; 2012. doi:10.1016/B978-0-12-394621-8.00011-X

Т

Tarkkanen AM, Westerlund-Wikström B, Erkkilä L, Korhonen TK. Immunohistological localization of the MrkD adhesin in the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun. 1998;66(5):2356-2361. doi:10.1128/iai.66.5.2356-2361.1998

Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V, et al. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. Vol 33.; 1995. https://journals.asm.org/journal/jcm.

Tofteland S, Haldorsen B, Dahl KH, Simonsen GS, Steinbakk M, Walsh TR, et al. Effects of phenotype and genotype onmethods for detection of extended-spectrum-β-lactamase-producing clinical isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in Norway. J Clin Microbiol. 2007;45(1): 199–205. doi:10.1128/JCM.01319-06

Tokajian S, Eisen JA, Jospin G, Farra A, Coil DA. Whole genome sequencing of extendedspectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from a patient in Lebanon. Front Cell Infect Microbiol | www.frontiersin.org. 2015;5(32). doi:10.3389/fcimb.2015.00032

Tollentino FM, Polotto M, Nogueira ML, et al. High Prevalence of bla CTX-M Extended Spectrum Beta-Lactamase Genes in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from a Tertiary Care Hospital: First report of bla SHV-12, bla SHV-31, bla SHV-38, and bla CTX-M-15 in Brazil. Microb Drug Resist. 2011;17(1):7-16. doi:10.1089/mdr.2010.0055

Touati A, Mairi A. Carbapenemase-Producing Enterobacterales in Algeria: A Systematic Review. Microb Drug Resist. 2020;26(5):475-482. doi:10.1089/mdr.2019.0320

Tripathi A, Sudip, Dutta K, Majumdar M, Dhara L, Banerjee D, Roy K. High Prevalence and Significant Association of ESBL and QNR Genes in Pathogenic *Klebsiella pneumoniae* Isolates of Patients from Kolkata, India. Indian J Microbio. 2012;5(4):557-54. doi:10.1007/s12088-012-0281-z

Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psichogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: An evolving crisis of global dimensions. Clin Microbiol Rev. 2012;25(4):682-707. doi:10.1128/CMR.05035-11

V

Van Beek J, Räisänen K, Broas M, et al. Tracing local and regional clusters of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* ST512 with whole genome sequencing, Finland, 2013 to 2018. Euro Surveill. 2019;24(38):1800522. doi:10.2807/1560-7917.ES.2019.24.38.1800522

Van Der Bij AK, Pitout JDD. The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemoth. 2012;67:2090–100. doi:10.1093/jac/dks214

Venkataramana Geetha P, Vijaya K, Aishwarya L, Mariappan S, Sekar U. Fluoroquinolone Resistance in Clinical Isolates of *Klebsiella Pneumoniae*. J Lab Physicians. 2020;12:121-125. doi:10.1055/s-0040-1716478

Vernet V, Philippon A, Madoulet C, Vistelle R, Jaussaud R, Chippaux C. Virulence Factors (Aerobactin and Mucoid Phenotype) in *Klebsiella Pneumoniae* and *Escherichia Coli* Blood Culture Isolates. Vol 30.; 1995. doi:10.1111/j.1574-6968.1995.tb07697.x

W

Wachino JI, Arakawa Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: An update. Drug Resist Updat. 2012;15(3):133-148. doi:10.1016/j.drup.2012.05.001

Walsh C. Antibiotics: Actions, Origins, Resistance. American Society for Microbiology; 2003. doi:10.1128/9781555817886

Wang A, Yang Y, Lu Q, et al. Presence of qnr gene in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* resistant to ciprofloxacin isolated from pediatric patients in China. 2008. doi:10.1186/1471-2334-8-68

Wang X, Chen G, Wu X, et al. Increased prevalence of carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* in hospital setting due to cross-species transmission of the bla NDM-1 element and clonal spread of progenitor resistant strains. Front Microbiol. 2013;1:595. doi:10.3389/fmicb.2015.00595

Wick RR, Heinz E, Holt KE, Wyres KL. Kaptive Web: User-Friendly Capsule and Lipopolysaccharide Serotype Prediction for *Klebsiella* Genomes. J Clin Microbiol. 2018;56(6):e00197-e00218. doi:10.1128/JCM.00197-18

Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. J Antimicrob Chemother. 2006;57(1):154-155. doi:10.1093/jac/dki412

Woodford N, Zhang J, Warner M, et al. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. J Antimicrob Chemother. 2008;62:1261-1264. doi:10.1093/jac/dkn396

Wu YH, Chen PL, Hung YP, Ko WC. Risk factors and clinical impact of levofloxacin or cefazolin nonsusceptibility or ESBL production among uropathogens in adults with community-onset urinary tract infections. J Microbiol Immunol Infect. 2014;47(3):197-203. doi:10.1016/j.jmii.2012.09.001

Wyres KL, C Lam MM, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. Nat Rev Microbiol. 2020;18:344-359. doi:10.1038/s41579-019-0315-1

Y

Yosef I, Goren MG, Qimron U. Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res. 2012;40:5569-5576. doi:10.1093/nar/gks216

Yu WL, Ko W-C, Cheng K-C, et al. Association between rmpA and magA Genes and Clinical Syndromes Caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. 2006;42:1351-1358. https://academic.oup.com/cid/article/42/10/1351/277546.

Yu WL, Ko WC, Cheng KC, Lee CC, Lai CC, Chuang YC. Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008;62(1):1-6. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2008.04.007

Ζ

Zacharczuk K, Piekarska K, Szych J, et al. Plasmid-borne 16s rRNA methylase ArmA in aminoglycoside-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Poland. J Med Microbiol. 2011;60(9):1306-1311. doi:10.1099/jmm.0.024026-0

Zankari E, Allesøe R, Joensen KG, Cavaco LM, Lund O, Aarestrup FM. PointFinder: A novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. J Antimicrob Chemother. 2017;72(10):2764-2768. doi:10.1093/jac/dkx217

Zhang R, Li J, Wang Y, Shen J, Shen Z, Wang S. Presence of NDM in non-*E. coli Enterobacteriaceae* in the poultry production environment. J Antimicrob Chemother. 2019;74:2209-2213. doi:10.1093/jac/dkz193

Zhang Y, LeJeune JT. Transduction of blaCMY-2, tet(A), and tet(B) from *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar Heidelberg to S. Typhimurium. Vet Microbiol. 2008;129(3-4):418-425. doi:10.1016/J.VETMIC.2007.11.032

Zhou H, Liu W, Qin T, Liu C, Ren H. Defining and Evaluating a Core Genome Multilocus Sequence Typing Scheme for Whole-Genome Sequence-Based Typing of *Klebsiella pneumoniae*. Front Microbiol. 2017;8:371. doi:10.3389/fmicb.2017.00371

Zhou Y, Liang Y, Lynch KH, Dennis JJ, Wishart DS. PHAST: A Fast Phage Search Tool. Nucleic Acids Res. 2011;39:W347-W352. doi:10.1093/nar/gkr485

Zhou Y, Yu H, Guo Q, et al. Distribution of 16S rRNA methylases among different species of Gram-negative bacilli with high-level resistance to aminoglycosides. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010;29:1349–1353. doi:10.1007/s10096-010-1004-1

Zurfluh K, Nüesch-Inderbinen M, Morach M, Berner AZ, Hächler H, Stephan R. Extended-Spectrum-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* Isolated from Vegetables Imported from the Dominican Republic, India, Thailand, and Vietnam. Appl Environ Microbiol. 2015;81:3115–3120. doi:10.1128/AEM.00258-15

Annexes



Annexe 1. Structure chimique de quelque β-lactamines et leurs inhibiteurs (Fair et Tor., 2014).





Annexe 2. Structure chimique de quelques aminoglycosides (Fair et Tor., 2014).

Note : L'anneau 2-DOS est en bleu.



Annexe 3. Structures chimiques de quelques quinolones (Fair et Tor., 2014).



-

Annexe 4. Structure chimique d'une sulfonamide et le trimthoprim (Fair et Tor., 2014).

Note : La fraction sulfonamide est surlignée en bleu.



Annexe 5. Structure chimique de la nitrofurantoine (Fair et Tor., 2014).

3







Annexe 7. Structure chimique des tétracyclines (Fair et Tor., 2014).



Annexe 8. Stucture chimique du Chloramphénicol (Fair et Tor., 2014).

Annexe 9. Liste des isolats.

Le sexe : M : Masculin, F : Féminin.

Les services : umc : urgence médico-chirurgical, reach : Réanimation chirurgical, cardio : Cardiologie, reamed : réanimation médicale, gastro : gastrologie, chvas : chrirugie vasculaire, rea : réanimation, reed : rééducation fonctionnelle, nephro : néphrologie, hemato : hématologie, chhb : chirurgie hépatho-billiare, chorth : chirurgie orthopédique, neurch : neurochirurgie, orl : , medint : médecine interne, uro : urologie, gyn : gynécologie, chgen : chirurgie générale, neonat : néonatalogie, neurch : neurochirurgie, chcard : chirurgie cardiaque, maxfac : maxillo-faciale.

La nature du prélévement : ps : pus, sa : sang, cc : catéthère central, ur : urine, tr : prélevement trachéal.

Identifiant	Service	Age	Sexe	Date de prélèvement	Nature du
229 SV/11		50	Б	16/01/2011	
220 SN/11	unic	30	Г	10/01/2011	ps
242 SK/11	reach	78	F	14/02/2011	ur
244 SK/11	reamed	34	М	12/02/2011	sa
245 SK/11	reamed	69	М	11/02/2011	сс
246 SK/11	reach	45	М	13/02/2011	сс
247 SK/11	reamed	74	М	14/02/2011	сс
248 SK/11	reamed	45	F	14/02/2011	tr
249 SK/11	reach	49	М	12/02/2011	ur
251 SK/11	reamed	49	F	17/02/2011	sa
255 SK/11	cardio	74	М	14/02/2011	sa
256 SK/11	reamed	73	F	21/02/2011	sa
257 SK/11	gastro	17	М	23/02/2011	ps
260 SK/11	reamed	60	М	01/03/2011	сс
261 SK/11	reamed	20	F	03/03/2011	ur
263 SK/11	reach	NP	М	01/03/2011	ur
266 SK/11	chvas	57	F	05/03/2011	ps
268 SK/11	reamed	19	М	08/01/2011	ur
269 SK/11	reamed	45	М	08/03/2011	сс
272 SK/11	reamed	20	F	09/03/2011	sa
276 SK/11	reamed	20	F	13/03/2011	cc

NP : non préciser.

Identifiant	Service	Age	Sexe	Date de prélèvement	Nature du
		8-			prélèvement
278 SK/11	reed	19	F	14/03/2011	ur
279 SK/11	rea	NP	F	17/03/2011	sa
281 SK/11	reamed	17	F	21/03/2011	gf
283 SK/11	reaumc	59	M	21/03/2011	sa
287 SK/11	reamed	51	Μ	26/03/2011	sa
302 SK/11	nephro	NP	Μ	11/04/2011	di
304 SK/11	reamed	70	Μ	11/04/2011	сс
305 SK/11	umc	NP	М	13/04/2011	tr
306 SK/11	reach	78	F	30/03/2011	сс
307 SK/11	reamed	47	Μ	19/04/2011	tr
311 SK/11	reamed	30	Μ	20/04/2011	tr
313 SK/11	chhb	36	М	24/04/2011	ps
316 SK/11	hemato	54	Μ	28/04/2011	sa
318 SK/11	reach	52	Μ	08/05/2011	ps
320 SK/11	reach	26	М	08/05/2011	lc
322 SK/11	reamed	69	F	09/05/2011	ur
324 SK/11	reach	27	М	09/05/2011	tr
328 SK/11	reach	21	F	16/05/2011	tr
330 SK/11	reamed	79	М	21/05/2011	ur
331 SK/11	reamed	21	F	22/05/2011	сс
336 SK/11	chorth	77	F	24/05/2011	ps
337 SK/11	umc	53	М	28/05/2011	ps
339 SK/11	neurch	39	М	29/05/2011	sa
341 SK/11	reach	14	F	01/06/2011	ur
342 SK/11	chvas	NP	М	04/06/2011	ps
343 SK/11	nephro	74	M	06/06/2011	ur
344 SK/11	chorth	73	M	07/06/2011	ps
345 SK/11	reach	77	F	07/06/2011	CC C
346 SK/11	ume	29	F	08/06/2011	ns
347 SK/11	reamed	28	M	10/06/2011	<u>ps</u>
348 SK/11	reamed	18	M	10/06/2011	sa
349 SK/11	reaumo	18	M	12/06/2011	CC CC
350 SK/11	reamed	79	M	12/06/2011	ns
352 SK/11	reamed	66	M	13/06/2011	
355 SK/11	reamed	35	M	20/06/2011	
356 SK/11	reach	14	F	24/06/2011	
366 SK/11	reed	71	M	30/06/2011	ui
368 SK/11	reamed	65	M	08/07/2011	ui 59
360 SK/11	reamed	66	M	13/07/2011	
373 SK/11	reach	22	F	20/07/2011	ui so
375 SK/11	chyon	23 50	Г М	20/07/2011	5a
276 SV/11	ciivas	74		22/07/2011	ps
3/0 SK/11	nepnro	74		24/07/2011	ur
5// SK/11	cnvas	72	M	26/07/2011	ps

Identifiant	Service	Age	Sexe	Date de prélèvement	Nature du
		8-		F	prélèvement
379 SK/11	uro	67	M	27/07/2011	ps
380 SK/11	reach	17	M	27/07/2011	ur
382 SK/11	medint	60	M	02/08/2011	ps
383 SK/11	neurch	ND	M	02/08/2011	ps
385 SK/11	chvas	60	Μ	04/08/2011	ps
387 SK/11	chvas	60	Μ	06/08/2011	ps
390 SK/11	umc	35	Μ	08/08/2011	tr
391 SK/11	reach	49	М	10/08/2011	tr
393 SK/11	reach	29	F	14/08/2011	сс
394 SK/11	reaumc	22	М	14/08/2011	tr
395 SK/11	reaumc	67	М	14/08/2011	tr
396 SK/11	nephro	72	М	16/08/2011	ur
399 SK/11	hemato	24	F	21/08/2011	gf
400 SK/11	reach	52	F	17/08/2011	сс
404 SK/11	reamed	63	F	24/08/2011	сс
406 SK/11	reamed	18	М	22/08/2011	ur
408 SK/11	reach	16	Μ	02/09/2011	tr
412 SK/11	reach	37	М	03/09/2011	ps
416 SK/11	chorth	69	F	07/09/2011	ps
417 SK/11	orl	NP	F	05/09/2011	cc
429 SK/11	umc	20	F	14/09/2011	ab
430 SK/11	chvas	30	М	14/09/2011	ps
431 SK/11	neonat	16	М	24/08/2012	lc
435 SK/11	chvas	20	М	22/09/2011	ps
436 SK/11	nephro	35	F	18/09/2011	liquide d'ascite
440 SK/11	nephro	35	F	28/09/2011	ps
442 SK/11	reaumc	23	М	03/10/2011	sa
448 SK/11	reamed	41	F	09/10/2011	tr
449 SK/11	chvas	70	F	10/10/2011	ps
454 SK/11	reamed	22	F	25/10/2011	tr
460 SK/11	chgen	56	M	23/10/2011	ps
464 SK/11	chorth	57	F	04/11/2011	ps
469 SK/11	umc	41	M	06/11/2011	ps
471 SK/11	chyas	59	M	11/11/2011	ps
474 SK/11	nephro	74	F	14/11/2011	CC PS
475 SK/11	chorth	22	M	13/11/2011	DS DS
476 SK/11	cardio	70	F	16/11/2011	
477 SK/11	reed	41	F	23/11/2011	55 CC
486 SK/11	reamed	46	M	05/12/2011	tr
400 SK/11 404 SK/11	nephro	86	M	07/12/2011	ur
108 SK/11	medint	60	M	1//12/2011	ns
500 SK/11	raamad	60	M	19/12/2011	ps ur
517 SV/12	reamed	16		01/01/2012	ui
J1/ SK/12	reamed	10	IVI	01/01/2012	ur

Identifiant	Service	Age	Sexe	Date de prélèvement	Nature du
Identifiant	Bervice	1150	Беле	Dute de preievement	prélèvement
518 SK/12	gyn	29	F	04/01/2012	gf
521 SK/12	neonat	NP	Μ	10/01/2012	lc
523 SK/12	nephro	57	Μ	15/01/2012	ur
526 SK/12	reamed	56	F	18/01/2012	lp
527 SK/12	maxfac	28	F	19/01/2012	ps
529 SK/12	chorth	26	Μ	20/01/2012	ps
532 SK/12	orl	58	Μ	23/01/2012	ps
533 SK/12	hemato	24	F	24/01/2012	ur
538 SK/12	neonat	1	Μ	31/01/2012	lc
539 SK/12	neonat	5d	F	02/02/2012	lc
542 SK/12	reamed	63	Μ	05/02/2012	ur
544 SK/12	reamed	47	Μ	08/02/2012	tr
545 SK/12	reed	38	Μ	12/02/2012	ps
546 SK/12	nephro	70	М	18/02/2012	ur
551SK/12	reach	35	F	19/02/2012	сс
555 SK/12	reamed	88	М	21/02/2012	ur
557 SK/12	reamed	35	F	19/02/2012	sa
561 SK/12	reach	53	F	22/02/2012	gf
571 SK/12	chhb	74	F	29/02/2012	ps
572 SK/12	neurch	8	M	28/02/2012	
573 SK/12	neurch	NP	M	06/03/2012	lc
574 SK/12	gastro	NP	M	08/03/2012	ab
576 SK/12	reaumc	23	M	11/03/2012	ps
579 SK/12	chorth	38	M	11/03/2012	
581 SK/12	chyas	47	M	19/03/2012	ps
582 SK/12	nephro	61	M	18/03/2012	ps
586 SK/12	umc	30	M	29/03/2012	CC
587 SK/12	chorth	30	M	28/03/2012	
598 SK/12	chorth	18	F	16/04/2012	ps
601 SK/12	nenhro	67	F	18/04/2012	ur
606 SK/12	chorth	36	M	22/04/2012	ns
612 SK/12	gyn	47	F	29/04/2012	ps ps
613 SK/12	reed	36	M	29/04/2012	ps ns
616 SK/12	reamed	26	M	05/05/2012	ps tr
622 SK/12	nephro	79	F	17/05/2012	u ur
622 SK/12	chorth	25	M	18/05/2012	ne
624 SK/12	gastro	54	M	15/05/2012	ps
624 SK/12	gasuo	27	F	02/07/2012	ul 11r
628 SK/12	require	ND	M	16/07/2012	tr
620 SK/12	require	1NF 07	IVI M	16/07/2012	u
620 SV/12	reautilic	27		10/07/2012	Sä tr
621 SV/12	nonhea	21		1//07/2012	<u> </u>
031 SK/12	nepnro	29		11/07/2012	ur
632 SK/12	reaumc	40	F	22/07/2012	sa

Identifiant	Service	Age	Sexe	Date de prélèvement	Nature du
633 SK/12	nephro	63	F	27/07/2012	sa
634 SK/12	chgen	54	М	31/07/2012	ab
636 SK/12	neurch	23	F	01/08/2012	ps
638 SK/12	hemato	52	М	04/08/2012	sa
640 SK/12	reamed	35	F	05/08/2012	ur
642 SK/12	reach	51	F	08/08/2012	сс
643 SK/12	reach	75	F	11/08/2012	сс
644 SK/12	hemato	17	М	12/08/2012	sa
645 SK/12	reach	29	F	13/08/2012	sa
649 SK/12	reaumc	54	М	14/08/2012	tr
651 SK/12	reamed	63	F	23/08/2012	ur
656 SK/12	reach	74	F	04/09/2012	tr
657 SK/12	reamed	44	М	02/09/2012	сс
658 SK/12	reach	62	F	08/09/2012	tr
659 SK/12	reamed	23	F	09/09/2012	sa
660 SK/12	reaumc	25	М	15/09/2012	сс
661 SK/12	reach	NP	F	12/09/2012	lc
662 SK/12	nephro	40	F	12/09/2012	ur
663 SK/12	nephro	52	F	13/09/2012	di
665 SK/12	reamed	44	М	19/09/2012	sa
666 SK/12	reamed	33	F	22/09/2012	tr
669 SK/12	reach	62	F	25/09/2012	sa
670 SK/12	reach	78	М	30/09/2012	tr
671 SK/12	medint	59	F	03/10/2012	ur
672 SK/12	chcard	68	F	02/10/2012	ps
673 SK/12	chvas	63	М	23/09/2012	PS
674 SK/12	chcard	68	F	04/10/2012	dn
676 SK/12	chvas	59	М	30/09/2012	ur
677 SK/12	reaumc	33	М	01/10/2012	sa
678 SK/12	reamed	28	М	10/10/2012	sa
679 SK/12	nephro	NP	М	11/10/2012	ur
680 SK/12	neurch	75	F	11/10/2012	ps
681 SK/12	reach	NP	М	17/10/2012	tr
682 SK/12	chvas	85	F	21/10/2012	ps
683 SK/12	nephro	74	М	23/10/2012	ut
684 SK/12	reamed	63	F	17/10/2012	ur
685 SK/12	nephro	80	Μ	23/10/2012	ur
686 SK/12	neurch	4	Μ	21/10/2012	lc
687 SK/12	reach	26	F	28/10/2012	sa
688 SK/12	chorth	29	Μ	08/11/2012	ps
689 SK/12	reaumc	24	M	08/11/2012	tr
690 SK/12	medint	32	F	13/11/2012	ur
691 SK/12	chorth	57	Μ	20/11/2012	ps

Identifiant	Service	Age	Sexe	Date de prélèvement	Nature du prélèvement
692 SK/12	reed	48	М	25/11/2012	ur
693 SK/12	chcard	72	М	26/11/2012	sa
694 SK/12	nephro	77	F	03/12/2012	ur
695 SK/12	neurch	39	F	03/12/2012	ps
697 SK/12	chvas	65	F	18/12/2012	ps
698 SK/12	maxfac	70	F	16/12/2012	ps
699 SK/12	reach	NP	М	16/12/2012	tr
700 SK/12	nephro	77	F	18/12/2012	ur
701 SK/12	umc	64	М	23/12/2012	ab

Annexe 10. Milieu gélose au sang frais.

Mélange de peptones	18,0 g
Extrait de levure	5,0 g
Amidon de maïs	1,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Agar	10,0 g
pH = 7,3	
Eau distillée	1 L
Sang frais	5%

Groupe	Gènes	Amorces	Séqu	ences	5' →	3'					Références
CTX	bla _{CTX-M all}	CTX-M F	SCS	ATG	TGC	AGY	ACC	AGT	AA		Tofteland et
		CTX-M R	ACC	AGA	AYV	AGC	GGB	GC			al., 2007
	bla _{CTX+M-1}	CTX-M-1 F	AAA	AAT	CAC	TGC	GCC	AGT	ТC		
	group	CTX-M-1 R	AGC	TTA	TTC	ATC	GCC	ACG	ΤT		Weedford
	$bla_{CTX+M-2}$	CTX-M-2 F	CGA	CGC	TAC	CCC	TGC	TAT	Т		al 2006
	group	CTX-M-2 R	CCA	GCG	TCA	GAT	TTT	TCA	GG		<i>u</i> ., 2000
	$bla_{CTX+M-9}$	CTX-M-9 F	CAA	AGA	GAG	TGC	AAC	GGA	ΤG		
	group	CTX-M-9 R	ATT	GGA	AAG	CGT	TCA	TCA	CC		
PMQR	qnrA	qnrA F	GGG	TAT	GGA	TAT	TAT	TGA	TAA	AG	
		qnrA R	CTA	ATC	CGG	CAG	CAC	TAT	ΤA		_
	qnrB	qnrB F	GGM	ATH	GAA	ATT	CGC	CAC	ΤG		_
		qnrB R	TTT	GCY	GYY	CGC	CAG	TCG	AA		_
	qnrC	qnrC F	GAT	TTT	TCC	GGC	CAA	GAT	ΤT		_
		qnrC R	TAA	CAA	TCA	CCC	CCA	ACT	GC		Zhou <i>et al.</i> ,
	qnrD	qnrD F	CGA	GAT	CAA	TTT	ACG	GGG	AAT		2011
		qnrD R	CGG	TGA	ACA	ATA	ACA	CCT	AAA	CTC	_
	qnrS	qnrS F	AGT	GAT	CTC	ACC	TTC	ACC	GC		_
		qnrS R	CAG	GCT	GCA	ATT	TTG	ATA	CC		_
	qepA	qepA F	GGA	CAT	СТА	CGG	CTT	CTT	CG		_
		qepA R	GGT	GAT	GAT	GAT	CTC	GTT	GC		
	aac(6)–Ib	aac(6)F	TGA	CCA	ACA	GCA	ACG	ATT	CC		Shin <i>et al</i> .,
		aac(6)R	TTA	GGC	ATC	ACT	GCG	TGT	ТС		2009
16S rRNA	armA	armA_F	AGG	TTG	TTT	CCA	TTT	CTG	AG		-
methylases		armA_R	TCT	CTT	CCA	TTC	CCT	TCT	CC		-
genes	rmtA	rmtA_F	СТА	GCG	TCC	ATC	CTT	TCC	TC		-
		rmtA_R	TTT	GCT	TCC	ATG	CCC	TTG	CC		-
	rmtB	rmtB_F	CCC	AAA	CAG	ACC	GTA	GAG	GC		Castanheira
		rmtB_R	CTC	AAA	CTC	GGC	GGG	CAA	GC		et al., 2008
	rmtC	rmtC_F	CGA	AGA	AGT	AAC	AGC	CAA	AG		-
		rmtC_R	ATC	CCA	ACA	TCT	CTC	CCA	СТ		-
	rmtD	rmtD_F	GAG	CGA	ACT	GAA	GGA	AAA	AC		-
		rmtD_R	CAG	CAC	GTA	AAA	CAG	CTC			
Mcr-1	mcr-1	CLR5-F	CGG	TCA	GTC	CGT	TTG	TTC			Liu et al.,
		CLR5-R	CTT	GGT	CGG	TCT	GTA	GGG			2016

Annexe 11. Tableau des couples d'amorces utilisés dans la thèse.

Annexe 12.	Conditions	de la	ligation.
------------	------------	-------	-----------

95°C pendant 3 minutes	-	
95°C pendant 30 secondes	24 cycles	
65°C pendant 5 minutes		2.5 heures
98°C pendant 2 minutes	-	
4°C	Jusqu'à récuparation	

Nombre d'echantillions	B (μL)	C (µL)
1-3	120	4
4-6	210	4
7-9	300	10
10-12	390	13

Annexe 13. Mélange des solutions B et C.

Annexe 14. Conditions de la PCR.

95°C pendant 10 minutes	-	
95°C pendant 5 secondes		
55°C pendant 30 secondes	35 cycles	1.5 heures
72°C pendant 30 secondes		1.5 neures
98°C pendant 2 minutes	-	
4°C	Jusqu'à récupération	

Annexe 15. Préparation de la dilution de la solution conjugée.

AT	Solution conjugée (µL)	Tampon de detection (µL)
1-3	5	495
4-6	10	990

Annexe 16. Liste des solutions, tampons et enzymes utilisés pour la PFGE.

- Tampon d'agarose pH 7,5, TE avec 0,1 mM Tris et 0,1 mM EDTA.
- Tampon Tris-EDTA pH 8 (TE), Tris 10 mM et EDTA 1 mM.
- Réactif de suspension cellulaire (SE) pH 7,4 FK 5248, conservé à température ambiante.
- Tampon de lyse cellulaire pH 8 (CLB) (50 mM Tris, 50 mM EDTA, 1% Sarcosyl (N-lauryl-sarcosine-sodium salt).
- Protéinase K, grade PCR recombinant, Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne. Conserver au réfrigérateur. La concentration enzymatique est de 14 à 22 mg / mL dans du Tris-HCL 10 mM, pH 7,5. La solution contient de l'acétate de calcium comme stabilisant.
- Substrat de tampon OPA 10 x (One-Phor-All Buffer). Tris-acétate 100 mM (pH 7,5), acétate de magnésium 100 mM, 500 mM d'acétate de potassium). Conserver au réfrigérateur.
- BSA 100 x et NEBuffer 10 x sont livrés dans le même emballage que l'enzyme de restriction. Conserver au congélateur.
- Agarose ultra pur (15510-027) Gibco BRL, Lifetechnologies. Conserver au réfrigérateur.
- Tampon TBE 10 x (tampon TE avec 5,50% d'acide borique, H_3BO_3).
- HCl 0,1 M et NaCl 1 M.

Annexe 17. Marqueurs de taille avec bandes respectives (14 pièces) pour l'isolat de référence G5244 (*Escherichia coli* EHEC).



Annexe 18. Photographie prise par GelDoc d'un gel de PFGE en présence de trois références G5244 d'EHEC.



Note : les puits 1, 8 et 15 contiennet la souche de référence (G5244 EHEC).

Strain	Organisme best match	Score-Value	score-value (second best match)
228	Klebsiella pneumoniae	2,297	2,22
240	Klebsiella pneumoniae	2,242	2,17
242	Klebsiella pneumoniae	2,324	2,234
244	Klebsiella pneumoniae	2,354	2,352
245	Klebsiella pneumoniae	2,463	2,392
246	Klebsiella pneumoniae	2,375	2,372
247	Klebsiella pneumoniae	2,354	2,199
248	Klebsiella pneumoniae	2,316	2,254
249	Klebsiella pneumoniae	2,346	2,346
251	Klebsiella pneumoniae	2,208	1,972
255	Klebsiella pneumoniae	2,303	2,279
256	Klebsiella pneumoniae	2,463	2,392
257	Klebsiella pneumoniae	2,369	2,323
260	Klebsiella pneumoniae	2,325	2,287
261	Klebsiella pneumoniae	2,375	2,33
263	Klebsiella pneumoniae	2,401	2,345
266	Klebsiella pneumoniae	2,482	2,442
268	Klebsiella pneumoniae	2,394	2,307
269	Klebsiella pneumoniae	2,263	2,192
270	Klebsiella pneumoniae	2,05	1,984
272	Klebsiella pneumoniae	2,39	2,3
276	Klebsiella pneumoniae	2,502	2,461
278	Klebsiella pneumoniae	2,241	2,188
279	Klebsiella pneumoniae	2,428	2,399
281	Klebsiella pneumoniae	2,278	2,258
283	Klebsiella pneumoniae	2,358	2,312
287	Klebsiella pneumoniae	2,365	2,341
302	Klebsiella pneumoniae	2,301	2,156
304	Klebsiella pneumoniae	2,356	2,112
305	Klebsiella pneumoniae	2,227	2,222
306	Klebsiella pneumoniae	2,422	2,339
307	Klebsiella pneumoniae	2,28	2,156
309	Klebsiella pneumoniae	1,968	1,965
311	Klebsiella pneumoniae	2,282	2,27
313	Klebsiella pneumoniae	2,381	2,336
316	Klebsiella pneumoniae	2,093	2,034
318	Klebsiella pneumoniae	2,413	2,369
320	Klebsiella pneumoniae	2,219	2,076
322	Klebsiella pneumoniae	2,278	2,219
324	Klebsiella pneumoniae	2,439	2,227
328	Klebsiella pneumoniae	1,936	1,931

Annexe 19. Tableau de l'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS.

Strain	Organisme best match	Score-Value	score-value
330	Klebsiella pneumoniae	2.146	2 024
331	Klebsiella pneumoniae	2,246	2,021
336	Klebsiella pneumoniae	2,234	2,064
337	Klebsiella pneumoniae	2,339	2 122
338	Klebsiella pneumoniae	2,335	2,122
339	Klebsiella pneumoniae	2,249	2,230
341	Klebsiella pneumoniae	2,217	2 268
342	Klebsiella pneumoniae	2,011	1 996
343	Klebsiella pneumoniae	2,461	2,316
344	Klebsiella pneumoniae	2,127	1 902
345	Klebsiella pneumoniae	2,127	2 271
346	Klebsiella pneumoniae	2,177	2,02
347	Klebsiella pneumoniae	2,177	2,02
348	Klebsiella pneumoniae	2,363	2,323
349	Klebsiella preumoniae	2,002	1 953
350	Klebsiella preumoniae	2,000	2 232
351	Klebsiella preumoniae	2,312	2,232
352	Klebsiella preumoniae	2,240	2,177
355	Klebsiella preumoniae	2,233	2,144
356	Klebsiella preumoniae	1 974	1,000
366	Klebsiella preumoniae	2 287	2 175
368	Klebsiella preumoniae	2,267	2,173
369	Klebsiella preumoniae	2,203	2,192
370	Klebsiella preumoniae	2,302	2,214
373	Klebsiella preumoniae	2,197	2,001
375	Klebsiella preumoniae	2,210	2,155
375	Klebsiella preumoniae	2,197	2,097
370	Klebsiella preumoniae	2,301	2,270
370	Klebsiella preumoniae	2,328	2,244
379	Klebsiella preumoniae	2,390	2,318
380	Klebsiella preumoniae	2,239	2,107
382	Klebsiella preumoniae	2,278	2,121
385	Klebsiella preumoniae	2,41	2,377
385	Klebsiella preumoniae	2,374	2,294
307	Klebsiella preumoniae	2,143	2,101
390	Klebsiella preumoniae	2,232	2,204
391	Klebsiella preumoniae	2,293	2,233
204	Klabsialla preumoniae	2,39	2,349
394	Klebsiella pheumoniae	2,52	2,131
206	Klabsialla preumoniae	2,19	2,112
200	Klabsialla preumoniae	2,414	2,334
399 400	Klebsiella preumoniae	2,274	2,093
400	Kievsiella pneumoniae	2,308	2,289
404	Klebsiella pneumoniae	2,149	2,049

Strain	Organisme best match	Score-Value	score-value
406		2.450	(second best match)
406	Klebslella pheumonide	2,439	2430
408	Klebslella pneumoniae	2,35	2,345
412	Klebsiella pneumoniae	2,38	2,279
416	Klebsiella pneumoniae	2,311	2,157
417	Klebsiella pneumoniae	2,353	2,301
429	Klebsiella pneumoniae	2,277	2,153
430	Klebsiella pneumoniae	2,376	2,32
431	Klebsiella pneumoniae	2,223	2,107
435	Klebsiella pneumoniae	2,395	2,374
436	Klebsiella pneumoniae	2,162	2,148
440	Klebsiella pneumoniae	2,223	2,371
442	Klebsiella pneumoniae	2,314	2,218
447	Klebsiella pneumoniae	2,155	2,025
448	Klebsiella pneumoniae	2,19	2,187
449	Klebsiella pneumoniae	2,306	2,296
454	Klebsiella pneumoniae	2,405	2,327
459	Escherichia coli	2,199	2,115
460	Klebsiella pneumoniae	2,454	2,442
464	Klebsiella pneumoniae	2,163	2,085
469	Klebsiella pneumoniae	2,382	2,331
471	Klebsiella pneumoniae	2,256	2,179
474	Klebsiella pneumoniae	2,312	2,298
475	Klebsiella pneumoniae	2,287	2,269
476	Klebsiella pneumoniae	2,111	2,111
477	Klebsiella pneumoniae	2,431	2,338
483	Klebsiella pneumoniae	2,414	2,377
486	Klebsiella pneumoniae	2,355	2,309
494	Klebsiella pneumoniae	2,358	2,311
498	Klebsiella pneumoniae	2,375	2.214
500	Klebsiella pneumoniae	2.257	2.225
511	Klebsiella pneumoniae	2,203	2.079
517	Klebsiella pneumoniae	2.338	2.243
518	Klebsiella pneumoniae	2,223	2.08
521	Klebsiella pneumoniae	2,422	2.381
523	Klebsiella pneumoniae	2.302	2.21
526	Klebsiella pneumoniae	2,302	2,107
520	Klebsiella preumoniae	2,173	2,107
527	Klehsjella nneumoniae	2,277	2,207
530	Klebsjella nneumoniae	2,717	2,324
531	Klebsjella nneumoniae	2,355	2,100
537	Klebsiella preumoniae	2,333	2,255
532	Klabsialla praumonica	2,00	2,003
535	Kiebsiella maninoniae	2,132	2,040
530	Kiedsiella pneumoniae	2,221	2,140
Strain	One anisme hest match	Score-Value	score-value
--------	-----------------------	---------------	---------------------
Suam	Organisme best maich	Scole- v alue	(second best match)
538	Klebsiella pneumoniae	2,284	2,255
539	Klebsiella pneumoniae	2,47	2,414
542	Klebsiella pneumoniae	2,399	2,246
544	Klebsiella pneumoniae	2,352	2,315
545	Klebsiella pneumoniae	2,381	2,214
546	Klebsiella pneumoniae	2,362	2,36
551	Klebsiella pneumoniae	2,361	2,31
555	Klebsiella pneumoniae	2,348	2,238
561	Klebsiella pneumoniae	2,234	2,147
571	Klebsiella pneumoniae	1,959	1,727
572	Klebsiella pneumoniae	2,451	2,447
573	Klebsiella pneumoniae	2,028	1,978
574	Klebsiella pneumoniae	2,469	2,452
576	Klebsiella pneumoniae	2,12	2,106
579	Klebsiella pneumoniae	2,321	2,318
581	Klebsiella pneumoniae	2,478	2,442
582	Klebsiella pneumoniae	2,43	2,404
586	Klebsiella pneumoniae	2,098	1,956
587	Klebsiella pneumoniae	2,342	2,281
589	Raoultella planticola	2,236	2,013
598	Klebsiella pneumoniae	2,248	2,179
601	Klebsiella pneumoniae	2,184	2,112
606	Klebsiella pneumoniae	2,224	2,14
612	Klebsiella pneumoniae	2,248	2,244
613	Klebsiella pneumoniae	2,162	2,052
616	Klebsiella pneumoniae	2,243	2,243
620	Klebsiella pneumoniae	2,425	2,338
622	Klebsiella pneumoniae	2,041	1,988
623	Klebsiella pneumoniae	2,239	2,142
624	Klebsiella pneumoniae	2,438	2,392
626	Klebsiella pneumoniae	2,234	2,203
628	Klebsiella pneumoniae	2,104	2,077
629	Klebsiella pneumoniae	2,109	2,079
630	Klebsiella pneumoniae	2,148	2,133
631	Klebsiella pneumoniae	2,279	2,155
632	Klebsiella pneumoniae	2,232	2,214
633	Klebsiella pneumoniae	2,266	2,117
634	Klebsiella pneumoniae	2,419	2,382
636	Klebsiella pneumoniae	2,491	2,95
638	Klebsiella pneumoniae	2,249	2,149
640	Klebsiella pneumoniae	2,316	2,248
642	Klebsiella pneumoniae	2,16	2,113
643	Klebsiella pneumoniae	2,361	2,289
	1 *	i	1

Strain	Organisme best match	Score-Value	score-value
614		2 204	(second best match)
044	Klebslella pheumoniae	2,304	2,192
645	Klebslella pneumoniae	2,064	2,035
649	Klebsiella pneumoniae	2,343	2,319
651	Klebsiella pneumoniae	2,232	2,149
652	Klebsiella pneumoniae	2,516	2,42
654	Klebsiella pneumoniae	2,389	2,344
656	Klebsiella pneumoniae	2,192	2,131
657	Klebsiella pneumoniae	2,464	2,388
658	Klebsiella pneumoniae	2,411	2,309
659	Klebsiella pneumoniae	2,087	2,04
660	Klebsiella pneumoniae	2,331	2,286
661	Klebsiella pneumoniae	2,292	2,273
662	Klebsiella pneumoniae	2,36	2,359
663	Klebsiella pneumoniae	2,267	2,13
665	Klebsiella pneumoniae	2,218	2,17
666	Klebsiella pneumoniae	2,423	2,339
667	Klebsiella pneumoniae	2,122	2,101
668	Klebsiella pneumoniae	2,312	2,141
669	Klebsiella pneumoniae	1,841	1,786
670	Klebsiella pneumoniae	2,248	2,116
671	Klebsiella pneumoniae	2,294	2,29
672	Klebsiella pneumoniae	1,83	1,786
673	Klebsiella oxytoca	2,211	2,205
674	Klebsiella pneumoniae	2,25	2,29
676	Klebsiella pneumoniae	2,266	2,229
677	Klebsiella pneumoniae	2,387	2,14
678	Klebsiella pneumoniae	2,274	2,216
679	Klebsiella pneumoniae	2,136	2,127
680	Klebsiella pneumoniae	2.232	2.025
681	Klebsiella pneumoniae	2.334	2,145
682	Klebsiella oxytoca	1.895	1.865
683	Klebsiella pneumoniae	2.224	2.092
684	Klebsiella pneumoniae	2.229	2,141
685	Klebsiella pneumoniae	2,181	2,18
686	Klebsiella pneumoniae	2,217	2.082
687	Klebsiella pneumoniae	2,187	2,016
688	Klebsiella preumoniae	2,107	2,010
689	Klebsiella nneumoniae	2,142	2,237
690	Klebsiella nneumoniae	2,095	2,077
601	Klebsiella nneumoniae	2,239	2,175
607	Klebsiella preumoniae	2,272	2,270
603	Klabsialla preumoniae	2,410	2,41
604	Kiebsiella mannonide	2,117	2,037
094	Kiedsiella pneumoniae	2,301	2,289

Strain	Organisme best match	Score-Value	score-value (second best match)
695	Klebsiella pneumoniae	2,401	2,347
697	Klebsiella pneumoniae	2,213	2,168
698	Klebsiella pneumoniae	2,41	2397
699	Klebsiella pneumoniae	2,365	2,28
700	Klebsiella pneumoniae	2,347	2,27
701	Klebsiella pneumoniae	2,345	2,342

Annexe 20. Photographie de gel montrant les bandes après digestion enzymatique par *BtsCl*.



Note : Le puit N°12 contient le contrôle positif aac(6')-Ib. Le puit N° 8 est le contrôle aac(6')Ib-cr. Le puit M contient the lader:19- 1114 pb (marqueur de taille).

Annexe 21. Électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE) après digestion par *XbaI*, profils de macro-restriction de l'ADN génomique de 193 isolats cliniques KP productricent de BLSE.



			5	416		07-09-2011	Orthopedic surgery
		- • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	6	376		24-07-2011	Nephrology
	─		C1	257		23-02-2011	Gastrology
			C2	440	ST-348	28-09-2011	Nephrology
			C3	377		26-07-2011	Surgical vascular
			C4	342		04-06-2011	Surgical vascular
			C5	348		10-06-2011	Medical reanimation
			C6	347		10-06-2011	Medical reanimation
			C7	345		07-06-2011	Surgical reanimation
			7	663		13-09-2012	Nephrology
			D1	699		16-12-2012	Surgical reanimation
			D2	527		19-01-2012	Maxilo-facial
			D3	687	ST-48	28-10-2012	Surgical reanimation
			D4	656		04-09-2012	Surgical reanimation
			D5	669		25-05-2012	Surgical reanimation
			D6	690		13-11-2012	Internal medecine
			D7	681		17-10-2012	Surgical reanimation
			D8	691		20-11-2012	Orthopedic surgery
		E E EEE MIL MILL M. M.	8	279		17-03-2011	Reanimation
			9	561		22-02-2012	Surgical reanimation
		I I UNECHDIES DE TO	10	366		30-06-2011	Reeducation
			11	375		22-07-2011	Surgical vascular
			12	385		04-08-2011	Surgical vascular
		Reine Reine is alle Beiter Beiteren	13	533		24-01-2012	Hematology
		STATES OF THE CALL STREET, STR	E1	571	ST-1942	2 29-02-2012	Hepato-billiaire Surgery
			E2	341		01-06-2011	Surgical reanimation
		(COLLE C COLLECT TE - T	E3	643		11-08-2012	Surgical reanimation
			E4	400		17-08-2011	Surgical reanimatiom
			E5	542		05-02-2012	Medical reanimation
			E6	336		24-05-2011	Orthopedic surgery
			F1	404		24-08-2011	Medical reanimation
			F2	322		09-05-2011	Medical reanimation
			F3	302		11-04-2011	Nephrology
		1. 非现于私主任 石匠 相当	F4	278		14-03-2011	Reeducation
			F5	394		14-08-2011	Reanimation medico-surgical emergency
			F6	390		08-08-2011	Medico-surgical emergency
		ELLE CONTRACTOR DE L'UNIONE	F7	395		14-08-2011	Reanimation medico-surgical emergency
			F8	469	ST-86	06-11-2011	Medico-surgical emergency
		IIII COLORE COLOR	14	662		12-09-2012	Nephrology
1			40	470		40 44 0044	O - miliata mu

Annexes

		14	662	12_00_2012	Nenbrology
		15	476	16-11-2011	Cardiology
		G1	360	13-07-2011	Medical reanimation
		G2	636	01-08-2012	Neurosurgery
		G3	693	26-11-2012	Cardiac surgery
		G4	391	10-08-2011	Surgical reanimation
		G5	665	19-09-2012	Medical reanimation
		G	631	ST-1/26 11-07-2012	Nenhrology
	1 11 1 12 12 12 12 12 12 17 17 17	G7	337	28-05-2011	Medico-surgical emergency
		G8	320	08-05-2011	Surgical reanimation
		69	612	29-04-2012	Genycology
	A LA A A P OFFICE A CONTRACTOR	G10	644	ST-1/26 12-08-2012	Hematology
	5 15 5 5 5 2222222200	G11	658	08-09-2012	Surgical reanimation
		G12	324	09-05-2011	Surgical reanimation
		H1	272	09-03-2011	Medical reanimation
		H2	287	ST-111 26-03-2011	Medical reanimation
		H3	276	13-03-2011	Medical reanimation
		H4	379	27-07-2011	Lirology
		H5	622	17-05-2012	Nenhrology
	E E ESTE E HURST HURST	H6	626	02-07-2012	Lirology
		H7	300	21_08_2011	Hematology
		Н8	475	13-11-2011	
		Но	387	06-08-2011	
	A CONTRACTOR OF A CONTRACTOR O	16	247	14-02-2011	Medical reanimation
П		17	383	ST-23 02-08-2011	Neurosurgery
		18	307	19-04-2011	Medical reanimation
	A REAL PROPERTY AND A REAL	19	500	18-12-2011	Medical reanimation
		10	417	05-09-2011	Oto-Rhino-I aryngology O R I
		12	498	14-12-2011	Internal medecine
		13	698	16-12-2012	Maxilo-facial
		14	678	10-10-2012	Medical reanimation
		15	657	ST-37 02-09-2012	Medical reanimation
		16	694	03-12-2012	Nenhrology
		17	3/6	08-06-2012	Medico-surgical emergency
		18	557	19-02-2017	Medical reanimation
			638	01_02_2012	Hematology
		13	3/3	06-06.2012	Nenbrology
	I II I BURNING	20	572	28-02.2012	Neurosurgery
		20	623	18-05-2012	Orthopedic surgery
		21	023	10-00-2012	Ormopeuic surgery

	20	572		28-02-2012	Neurosurgery
	21	623		18-05-2012	Orthopedic surgery
	22	680		11-10-2012	Neurosurgery
	23	616		05-05-2012	Medical reanimation
	24	261		03-03-2011	Medical reanimation
	25	281		21-03-2011	Medical reanimation
	26	352		13-06-2011	Medical reanimation
	27	350		12-06-2011	Medical reanimation
	28	242		14-02-2011	Surgical reanimation
	29	313		24-04-2011	Hepato-billiaire Surgery
	30	318		08-05-2012	Surgical reanimation
	31	686		21-10-2012	Neurosurgery
The second s	32	435		22-09-2011	Vascular surgery
	33	460		23-10-2011	General surgery
	34	581		19-03-2012	Vascular surgery
	J1	676	ST-37	30-09-2012	Vascular surgery
	J2	701		23-12-2012	Medico-surgical emergency
	J3	624		15-05-2012	Gastrology
	J4	697		18-12-2012	Vascular surgery
	J5	677		01-10-2012	Reanimation medico-surgical emergency
	J6	692		25-11-2012	Reeducation
	J7	406		22-08-2011	Medical reanimation
	J8	382		02-08-2011	Internal medecine
	J9	695		03-12-2012	Neurosurgery
	35	685		23-10-2012	Nephrology
	36	477		23-11-2011	Reeducation
	37	396		16-08-2011	Nephrology
	38	523		15-01-2012	Nephrology
	39	373		20-07-2011	Surgical reanimation
	40	266		05-03-2011	Vascular surgery
	41	256		03-09-2011	Surgical reanimation
	42	305		13-04-2011	Surgical medical emergency
	43	587		28-03-2012	Orthopedic surgery
	44	349		12-06-2011	Reanimation medico-surgical emergency
	45	331		22-05-2011	Reanimation medico-surgical emergency
	46	328		16-05-2011	Surgical reanimation
	47	659		09-09-2012	Medical reanimation
	48	651		23-08-2012	Medical reanimation
	K1	355		20-06-2011	Medical reanimation
	K2	330		21-05-2011	Medical reanimation

		1 I I d f ferrerensen	к	(1 3	55	20-06-2011	Medical reanimation
		iff a contratter	к	<2 3	30	21-05-2011	Medical reanimation
			к	K 3 4	12	03-09-2011	Surgical reanimation
			к	<4 2·	44	12-02-2011	Medical reanimation
			к	<5 2·	45	11-02-2011	Medical reanimation
		-	к	K 6 4	-30	14-09-2011	Vascular surgery
		TET E E EIERSTER	К	<7 4	36	18-09-2011	Nephrology
		6 66 6 6 6600 ft fm	К	<8 2·	46 ST-147	7 13-02-2011	Surgical reanimation
			к	<9 2-	49	12-02-2011	Surgical reanimation
			К	<10 2	55	14-02-2011	Cardiology
		I II B B BBBB HERRESSER	к	<11 2	28	16-01-2011	Medico-surgical emergency
			К	(12 4	94	07-12-2011	Nephrology
			ĸ	<13 3	93	14-08-2011	Surgical reanimation
		FIE I E BERLETET	к	K 14 6	01 ST-147	7 18-04-2012	Nephrology
			К	<15 2	51	17-02-2011	Medical reanimation
			К	<16 3	04	11-04-2011	Medical reanimation
			К	(17 6	88	08-11-2012	Orthopedic surgery
			К	K18 6	06	22-04-2012	Orthopedic surgery
		1 11 11 14 14 14 14	К	(19 5	86	29-03-2012	Medico-surgical emergency
			ĸ	<20 6 [°]	79	11-10-2012	Nephrology
			К	(21 4	86	05-12-2011	Medical reanimation
			K	<22 4 [°]	74	14-11-2011	Nephrology
			K	<23 4·	42	03-10-2011	Reanimation medico-surgical emergency
			K	<24 5	55	21-02-2012	Medical reanimation
			K	<25 6	33	27-07-2012	Nephrology
		I I I I I I I I I I I I I I I I I I I	K	<26 6	70	30-09-2012	Surgical reanimation
			K	<27 6	13	29-04-2012	Reeducation
			K	<28 5 ⁻	73	06-03-2012	Neurosurgery
			К	<29 5	82	18-03-2012	Nephrology
			K	<30 4	49	10-10-2011	Vascular surgery
			K	(31 5	74	08-03-2012	Gastrology
			K	<32 5	29	20-10-2012	Orthopedic surgery
			K	<33 6	83	23-10-2012	Nephrology
			K	<34 6	40 ST-392	2 05-08-2012	Medical reanimation
			К	(35 5	76	11-03-2012	Reanimation medico-surgical emergency
			4	19 5	51	19-02-2012	Surgical reanimation
	4		5	50 5	39	02-02-2012	Neonatal
			5	51 5	21	10-01-2012	Neonatal
			5	52 5	38	31-01-2012	Neonatal
- 1							



Articles

Article 1



GOPEN ACCESS

Citation: Zemmour A, Dali-Yahia R, Maatallah M, Saidi-Ouahrani N, Rahmani B, Benhamouche N, et al. (2021) High-risk clones of extended-spectrum β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from the University Hospital Establishment of Oran, Algeria (2011–2012). PLoS ONE 16(7): e0254805. https://doi.org/10.1371/journal. pone.0254805

Editor: Zhi Ruan, Zhejiang University, CHINA

Received: December 26, 2020

Accepted: July 5, 2021

Published: July 26, 2021

Copyright: © 2021 Zemmour et al. This is an open access article distributed under the terms of the <u>Creative Commons Attribution License</u>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its <u>Supporting</u> Information files.

Funding: For this work, author Assia Zemmour, received the financial support from « Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed BOUDIAF and material support from Karolinska Institutet and the University Hospital Establishment of Oran. The financial funder had no role in study RESEARCH ARTICLE

High-risk clones of extended-spectrum βlactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from the University Hospital Establishment of Oran, Algeria (2011–2012)

Assia Zemmour^{1,2*}, Radia Dali-Yahia^{3,4®}, Makaoui Maatallah^{5®}, Nadjia Saidi-Ouahrani¹, Bouabdallah Rahmani⁶, Nora Benhamouche¹, Hissa M. Al-Farsi^{7,8}, Christian G. Giske^{7,9}

Faculté de Sciences de la Nature et la Vie, Département de Génétique Moléculaire Appliquée, Université des Sciences et la Technologie d'Oran Mohamed-Boudiaf USTOMB, Oran, Algérie, 2 Laboratoire de Génétique Médicale Appliquée à l'Ophtalmologie, Université d'Oran 1, Oran, Algérie, 3 Service de bactériologie, Etablissement Hospitalo-Universitaire 1er Novembre 1954, Oran, Algérie, 4 Faculté de médicine, Université d'Oran 1, Oran, Algérie, 5 Faculté de pharmacie de Monastir, Laboratoire d'Analyse, Traitement et Valorisation des Polluants de l'Environnement et des Produits (LATVPEP: LR01ES16), Université de Monastir, Monastir, Tunisie, 6 Faculté de Génie Electrique, Département d'Electronique, Université des Sciences et la Technologie d'Oran Mohamed-Boudiaf USTOMB, Oran, Algérie, 7 Division of Clinical Microbiology, Department of Laboratory Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, 8 Central Public Health Laboratories, Ministry of Health, Muscat, Sultanate of Oman, 9 Clinical Microbiology, Karolinska University Hospital Solna, Stockholm, Sweden

• These authors contributed equally to this work.

* assia.zemmour@usto-univ.dz, zemmourassia@hotmail.fr

Abstract

The purpose of the study was to characterize the resistome, virulome, mobilome and Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-associated (CRISPR-Cas) system of extended-spectrum β-lactamase producing Klebsiella pneumoniae (ESBL-KP) clinical isolates and to determine their phylogenetic relatedness. The isolates were from Algeria, isolated at the University Hospital Establishment of Oran, between 2011 and 2012. ESBL-KP isolates (n = 193) were screened for several antibiotic resistance genes (ARGs) using qPCR followed by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE). Representative isolates were selected from PFGE clusters and subjected to whole-genome sequencing (WGS). Genomic characterization of the WGS data by studying prophages, CRISPR-Cas systems, Multi-Locus Sequence Typing (MLST), serotype, ARGs, virulence genes, plasmid replicons, and their pMLST. Phylogenetic and comparative genomic were done using core genome MLST and SNP-Based analysis. Generally, the ESBL-KP isolates were polyclonal. The whole genome sequences of nineteen isolates were taken of main PFGE clusters. Sixteen sequence types (ST) were found including high-risk clones ST14, ST23, ST37, and ST147. Serotypes K1 (n = 1), K2 (n = 2), K3 (n = 1), K31 (n = 1), K62 (n = 1), and K151 (n = 1) are associated with hyper-virulence. CRISPR-Cas system was found in 47.4%, typed I-E and I-E*. About ARGs, from 193 ESBL-KP, the majority of strains were multidrug-resistant, the CTX-M-1 enzyme was predominant (99%) and the prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes was high with aac(6')-lb-cr (72.5%) and qnr's (65.8%). From 19 sequenced isolates we identified ESBL, AmpC, and carbapenemase genes: blaCTX-M-15

design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

(n = 19), bla_{OXA-48} (n = 1), bla_{CMY-2} (n = 2), and bla_{CMY-16} (n = 2), as well as non-ESBL genes: qnrB1 (n = 12), qnrS1 (n = 1) and armA (n = 2). We found IncF, IncN, IncL/M, IncA/C2, and Col replicon types, at least once per isolate. This study is the first to report qnrS in ESBL-KP in Algeria. Our analysis shows the concerning co-existence of virulence and resistance genes and would support that genomic surveillance should be a high priority in the hospital environment.

Introduction

Klebsiella pneumoniae (KP) is notorious for its great propensity to acquire antimicrobial resistance and confer nosocomial infections. This species is associated with the emergence of strains which are both hypervirulent and multidrug-resistant (MDR) [1]. KP frequently produce extended-spectrum β -lactamases (ESBLs), bacterial enzymes that can hydrolyze penicillins, cephalosporins, monobactams, and to some extent carbapenems [2,3]. Multidrugresistant Gram-negative bacilli are the cause of high incidence rates of nosocomial infections worldwide [4]. The mobile genetic elements (MGEs) (plasmids, bacteriophages, and transposons) are capable of horizontal gene transfer (HGT) and hence are potential agents for the spread of virulence and/or antibiotic resistance genes (ARGs) [5,6].

In addition to ARGs and pathogenicity the prokaryotes, most archaea, and many bacteria encode the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-associated genes (CRISPR-Cas) systems conferring an adaptive immunity against MGEs [7,8]; another form of acquired resistance, to MGEs. The CRISPR-Cas system is composed of CRISPR-loci (unique spacers and direct repeats (DRs) alternately), *cas* genes, and the leader sequence is an AT-rich sequence located upstream of the first repeat promotes transcription of the CRISPR locus [9–11]. Concerning, the classification of KP CRISPR-Cas system, two subtypes have been reported; I-E with one locus and I-E* with two loci up and downstream *cas* genes [12].

The Algerian antimicrobial resistance surveillance reported that the percentage of KP-ESBL was the highest among ESBL-producing Enterobacteriaceae during 2011, 2012, and 2013 with 57.7%, 60.7%, and 57.3%, respectively [13,14]. Consequently, ESBL-KP is considered as one of the most concerning antimicrobial resistance threats in Algeria.

The aims herein were to characterize ARGs, virulence genes, CRISPR systems, prophages, and clonal structure of clinical isolates KP-ESBL producing from the University Hospital Establishment, Oran, Algeria (EHUO).

Materials and methods

Ethical statement

The isolates were received from the Bacteriology laboratory of the University Hospital Establishment of Oran. The hospital routinely stores the ESBL-producing Enterobacteriaceae for further studies. The strains were collected for clinical diagnosis, and no additional sampling was required. A permit was obtained from the Ministry of Health in Algeria (referenced record: 114/Bac/EHU/2014) to transport and characterize the bacterial isolates and related clinical data via anonymization of the patients involved.

Bacterial isolates and antimicrobial susceptibility

Initially, at the EHUO the strains were identified phenotypically by API20E® (bioMérieux-Marcy l'Etoile-France) and double disk synergy technique as KP-ESBL [15]. The antimicrobial

susceptibility testing of bacteria was performed mainly by the disk diffusion method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines [16]. Susceptibility testing was performed against different discs of antibiotics [ampicillin (10µg), ticarcillin (75µg), amoxicillin/clavulanic acid (20/10µg), cephalothin (30µg), cefazolin (30µg), ceftazidime (30µg), cefpirome (30µg), cefotaxime (30µg), cefepime (30µg), cefoxitin (30µg), aztreonam (30µg), ertapenem (10µg), imipenem (10µg), meropenem (10µg), amikacin (30µg), gentamicin (10µg), nalidixic acid (30µg), ciprofloxacin (5µg) pefloxacin (5µg), trimethoprim/sulfamethoxazole (10/20µg), fosfomycin (200µg), nitrofurantoin (300µg)]; The susceptibility to antibiotics was determined by the Mueller-Hinton (MH) agar diffusion method which was previously seeded with a pure culture of the strain to be studied from a 0.5 McFarland suspension and an incubation at 37°C for 18 hours, the control was the *E. coli* ATCC25922. Since 2012, the analysis was updated with several versions of CLSI guidelines, in this paper the 2020 criterion was used [16].

The reports showed that the percentage of KP-ESBL was the highest among ESBL-producing Enterobacteriaceae and associated with nosocomial infection in the EHUO. We received 219 KP-ESBL responsible for nosocomial infectious diseases, collected between January 2011 and December 2012 and isolated from different departments of the EHUO for further tests.

At Karolinska Institutet, the isolates were re-tested and re-identified using MALDI-TOF/ MS (Microflex, MALDI Biotyper, BrukerDaltonics, Germany), the contaminated and non-viable strains were excluded. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) guideline on detection of resistance mechanisms version 2.0 (July 2017) was used to select isolates that had a diameter of less than 27 mm with meropenem for the confirmation kit KPC/MBL and OXA-48 (ROSCO DIAGNOSTICA®, Taastrup, Denmark) [17].

Molecular screening of ARGs

The extraction of the DNA by thermal shock method was carried out for all strains, four to five large colonies were taken, suspended in an Eppendorf tube containing 200 μ L of molecular biology quality water (Sigma Aldrich), after homogenization (vortex) followed by heating at 95°C for 5 minutes, and centrifugation for 2 minutes. The total DNA was retained in the supernatant.

The characterization for all resistant genes was carried out by SYBR Green real-time PCR, using the Rotor Gene 3000 apparatus (Corbett Research, Australia). The analysis of the results was done with the Rotor Gene Real Time Analysis Software (Version 6.1). The same composition was used for the reaction mixture for all PCR-SYBR Green. A total volume of 25 μ l of the reaction mixture contains 12.5 μ l QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Germany), 1.25 μ l of each primer (10 μ M), 7.5 μ l of RNase-free water, and 2.5 μ l DNA tested.

Amplification of the bla_{CTX-M} was done as described previously for all isolates [18]. CTX-M-positive isolates were screened for CTX-M-1, CTX-M-2, and CTX-M-9 groups (<u>S1</u> <u>Table</u>) [19]. The thermal conditions were as follows: denaturation at 95°C for 15 mins, then 40 cycles of 30 s at 95°C, 1 min at 52°C and 1 min at 72°C, and a final extension of 65°C for 30 s. All PCRs were performed in the presence of appropriate positive control.

Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qepA*, and *aac*(6)–*Ib*) was searched for in all strains (<u>S1 Table</u>) [20,21]. The thermal conditions for the amplification of the *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, and *qepA* genes were as follows: denaturation at 95°C for 15 mins, then 30 repetitions of 30 s at 95°C, 1 min at 52°C and 1 min at 72°C, and a final extension of 65°C for 30 s. Furthermore, the conditions of the PCR for *aac* (6)-*Ib* were as follows: denaturation at 95°C for 15 mins, then 45 cycles, 20 s at 95°C. 40 s at 59°C and 20 seconds at 70°C, and a final extension of 65°C for 30 s. PCRs were carried in

presence of the following positive controls: *qnrB*, *qnrS*, *qepA*, and *aac*(6)-*Ib*. For *aac*(6)-*Ib*, the positive PCR products were enzymatically digested by *BtsCl* (New England Biolabs, Ipswich, USA) and incubated at 50°C for 2 hours. Agarose gel 2%, E-Gel® (Invitrogen, USA) was used for the separation of digests.

Amikacin resistant strains were tested for the presence of 16S rRNA methylases genes; *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, and *rmtD* (S1 Table), the primers were previously described elsewhere [22]. Using the following amplification conditions: denaturation at 95°C for 15 minutes and cycle repetitions: 30 s at 95°C and 1 min at 58°C and 1 min at 72°C, and a final extension at 65°C for 30 s. Positive controls for *armA*, *rmtB*, and *rmtD* were included in the PCR reaction.

Later, the Check MDR CT101 microarray (Checkpoints, The Netherlands) was used for strains that were negative in the CTX-M PCR and those which were resistant to cefoxitin for the detection of plasmid-mediated AmpC genes (pAmpC). The bacterial DNA extraction was done by the BioRobot M48 using the MagAttract DNA mini M48 kit (both from Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The Nanodrop (Wilmington, Delaware USA) was used to check the DNA concentration. The results were analyzed by Check-Point Software (version 1.2).

Pulsed-field gel electrophoresis

All isolates were typed using Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) method. It was performed according to the PulseNet protocol for non-O157 *E. coli* using *XbaI* [23]. The band patterns were analyzed by GelCompar II version 5.10 (Applied Maths, Belgium). A dendrogram was generated based on Dice similarity and the Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Averages (UPGMA). Closely related isolates were estimated according to the criteria established by Tenover *et al*. Dice co-efficient of \geq 0.80 was considered the cut-off for possible clonal relatedness [24].

Whole Genome Sequencing (WGS)

A total of nineteen isolates were taken for the WGS, seventeen were selected from the PFGE clusters, and two non-typeable isolates. The Genomic DNA was extracted using MagNApure 96 system (Roche Diagnostics, Nederland, Almere, Netherlands). The extracted DNA was quantified using the third generation Qubit 3.0 fluorometer (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc.) according to the manufacturer's recommendations for the Qubit dsDNA HS Assay Kit (High Sensitivity). Sequencing was carried out on the HiSeq 2500 platform (Illumina R), San Diego, USA) at the Science for Life laboratory (SciLife, Solna, Sweden). Sequencing quality control showed that the 10x coverage was >98% for 19 isolates and the 30x coverage was \geq 98% for 18 isolates. The main duplicate rate was \geq 9.49% and the main median insert size between 186 and 267 (S2 Table). Raw reads data are available from the NCBI database (SRA) as project PRJNA672836 (accession no. SAMN16579464 to SAMN16579482).

In silico analysis and annotation

The trimming and *de novo* assembly of the short paired reads were performed using CLC Genomics Workbench V 11.0, and the CLC Microbial Genomics Module 3.0 (Qiagen Bioinformatics, Aarhus, Denmark). The assembled genomes were mapped to the reference genome *K. pneumoniae* CG43 (GenBank accession number: NC_022566) and to call SNPs using the default settings.

The Center for Genomic Epidemiology database (<u>https://cge.cbs.dtu.dk</u>); ResFinder, PlasmidFinder, and pMLST were used [25,26]. CrisprCasFinder and CRISPRminer were utilized to characterize the CRISPR-Cas loci composed of operon organization, spacers and direct repeated (DRs), typing, self-targeting, and to map anti-CRISPR [9,27]. Basic Local Alignment Search Tool (megaBlast) was used only for non-duplicated spacers in several databases: virus (taxid: 10239), plasmids, and chromosomal bacterial genomes (taxid: 2). The leaders were searched by investing and blasting the regions upstream the CRISPR arrays (up to ~1kb) and using Bacterial promoter prediction program (Bprom) to predict the canonical core promoter elements (-10, -35 and the promoter sequence) of each CRISPR array [28]. PHAge Search Tool Enhanced Release (PHASTER) was used to identify putative prophages [29,30]. Kaptive V 0.7.0 was used to predict the K-type [31].

Assembled contigs have been deposited into the Bacterial Isolate Genome Sequence Database (BIGSdb) (http://bigsdb.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html) and used to predict the virulence genes, the MLST scheme, and 632 loci core genome MLST (cgMLST632) scheme [32]. In this study, the isolates having three virulence gene clusters and more (high virulence factors) were considered as virulent strains while the isolates having less as classic strains (few virulence factors). The used MLST schemes: the first was based on the sequences of seven housekeeping genes (gapA, infB, mdh, pgi, phoE, rpoB, and tonB) and the second cgMLST632 was based on scanning the genomes against 632 loci. Annotated loci were saved in the form of allele numbers which allow the identification of allelic profiles of each isolate. The evolutionary relationship between isolates was assessed by Minimum Spanning Tree (MST), an algorithm implemented in BioNumerics v.7.6.3. The assembled and trimmed contigs in Fasta formats are available in the BIGSdb. The allelic profile of cgMLST scheme was analyzed by BioNumerics v.7.6.3 and the clonal relationship among isolates was investigated by MST using default parameters, and no re-sampling was performed. The allelic profiles were used as categorical data and the resulted phylogenetic network was able to illustrate the connection between isolates by displaying the mismatch between their profiles. According to Bialek-Davenet, clonal groups could be defined as related isolates which have less than 100 allelic mismatches [32]. The MST analysis was also expanded by overlaying the main characteristics of isolates such as virulence factors, ARGs, and infections sites.

The interactive tree of life, iTol V 5.5 (<u>https://itol.embl.de/</u>) was used to annotate the SNP-based analysis tree [<u>33</u>].

Results

Phenotypic analysis

For the bacterial isolates, after confirmation of the ESBL-KP phenotype, we finally included 193 non-duplicate clinical isolates from blood (n = 54), urinary tract infection (UTI) (n = 44) and others infection types (n = 95) (<u>Table 1</u>).

Antimicrobial susceptibility tests were analyzed according to CLSI standards, 99.5% of the strains were resistant to cefotaxime, 76% were resistant to ciprofloxacin, and only 3.6% were resistant to cefoxitin. Resistance to gentamicin was observed in 91.2% of isolates, while resistance to amikacin was observed in 20.2% of isolates. Two strains were resistant to ertapenem and two strains were intermediate to imipenem. Only one strain (0.5%) was intermediate to meropenem (Table 1, S2 Fig, and S3 Table). Eight isolates were tested with ROSCO test; 7 isolates had ESBL and porin loss with synergism between CAZ/clavulanate and one isolate represented no zone of inhibition to temocillin, it was featured as ESBL and OXA-48 with synergism between CAZ/clavulanate. The synergism between CAZ/clavulanate is due to the clavulanate inhibits of beta-lactamases in vitro which creates an area of synergy.

All non-duplicate clinical isolates (N = 193)						
Samples (N = 193)	Blood (n = 54), UTI (n = 44), abdominal fluid (n = 5), respiratory (n = 2), drain (n = 1), vaginal discharge (n = 4), cerebrospinal fluid (n = 9), pleural fluid (n = 1), wound secretion (n = 49), and tracheal sample (n = 24).					
Sampling period	January, 2011 to December, 2012.					
Hospital	University Hospital Establishment of Oran, Algeria.					
Phenotypic resistance to antibiotics (%)	Amoxicillin/clavulanic acid (16.6), ceftazidime (83.9), cefotaxime (99.5), cefoxitin (3.6), ertapenem (1), amikacin (20.2), nalidixic acid (42.5), ciprofloxacin (76), pefloxacin (77.5), gentamicin (91.2).					
Resistance genes and enzymes $(N = 193)$	CTX-M-1 group (n = 191), CTX-M-9 group (n = 1), ESBL SHV 238S and 240K (n = 1), acc(6')-Ib-cr (n = 140), qnrB (n = 123), qnrS (n = 4), armA (n = 17), CMY II (n = 4).					
Combination resistance genes and enzymes (N = 193)	CTX-M-1 group only (n = 30) CTX-M-1 group, $acc(6')$ - <i>lb</i> -cr (n = 28) CTX-M-1 group, $armA$ (n = 6) CTX-M-1 group, CMYII (n = 1) CTX-M-1 group, $qnrB$ (n = 10) CTX-M-1 group, $qnrB$, $acc(6')$ - <i>lb</i> -cr (n = 100) CTX-M-1 group, $qnrB$, $acc(6')$ - <i>lb</i> -cr, $armA$ (n = 5) CTX-M-1 group, $qnrB$, $acc(6')$ - <i>lb</i> -cr, cr , $ArmA$ (n = 2) CTX-M-1 group, $qnrB$, $acc(6')$ - <i>lb</i> -cr, CMYII (n = 1) CTX-M-1 group, $qnrB$, $acc(6')$ - <i>lb</i> -cr, CMYII (n = 1) CTX-M-1 group, $qnrB$, $acc(6')$ - <i>lb</i> -cr, OXA-48 (n = 1) CTX-M-1 group, $qnrB$, $acc(6')$ - <i>lb</i> -cr (n = 3) CTX-M-9 group, $qnrS$ (n = 1) SHV-Variant only (n = 1)					
PFGE results	Typeable isolates (n = 191), the biggest cluster (n = 37), similarity (63.7%), 12 PFGE- clusters.					
Genome sequenced KP-ESBL (N = 19)	1					
Samples	Blood $(n = 7)$, UTIs $(n = 6)$, and others $(n = 6)$.					
Resistance genes						
ESBL resistance genes	$bla_{CTX-M-15}$ (n = 19), bla_{TEM-1B} (n = 12), $bla_{SHV-variant}$ (n = 2), bla_{CMY-2} (n = 1), bla_{CMY-16} (n = 2), and bla_{OXA-48} (n = 1).					
No ESBL resistance genes	armA (n = 2), $qnrB1$ (n = 12), $qnrS1$ (n = 1), $acc(6')$ - <i>Ib-cr</i> (n = 11), $oqxA$ (n = 19), $oqxB$ (n = 19), $aph(3'')$ - <i>Ib</i> (n = 12), $aph(6)$ - <i>Id</i> (n = 13), $aac(3)$ - <i>IIa</i> (n = 12), $aadA1$ (n = 3), $aadA2$ (n = 3), and others					
STs Total STs (17)	ST13 (n = 1), ST14 (n = 1), ST23 (n = 1), ST37 (n = 2), ST48 (n = 1), ST86 (n = 1), ST147 (n = 2), ST111 (n = 1), ST307 (n = 1), ST348 (n = 1), ST392 (n = 1), ST405 (n = 1), ST831 (n = 1), ST1426 (n = 2), ST1942 (n = 1), ST2108 (n = 1).					
High risk clones	ST14 (n = 1), ST37 (n = 2), ST147 (n = 2), ST307 (n = 1).					
K-Types Total K-types (n = 16)						
Virulence	Classic strains (n = 12), virulent strains (n = 7). Associated serotypes with virulence: K1 (n = 1), K2 (n = 2), K3 (n = 1), K31 (n = 1), K62 (n = 1), and K151 (n = 1).					
Replicons Total isolates with replicons (n = 17)	Inc groups IncF: IncHI1 (n = 3), IncL/M (n = 2), IncL/M(poxa-48) (n = 1), IncA/C2 (n = 2) and IncR (n = 2). IncF: FII _K (n = 13), FIB _K (n = 12), FIB (pQil) (n = 3), and FIB (Mar) (n = 2). Col replicons: ColRNAI (n = 3), Col44I (n = 3), Col440II (n = 1), and ColpVC (n = 1).					
CRISPR-Cas system types	Total CRISPR-Cas ($n = 9$), I-E ($n = 5$), I-E [*] ($n = 4$). Total spacers ($n = 184$), spacers length (22 or 23 bp), unique spacers ($n = 135$), matched with phages ($n = 16$), matched with plasmids ($n = 18$), matched with chromosome ($n = 155$), no homology ($n = 26$), Self-target spacers ($n = 9$), DRs I-E length (29 bp), DRs I-E [*] length (28 or 29 bp).					
Phages Total phage (N = 86)	Intact (n = 51), incomplete (n = 17), questionable (n = 18). Phages carried $bla_{CTX-M-15}$ (n = 2).					

Table 1. Summary of the main findings.

In the paper abdominal fluid, respiratory, drain, vaginal discharge, cerebrospinal fluid, pleural fluid, wound secretion, and tracheal sample were grouped as others. DRs: Direct Repeats, UTI: Urinary Tract Infection.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254805.t001

Molecular and core genomic typing

PFGE showed that almost all of the isolates (191/193) were typeable. The PFGE analysis divided the 191 isolates into 37 PFGE types. The majority of the strains were grouped in clonal groups consisting of two or more isolates. The similarity between the isolates was 63.7% which showed a relatively high degree of relatedness between the members of the population. Importantly, the PFGE analysis has the ability to distinguish between clonally related and unrelated isolates. Cluster C11 was the most predominant (n = 35) followed by other medium and minor clusters (S1 Fig). Nineteen isolates were selected for whole-genome sequencing: seventeen representing PFGE-cluster isolates, (one isolate from each cluster, and more than one for the big clusters), and the two non-typeable isolates as well.

cgMLST analysis revealed 16 distinct STs and most of them were well described in the literature. Each PFGE cluster was assigned a distinct ST. The largest cluster C11 had two related STs—ST392 and its single locus variant (SLV) ST147. Two distinct clusters (C9 and C10) were shown to belong to the same sequence type, ST37. The MST disclosed the relatedness of isolates and the connection among STs. We downloaded profiles of all isolates and their STs from the BIGSdb-Kp to draw the MST based on their cgMLST profiles seen in Figs 1 and 2, demonstrate three characteristics: first, the isolates were divergent, having a high number of allelic mismatches (472 to 511). Three isolates of Cluster C11 were found to be linked together in the same clonal group. Second, the cgMLST632 scheme was able to distinguish between strains that had the same ST, for instance in ST147 and ST1426. The number of allelic mismatches within identical STs was very low (i.e.3 and 4 allelic changes within ST1426 and ST147 isolates respectively). Third, the cgMLST increased the resolution in two isolates of ST37 (differed by 294 loci) and showed a high complexity within these isolates suggesting that ST37 isolates are heterogeneous.

SNP-based phylogenetic analysis revealed a sharp discontinuity within isolates. Identical to the cgMLST results, the Maximum Likelihood tree (MLTree) displayed two minor groups of related isolates, but a majority of unrelated isolates were apparently clustered in heterogeneous branches that were well separated from each other. The SNP-based phylogenetic approach identified closely related isolates which were previously obtained by PFGE and cgMLST but with much finer resolution. Furthermore, the phylogenetic analysis revealed congruence between SNP-based analysis and cgMLST, especially within closely related isolates. In total, 85,965 SNPs were present in the alignment, with 19,701 the average SNPs differences over all sequence pairs. Interestingly, SNP-based analysis provided optimal resolution especially within identical STs; ST1426 isolates differed with 27 SNPs (Fig.3).

Genotypic and ARGs analysis

Screening of ARGs by PCRs showed that CTX-M-1 group was the predominant with 98.96% (191/193), only one strain was from the CTX-M-9 group and one strain had SHV-type (238S +240K). About the PMQR, the prevalence of *aac(6')-Ib-cr* and *qnr* genes was very high 72.5% and 65.8%, respectively. Among *qnr* gene, 63.7% were *qnrB*, whereas 2.1% were *qnrS*. Among amikacin-resistant strains (24/193), we found that 17 isolates were positive for *armA*, and 7 isolates were negative for all 16S rRNA methylase encoding genes. Among the isolates resistant to cefoxitin 6/193, 4 had the CMY II and 2 isolates were negative for all pAmpC enzymes. The most prevalent combination was CTX-M group 1, *qnrB* and *aac(6')-Ib-cr* with 51.81% (100/193) (Table 1).

Mapping ARGs revealed that β -lactamases genes were found in all isolates: $bla_{CTX-M-15}$ was found in all isolates, bla_{TEM-1B} (12/19) whereas $bla_{SHV-variant}$ (2/19). Regarding carbapenemase genes, only one strain had bla_{OXA-48} . Two variants of pAmpC were found bla_{CMY-2} (1/19) and



Fig 1. Minimum Spanning Tree (MST) analysis of 19 isolates of *K. pneumoniae* **based on 632 allelic profiles of cgMLST**. Each node within the tree represents a single isolate with a unique genotype. Selected nodes are labeled with corresponding STs. The length of branches linked two nodes indicates the number of allelic mismatches in a pairwise comparison. The oval discontinued dash in red, green, and blue demonstrate the isolates having ST37, ST1426, and ST147, respectively.

 bla_{CMY-16} (2/19). The aminoglycosides resistance genes found were: armA (2/19), aac(3)-IIa (1/19), aadA2 (3/19), aadA1 (1/19), aph(3")-Ib (12/19), and aph(6)-Id (12/19). Resistance genes to fluoroquinolones were detected frequently; both qnrB1 (12/19) and aac(6")-lb-cr (11/19), the latter confers simultaneous resistance to aminoglycosides and fluoroquinolones. We rarely found qnrS1 (1/19). Almost all isolates had the concomitant presence of resistance



Fig 2. Minimum Spanning Trees (MSTs) analysis showing the distribution of MDR profiles, virulence factors, and infection types among 19 isolates of *K. pneumoniae* based on 632 allelic profiles of cgMLST. Each node within the tree represents a single isolate with a unique genotype. Selected nodes are labeled with corresponding STs. The length of branches linked two nodes indicates the number of allelic mismatches in a pairwise comparison. Long branches are marked with dashed lines. Thick lines correspond to a short branch with less than 100 allelic mismatches. The grey zones surrounding nodes indicate that they belong to the same clonal group. Four MST graphs were generated separately based on the following associations. A: MST versus virulence genes, B: MST versus infection types, C: MST versus resistance genes profiles, D: MST versus MDR and virulence classes. MDR: Multi-Drug Resistance. UTI: Urinary Tract Infection.

determinants to β -lactams, aminoglycosides, and fluoroquinolones. We observed the presence of phenicol, sulfonamide, tetracycline, and macrolide resistance genes (<u>Table 1</u> and <u>Fig 4</u>).

Capsular serotype and virulence genes

Typing of the capsular *cps* (*wzc* and *wzi*) revealed sixteen K-type: 1, 2 (n = 2), 3, 6, 12, 15, 18, 20 (n = 2), 27, 31, 61, 62, 63, 64 (n = 2), 102, 124, and 151. K2 was found in two isolates having different STs (ST14 and ST86). The isolates having the same STs, ST147, and ST1426 had the same K-type K64 and K20 respectively (<u>Table 1</u>).

All sequenced isolates had at least *mrk* cluster genes encoding to fimbriae type III, thus giving biofilm formation phenotype. The isolate having the ST23 and K1 was the most virulent



carrying yersiniabactin, aerobactin/receptor, allantoinases, and fimbriae type III clusters, in addition to *iro*, *kfu*, *clb*, *mce* clusters, and *rmpA/A2*. The following K-types: K1 (ST23), K2 (ST14 and ST86), K3 (ST13), K31 (ST2108), K6 (ST348), and K151 (ST405) were found in virulent strains (Table 1 and Fig 4).

Analysis of mobile genetic elements

In total 17 plasmid replicon types were detected (Table 1). The identified replicons were from plasmid incompatibility groups (IncF, IncHI1, IncL/M, IncA/C2, and IncR), and Col plasmids replicons (ColRNAI, Col44I, Col440II, and ColpVC). The replicons were FII_K (n = 13), FIB_K (n = 12), FIB (pQil) (n = 3), and FIB (Mar) (n = 2). The last replicon was found in two isolates and it was simultaneously present with the FIBK. The replicon sequence typing (RST) scheme discriminating of IncF plasmid variants revealed that the same FAB Formula K5:A22: B- in the isolates having the same ST147. The ST of the replicon IncA/C was ST3 or it was the nearest. For the replicon IncN was ST9.

The analysis of the prophages showed that all strains had at least one prophage. The highest number was observed in the isolate having ST111 with 9 prophages. Crossed analysis between the position of the resistance genes and the prophages revealed that $bla_{CTX-M-15}$ was hosted in the incomplete sequence of the phage SJ46 in two isolates (ST86 and ST1942), (Table 1).

Analysis of CRISPR-Cas system

In this study, the occurrence of the CRISPR-Cas system was 47.36% (9/19 isolates). in Fig 5A, two groups are seen; the first, consists of 5 isolates sub-typed I-E and the second is composed of 4 isolates sub-typed I-E*. In our results, the isolates having STs: 392, 147, 2108, 348 were typed I-E, and those who had STs: 13, 23, 111, and 14 were typed I-E*. The anti-CRISPR was





Fig 4. Heatmap with all results (resistance genes, virulence, MLST, K-types, replicons with the ML Tree from the SNP-based analysis) among the sequenced 19 isolates. The scale is modified.

absent in all isolates having the CRISPR-Cas system. Isolates having the sub-type I-E had the highest number of spacers.

A total of 184 non-duplicated spacers were found; 135 spacers were unique and 49 were shared between CRISPR arrays. Blasting spacer's results showed 158 spacers had perfect homology spacers targeting with 16 bacteriophages, 18 plasmids, and 155 chromosomes. Some spacers matched with chromosomes, plasmids, and/or phages. Isolates within the same ST (ST147) had the same array and organization. The rate of self-targeting spacers was 5% (9 of 184) found in 5 of 9 isolates (55.55%) (Table 1 and Fig 5B).

Three leader groups were found: leaders 1 (96bp), leaders 2 (252bp), and leaders 3 (47bp). The first for I-E subtype and the two latest for the I-E* sub-type. Leaders1 and leaders 3 were conserved but leaders 2 had 96.4% of identity. Concerning the core promoter (-10, -35 and promoter) was found for leaders 1 and leaders 2, while leaders 3 had only the promoter. Searching upstream the leaders 2 an ABC transport system was found (Fig 5A).

Discussion

Herein, the data presents genomic epidemiology and surveillance study in ESBL-KP clinical isolates between 2011 and 2012, from one hospital "EHUO" in Oran, Algeria. Phylogenetically, the isolates were genomically diverse and characterized by multiple combinations of ARGs. ESBLs are usually associated with multidrug resistance and have become a great challenge for infection control in human health that resulted in treatment failure [34,35]. Herein, the

Fig 5. Architecture and organization of the CRISPR-Cas system in clinical ESBL-KP isolates. A. The operon organization (*cas* genes), the leaders, classification, and core-promoter. The rows represent *cas* genes in different colors, the brown diamonds represent the spacer, and the blue rectangle represents the Direct Repeated (DR). B. Spacer map, their distribution, and the matching results. Spacers are represented in a box without repeats. Identical spacers are represented by the same ID and color. P: Plasmid, V: Virus or Phage, S: Self-target, RS: The reverse self-target, spacers in red had no homology. +: Longer spacer.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254805.g005

CTX-M group 1 was found in almost all isolates (99%) and featured later *bla*_{CTX-M-15} in the 19 sequenced isolates, which was expected due to its predominance in most parts of the world [<u>36-40</u>]. Rodrigues *et al.* reported that CTX-M-15 was associated with the increase of MDR-KP epidemic clones (ST15, ST147, and ST336) [41]. In our study, two isolates were ST147 and could represent a higher risk in the nosocomial setting, due to the propensity of causing outbreaks. The predominant replicons were IncFIIK and IncFIBK. It was reported that *bla*_{CTX-M-15} is mainly harbored on IncFII_K plasmids in ESBL-KP isolates and it was described as dynamic, with the capacity to disseminate ARGs among Enterobacteriaceae [34,42-44]. The characteristic combination bla_{CTX-M-15}, bla_{TEM-1B}, bla_{OXA-1}, qnrB, and aac(6')-Ib-cr was found in 8/19 isolates and 7/8 were also associated to IncF replicon group which was previously partially described in Morocco; *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-1b}, *bla*_{OXA-1}, *aac*(6')-*Ib-cr*, and *qnrB1* genes were co-transferred and carried by a conjugative plasmid of high molecular weight [45]. In Algeria, the first report of OXA-48-producing KP located in IncL/M-type plasmid, belonging to the pandemic ST101 clone, isolated in May 2014 [46]. Our data show, OXA-48-producing KP was isolated from a patient with UTI in 2012 and belongs to the ST1426 non-epidemic clone, IncL/M replicon, and bla_{OXA-48}. This means that in Algeria, bla_{OXA-48} was present earlier than the first published report.

Regarding AmpC enzymes, CMY-2 type was found, featured as *bla*_{CMY-2} and *bla*_{CMY-16}. CMY-2 is the most widespread type of AmpC enzyme with the widest geographical distribution, including Algeria [47,48]. During the last two decades, PMQR has been reported by the acquisition of qnr, qepA, and aac(6')-Ib-cr genes [49]. It was previously described that qnrB was predominant among strains from Africa while qnrS was mainly detected in strains from Vietnam [50]. Our results showed a high prevalence of PMQR genes *aac(6')Ib-cr* (72.5%), qnrB (63.7%) and rarely qnrS (2%), featured by WGS as qnrB1 and qnrS1. The first report of qnrS1, qnrB1 and qnrB4 was from Enterobacter cloacae clinical isolates from Algerian hospitals, in 2008 [51]. In Algiers, Klebsiella oxytoca was isolated from wastewater hospital had PMQR genes (qnrB1 and aac(6')Ib-cr) [37]. This study is the first report of qnrS1 in ESBL-KP in Algeria. As previously described, clinical isolates carrying armA have been associated with IncL/M plasmids, with the concomitant presence of the bla_{CTX-M3} [52]. Also, armA was identified on IncN plasmids, in animals [53]. In the present study, armA was found in two isolates; one had IncL/M replicon and the second IncN replicon as ST9. This suggests that animal contact and food (animal meat) represent a potential reservoir and a route for dissemination of IncN plasmid harboring armA to humans by HGT.

Herein, an incomplete sequence of *Salmonella* phage was found hosting $bla_{CTX-M-15}$. It was previously described that bacteriophages could contribute to the spread of ARGs among Enterobacteriaceae isolated from animals and food, highlighting the role of HGT of ARGs and bla_{CTX-M} particularly [54,55]. Thus phages could be a reservoir to spread ARGs by transduction.

About the virulent strains, several serotypes of K antigens have been reported around the world, the most studied were K1 and K2 because they were associated with a serious infection [56,57]. It was found that the K1 was associated with the ST23 and K2 was found in several STs: 25, 65, 86, 380, 14, 66, 374, 493, and 1013 (SLV ST5) [58]. In this study, the virulent strains

were K1 (ST23), K2 (ST14 and ST86), K3 (ST13), K6 (ST348), K31 (ST2108), and K151 (ST405).

The MST analysis about the ARGs, virulence factors, and infection types provided an overview of the sequenced isolates, their combination, and relatedness. Fig 2 showed that three isolates of CG147 were isolated from different origins, with few virulence factors (classic) and MDR. Regarding the CG1426, the related isolates were also isolated from distinct origins, possessed few virulence factors and not presenting the same ARGs profiles. The combination MDR and virulent strains was seen in 6 of 19 strains (2 cases of bloodstream infection and 4 other cases). The combination of MDR and virulence genes presents a high health risk by increasing mortality and antibiotics less efficient. It was reported that the prevalence of KP having the combination MDR and hyper-virulence is increasing and our data would provide further arguments for enhancing the clinical awareness for *K. pneumoniae* having the combination MDR and virulence [57].

In three studies, the CRISPR-Cas system in KP genomes had a variable occurrence ranging between 11.5% and 54.4% [14,59,60]. A relation could be seen between STs, CRISPR-Cas type, and types of samples; regarding UTI, from 6 isolates: 4 had no CRISPR-Cas system and 2 had CRISPR-Cas system type I-E. While blood samples, from 7 isolates: 3 isolates had no CRISPR-Cas system, 3 isolates had I-E^{*} and one isolate had I-E. In another study, the subtype I-E was found in isolates mostly from UTI samples and having ST34, 45, 66, 67, 147, 273, 383, 392, and 941, while the subtype I-E^{*} was found in isolates from blood samples present in ST14, 15, 23, 111, 374, 493, and 505 [60]. The leader sequence length is variable, but must be at least 60 bp in length and can be up to 500 bp. Apparently, the sequence length is relatively conserved within a species [12,61]. The leaders' lengths corroborate with previous work from Shen *et al* [14]. Paradoxically, the leaders 3 lacked (-10) and (-35) sites are essential for the interference and not for the adaptation process [62]. Thus, self-target spacers in the loci downstream the leaders 3 could not have auto-immunity function.

The PFGE method was able to distinguish between strains and accurately define dominant clones. Currently, WGS-based typing approaches have become international typing reference methodology. Accordingly, the seven-gene MLST pattern can easily be extracted from WGS data; the analyzed genomes could be sorted into 16 different STs. MLST analysis has shown that the spread of ESBL-KP is largely multi-clonal, by contrast, the international spread of KPC-KP is limited to specific clones. The PFGE and MLST identified that the largest cluster (C11) was ST147 (n = 35), this sequence type poses a serious public health threat worldwide.

In our study, the analysis of five major groups C1, C7, C8, C9, and C11 showed twentyeight resistance patterns. The relationship between resistance patterns and pulsotype demonstrated that the strains from C11 had mostly the pattern CEP CTX CAZ NAL PEF CIP GEN (42.8%) but this same resistance profile belonged to the PFGE-clusters (<u>S4 Table</u>). So far, there is no significant association between the resistance patterns and pulsotypes of ESBL-KP isolates, the same statement was previously described in several studies concerning KP clinical isolates [<u>63,64</u>]. Chromosomally identical *K. pneumoniae* strains had different resistance profiles; this is due to the presence of plasmid-mediated resistance genes [<u>64,65</u>]. Phenotypic methods such as antimicrobial susceptibility tests had a weak discriminatory power [<u>65</u>].

The first cgMLST scheme employed was based on a total of 694 highly conserved genes [47], and cluster analysis based on the data-enabled precise definition of globally distributed virulent strains and MDR clonal groups. During this study, we identified the CGs and used the same rule of Bialek-Davenet *et al* for the definition of CGs for which KP cgMLST CGs were defined as groups of cgMLST profiles \leq 100 allelic mismatches. The cgMLST gives an overview of major CGs and yielded a satisfactory resolution within identical sequence types but it

is not sufficient for outbreak investigation as set out in our study. Hence we join the conclusion that the authors highlighted the need to combine additional loci to gain more resolution required to understand the recent transmission events for epidemiological purposes.

More recently, Zhou *et al* have designed an extended scheme of cgMLST based on a total of 1,143 conserved genes from 671 KP genomes [66]. The novel extended cgMLST scheme was able to distinguish outbreak from non-outbreak isolates and highlighted the possibility to reveal several sub-clones of epidemic ST11 clone. Furthermore, based on this cgMLST, a threshold with <10 alleles difference was applied for clustering outbreak strains. In the same context, few studies have validated this strict cut-off (< 10 allele difference) for tracing local and regional clusters of KPC ST512 from several healthcare facilities in Finland, and to seek for an eventual epidemiological link between MDR-KP ST348 isolates in horses and humans in Portugal [67,68].

In addition to cgMLST, we conducted an SNP-based analysis and constructed a deep phylogeny that provided reliable and concordant results. Firstly, to differentiate between isolates (631 and 644 isolates) within identical STs; ST1426 isolates differed with 27 SNPs and secondly, to know the occurrence of these isolates was sporadic despite their close date of isolation (1 month). The isolates have shown a slight difference in their profiles of ARGs and replicon types (Fig 2). The bla_{OXA-48} and its associative IncL/M replicon type were restricted to the 631 isolate. The same characteristics for the two isolates (601 and 246 both had ST147) with the exception that differed with 48 SNPs and isolated separately in an interval of time of one year. These isolates are distantly related to their SLV ST392 (2,465 SNPs). In the same context of identical STs (ST37), the amplitude of polymorphism reached 12,506 SNPs, due to a major recombinational event. The SNP-based analysis provided insight into the genetic diversity of the detected clones of ESBL-KP and has proven its capability for readily scaling the SNP differences among unrelated and closely related isolates. However, it is still unclear whether a simple or strict SNP threshold is appropriate for case definition of an outbreak. The SNP thresholds vary widely even for one pathogen and the difficulty to define allele/SNP threshold remains a matter of discussion in outbreak simulations [69]. Nowadays, the majority of analyses are based on SNP-based approaches which provided an exceptionally high resolution. However, these approaches are on the other hand more flexible as they are not subjected to predefined schemes. The analyses are dependent on the quality of sequencing, assembly, and essentially the selection of reference genome. Consequently, such approaches tend to be less standardized and can hamper the comparability between different studies, especially if different parameters are used i.e. different reference genome. Alternatively, for some species including K. pneumoniae the BacWGSTdb is a useful, free, and public database for typing and tracking outbreak sources [70].

There is still a paucity of surveillance and epidemiology data of antimicrobial resistance in Africa generally and Algeria specially. The reports from the Algerian surveillance system are statistically not representative of the situation; few labs are collaborating comparing to the size of the country. To complement current approaches, sentinel genomic surveillance of MDR-virulent-KP could be of high public health importance in Algeria.

Conclusions

This study revealed the dissemination of ESBL-producing *K. pneumoniae* in the EHUO, and showed that the hospital is a reservoir of highly pathogenic lineages. Importantly, WGS provided a deeper insight into the epidemiological characterization of major clones, including resistome, virulome, plasmid replicon typing, phage typing, and CRISPR-Cas contents. The cgMLST and SNP-based analysis were able to display the phylogenetic relationship among the

studied clones; our finding pointed out a polyclonal spread of ESBL-KP with high genetic diversity. Furthermore, the combination of the PFGE and SNP-based analyses provided optimal resolution for the clinical isolates, indicating no evidence of a classical outbreak between 2011 and 2012 in this hospital. In terms of resistome and virulome, the strains demonstrated an MDR and/or virulence profiles. These high-risk strains pose a serious challenge for clinical prevention, diagnosis, and treatment. Undoubtedly, there is a compelling need for more comprehensive approaches to understand the evolution and transmission of these successful high-risk clones. To our knowledge, this is the first report of *qnrS1*, virulence genes, and CRISPR--Cas system in *K. pneumoniae* in Algeria. Finally, ESBL-KP isolates cause nosocomial infections and therefore public health problems, more genomic surveillance should be a priority in the hospital environment.

Supporting information

S1 Fig. Pulsed-field gel electrophoresis after *XbaI* digestion, Genomic DNA macro-restriction profiles of 193 clinical isolates ESBL-KP. (PDF)

S2 Fig. Graph of the interpretive results of antimicrobial susceptibility according to CLSI 2020.

(DOCX)

S1 Table. Primers sequences. B: G or T or C, M: A or C, V: G or A or C, H: A or T or C, S: G or C, Y: T or C.

(DOCX)

S2 Table. Sequencing quality of the nineteen sequenced isolates. (XLSX)

S3 Table. Interpretive results of antimicrobial susceptibility according to CLSI 2020, 193 clinical isolates ESBL-KP. A: Salmonella breakpoints. (DOC)

S4 Table. Relationship between resistance patterns and PFGE-pulsotype. AMC: Amoxicillin/clavulanic acid, CAZ: Ceftazidime, CTX: Cefotaxime, CEF: Cefepime, FOX: Cefoxitin, ERT: Ertapenem, IMP: Imipenem, MEM: Meropenem, AMK: Amikacin, GEN: Gentamicin, NAL: Nalidixic acid, CIP: Ciprofloxacin, PEF: Pefloxacin. (DOCX)

S1 Raw images. (PDF)

Acknowledgments

We thank all the technicians of the laboratory of bacteriology, EHU of Oran and the computer and network service of the University of Sciences and Technology of Oran, Algeria.

We are grateful to the laboratory analysts of the Clinical microbiology, Karolinska University Hospital Solna, Stockholm and especially the Giske's research group.

Author Contributions

Conceptualization: Radia Dali-Yahia, Bouabdallah Rahmani, Christian G. Giske.

Data curation: Assia Zemmour, Christian G. Giske.

Formal analysis: Assia Zemmour, Radia Dali-Yahia, Christian G. Giske.

Funding acquisition: Assia Zemmour, Christian G. Giske.

Investigation: Assia Zemmour, Radia Dali-Yahia, Nadjia Saidi-Ouahrani, Christian G. Giske.

Methodology: Assia Zemmour, Hissa M. Al-Farsi, Christian G. Giske.

Project administration: Nadjia Saidi-Ouahrani, Bouabdallah Rahmani, Nora Benhamouche.

Resources: Radia Dali-Yahia, Nora Benhamouche, Christian G. Giske.

Software: Assia Zemmour, Makaoui Maatallah, Hissa M. Al-Farsi, Christian G. Giske.

Supervision: Nadjia Saidi-Ouahrani, Christian G. Giske.

Validation: Assia Zemmour, Nadjia Saidi-Ouahrani, Bouabdallah Rahmani.

Visualization: Makaoui Maatallah, Christian G. Giske.

Writing - original draft: Assia Zemmour, Makaoui Maatallah, Nadjia Saidi-Ouahrani.

Writing – review & editing: Assia Zemmour, Makaoui Maatallah, Hissa M. Al-Farsi, Christian G. Giske.

References

- Merino S, Camprubí S, Albertí S, Benedí VJ, Tomás JM. Mechanisms of Klebsiella pneumoniae resistance to complement-mediated killing. Infect Immun. 1992; 60(6):2529–2535. <u>https://doi.org/10.1128/iai.60.6.2529-2535.1992</u> PMID: <u>1587619</u>
- 2. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum b-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev. 2005; 18(4): 657–686. https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005 PMID: 16223952
- Giske CG, Sundsfjord AS, Kahlmeter G, Woodford N, Nordmann P, Paterson DL et al. Redefining extended-spectrum β-lactamases: balancing science and clinical need. J Antimicrob Chemother. 2009; 63(1): 1–4. <u>https://doi.org/10.1093/jac/dkn444</u> PMID: <u>18957393</u>
- World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. 2014. Available from: <u>https://apps.who.int/iris/handle/10665/112642</u>.
- Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. Nat Rev Microbiol. 2005; 3(9): 722–732. <u>https://doi.org/10.1038/nrmicro1235</u> PMID: <u>16138100</u>
- Partridge SR. Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. FEMS microbiology reviews. 2011; 35(5): 820–855. <u>https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00277.x</u> PMID: 21564142
- Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. Nucleic Acids Res. 2007; 35: W52–W57. <u>https://doi.org/10.1093/nar/</u> gkm360 PMID: 17537822
- Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. Nat Rev Microbiol. 2015; 13(11): 722–736. <u>https://doi.org/10. 1038/nrmicro3569</u> PMID: <u>26411297</u>
- Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. Microbiology (Reading). 2005; 151(Pt 8): 2551– 2561. <u>https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0</u> PMID: <u>16079334</u>
- Jansen R, van Embden JD, Gaastra W, Schouls LM. Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes. OMICS. 2002; 6(1): 23–33. <u>https://doi.org/10.1089/15362310252780816</u> PMID: <u>11883425</u>
- Díez-Villaseñor C, Almendros C, García-Martínez J, Mojica FJM. Diversity of CRISPR loci in *Escherichia coli*. Microbiology (Reading). 2010; 156(Pt5): 1351–1361. <u>https://doi.org/10.1099/mic.0.036046–0</u>
- Shen J, Lv L, Wang X, Chen G. Comparative analysis of CRISPR-Cas systems in *Klebsiella* genomes. J Basic Microbiol. 2017; 57(4): 325–336. <u>https://doi.org/10.1002/jobm.201600589</u> PMID: <u>28156004</u>
- **13.** Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques, Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques. 13eme rapport d'évaluation (Janvier à décembre 2011). Available from http://www.sante.dz/aarn/documents/pdf/rapport13.pdf.

- Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques, Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques. 14eme rapport d'évaluation (2012–2013). Available from <u>http://www.sante.dz/aarn/documents/pdf/evaluation-2012_2013.pdf</u>.
- Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer β-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis. 1988; 10(4): 867–878. <u>https://doi.org/10.1093/clinids/10.4.867</u> PMID: 3263690
- 16. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2020;30th ed, supplement M100. Wayne, PA.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. The EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. 2017. Version 2.0.
- Tofteland S, Haldorsen B, Dahl KH, Simonsen GS, Steinbakk M, Walsh TR, et al. Effects of phenotype and genotype onmethods for detection of extended-spectrum-β-lactamase-producing clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Norway. J Clin Microbiol. 2007; 45(1): 199–205. https://doi.org/10.1128/JCM.01319-06 PMID: 17079502
- Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β-lactamases. J Antimicrob Chemother. 2006; 57(1): 154–155. <u>https://doi.org/10. 1093/jac/dki412</u> PMID: <u>16284100</u>
- Zhou TL, Chen XJ, Zhou MM, Zhao YJ, Luo XH, Bao QY. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates in Wenzhou, Southern China, 2002–2008. Jpn J Infect Dis. 2011; 64(1): 55–57. PMID: <u>21266756</u>.
- 21. Shin SY, Kwon KC, Park JW, Song JH, Ko YH, Sung JY, et al. Characteristics of aac(6')-lb-cr gene in Extended-Spectrum β-Lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumonia isolated from Chungnam area. Korean J Lab Med. 2009; 29(6): 541–550. <u>https://doi.org/10.3343/kjlm.2009.29.6.541</u> PMID: 20046086
- Castanheira M, Fritsche TR, Sader HS, Jones RN. *RmtD* 16S RNA methylase in epidemiologically unrelated spm-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(4): 1587–1588. <u>https://doi.org/10.1128/AAC.01502-07</u> PMID: <u>18367713</u>
- Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. Foodborne Pathog Dis. 2006; 3: 59–67. <u>https://doi.org/10.1089/fpd.2006.3</u>. 59 PMID: 16602980
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995; 33: 2233–2239. <u>https://doi.org/10.1128/jcm.33.9.2233-2239.1995</u> PMID: 7494007
- Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. J Antimicrob Chemother. 2012; 67(11):2640–2644. <u>https://doi. org/10.1093/jac/dks261</u> PMID: 22782487
- Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, et al. PlasmidFinder and pMLST: *in silico* detection and typing of plasmids. Antimicrob. Agents Chemother. 2014; 58(7): 3895– 3903. <u>https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14</u> PMID: <u>24777092</u>
- Zhang F, Zhao S, Ren C, Zhu Y, Zhou H, Lai Y, et al. CRISPRminer is a knowledge base for exploring CRISPR-Cas systems in microbe and phage interactions. Commun Biol. 2018; 1: 180. <u>https://doi.org/ 10.1038/s42003-018-0184-6</u> PMID: <u>30393777</u>
- Solovyev V, Salamov A. Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences. Metagenomics and its Applications in Agriculture ed: Nova Science Publishers. 2011: 61–78.
- Zhou Y, Liang Y, Lynch KH, Dennis JJ, Wishart DS. PHAST: a fast phage search tool. Nucleic Acids Res. 2011; 39: W347–52. <u>https://doi.org/10.1093/nar/gkr485</u> PMID: <u>21672955</u>
- Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. Nucleic Acids Res. 2016; 44: W16–W21. <u>https://doi.org/10.1093/nar/gkw387</u> PMID: <u>27141966</u>
- Wyres KL, Wick RR, Gorrie C, Jenney A, Follador R, Thomson NR et al. Identification of *Klebsiella* capsule synthesis loci from whole genome data. Microb Genom. 2016; 2(12): e000102. <u>https://doi.org/10. 1099/mgen.0.000102</u> PMID: 28348840
- Bialek-Davenet S, Criscuolo A, Ailloud F, Passet V, Jones L, Delannoy-Vieillard AS et al. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. Emerg Infect Dis. 2014; 20(11): 1812–1820. <u>https://doi.org/10.3201/eid2011.140206</u> PMID: <u>25341126</u>

- Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. Nucleic Acids Res. 2019; 47(W1): W256–W259. <u>https://doi.org/10.1093/nar/gkz239</u> PMID: 30931475
- Coelho A, González-López JJ, Miró E, Alonso-Tarrés C, Mirelis B, Larrosa MN et al. Characterisation of the CTX-M-15-encoding gene in *Klebsiella pneumoniae* strains from the Barcelona metropolitan area: plasmid diversity and chromosomal integration. Int J Antimicrob Agents. 2010; 36(1): 73–78. <u>https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.03.005</u> PMID: 20392607
- 35. Wang X, Chen G, Wu X, Wang L, Cai J, Chan EW et al. Increased prevalence of carbapenem resistant Enterobacteriaceae in hospital setting due to cross-species transmission of the *bla_{NDM-1}* element and clonal spread of progenitor resistant strains. Front Microbiol. 2015; 6: 595. <u>https://doi.org/10.3389/</u> fmicb.2015.00595 PMID: 26136735
- 36. Tokajian S, Eisen JA, Jospin G, Farra A, Coil DA. Whole genome sequencing of Extended-Spectrum β-Lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from a patient in Lebanon. Front Cell Infect Microbiol. 2015; 5: 32. https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00032 PMID: 25905047
- Anssour L, Messai Y, Estepa V, Torres C, Bakour R. Characteristics of ciprofloxacin-resistant Enterobacteriaceae isolates recovered from wastewater of an Algerian hospital. J Infect Dev Ctries. 2016; 10 (7): 728–734. <u>https://doi.org/10.3855/jidc.6727</u> PMID: <u>27482804</u>
- Shehreen S, Chyou TY, Fineran PC, Brown CM. Genome-wide correlation analysis suggests different roles of CRISPR-Cas systems in the acquisition of antibiotic resistance genes in diverse species. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2019; 374(1772): 20180384. <u>https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0384</u> PMID: <u>30905286</u>
- Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. J Antimicrob Chemother. 2007; 59: 165–174. <u>https://doi.org/10.1093/jac/ dkl483</u> PMID: <u>17158117</u>
- 40. Rossolini G, D'Andrea M, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum β-lactamases. Clin Microbiol Infect. 2008; 14 Suppl 1: 33–41. <u>https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01867.x</u> PMID: 18154526
- Rodrigues C, Machado E, Ramos H, Peixe L, Novais Â. Expansion of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in hospitalized patients: a successful story of international clones (ST15, ST147, ST336) and epidemic plasmids (IncR, IncFIIK). Int J Med Microbiol. 2014; 304(8): 1100–1108. <u>https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.08.003</u> PMID: <u>25190354</u>
- Dolejska M, Brhelova E, Dobiasova H, Krivdova J, Jurankova J, Sevcikova A et al. Dissemination of IncFII_K-type plasmids in multiresistant CTX-M-15-producing Enterobacteriaceae isolates from children in hospital paediatric oncology wards. Int J Antimicrob Agents. 2012; 40(6): 510–515. <u>https://doi.org/10. 1016/j.ijantimicag.2012.07.016</u> PMID: 23043911
- Carattoli A. 2013. Plasmids and the spread of resistance. Int J Med Microbiol. 2013; 303(6–7): 298– 304. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.001 PMID: 23499304
- Carattoli A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53(6): 2227–2238. https://doi.org/10.1128/AAC.01707-08 PMID: 19307361
- 45. Barguigua A, El Otmani F, Talmi M, Reguig A, Jamali L, Zerouali K et al. Prevalence and genotypic analysis of plasmid-mediated β-lactamases among urinary *Klebsiella pneumoniae* isolates in Moroccan community. J Antibiot (Tokyo). 2013; 66(1): 11–16. https://doi.org/10.1038/ja.2012.91 PMID: 23093031
- Loucif L, Kassah-Laouar A, Saidi M, Messala A, Chelaghma W, Rolain JM. Outbreak of OXA-48-Producing *Klebsiella pneumonia* involving a Sequence Type 101 Clone in Batna University Hospital, Algeria. Antimicrob Agents Chemother. 2016; 60(12): 7494–7497. <u>https://doi.org/10.1128/AAC.00525-16</u> PMID: 27645236
- 47. Koeck JL, Arlet G, Philippon A, Basmaciogullari S, Thien HV, Buisson Y et al. A plasmid-mediated CMY-2 β-lactamase from an Algerian clinical isolate of *Salmonella senftenberg*. FEMS Microbiol Lett. 1997; 152: 255–260. <u>https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10436.x</u> PMID: <u>9231418</u>
- 48. labadene H, Messai Y, Ammari H, Alouache S, Verdet C, Bakour R et al. Prevalence of plasmid-mediated AmpC β-lactamases among Enterobacteriaceae in Algiers hospitals. Int J Antimicrob Agents. 2009; 34: 340–342. <u>https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.05.011</u> PMID: <u>19570655</u>
- Poirel L, Cattoir V, Nordmann P. Is plasmid-mediated quinolone resistance a clinically significant problem?. Clin Microbiol Infect. 2008; 14(4): 295–297. <u>https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01930.x</u> PMID: <u>18190576</u>
- Breurec S, Guessennd N, Timinouni M, Le TA, Cao V, Ngandjio A et al. *Klebsiella pneumoniae* resistant to third-generation cephalosporins in five African and two Vietnamese major towns: multiclonal population structure with two major international clonal groups, CG15 and CG258. Clin Microbiol Infect. 2013; 19(4): 349–355. <u>https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03805.x</u> PMID: 22390772

- Iabadene H, Messai Y, Ammari H, Ramdani-Bouguessa N, Lounes S, Bakour R et al. Dissemination of ESBL and Qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria. J Antimicrob Chemother. 2008; 62(1): 133–136. https://doi.org/10.1093/jac/dkn145 PMID: 18385142
- 52. Bercot B, Poirel L, Nordmann P. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases among Extended-Spectrum β-Lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 2008; 52(12): 4526–4527. https://doi.org/10.1128/AAC.00882-08 PMID: 18838598
- González-Zorn B, Teshager T, Casas M, Porrero MC, Moreno MA, Courvalin P et al. armA and aminoglycoside resistance in Escherichia coli. Emerg Infect Dis. 2005; 11: 954–956. <u>https://doi.org/10.3201/</u> eid1106.040553 PMID: <u>15963296</u>
- Zhang Y, Lejeune JT. Transduction of bla_{CMY-2}, tet(A) and tet(B) from Salmonella enterica subspecies enterica serovar Heidelberg to S. Typhimurium. Vet Microbiol. 2008; 129(3–4): 418–425. <u>https://doi.org/ 10.1016/j.vetmic.2007.11.032</u> PMID: <u>18187273</u>
- Colavecchio A, Cadieux B, Lo A, Goodridge LD. Bacteriophages Contribute to the Spread of Antibiotic Resistance Genes among Foodborne Pathogens of the Enterobacteriaceae Family—A Review. Front Microbiol. 2017; 8: 1108. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01108 PMID: 28676794
- 56. Lam MMC, Wyres KL, Duchêne S, Wick RR, Judd LM, Gan YH et al. Population genomics of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clonal-group 23 reveals early emergence and rapid global dissemination. Nat Commun. 2018; 9(1): 2703. https://doi.org/10.1038/s41467-018-05114-7 PMID: 30006589
- Liu C, Shi J, Guo J. High prevalence of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* infection in the genetic background of elderly patients in two teaching hospitals in China. Infect Drug Resist. 2018; 11: 1031– 1041. <u>https://doi.org/10.2147/IDR.S161075</u> PMID: <u>30104891</u>
- Cubero M, Grau I, Tubau F, Pallarés R, Dominguez MA, Liñares J et al. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* serotype K1 clinical isolates form robust biofilms at the air liquid interface. PLoS ONE. 2019; 14 (9): e0222628. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222628</u> PMID: <u>31532800</u>
- Li HY, Kao CY, Lin WH, Zheng PX, Yan JJ, Wang MC et al. Characterization of CRISPR-Cas systems in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates uncovers its potential association with antibiotic susceptibility. Front. Microbiol. 2018; 9: 1595. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01595 PMID: 30061876
- Ostria-Hernández ML, Sánchez-Vallejo CJ, Ibarra JA, Castro-Escarpulli G. Survey of clustered regularly interspaced short palindromic repeats and their associated Cas proteins (CRISPR/Cas) systems in multiple sequenced strains of *Klebsiella pneumoniae*. BMC Res Notes. 2015; 8: 332. <u>https://doi.org/10.1186/s13104-015-1285-7</u> PMID: 26238567
- Bonomo ME, Deem MW. The physicist's guide to one of biotechnology's hottest new topics: CRISPR-Cas. Phys Biol. 2018; 15(4): 041002. https://doi.org/10.1088/1478-3975/aab6d6 PMID: 29543191
- Yosef I, Goren MG, Qimron U. Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res. 2012; 40(12): 5569–5576. <u>https://doi.org/10.1093/nar/gks216 PMID: 22402487</u>
- Mohamed ER, Aly SA, Halby HM, Ahmed SH, Zakaria AM, El-Asheer OM. Epidemiological typing of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, which causes paediatric ventilator-associated pneumonia in Eqypt. J Med Microbiol. 2017; 66(5): 628–634. https://doi.org/10.1099/jmm.0.000473 PMID: 28485710
- Sękowska A, Gospodarek E, Kamińska D. Antimicrobial susceptibility and genetic similarity of ESBLpositive Klebsiella pneumoniae strains. Arch Med Sci. 2012; 8(6): 993–997. <u>https://doi.org/10.5114/</u> aoms.2012.32404 PMID: 23319972
- Aitta AA, El Said M, Gamal D, El-Kholy A, Omer M et al. Biotyping and molecular characterization of Klebsiella pneumoniae producing extended-spectrum beta-lactamase in Cairo, Egypt: a multicenter study. Researcher. 2013; 5(9): 1–11.
- Zhou H, Liu W, Qin T, Liu C, Ren H. Defining and Evaluating a Core Genome Multilocus Sequence Typing Scheme for Whole-Genome Sequence-Based Typing of *Klebsiella pneumoniae*. Front Microbiol. 2017; 8: 371. <u>https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00371</u> PMID: <u>28337187</u>
- van Beek J, Räisänen K, Broas M, Kauranen J, Kähkölä A, Laine J et al. Tracing local and regional clusters of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* ST512 with whole genome sequencing, Finland, 2013 to 2018. Euro Surveill. 2019; 24(38): 1800522. <u>https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019</u>. 24.38.1800522
- Trigo da Roza F, Couto N, Carneiro C, Cunha E, Rosa T, Magalhães M. Commonality of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* ST348 Isolates in Horses and Humans in Portugal. Front Microbiol. 2019; 10: 1657. <u>https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01657</u> PMID: <u>31379799</u>
- Schürch AC, Arredondo-Alonso S, Willems RJL, Goering RV. Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches. Clin Microbiol Infect. 2018; 24(4): 350–354. <u>https://doi.org/10.1016/j. cmi.2017.12.016</u> PMID: <u>29309930</u>

70. Feng Y, Zou S, Chen H, Yu Y, Ruan Z. BacWGSTdb 2.0: a one-stop repository for bacterial wholegenome sequence typing and source tracking. Nucleic Acids Res. 2021; 49(D1): D644–D650. <u>https:// doi.org/10.1093/nar/gkaa821</u> PMID: <u>33010178</u>

Article 2

 $See \ discussions, stats, and author \ profiles \ for \ this \ publication \ at: \ https://www.researchgate.net/publication/322334736$

Phenotypic and Genotypic Identification of Bacteria from Women Breast-Milk and the Feces of their Childs in the Western Region of Algeria

Article in Journal of Pure and Applied Microbiology · December 2017

DOI: 10.22207/JPAM.11.4.15

citations 0		READS	
10 autho	ors, including:		
0	Malika Mekhici Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf 1 PUBLICATION 0 CITATIONS SEE PROFILE		Bertrand Cornu Université Libre de Bruxelles 8 PUBLICATIONS 32 CITATIONS SEE PROFILE
	W. Dib University of Oran 29 PUBLICATIONS 25 CITATIONS SEE PROFILE		Assia Zemmour Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf 2 PUBLICATIONS 0 CITATIONS SEE PROFILE

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:

Association analysis of the IL-1 gene cluster polymorphisms with aggressive and chronic periodontitis in the Algerian population View project

Phenotypic and Genotypic Identification of Bacteria from Women Breast-Milk and the Feces of their Childs in the Western Region of Algeria

Malika Talhi-Mekhici^{1*}, Bertrand Cornu², Rahma Talhi- Mehaya¹, Djemaia Sahraoui¹,Wafaa Dib³, Leila Amel Yazi⁴, Assia Zemmour¹, Saidi-Ouahrani Nadjia⁶, Mourad Kacem⁵ and Corinne Vander Wauven²

¹Laboratoire de Génétique moléculaire, Département de Génétique Moléculaire Appliquée. Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf (USTO-MB), Algérie.
²Institut de Recherches Microbiologiques JM Wiame, Av. E. Gryson 1, B-1070 Bruxelles, Belgique.
³Laboratoire de Physiologie de la Nutrition et Sécurité Alimentaire, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université d'Oran 1, Ahmed Ben Bella, Algérie.
⁴Service de Bactériologie, Etablissement Hospitalier Universitaire d'Oran (EHUO), Algérie.
⁵Département de Biotechnologie, Faculté des Sciences, Université d'Oran 2, Mohamed Ben Ahmed, Algérie.
⁶Laboratoire de biologie du développement et de la différenciation, Université d'Oran 1, Ahmed Ben Bella, Algérie.

http://dx.doi.org/10.22207/JPAM.11.4.15

(Received: 02 October 2017; accepted: 07 November 2017)

Breast-milk is an important source of bacteria for the colonization of the infant's gut. The aim of our study was to isolate and identify bacteria from samples of breast-milk of 32 women and from fecal samples of their breast-fed infants. Antimicrobial activity of isolates was also performed. A total of 155 isolates were characterized by phenotypic tests and identified by 16S rDNA sequencing analysis. The isolates belonged to 6 different species of acid lactic bacteria (LAB) and *Staphylococcus epidermidis*. Enterococcus faecium was the most frequently isolated species (40.8%) and faeces (42.5%). According to the mother's lifestyle, we noticed that the genus Enterococcus was the most frequently isolated from rural mother's milk as well as urban mother's milk. Lactobacillus fermentum ($P \le 0.05$) and Staphylococcus epidermidis ($P \le 0.01$) were isolated only from rural mother's milk. An antimicrobial activity was observed in 30 strains from 148 LAB, the higher level of antagonist was with *E.faecium* (35 mm). The observed results showed that the isolated strains from rural mother's milk were different from that urban mother's milk. Eventual studies can be carried out about lifestyle and nutrition of mothers to explain the effect on the flora found in the milk and feces infants.

Keywords: Human milk, Feces infant, Bacteria, identification, Antimicrobial activity.

Breastfeeding is largely recognized as an important factor for the child's health after birth. It is associated with lower infant morbidity and mortality, as well as with reduced incidence and severity of infections^{1 2 3}. The establishment of the gut microbiota in newborns is a crucial step for gut maturation^{4 5}, metabolic and immunologic programming, and consequently health status⁶.

Human milk appears as an important source of bacteria for the colonization of the infant's gut and the same species of bacteria are

^{*} To whom all correspondence should be addressed. Tel.: +2130554242773;

E-mail: malika.talhi@univ-usto.dz

found in the infant's feces and their mother's milk^{7 8 9 10 11}. The microbiome of human milk is very diverse. Sequencing of the 16S rRNA gene has shown the complexity of the bacterial community in breast-milk^{12 13 14}, its variability among women and its relative stability over time¹⁵ ¹². Culture-independent methods consistently show *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, and *Streptococcus* having the most relative abundance^{16 12 17}.

On the other hand, culture-dependent methods have shown the prevalence of the facultative anaerobic genera *Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Propionibacterium*. Other genera isolated comprise *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Veilonella*, and *Rothia*^{9 18 19 17 20}. The presence of lactic acid bacteria (LAB) in human milk is well documented^{7 21 19}.

Therefore, milk is a source of lactic bacteria for the infant gut ⁷ ¹⁹. LAB form a large group of anaerobic and aero-tolerant, non-sporulating, Gram-positive, catalase and oxidase-negative rods and cocci, generally with complex nutritional requirements. They produce antimicrobial substances, such as bacteriocins and organic acids, which can inhibit the growth of gastro intestinal pathogens in the infant's gut²² ²³ ²⁴ ²⁵. Bacteriocins have important potential applications in food and pharmaceutical industries²⁶ ²⁷

The transmission of LAB with antibacterial activity through breast-feeding could play an important role in the prevention of intestinal infections and in the establishment of a healthy gut microbiome in the infant. The aim of our research was to identify the bacteria from mother-infant couples in Algeria. The second aim was to assess the antibacterial properties of LAB from breast milk and infants' feces. Few publications have addressed the question of the antimicrobial activity of LAB from breast-milk or infants, despite its potential contribution to their probiotic potential²⁸

Moreover, previous studies on breast milk and infant gut microbiota have been conducted mostly in western countries or China. Yet there are geographical differences in infant's gut microbiota and environmental factors, such as diet and familial environment, are known to influence its composition³¹ ⁶. In our work, we have screened mother-infant couples in Algeria, a country where few studies have been conducted in the field³².

MATERIAL AND METHODS

Sampling and isolation of LAB

The 32 couples mothers-infant were recruited from the hospital "Etablissement Hospitalier Universitaire d'Oran, EHUO". The collected breast milk samples and feces were analyzed within the Service de Bactériologie, Etablissement Hospitalier Universitaire d'Oran (EHUO).

All participants were selected according to the following criteria: healthy women without current or past infection, full-term pregnancy and absence of infant or maternal perinatal problems. The infants were full-term vaginally delivered and breastfed. The mothers were informed of the procedures and the aims of the experiment, and gave their consent to the taking of samples. The milk samples were collected in sterile tubes, by manual expression using sterile gloves and after wiping the nipples and areola with a swab soaked in sterile water. The first drops of milk were not collected. Feces samples of the newborns (1g) were collected with sterile swab immersed, in 9 mL of sterile saline to allow the dispersion of samples.

Samples were collected from 32 mothers and their infants aged from 1 to 6 months. The samples were processed immediately after collection. Serial dilutions of the samples were plated in triplicate on specific culture media: de Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS, Oxoid) supplemented with 0.5g/L of L-cysteine (MRScys) and Bifidobacteria Selective Medium agar (BSM)³³. The plates were incubated at 37°C under anaerobic conditions (AnaeroGen, Oxoid) for 48 h to 72 h. Colonies with different morphologies were streaked on the appropriate medium. Purified isolates were tested for catalase and oxidase, and submitted to Gram staining. All isolates which were catalase-negative, oxidase negative and Grampositive were kept for further analysis and stored at -80°C as frozen cultures in MRS broth with 50% glycerol.

Identification of the isolates

An identification and biochemical characterization of some isolates was obtained
with the VITEK® 2 Advanced Colorimetry[™] (BioMérieux). Cell suspensions and subsequent analyses were made according to the manufacturer's recommendations.

For the molecular identifications, an almost complete 16SrRNA gene fragment was amplified with the primers pH (AAGAGGTGATCCAGCCGCA) and 10-27Fd (a slightly shorter pA primer AGTTTGATCCTGGGTCAG)34 or BifiFd (TYMTGGCTCAGGATGAAC). The latter primer corresponds to position 17 to 34, which is conserved in lactic acid bacteria and bifidobacteria, and was used when the initial amplification with the 10-27Fd primer failed. We used a standard PCR program of: 1 min. at 95°C followed by 40 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 55°C and 2 min at 72°C, and ending by 10 min final elongation at 72°C in a T100 Thermocycler (BioRad). The amplification products were sequenced (Beckman Coulter Genomics, UK) with the primers used for the amplification.

A preliminary Blast analysis³⁵ of the sequences provided the genus to which each isolate belonged. The MEGA 5.2 software³⁶ was used to build phylogenetic trees from the multiple alignments with the type strains of the genus, using both the neighbour-joining method³⁷ and maximum likelihood. A taxonomic allocation was inferred from the closest reference strains the isolates clustered with. All sequences were deposited in GenBank under the access numbers KY552930 to KY552956.

Assay of antibacterial activity

Six commonly used indicator strains: Escherichia coli ATCC 25 923, Pseudomonas aeruginosa ATCC 43 300, Staphylococcus aureus ATCC 25 923, Listeria innocua ATCC 29 523, Listeria ivanovii ATCC 29 723 and Micrococcus luteus ATCC4698, were used for the detection of antimicrobial activity. They were cultivated in TSB (Tryptic Soy Broth, Difco) and 200 µl of the indicator culture were spread on to the surface of TSA (Tryptic Soy Agar, Difco) plates, to make indicator plates. Cell-free supernatants of the isolates to be tested were obtained by centrifugation of fully grown cultures at 13000 rpm for 5 min and filtration of the supernatant through a 0.45µm filter. The pH of all supernatants was adjusted to pH 6.5 with NaOH 1M.

Antibacterial activity was tested by the paper disc diffusion assay³⁸ and by the welldiffusion assay. In the first case, sterile paper discs (9 mm antibiotic assay paper discs) were placed on the surface of the indicator plate immediately after spreading and 100 μ l of the cell-free supernatant of the isolates to be tested were deposited on the paper discs. The plates were incubated for 18 h to 24 h at 37°C. In the second case, wells were aseptically punctured into the indicator plates and filled with 100 μ l of the cell-free supernatants. The plates were left at 4°C for 30 min and then incubated at 37°C for 24 h. The antimicrobial activity of the isolates was estimated from the size of the inhibition zone around the wells or the paper disc³⁹.

Proteolytic treatment

A 20- μ L volume of proteolytic enzymes (proteinase K, Thermofisher or trypsin) in their recommended buffers, and at a final concentration of 0.1mg/mL, was added to 200 μ L of supernatans (filtered and neutralized as stated before). The tubes were incubated at 37°C for 2 hours, and then puted at 100°C for 5 min to stop proteolysis.

Acid and bile tolerance test

Resistance to bile was tested as stated in^{40 41}. In short, cells pretreated in PBS pH2.0 for 3 hours, were used to inoculate MRS medium with 0.2% and 3% bile (bovine bile, Sigma). Growth was assessed after 24h anaerobic incubation at 37° by plating serial dilution of the cultures.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed with SPSS 20 software. The Pearson's tests were applied on different species of bacteria from breast milk and infant feces; urban and rural lifestyles of mothers. In the descriptive analysis, correlation coefficient was used for statistical analysis of this study. A *P-value* of <0.05 was considered to be statistically significant.

RESULTS

Diversity of lactic bacteria in breast milk and infant's feces

Suitable dilutions of the milk and feces samples from the 32 mother-infant couples were spread on MRS-Cys and BSM agar plates. For each sample, colonies with different phenotypes were picked up and purified. A total of 155 isolates

1770 TALHI-MEKHICI et al.: STUDY OF BACTERIA FROM WOMEN BREAST-MILK

(81 from milk and 74 from faeces samples) which were catalase-negative, oxidase-negative and Gram-positive were identified and kept for further analysis. Cocci (130 isolates) were identified by VITEK® 2 Advanced Colorimetry[™]. All isolates of this group were URE negative and grew in the presence of 6.5% of NaCl. They fell in 5 phenotypic groups (Table 1).

The identification by Vitek2 was later confirmed by sequencing the 16S rRNA gene of a few isolates of each group. All sequences were over 99% identical to the closest type strain.

BSM medium was expected to yield Bifidobacterium isolates. Yet none were identified among the isolates. Colonies growing on BSM medium were identified as Lactobacillus fermentum, E. faecium, Lactococcus lactis, and Leuconostoc mesenteroides. Staphylococcus epidermidis colonies were also found on BSM medium. Among 32 samples from mothers and infant (milk/infants feces) couples, we isolated and identified 7 species (Table 2), *Enterococcus feacium* (38,3%/43,24%, r=constant, *p* constant), *Enterococcus durans* (34.6%/21,62%, r=0.86, *p*=0.64), *Enterococcus feacalis* (9,87%/20,27%, r=-0.168, p=0.555), *Lactobacillus fermentum* (4,93%/10.81%, r=0.218, p=0.23), *Staphylocoque epidermidis* (9,87%/1.35%, r=0.311, p=0.083). We noted that *Enterococcus feacium* was isolated in the majority of the milk and fecal samples.

A positive correlation is observed for 6 groups and negative for *Enterococcus feacalis*. For *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactococcus lactis*, the correlation is significant at the level of 0.01 with (P-value= 0).

According to the mother's lifestyle, we noticed that the genus Enterococcus was the most frequently isolated from rural mother's milk as well as urban mother's milk, respectively : *E. faecium*

Table 1. Phenotypic identification of Enterococci by VITEK® 2 Advanced Colorimetry™

Group	Phenotype	Number of isolates	Vitek2-based Identification
1	TyrA (+), AspA (+), AGAL (+), Sac (+), BGAL (+), ADH(+)	50	E. faecium
2	TyrA (-), AspA (-), AGAL (-), Sac (-), BGAL (-), ADH (+)	10	E. faecium
3	TyrA (-), AspA (-), AGAL (-), SAC (-), BGAL (-), ADH (-)	3	E. faecium
4	AMY(+), AspA (-), AGAL (-), Leu (+), ALaA, O129R (-),	23	E. faecalis
	AGLU (+), dSOR (+)		
5	CEDEX (-), LAC (-), dMAN (-), AGAL (-), Sac (-), BGAL (-),	44	E. durans
	ADH (-), ALaA (+), SAL (-)		

Table 2. Comparison of frequencies of bacteria	al genera detected in breast milk and infant feces
--	--

Species	Breast milk $n = 32$		Infant feces n= 32		Statistical analysis	
	Ν	%	Ν	%	Coef. correlation	<i>p</i> - value
Lactobacillus fermentum	4	4.93	8	10.81	0.218	0.23
Enteroccoccu faecium	31	38,3	32	43,24	Constant	constant
Enteroccoccu durans	28	34,6	16	21,62	0,86	0,64
Enteroccoccu faecalis	8	9,87	15	20,27	-0,168	0,555
Staphyloccoccus epidermidis	8	9,87	1	1,35	0,311	0,083
Leuconostoc mesenteroides	1	1,23	1	1,35	1**	
Lactococcus lactis	1	1,23	1	1,35	1**	
Total	81		74			

N : total number of bacteria in %

n : sampling quantity

** : significant correlation at level 0.01 (bilateral)

(35.55% /41.66%, p=0.154), E. durans (28.88% /41.66%, p=0.325) and E. faecalis (4.44%/16.67%, p=0.325) (Figure 1 and Table 3).

For the following genera: Lb. fermentum, S Epidermidis, Ln. mesenteroides, and Lactococcus lactis, were isolated only from the rural mother's milk respectively: 8.88%, 17.77%, 2.22%, and 2.22%.

A significant correlation is observed for Lactobacillus fermentum (-0.378, $P \le 0.05$) and *Staphylococcus epidermidis* (-0.577, $P \le 0.01$). For other genera, Enterococcus feacium, Enterococcus durans, Enterococcus feacalis, Leuconostoc.

mesenteroides, and Lactococcus lactis, none significant correlation is noticed.

Antimicrobial activity

All LAB isolates were tested for their antimicrobial activity against 6 indicator strains (E. coli, L. innocua, L.ivanovii, M. luteus, P. aeruginosa, and S. aureus). Thirty isolates (21% of all LAB isolates) had a marked inhibitory effect against at least one of the indicator strains in a plate assay. Isolates with antimicrobial activity were not distributed evenly between the different species (Table 4).



Fig. 1. Distribution of different isolates (species) of the milk mothers from the rural and the urban regions

Species	Milk (n=16) Rural mother		Milk (n=16) Urban mother		Statistical analysis	
	Ν	%	Ν	%	Coef. correlation	<i>p</i> -value
Lactobacillus fermentum	4	8,88	0	0	-0,378*	0,033
Enteroccoccus faecium	16	35,55	15	41,66	0,258	0,154
Enteroccoccu durans	13	28,88	15	41,66	-0,18	0,325
Enteroccoccu faecalis	2	4,44	6	16,67	0,18	0,325
Staphyloccoccus epidermidis	8	17,77	0	0	-0,577**	0,001
Leuconostoc mesenteroides	1	2,22	0	0	-0,180	0,325
Lactococcus lactis	1	2,22	0	0	-0,180	0,325
total	45		36			

Table 3. Comparison of frequencies of bacterial genera detected in mother's breast milk from rural and urban regions

N : total number of bacteria

n : sampling quantity

*: significant correlation at level 0.05 (bilateral)

** : significant correlation at level 0.01 (bilateral).

Species	Number	Isolates with	Number of isolates inhibiting				
	tested	antimicrobial activity	P. aeruginosa	L. ivanovii	L. inoccua	M. luteus	
Lb. fermentum	12	25%	2	none	none	2	
E.faecium	65	29%	10	5	4	12	
E.durans	40	0%	none	none	none	none	
E.faecalis	23	30%	7	2	none	2	
Lc.lactis	2	50%	1	none	none	-	
Ln.mesenteroides	2	0%	none	none	none	none	

Table 4. Distribution per species of isolates with antibacterial activity

Table 5. Probiotic and antagonism properties of the isolates with antimicrobial activity

Isolate	Species	Sample type	Inhibition zone P. aeruginosa	e (diameter in <i>M. luteus</i>	mm) on indio <i>L.innocua</i>	cator strains: <i>L. ivanovii</i>	Growth in the presence of bile salt (2%) ¹	
Dpt	E. faecium	Feces	-	-	-	12	-	
D3	E. faecium	Milk	22	-	10	-	+	
D5	E. faecium	Milk	-	35	-	-	+	
D8	E. faecium	Milk	35	9	-	-	+	
D20	E. faecium	Feces	-	30	11	-	+	
D21	E. faecium	Feces	35	10	-	11	+	
D22	E. faecium	Feces	-	33	-	-	-	
D26	E. faecium	Milk	12	14	13	12	+	
D27	E. faecium	Feces	-	15	12	12	-	
D37	E. faecium	Feces	-	-	-	9	+	
M3	E. faecium	Milk	-	10	-	-	+	
M7	E. faecium	Feces	13	12	-	-	-	
M9	E. faecium	Milk	-	30	-	-	+	
M10	E. faecium	Milk	30	9	-	-	+	
M20	E. faecium	Milk	25	-	-	-	+	
M24	E. faecium	Feces	28	9	-	-	+	
M32	E. faecium	Milk	32	-	-	-	+	
D50	E. faecium	Feces	10	-	-	-	-	
Dgr	E. faecalis	Feces	-	-	-	13	-	
R44	E. faecalis	Milk	15	-	-	-	+	
M15	E. faecalis	Milk	10	-	-	-	+	
M22	E. faecalis	Milk	29	-	-	12	-	
M29	E. faecalis	Feces	25	10	-	-	+	
D19	E. faecalis	Milk	9	-	-	-	+	
M4	E. faecalis	Feces	25	10	11	-	+	
D48	E. faecalis	Feces	26	-	-	-	+	
M28	Lc. lactis	Milk	33	-	-	-	+	
M1	Lb.fermentum	Milk	-	12	-	-	+	
M14	Lb.fermentum	Feces	15	-	-	-	+	
M25	Lb.fermentum	Milk	11	20	-	-	+	

1:+: growth after treatment of 3h at pH3.0 in the presence of 2% bile salt; -: no growth after exposure to bile salts.

None of the 40 *E. durans* isolates (group 5 in Vitek2-identified *Enterococcus* isolates) had any antagonist activity against the indicator strains, and neither did the *Leuconostoc* isolates. Most of isolates with antibacterial activity belonged to the species *E. faecium*. Nine isolates were antagonist against more than one indicator strain (Table 5). Multi-antagonist isolates were found among *E. faecalis* (M4) and *E. faecium* (D21, D26 and D27).

Interestingly, none of the isolates had any effect on *E. coli* or *S. aureus*, but a high proportion (20 of the 30: 67%) of the antagonist isolates had an inhibitory effect on *Pseudomonas*. Isolates D8 (*E. faecium*) and M29 (*E. faecalis*) and the *Lactococcus* isolate had the highest antibacterial activity against *P. aeruginosa*. Large inhibition zones (of more than 30 mm) were also produced by four *E. faecium* isolates against *M. luteus* (Table 5).

The active supernatant retained their antibacterial activities after heat treatment (30 min at 100°). A treatment with proteinase K or trypsin results in the loss of the antimicrobial activity of all the active supernatants. This suggests that the antimicrobial activity is due to a heat stable, peptidic, bacteriocin-like product.

Most antagonist strains grew in the presence of bile salt (Table 5), an interesting capacity when looking for potential probiotic strains.

DISCUSSION

Our study was done on a sampling of the Algerian population, 32 mothers-child couples resident in rural regions (n=16) and others in urban regions (n=16). Mother's maternal milk and feces of their babies aged from 1 and 6 months old.

We isolated and identify 81 bacterial strains from the maternal milk, 67 enterococci (82.71%), 8 staphylococci (9.87%), 4 lactobacilli (4.93%), 1 leuconostoc (1.23% and 1 lactococci (1.23%).

74 bacterial strains were identified in infant feces samples, 63 enterococci (85.13 %), 8 lactobacilli (10.81 %), 1 staphylococci (1.35 %), 1 leuconostoc (1.35 %) and 1 lactococci (1.35 %). We noted that the same genura are identified in the human milk as well as in the feces.

Most of the LAB isolated during this

study belonged to the genus *Enterococcus*. This confirms what has been related in other studies were *Enterococcus* was predominant in breast-milk and infants feces¹⁷.

Studies have indicated that Enterococci are the most commonly isolated species during the first two months of infancy, with Lactobacilli being the second most common early colonizer¹⁹. Our results are also in accordance with previous studies of human milk based on a culturedependent approach where *S. epidermidis* was one of the predominant species¹⁹ ¹⁷. Staphylococcus appears also as a dominant genus through the 16S rRNA gene abundance in culture-independent approaches¹⁶ ¹⁷.

No significant difference (P- value > 0.05) was observed for four genera : *Lactobacillus fermentum, Enterococcus durans, Enterococcus feacalis, Staphylococcus epidermidis* isolated from the babie's feces and the maternal milk. This means that there is a homogeneous distribution of these genera in these two environments. Our results are in agreement with the previous studies which showed that the bacterial composition of the fecal microbiote of the breast-fed babies reflects that of the maternal milk ⁴²

Our data show the presence of lactobacilli (with 8.88 %) only in the maternal milk of resident mothers in rural areas⁴³ noticed that lactobacilli tends to have more important percentages in the milk of the resident women in rural areas. Our results are also in agreement with previous studies realized in South Africa, in Japan and South Korea⁴⁴. Another Japanese study showed that rural women seem to have a higher prevalence of *L. reuteri* colonization than women from the other countries. This may be related to the wide use of functional foods, probiotics and various fermented foods as an important part of the Japanese diet⁴⁵.

In this study, the diet of lactating mothers was using a questionnaire that in rural maternal local bread, local fermented cheeses, raw goats' milk and druid fruit consumption was higher suggesting that the incorporation of probiotics in the mother's diet before delivery and in the infant diet during breastfeeding may positively influence the maturation process of gut immunity.

In our study, bifidobacteria was not identified as noticed in our previous works ⁴⁶. On the other hand, the majority of the papers published

1774 TALHI-MEKHICI et al.: STUDY OF BACTERIA FROM WOMEN BREAST-MILK

previously show the presence of *Bifidobacterium*. This could reflect a diminished importance of members of this genus in the Algerian-mother-infant couples, due to the differences in nutrition, the way of life and genetics. All this factors influenced microbial composition of human milk⁴⁷.

We have identified in this study, the species *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *Lactobacillus fermentum* and *Lactococcus lactis* as the most promising in terms of antagonism. Some recognized probiotic strains belonged to those species⁴⁸. As we tested the antimicrobial activity on a limited range of commonly used indicator strains, it can be expected that a more extended survey, on a higher number of strains, would reveal a higher proportion of antagonists among the milk or feces isolates.

Our results suggest that the production of bacteriocins could explain the antimicrobial activity of the isolates. A conventional bacteriocin would not act on Gram-negative species. Yet, we have observed a high proportion of isolates with an antibacterial effect on the Gram-negative *P. aeruginosa*, a less frequent property of antagonistic LAB, although observed in some studies⁴⁹. If the peptidic nature of the antagonist molecule was to be confirmed, its mechanism of action would be worth investigating.

Eight isolates (D21, D26, M7, M10, M24, M29, M4, M25) cumulate an antagonist effect against *P. aeruginosa* with an effect on the Grampositif species of *Micrococcus* and *Listeria*. This could reflect the possibility that some LAB possess several antimicrobial mechanisms.

In this study we performed a screening of 30 antagonist strains. The advantages of these thirty particular isolates deserve investigation of a new in vivo study to determine their produced antimicrobial substances. Some of these strains could be exploited in the development of dairy formulas for babies or new food products. Bacteriocin-producing strains can also play an important role in food fermentation and preservation.

CONCLUSION

This present research is the first study related to the microbiome of women breast-milk from different regions, done in Algeria. This

J PURE APPL MICROBIO, 11(4), DECEMBER 2017.

work indicates that lifestyle of mothers (rural and urban) influences the presence of bacteria in their breast milk, which we have noted for the 32 milk samples of resident mothers from different regions. A significant difference is observed for two species, *Lactobacillus fermentum* and *Staphylococcus epidermidis*.

Our study confirms that human milk and infant feces analyzed in pairs share the same species, indicating that breastfeeding could contribute to the bacterial transfer from mother to child and thus colonize the intestinal flora of the baby.

To compare the flora of breast milk according to the lifestyle we suggest increasing the number of samples to confirm this result and collect accurate data on lifestyle such as diet, social conditions and economical life.

REFERENCES

- Kramer, M. S. *et al.* Infant growth and health outcomes associated with 3 compared with 6 mo of exclusive breastfeeding. *Am. J. Clin. Nutr*, 2003 ; 78, (2) : 53291–295.
- Ladomenou, F., Moschandreas, J., Kafatos, A., Tselentis, Y. & Galanakis, E. Protective effect of exclusive breastfeeding against infections during infancy: a prospective study. *Arch. Dis. Child*, 2010; 95(12):1004–1008.
- Duijts, L., Jaddoe, V. W. V., Hofman, A. & Moll, H. A. Prolonged and exclusive breastfeeding reduces the risk of infectious diseases in infancy. *Pediatrics*, 2010; 126(1): e18-25
- 4. Fernández, L. *et al.* The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol. Res,* 2013; **69**(1): 1–10.
- Gritz, E. C. & Bhandari, V. The human neonatal gut microbiome: a brief review. *Front. Pediatr*, 2015; 3, 17.
- Matamoros, S., Gras-Leguen, C., Le Vacon, F., Potel, G. & de La Cochetiere, M.-F. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends Microbiol*, 2013; 21(4): 167–173.
- Martín, R. *et al.* Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J. Pediatr*, 2003; 143(6): 754–758.
- Martýin, R. *et al.* The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends Food Sci. Amp Technol*, 2004; 15: 121–127
- 9. Martin, R. *et al.* Isolation of Bifidobacteria from Breast Milk and Assessment of the

Bifidobacterial Population by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Quantitative Real-Time PCR. *Appl. Environ. Microbiol*, 2009; **75:** 965–969.

- Martín, V. *et al.* Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *J. Hum. Lact. Off. J. Int. Lact. Consult. Assoc*, 2012; 28: 36–44.
- Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C. & Chassard, C. Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health. *Nutr. Rev*, (2015) ; 73(7): 426–437.
- Hunt, K. M. *et al.* Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PloS One*, 2011; 6 (6): e21313.
- 13. Ward, T. L., Hosid, S., Ioshikhes, I. & Altosaar, I. Human milk metagenome: a functional capacity analysis. *BMC Microbiol*, 2013 ; **13** :116.
- Sakwinska, O. *et al.* Microbiota in Breast Milk of Chinese Lactating Mothers. *PloS One*, 2016 ; 11: e0160856.
- Martín, R. *et al.* Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Res. Microbiol*, 2007; **158** (1): 31–37.
- Collado, M. C., Delgado, S., Maldonado, A. & Rodríguez, J. M. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. *Lett. Appl. Microbiol*, 2009; 48(5): 523–528.
- 17. Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C. & Chassard, C. Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *Br. J. Nutr,* 2013 ; **110**(7): 1253–1262.
- Pérez-Cano, F. J., Dong, H. & Yaqoob, P. In vitro immunomodulatory activity of Lactobacillus fermentum CECT5716 and Lactobacillus salivarius CECT5713: two probiotic strains isolated from human breast milk. *Immunobiology*, 2010; 215(12): 996–1004.
- Solís, G., de Los Reyes-Gavilan, C. G., Fernández, N., Margolles, A. & Gueimonde, M. Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breastmilk and the infant gut. *Anaerobe*, 2010; 16(3): 307–310.
- Walker, W. A. & Iyengar, R. S. Breast milk, microbiota, and intestinal immune homeostasis. *Pediatr. Res*, 2015; 77(1-2): 220–228.
- Lara-Villoslada, F. *et al.* Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. *Br. J. Nutr,* 2007; 98 Suppl 1: S96-100.
- 22. Aasen, I. M., Møretrø, T., Katla, T., Axelsson,

L. & Storrø, I. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by Lactobacillus sakei CCUG 42687. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 2000; **53**(2): 159–166.

1775

- 23. Bergogne-Bérézin, E. Treatment and prevention of antibiotic associated diarrhea. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2000; **16**(4): 521–526.
- Martín, R. *et al.* Lactobacillus salivarius CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair. *Int. J. Food Microbiol*, 2006; 112(1): 35–43.
- 25. Adeniyi, B., Adetoye, A. & Ayeni, F. Antibacterial activities of lactic acid bacteria isolated from cow faeces against potential enteric pathogens. *Afr. Health Sci*, 2015; **15**(3): 888.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F. & Chikindas, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol*,2001; 71(1):1–20.
- Perez, R. H., Zendo, T. & Sonomoto, K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microb. Cell Factories*, 2014; 13(Suppl1): S3.
- Heikkilä, M. P. & Saris, P. E. J. Inhibition of Staphylococcus aureus by the commensal bacteria of human milk. *J. Appl. Microbiol*, 2003 ; 95(3): 471–478
- Arici, M., Bilgin, B., Sagdic, O. & Ozdemir, C. Some characteristics of Lactobacillus isolates from infant faeces. *Food Microbiol*, 2004; 21(1) : 19–24.
- Rodríguez, E. *et al.* Antimicrobial properties of probiotic strains isolated from breast-fed infants. *J. Funct. Foods*, 2012 ; 4(2) : 542–551.
- Sepp, E. *et al.* Intestinal microflora of Estonian and Swedish infants. *Acta Paediatr. Oslo Nor*, 1997; 86(9): 956–961.
- Bahri, F. *et al.* Characterization of Lactobacillus strains isolated from Algerian children faeces for their probiotic properties. *Afr. J. Microbiol. Res*, 2014; 8(3): 297-303.
- Rada, V. & Petr, J. A new selective medium for the isolation of glucose non-fermenting bifidobacteria from hen caeca. J. Microbiol. Methods, 2000 ; 43(2): 127–132.
- Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M. & Böttger, E. C. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res*, 1989; 17(19) : 7843–7853.
- Altschul, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 1997; 25(17): 3389–3402.

1776 TALHI-MEKHICI et al.: STUDY OF BACTERIA FROM WOMEN BREAST-MILK

- Tamura, K. *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol*, 2011; 28(10): 2731– 2739.
- 37. Saitou, N. & Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol*, 1987; 4(4): 406–425.
- Sobrino, O. J. *et al.* Antibacterial activity of Lactobacillus sake isolated from dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol*, 1991; 13(1) :1–10
- Barefoot, S. F. & Klaenhammer, T. R. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by Lactobacillus acidophilus. *Appl. Environ. Microbiol*, 1983; 45(6):1808–1815.
- 40. Gilliland, S. E. & Walker, D. K. Factors to consider when selecting a culture of Lactobacillus acidophilus as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. *J. Dairy Sci*, 1990; **73(4)** : 905–911
- 41. Tsai, C.-C., Lin, P.-P. & Hsieh, Y.-M. Three Lactobacillus strains from healthy infant stool inhibit enterotoxigenic Escherichia coli grown in vitro. *Anaerobe*, 2008; **14**(2): 61–67.
- 42. Virginia M, Antonio M-B, Laura Moles, Mercedes R-B, Rosa C, Leonides F, Juan M. R, Esther J. Sharing of Bacterial Strains Between Breast Milk and Infant Feces. *J of Human Lactation*, 2012; **28**(1) 36-44.
- 43. Mansoureh T, Maryam M, Farkhondeh P,

Golnoush M, Mehri K, Nimah B, and Hajieh G S. The influence of impact delivery mode, lactation time, infant gender, maternal age and rural or urban life on total number of Lactobacillus in breast milk Isfahan – Iran.. Advanced Biomedical Research, 2015 ; **4**: 141.

- Sinkiewicz, G. & Ljunggren, L. Occurrence of Lactobacillus reuteri in human breast milk. *Microb. Ecol. Health Dis*, 2008; 20(3): 122–126.
- Arai S, Morinaga Y, Yoshikawa T, Ichiishi E, Kiso Y, Yamazaki M, et al. Recent trends in functional food science and the industry in Japan. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002; 66(10):2017–29.
- 46. Medjaoui I, Bouabdellah R, Talhi M, Mahammi FZ, Moghtit FZ, Mehtar N and Gaouar SB-S. Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Human Milk and Newborn Feces. J of Pure and App Microbiology, 2016; 10(4): 2613-2620.
- Gomez-Gallego, C., Garcia-Mantrana, I., Salminen, S. & Collado, M. C. The human milk microbiome and factors influencing its composition and activity. *Semin. Fetal. Neonatal Med*, 2016; 21(6): 400–405.
- Rolfe, R. D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J. of Nutrition*, 2000 ; **130**(2S Suppl):396 S–402S.
- Yang, E., Fan, L., Jiang, Y., Doucette, C. & Fillmore, S. Antimicrobial activity of bacteriocinproducing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *Applied and Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2012; 2(1) :48.