



HAL
open science

Analyse de la résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries et étude d'une potentielle voie alternative aux traitements antibiotiques

Amel Mhaya

► **To cite this version:**

Amel Mhaya. Analyse de la résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries et étude d'une potentielle voie alternative aux traitements antibiotiques. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux; Université de Sfax (Tunisie), 2019. Français. NNT : 2019BORD0420 . tel-03506233

HAL Id: tel-03506233

<https://theses.hal.science/tel-03506233v1>

Submitted on 2 Jan 2022

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

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

THÈSE EN COTUTELLE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

République Tunisienne

Ministère de l'Enseignement Supérieur

et de la Recherche Scientifique

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX, FRANCE

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

SPÉCIALITÉ : MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE

ET DE LA FACULTÉ DES SCIENCES DE SFAX, TUNISIE

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES FONDAMENTALES

SPÉCIALITÉ : SCIENCES BIOLOGIQUES

Par Amel MHAYA

**Analyse de la résistance aux antibiotiques chez les
entérobactéries et étude d'une potentielle voie alternative
aux traitements antibiotiques**

Sous les directions du Pr. Corinne ARPIN et du Pr. Slim TOUNSI

Soutenu le 13 Décembre 2019

Membres du jury:

Pr. Véronique DUBOIS
Pr. Raphaël DUVAL
Pr. Mamdouh BEN ALI
Pr. Sami MAALEJ

PU-PH, Université de Bordeaux
PU, Université de Lorraine, Nancy
PU, Centre de Biotechnologie, Sfax
PU, Université de Sfax

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinateur

REMERCIEMENTS

A mon jury de thèse,

Madame la Professeure Corinne ARPIN ma directrice de thèse en France, pour m'avoir accueillie dans votre unité de recherche et m'avoir dirigé, encadré et guidé dans ce travail et surtout pour m'avoir donné la chance de continuer mes recherches dans votre laboratoire. Merci pour vos conseils, et pour m'avoir enseigné la rigueur scientifique, la démarche scientifique et le sens critique.

Monsieur le Professeur Slim TOUNSI, mon directeur de thèse en Tunisie, pour m'avoir accueillie dans votre unité de recherche, merci pour la confiance, l'encouragement et également pour votre disponibilité et patience.

Monsieur Mamdouh BEN ALI et Monsieur Raphaël DUVAL pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit de thèse,

Mme Véronique Dubois pour avoir accepté d'examiner ce travail et être présidente du jury de thèse. Je remercie également Monsieur Sami MAALEJ pour avoir accepté d'examiner ce travail.

A L'UMR 5234,

Je tiens à remercier tout particulièrement le Docteur Dominique Bégu pour les idées techniques et scientifiques partagées et la contribution dans tous les projets surtout dans la production de la bacthuricine recombinante, ainsi que toutes les constructions du gène *mgrB*.

J'adresse mes remerciements à Marie-Line Andreola et toute l'équipe virologie-bactériologie et tous les membres de l'Unité UMR5234, merci pour tous les services techniques, les discussions scientifiques ou non scientifiques.

Au centre de biotechnologie de Sfax (laboratoire de biopesticide),

Je tiens à remercier tout particulièrement toute l'équipe de biopesticide pour tous les services, les conseils techniques et les discussions scientifiques.

A ma chère famille,

Mon père, ma mère, mon frère, mes 3 sœurs, mes beaux frères et ma belle sœur qui m'ont soutenue au cours de mes études en France. Merci pour votre soutien et vos encouragements.

A mes ami(e)s,

Merci pour votre soutien et présence, et pour tous les moments partagés ensemble.

ABREVIATIONS

BLSE	Bêta-Lactamase à Spectre Etendu
CASFM	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
DO	Densité optique
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
Kb	Kilobases
LB	Luria-Bertani
MH	Mueller-Hinton
McF	Mac Farland
CS	Colistine
LPS	Lipopolysaccharide
LAra4N	4-amino-4-deoxy-L-arabinose
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CPS	Capsule polysaccharidique
MLST	Multi Locus Sequence Typing
Pb	Paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEtN	Phosphoéthanolamine
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
R	Résistant
S	Sensible
ST	Séquence-type
UFC	Unité formant colonies
HR	Hétérorésistance
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
PAP	Population analysis profile
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool

Tableaux

Tableau 1 : Répartition des clusters et des espèces du complexe <i>Enterobacter cloacae</i> en utilisant la technique de séquençage de gène hsp 60 ¹²	23
Tableau 2. Résistances naturelles aux β-lactamines chez l'ordre des <i>Enterobacterales</i>	25
Tableau 3. Les principales β-lactamines	32
Tableau 4. Conditions des cycles d'amplification par PCR.....	54
Tableau 5. Amorces des jonctions de plasmide IncHI2	59
Tableau 6. Répartition des 170 entérobactéries identifiées lors d'infections urinaires en fonction de leur site de prélèvements et de la présence de BLSE.....	71
Tableau 7. Caractéristiques des 15 <i>E. coli</i> productrices de BLSE analysées dans cette étude	74
Tableau 8. Caractéristiques des 8 <i>K. pneumoniae</i> productrice de BLSE analysées dans cette étude	75
Tableau 9. Liste des amorces utilisées pour tester la résistance à la colistine	105
Tableau 10. Tampons pour préparer les cellules chimiocompétentes.....	107
Tableau 11. Amorces utilisées pour les étapes de sous-clonage et de clonage chez Eh22 et <i>K. pneumoniae</i>	108
Tableau 12. Valeurs de CMI de colistine de souches et de transformants d' <i>E. hormaechei</i> et <i>K. pneumoniae</i> contenant différentes constructions du gène <i>mgrB</i>	111
Tableau 13. Fréquences de mutation chez 7 souches d'ECC appartenant à des clusters 'cliniques'	114
Tableau 14. Profil des souches de clusters cliniques du complexe d' <i>E. cloacae</i>	116
Tableau 15. Classification des bactériocines selon Cotter et al ¹⁸⁰	122
Tableau 16. Classification des bactériocines produites par <i>B. thuringiensis</i> selon Salazar-Marroquín et al. ²⁹⁴	141
Tableau 17. Amorces utilisées pour amplifier le gène de la bacthuricine Bt 103.....	148

Figures

Figure 1. Mécanismes intrinsèques de résistance de la résistance aux β -lactamines par défaut d'accumulation.	25
Figure 2. Résumé des principaux mécanismes de mobilisation des gènes de résistance chez les entérobactéries ¹⁷	27
Figure 3. Principales caractéristiques structurales des plasmides IncN, IncF et IncA/C.	28
Figure 4. Les principales porines non sélectives de la membrane externe d' <i>E. coli</i>	30
Figure 5. Schéma de l'assemblage et mécanisme de fonctionnement de la pompe AcrAB–TolC ²⁴	31
Figure 6. Mécanisme d'action des bêta-lactamines ²⁸	33
Figure 7. Mécanisme de résistance aux bêta-lactamines ²⁷	33
Figure 8. Relation moléculaire et fonctionnelle entre les β -lactamases ³¹	35
Figure 9. Des positions mutées dans la séquence de β -lactamases de type TEM et le nombre d'enzymes substituées à ces positions.	39
Figure 10. Diversité des BLSE chez les <i>Enterobacteriaceae</i> isolés à partir d'échantillons cliniques dans 18 hôpitaux français (n = 200) ³⁹	40
Figure 11. Les six sous-lignées (ou groupes) connues de β -lactamases de type CTX-M, présentées dans un diagramme en arborescence qui reflète la similarité au niveau de la séquence des acides aminés ⁴⁹	41
Figure 12. Distribution mondiale des types CTX-M59.....	42
Figure 13. Carte de l'Europe montrant les données 2018 sur les fréquences d' <i>E. coli</i> (A) et de <i>K. pneumoniae</i> (B) résistants aux C3G.	43
Figure 14. Répartition des différents types de carbapénémases parmi les Entérobactéries productrices de carbapénémases dans le monde ⁶⁸	45
Figure 15. Distribution mondiale de carbapénémases KPC chez <i>K. pneumoniae</i> ³⁴	46
Figure 16. Distribution mondiale de carbapénémases de métallob β -lactamases de New Delhi chez les entérobactéries et <i>P. aeruginosa</i> ³⁴	47
Figure 17. Analyse phylogénétique des variants de métallob β -lactamase-1 (NDM-1).....	48
Figure 18. Distribution mondiale de carbapénémases type oxacillinase OXA-48 chez les entérobactéries et <i>P. aeruginosa</i> ³⁴	49
Figure 19. Carte géographique de la Tunisie avec les différentes régions où les échantillonnages ont été réalisés	50
Figure 20. Electrophorèse sur gel d'agarose des amplicons PCR du clade ST131 ⁶³	57
Figure 21. Analyse des pulsotypes (enzyme SpeI) des souches Eh22 et Eh23	61

Figure 22. Antibiogramme de la souche Eh22 (méthode de diffusion sur milieu MH).....	61
Figure 23. Antibiogramme de la souche Eh22 réalisé sur une gélose MH contenant 250 mg/l de cloxacilline	62
Figure 24. PFGE-S1 nucléase de Eh22 et du Tc 22(C600).....	64
Figure 25. Résultats de l'électrophorèse sur gel d'agarose des amplicons obtenus après amplification des gènes des β -lactamases	65
Figure 26. Analyse du plasmide pTc300 comparé à un plasmide de 444 kpb, p-444 (CP028197) isolé de <i>Salmonella</i> spp (VistaTools for Comparative Genomics).....	67
Figure 27. Antibiogramme de la souche de <i>K. pneumoniae</i> 18TA	76
Figure 28. Pulsotype (XbaI) des souches d'15 <i>E. coli</i> productrices de BLSE.....	76
Figure 29. Antibiogramme du transconjugant Tc18TA (<i>E. coli</i> C600)	78
Figure 30. Structure de la colistine et polymyxine B ¹²²	85
Figure 31. Schéma illustrant le mode d'action présumé des polymyxines au niveau des membranes interne et externe des bactéries à Gram négatif.	86
Figure 32. Voies de régulation des modifications du LPS chez <i>K. pneumoniae</i> ¹²²	88
Figure 33. Alignement de différents MgrB identifiés à partir de séquences génomiques de bactéries de l'ordre des <i>Enterobacterales</i> ¹²⁴	89
Figure 34. Mutations chromosomiques dans le gène <i>mgrB</i> et les changements dans la protéine MgrB (47 acides aminés) responsables de la résistance acquise à la colistine (avec * : codon stop) ¹²²	90
Figure 35. Régulation des gènes impliqués dans la résistance à la colistine chez les entérobactéries comme <i>E. coli</i> (A) et <i>K. pneumoniae</i> (B) ¹³³	92
Figure 36. Modèle de régulation croisée entre PhoPQ et PmrAB médiée par PmrD	93
Figure 37. Modèle de résistance à la colistine induite par CrrC chez <i>K. pneumoniae</i> ¹³²	94
Figure 38. Distribution chez les entérobactéries du gène <i>mcr-1</i> identifié chez l'homme et/ou l'animal ¹²²	96
Figure 39. Arbre phylogénétique obtenu pour les phosphoéthanolamines transférases de type Mcr identifiées par la méthode de la distance en utilisant l'algorithme Neighbor-Joining (logiciel SeaView, version 4) ⁹⁶	97
Figure 40. Détermination de l'hétérorésistance et les critères d'interprétation ¹⁶⁸	99
Figure 41. Mécanisme d'hétérorésistance à la colistine médié par Ecr chez une souche d' <i>Enterobacter spp</i> ¹⁷¹	100
Figure 42. Sélection de mutants par le test de PAP (Population Analysis Profil)	103
Figure 43. Séquences de la région codante et en amont du gène <i>mgrB</i> d'Eh22-wt.....	109
Figure 44. Amplification de gène <i>mgrB</i> avec les amorces KpmgrB-112_S et KpmgrB+87_AS (Tableau 10)	110
Figure 45. Comparaison de MgrB chez Kp5196, Eh22wt et <i>E. coli</i> K12.	112

Figure 46. Alignement des régions en amont du gène <i>mgrB</i> chez <i>E. coli</i> souche K12 (Ec K12), Kp5196 et Eh22wt	112
Figure 47. Schéma des différentes constructions comprenant les délétions des séquences DR1 ou DR2 ou DR1/DR2	113
Figure 48. E-test à la colistine pour les souches CAE 15 sauvage (A) et CAE 15 hétéroresistante (B), flèche bleue : colonies « squatteuses » < 2 mg/l de colistine, flèche rouge : CMI= 0,5 mg/l de colistine.	115
Figure 49. Synthèse de lanthionine et structure de lantibiotique	123
Figure 50. Formation de pores membranaires par le complexe nisine-lipide II selon Chatterjee C. et al., ¹⁹¹	124
Figure 51. Structure d'un lantibiotique à deux peptides « two-peptides » comme la lacticine 3147 ²⁰⁰	125
Figure 52. Systèmes de régulation lantibiotiques: modèle de production et détection	126
Figure 53. Représentation schématique de la structure d'une bactériocine modèle de classe IIa et ces domaines structuraux prédits ²¹²	127
Figure 54. Machines suggérées pour la production de bactériocines de classe IIa: synthèse, traitement, excrétion et immunité ²¹²	129
Figure 55. Représentation schématique d'un modèle structural de la lactococcine G et son orientation dans la membrane des cellules cibles.....	130
Figure 56. Récapitulatif du mode d'action des bactériocines ¹⁷⁹	131
Figure 57. Vue simplifiée du mode de vie complexe de <i>B. thuringiensis</i> dans différents niches environnementales ²³⁴	133
Figure 58. Cycle de vie de <i>B. thuringiensis</i>	134
Figure 59. Méthode de diffusion sur milieu solide à partir de puits	146
Figures 60. Schéma du gène <i>bt103</i> (en bleu) et de son environnement dans le vecteur pET-32a(+) pour les différentes protéines de fusions réalisées.....	149
Figure 61. Deux tests AWDA indépendants de l'activité antibactérienne de Bt BUMP103 contre le bacille à Gram négatif, <i>K. pneumoniae</i> Kp5241.	152
Figure 62. Amplification de gène de la bacthuricine Bt103	153
avec différentes amorces amorces atg_S / taa_AS et -45_S/+34_AS2.....	153
Figure 63. Séquence nucléotidique (A) et peptidique (B) de la bacthuricine recombinante Bt103.	154
Figure 64. Prédiction de signal de sécrétion et de son site de clivage chez les bactéries à Gram positif (A) et chez les bactéries à Gram négatif (B)	155
Figure 65. Prédiction de la structure secondaire de la bacthuricine Bt103	156
Figure 66. Prédiction de la structure tertiaire de la bacthuricine Bt103 par le logiciel Phyre2	156

Figure 67. Test de solubilité de la bacthuricine Bt103 sans signal de sécrétion	157
Figure 68. Test de solubilité de la bacthuricine Bt103 sans et avec signal de sécrétion.....	158
Figure 69. Analyse de la sécrétion de la bacthuricine Bt103 sans ou avec son signal de sécrétion	159
Figure 70. Test d'activité utilisant la méthode de diffusion à l'aide de disque imbibé.....	160
avec signal de sécrétion (sec+) et sans signal de sécrétion (sec-).	160

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	2
SOMMAIRE	10
Résumé	17
Abstract	18
Introduction générale	19
Chapitre I : La résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries	21
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	21
Introduction	21
I. Les entérobactéries	22
II. La résistance naturelle ou intrinsèque	24
III. La résistance acquise	26
1. Supports génétiques de la résistance acquise	26
a) La résistance chromosomique	27
b) La résistance plasmidique	27
IV. La résistance adaptative	29
V. Les mécanismes biochimiques de la résistance naturelle ou acquise aux β -lactamines chez les entérobactéries	29
A. Défaut d'accumulation de l'antibiotique par diminution de la perméabilité et efflux actif	29
B. Modification de la cible des β -lactamines	31
C. Production d'enzymes inactivant les β -lactamines chez les BGN	31
1. Les Bêta-lactamines	31
a) Mode d'action	32
2. Production de β -lactamases	33
a) Mode d'action	33
b. Classifications des β -lactamases	34
3. Description des β -lactamases les plus couramment rencontrées chez les entérobactéries	35
a) β -lactamases du groupe 1 (classe C de Ambler)	35
b) β -lactamases du groupe 2 (classe A de Ambler, sauf 2d, 2de et 2df)	36

c) Les β -lactamases du groupe 3 : métalloenzymes (classe B de Ambler)	37
VI. Epidémiologie de la résistance aux β -lactamines par production de BLSE chez les entérobactéries	38
A. BLSE de type TEM (TEMoneira, nom du patient)	38
B. BLSE de type SHV (SuLfHydryL VariABLE)	39
C. BLSE de type CTX-M (Céfotaximase-Munich)	40
1. Classification des BLSE de type CTX-M	40
2. Chronologie de l'émergence des BLSE de type CTX-M	41
3. Epidémiologie des entérobactéries productrices de CTX-M	42
D. Epidémiologie des entérobactéries productrices des carbapénémases	44
1. Les carbapénémases de classe A	45
2. Carbapénémases de classe B	46
3. Carbapénémases de classe D	48
Contexte de l'étude de la 1^{ère} partie	50
Matériels et méthodes	51
VII. Souches bactériennes étudiées	51
A. Milieux de culture	51
B. Identification bactérienne	51
C. Antibiogrammes et détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)	51
D. Caractérisation moléculaire des gènes de β -lactamase	52
1. Extraction d'ADN total	52
a) ADN extrait après ébullition	52
b) ADN extrait en utilisant un tampon salin (NaCl 5M)	52
2. Extraction plasmidique utilisant une technique de lyse alcaline	53
E. Amplification par Polymerase Chain Reaction (PCR)	53
F. Mise en évidence de l'ADN après électrophorèse en gel d'agarose	54
G. Purification de l'ADN amplifié pour le séquençage	54
H. Réactions de séquençage	55
A. Analyse des pulsotypes après digestion par une enzyme de restriction et électrophorèse en champs pulsé	55
B. Détermination des phylogroupes génétiques d' <i>E. coli</i>	56
C. Multi Locus Sequence Typing (MLST)	56
D. Détermination des clades et sous-clades chez <i>E. coli</i> ST 131	56
IX. Analyse des plasmides	57

A. Conjugaison	57
B. Analyse du contenu plasmidique et de la taille des plasmides après PFGE et digestion à la nucléase S1	57
C. Analyse des plasmides	58
D. Séquençage de plasmide conjugatif par une technique de séquençage next génération (NGS).....	58
Résultats.....	60
X. Première étude épidémiologique (Septembre 2016, Djerba)	60
A. Identification biochimique et moléculaire de 2 souches du complexe <i>E. cloacae</i>	60
B. Etude de la clonalité des isolats Eh22 et Eh23 par analyse de leur pulsotype et de leur sequence type.....	60
a) Sensibilité aux antibiotiques.....	61
b) Analyse de la présence de gènes de β -lactamase	62
c) Analyse du support des gènes de résistance des isolats Eh22 et Eh23.....	62
d) Amplifications par PCR réalisées à partir d'agarose découpé sur le gel de PFGE-S1 nucléase	64
e) Séquençage par la technique Illumina et analyse du plasmide pTc300 (IncHI2)	65
Discussion.....	68
Conclusion.....	70
XI. Deuxième étude épidémiologique : Décembre 2017-Janvier 2018, Sfax et Tunis ...	71
A. Collecte et identification des souches.....	71
B. Recherche de la présence de BLSE et/ou carbapénémase.....	72
C. Répartition des entérobactéries productrices de BLSE	72
1. En milieu hospitalier	72
2. Au niveau de la communauté.....	72
D. Analyse des gènes codant pour les BLSE et profils de résistance aux antibiotiques des E-BLSE.....	73
E. Etude de la clonalité des souches par PFGE et MLST	76
F. Typage plasmidique.....	77
Discussion.....	79
Conclusion.....	81

Chapitre 2 : Analyse de la résistance à la colistine d'une souche d'<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp <i>steigerwaltii</i> : comparaison avec une souche de <i>K. pneumoniae</i> délétée pour le gène <i>mgrB</i>	84
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	84
Introduction	84
XII. Les polymyxines.....	85
A. Mécanismes d'action des polymyxines	85
B. Mécanismes de résistance de la colistine	87
1. Résistances naturelles à la colistine	87
2. Résistances acquises à la colistine chez les entérobactéries	87
a) Résistances chromosomiques.....	87
b) Résistance plasmidique à la colistine	95
3. L'hétérorésistance à la colistine chez les entérobactéries	99
XIII. Définition et mécanisme d'hétérorésistance à la colistine.....	99
OBJECTIF DU CHAPITRE 2	101
XIV. Matériel.....	102
A. Souches utilisées dans cette étude	102
B. Plasmides vecteurs utilisés	103
XV. Méthodes de bactériologie et biologie moléculaire.....	103
A. Sélection de mutants par le test de PAP (Population Analysis Profil)	103
B. Détermination de la résistance à la colistine	104
C. Amplification par PCR et séquençage.....	104
D. Purification des plasmides	105
E. Réalisation de mutants de délétion	106
F. Transformation dans la bactérie <i>E. coli</i> DH5 alpha.....	106
G. Préparation de cellules chimiocompétentes <i>E. cloacae</i>	107
H. Préparations de cellules électrocompétentes de <i>K. pneumoniae</i>	107
I. Transformation dans les souches résistantes à la colistine	107
Résultats.....	109
Etude d'un mutant <i>mgrB</i> chez <i>E. hormaechei steigerwaltii</i>	109
XVI. Sélection du mutant Eh22-mut d' <i>E. hormaechei steigerwaltii</i>	109
XVII. Probable délétion de gène <i>mgrB</i> de la souche <i>K. pneumoniae</i> 5241	110

XVIII. Complémentation d'Eh22-Mut avec le gène mgrB sauvage d'Eh22-wt et complémentation de Kp5241 avec le gène mgrB sauvage de Kp5196	110
XIX. Complémentation croisée du gène chez les 2 souches Eh22-mut et Kp5241	112
XX. Etude de la séquence en amont du gène mgrB chez <i>E. coli</i> Eh22-wt et Kp5196...	112
XXI. Etude de l'hétérorésistance chez différentes ECC (<i>E. cloacae</i> complexe)	114
A. Analyse de souches appartenant à différents clusters.....	114
Discussion.....	117
Conclusion.....	119

Chapitre 3: Les bactériocines ou bactériocines-like, une alternative potentielle aux traitements par les antibiotiques 120

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 120

Introduction 120

XXII. Les bactériocines.....	121
A. Définition.....	121
B. Classification	121
1. Les différentes classes de bactériocines.....	122
a) Les bactériocines de classe I : les lantibiotiques	122
b) Les bactériocines de classe II.....	126
c) Récapitulatif sur le mode d'action des bactériocines	131
XXIII. <i>Bacillus thuringiensis</i>	Erreur ! Signet non défini.
A. Taxonomie	132
B. Habitat	132
C. Cycle de vie	133
D. Culture et identification	134
E. Facteurs de virulence	135
1. Facteurs de virulence protéique	135
a) Chitinases de <i>B. thuringiensis</i>	135
b) Métalloprotéases de <i>B. thuringiensis</i>	135
c) Métalloprotéases de type Enhancine	136
d) Métalloprotéases InhA	137
e) Autres métalloprotéases de <i>B. thuringiensis</i> et leur association avec la formation de biofilm.....	137

f) Cytolysines	138
2. Facteurs de virulence non protéiques de Bt	138
a) Zwittermycine A	138
b) β -exotoxines	139
3. Bactériocines produites par <i>B. thuringiensis</i>	139
a) Généralités sur la production de bactériocines chez <i>B. thuringiensis</i>	139
b) Activité antimicrobienne de <i>B. thuringiensis</i> contre des bactéries à Gram positif	141
c) Activité antimicrobienne de <i>B. thuringiensis</i> contre des bactéries à Gram négatif	142
d) Activité antimicrobienne de <i>B. thuringiensis</i> contre les champignons	142
e) Potentielles applications des bactériocines de <i>B. thuringiensis</i>	142
OBJECTIF DE LA PARTIE 3	145
Matériels et méthodes	146
XXIV. Souches de <i>B. thuringiensis</i> étudiées	146
XXV. Criblage de l'activité antimicrobienne de Bt	146
A. Méthode de diffusion à partir de puits (ou AWDA, pour agar well diffusion assay) ³¹⁰	146
B. Méthode de diffusion à partir de disque	147
C. Recherche <i>in silico</i> des gènes candidats et de leur signal de sécrétion	147
D. Amplification par PCR du gène <i>bt103</i>	147
E. Clonage du gène la bacthuricine Bt103	148
F. Prédiction <i>in silico</i> de la structure de la bacthuricine Bt103	149
G. Production de la bacthuricine dans <i>E. coli</i> BL21-pLysS	149
H. Analyse des protéines	151
1. Electrophorèse des protéines SDS-PAGE.....	151
2. Révélation par Western-Blot.....	151
Résultats.....	152
XXVI. Mise en évidence de l'activité d'inhibition de croissance de Bt BUMP103 vis-à-vis de Kp5241	152
XXVII. Recherche du gène codant pour la bacthuricine F013 par analyse <i>in silico</i>	152
XXVIII. Recherche du gène <i>bt103</i>	153
XXIX. Analyse de la séquence du gène <i>bt 103</i>	154
XXX. Prédiction de signal de sécrétion de la bacthuricine Bt103	154

XXXI. Prédiction de la structure secondaire et tertiaire de la bacthuricine Bt103.....	155
XXXII. Analyse de la solubilité et de la sécrétion de la bacthuricine Bt103 chez <i>E. coli</i> BL21-pLysS.....	157
XXXIII. Analyse du surnageant de sécrétion d' <i>E. coli</i> BL21-pLysS avec Bt103.....	158
XXXIV. Tests préliminaires d'activité de la bacthuricine recombinante Bt103	160
Discussion.....	161
Conclusion.....	162
Conclusion générale	163
Bibliographie.....	164

Résumé

Analyse de la résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries et étude d'une potentielle voie alternative aux traitements antibiotiques

L'augmentation des bactéries multirésistantes (BMR) aux antibiotiques est un problème majeur de santé publique. Le premier objectif de la thèse a été de rechercher la présence, peu documentée, de BMR dans la communauté en Tunisie. Pour la première fois, nous isolons une *Klebsiella pneumoniae* de séquence type ST147 productrice de la carbapénèmase NDM-1 dans ce milieu, à Sfax. Nos données indiquent aussi une proportion inhabituellement élevée (47%) d'*Escherichia coli* produisant deux β -lactamases à spectre élargi. Quatre d'entre eux, avec CTX-M-15 et CTX-M-27, se divisent en 2 souches clonales de type A-ST617 (2 isolats) et B2-ST131 subclade C2 (2 isolats). Toutes contiennent un plasmide avec la même combinaison allélique, F31:A4:B1 ; suggérant une possible dissémination de ce réplicon. Lors d'une autre étude (milieu communautaire, Djerba), une souche clonale Eh22 d'*Enterobacter hormaechei* multirésistante, contenant un plasmide conjugatif IncHI2 de 300 kpb, a été isolée chez 2 patients sans lien épidémiologique apparent. Le plasmide a été séquencé et montre la présence de différents gènes de résistance incluant 4 gènes codant pour des β -lactamases (*bla*_{TEM-1}, *bla*_{DHA-1}, *bla*_{CTX-M-3} et *bla*_{SHV-12}). Dans une seconde partie, nous avons étudié chez Eh22 la résistance à la colistine (CS), antibiotique de dernier recours. Après avoir sélectionné un mutant *in vitro*, nous avons montré pour la première fois, chez *Enterobacter* spp, que cette résistance pouvait être due à une mutation dans le gène codant pour MgrB, un régulateur négatif du système à 2 composants PhoQP qui permet la synthèse de groupements cationiques sur le lipopolysaccharide, cible de la CS. Dans une dernière partie, des molécules de type bactériocines actives sur les BMR ont été recherchées à partir d'une collection de *Bacillus thuringiensis*. L'une d'elle, BUPM103, inhibe la croissance de BMR. Une analyse *in silico* a permis d'identifier le gène d'une potentielle bacthuricine Bt103 (15 kDa) qui a été produite dans *E. coli*. Le surnageant de sécrétion filtré a montré une activité d'inhibition de la croissance de *K. pneumoniae* multirésistante, contrairement au contrôle (sans sécrétion). Cette bacthuricine recombinante pourrait constituer une alternative thérapeutique pour le traitement des BMR.

Mots clés : Entérobactéries, épidémiologie, communauté, NDM-1, β -lactamases à spectre élargi, colistine, MgrB, bacthuricine recombinante.

Abstract

Analysis of antibiotic resistance in enterobacteria and study of a potential alternative way to antibiotic treatments

The increase of multidrug-resistant bacteria (BMR) to antibiotics is a major public health problem. The first objective of the thesis was to search for the presence of BMR, poorly documented in the community in Tunisia. For the first time, we isolate a *Klebsiella pneumoniae* belonging to the sequence type ST147 producing carbapenemase NDM-1 in this setting, at Sfax. Our data also indicate an unusually high proportion (47%) of *Escherichia coli* producing committally two extended-spectrum β -lactamases. Four of them, with CTX-M-15 and CTX-M-27, are divided into 2 clonal strains of type A-ST617 (2 isolates) and B2-ST131 subclade C2 (2 isolates). All contain a plasmid with the same allelic combination, F31: A4: B1; suggesting a possible dissemination of this replicon. In another study (community-based, Djerba), a multiresistant clonal strain Eh22 of *Enterobacter hormaechei*, containing a 300 kbp conjugative plasmid of IncHI2, was isolated from 2 patients without apparent epidemiological relationship. The plasmid was sequenced and shows the presence of different resistance genes including 4 genes encoding β -lactamases (*bla*_{TEM-1}, *bla*_{DHA-1}, *bla*_{CTX-M-3} and *bla*_{SHV-12}). In a second part, we studied in Eh22, the resistance to colistin (CS), antibiotic of last resort. After selection of an *in vitro* mutant, we showed for the first time, in *Enterobacter* spp, that this resistance can be due to a mutation in the gene encoding MgrB, a negative regulator of the 2-component PhoQP system that allows the synthesis of cationic residues on lipopolysaccharide, target of CS. In the last part, bacteriocin-like molecules active on BMR were searched in a collection of *Bacillus thuringiensis*. One of them, BUPM103, inhibits the growth of BMR. The gene for a potential bacthuricin Bt103 (15 kDa) was identified by an *in silico* analysis and it was produced in *E. coli*. The filtered supernatant secretion showed a growth inhibitory activity against a multiresistant *K. pneumoniae*, in contrast to control (without secretion). This recombinant bacthuricine could constitute a therapeutic alternative for the BMR treatment.

Key words: ***Enterobacteriaceae*, epidemiology, community, NDM-1, extended-spectrum β -lactamases, colistin, MgrB, recombinant bacthuricin.**

Introduction générale

La résistance aux antibiotiques est un problème majeur de santé publique^{1,2}. L'utilisation massive et répétée d'antibiotiques en santé humaine et animale, en augmentant la pression de sélection, a conduit à l'émergence de bactéries multirésistantes (BMR), et même pan-résistantes rendant les traitements par les antibiotiques inefficaces. Cette situation est particulièrement critique chez les entérobactéries, bactéries les plus souvent retrouvées en pathologie humaine. Les mécanismes génétiques de la résistance acquise peuvent être la conséquence de mutations, mais aussi dus à l'acquisition de gènes de résistance via des mécanismes de transferts horizontaux qui permettent le passage des gènes de résistance entre bactéries.

Chez les entérobactéries, la résistance acquise par acquisition de gènes s'est principalement effectuée par l'intermédiaire d'éléments génétiques mobiles, tels que les plasmides conjugatifs ou les éléments conjugatifs et intégratifs (appelés aussi transposons conjugatifs). D'autres éléments génétiques mobiles que sont les éléments transposables (séquences d'insertion et transposons) et les intégrons, contribuent à la mobilité des gènes de résistance entre réplicons. Chez une même bactérie, plusieurs plasmides peuvent co-exister, soit parce qu'un plasmide existe en plusieurs copies, soit parce que différents plasmides cohabitent s'ils appartiennent des groupes d'incompatibilité distincts. Quand un plasmide conjugatif accumule plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques et transfère dans une autre bactérie, il confère en bloc une multirésistance. Ce phénomène est d'autant plus inquiétant que des nouveaux mécanismes de résistance apparaissent.

L'émergence et la propagation des bactéries telles que les souches d'*Escherichia coli* appartenant au phylogroupe B2 et à la séquence type ST131 sont inquiétantes. C'est un clone qui s'est propagé au niveau mondial de façon pandémique. Il possède des plasmides conjugatifs, hautement transmissibles portant de nombreux gènes de résistance. En particuliers, ce clone peut contenir des plasmides portant des gènes de β -lactamases qui codent pour des enzymes qui hydrolysent les β -lactamines, rendant inefficaces la plupart des molécules de cette classe d'antibiotiques, très utilisée pour le traitement des infections. Parmi les β -lactamases, on retrouve les β -lactamases à spectre élargi (BLSE) qui confèrent une résistance à la plupart des β -lactamines, excepté aux céphamycines et carbapénèmes. Les BLSE de type CTX-M (CéfoTaXimase-Munich) sont considérées depuis le début des années 2000, comme des enzymes pandémiques en milieu hospitalier, mais aussi en milieu

communautaire. Une prévalence élevée des enzymes CTX-M-15, appartenant au CTX-M du groupe 1 et CTX-M-27 (groupe 9) a été trouvée au niveau mondial.

L'augmentation des BLSE a conduit à une utilisation accrue des carbapénèmes et a favorisé l'émergence de β -lactamases de type carbapénémases. Parmi ces dernières, on retrouve des enzymes de type NDM-1, pour New-Delhi Métalloenzyme-1, qui a été signalée pour la première fois chez un patient suédois précédemment hospitalisé à New Delhi, en Inde en 2008. Depuis, les souches d'entérobactéries portant des plasmides avec le gène codant pour NDM-1 sont retrouvées dans de nombreux pays.

Depuis une décennie, l'augmentation des BMR a conduit à la réutilisation d'antibiotiques anciens, comme la colistine (polymyxine E). La colistine est devenue l'un des antibiotiques de dernier recours pour le traitement des infections graves causées par des bacilles à Gram négatif pan-résistants aux antibiotiques. La réintroduction de la colistine a conduit à une description de plus en plus fréquente dans la littérature, de souches résistantes à cet antibiotique. Le mécanisme de cette résistance était principalement dû à des mutations chromosomiques, mais à la fin de l'année 2015, un gène appelé *mcr-1* localisé sur un plasmide conjugatif conférant la résistance à la colistine a aussi été décrit.

Comprendre les mécanismes de résistance aux antibiotiques et surveiller l'émergence des résistances et des BMR est indispensable pour enrayer leur dissémination. Un autre prérequis indispensable est de développer de nouvelles stratégies de lutte contre les BMR. Une des voies est le développement de nouvelles molécules actives contre ces bactéries multirésistantes. Dans ce cadre, la recherche de substances antibactériennes, telles que les bactériocines, qui sont produites par certaines bactéries pour inactiver la croissance d'autres bactéries, est d'intérêt.

Cette thèse s'articule autour de 3 objectifs principaux : (i) Réaliser une étude épidémiologique en Tunisie pour surveiller cette résistance chez l'homme, à la fois dans les milieux hospitalier et communautaire. Les souches d'entérobactéries possédant des gènes de résistance aux antibiotiques et en particuliers aux β -lactamines seront identifiées et les plasmides porteurs des gènes de résistance seront analysés. (ii) Analyser la résistance à la colistine et l'hétérorésistance, par acquisition de mutations chromosomiques, chez *Enterobacter cloacae* Complexe VIII, espèce bactérienne pour laquelle peu de données sont disponibles dans la littérature. (iii) Identifier et évaluer le potentiel antibactérien de souches de *Bacillus thuringiensis* produisant des molécules de type bactériocines, et développer un protocole d'extraction et de purification de ces bactériocines recombinantes.

Chapitre I : La résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction

Depuis la découverte de la pénicilline par Sir Alexander Fleming en 1928, les antibiotiques ont permis de traiter des nombreuses infections bactériennes, en particulier lors de la Seconde Guerre mondiale³. Rapidement après la découverte de la pénicilline, d'autres molécules naturellement synthétisées par des micro-organismes, comme des champignons, ont été découvertes. Puis d'autres antibiotiques d'origine semi-synthétiques ou de synthèse ont été fabriqués afin de lutter contre les agents infectieux que sont les bactéries. L'utilisation massive d'antibiotiques a conduit à la sélection des bactéries résistantes et aussi à l'émergence rapide de ces dernières⁴. Des études récentes, utilisant la métagénomique fonctionnelle pour étudier les résistomes des souches bactériennes, ont montré que la résistance aux antibiotiques était un mécanisme biologique ancien⁵. En effet, des échantillons de pergélisol ont révélé l'existence de gènes de résistance datant de plus de 30.000 ans^{6,7}. Les gènes de résistance aux antibiotiques avaient diverses fonctions avant leur utilisation anthropique, et ont contribué à l'évolution des réservoirs naturels de résistance⁸. Les analyses des génomes entiers des bactéries isolées de pergélisol et de sols anciens ont permis de mieux comprendre le rôle du transfert horizontal de gènes (HGT, pour Horizontal Gene Transfer) dans l'évolution de la résistance aux antibiotiques et des maladies émergentes. Ce processus est considéré comme l'un des facteurs principaux de l'augmentation de la résistance des bactéries aux antibiotiques ainsi que la propagation des gènes de virulence⁵. Ce processus de HGT se produit selon 3 principaux mécanismes génétiques⁹:

- La transformation implique l'incorporation de l'ADN par des bactéries naturellement compétentes, puis ces bactéries intègrent cet ADN à leur génome par des mécanismes de recombinaison.
- La transduction consiste en un transfert d'ADN entre bactéries par l'intermédiaire de bactériophages (virus de bactéries).
- La conjugaison est un mécanisme qui requiert le contact entre les bactéries, puis le transfert unilatéral de matériel génétique d'une bactérie donatrice vers une bactérie

réceptrice. Ce mécanisme met en jeu des plasmides conjugatifs ou des éléments conjugatifs et intégratifs (ICE, pour Integrative and Conjugative Elements) qui codent pour des systèmes de sécrétion de type IV (encore appelés pili sexuels).

I. Les entérobactéries

Les entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif, aérobie-anaérobie facultatif, qui constituent une vaste famille d'un point de vue génétique. Elles sont largement retrouvées sur les plantes, dans le sol et l'eau et dans le tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud, d'où leur nom. Certaines entérobactéries constituent une part importante de la flore intestinale de l'homme. Les entérobactéries sont souvent impliquées en pathologie humaine. Certaines d'entre elles ont acquis différents mécanismes de résistance aux antibiotiques qui les placent comme bactéries de priorité critique par l'Organisation Mondiale de la Santé pour la recherche et le développement de nouveaux traitements antibiotiques.

Escherichia coli est la bactérie la plus couramment isolée en pathologie humaine. C'est une bactérie commensale du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux à sang chaud. Certaines souches possédant des facteurs de pathogénicité, peuvent être responsables d'une large gamme d'infections digestives et extra-digestives. Parmi ces dernières, *E. coli* est très souvent impliquée dans les infections urinaires, et d'autres infections comme des bactériémies, abcès hépatiques, ... voire des infections transmises aux descendants (méningites chez le nouveau-né). Ces infections peuvent être endogènes ou exogènes. Pour ces dernières, les souches peuvent être transmises aux patients via des pratiques de soins. On les retrouve aussi bien en milieu hospitalier qu'en milieu communautaire. Quatre phylogroupes majeurs ont été caractérisés chez *E. coli* : A, B1, D et B2, selon leurs facteurs de virulence (les souches des 2 premiers groupes n'hébergeant aucun ou très peu de facteurs comparativement aux deux derniers, notamment au groupe B2)¹⁰.

Klebsiella pneumoniae est une bactérie immobile et capsulée. *K. pneumoniae* a été décrite pour la première fois par Carl Friedlander en 1882, en tant que bactérie isolée des poumons¹¹. Elle est ubiquitaire dans la nature, et se retrouve aussi sur les surfaces muqueuses des mammifères. Chez l'homme, elle est présente dans le tractus intestinal, nasopharynx et sur la peau. Elle est responsable d'épidémies dues à la propagation de différents clones associés à

des infections opportunistes chez des patients dont le système immunitaire est affaibli. Une étude récente, publiée en 2019, réalisée sur des patients hospitalisés dans 244 hôpitaux répartis sur 31 pays, a montré que des souches clonales se propageaient au sein d'un même hôpital et parfois même entre des hôpitaux proches¹².

Le complexe *Enterobacter cloacae* (ECC, pour *E. cloacae complex*) a été subdivisé en 13 clusters génétiques sur la base du séquençage du gène *hsp60* (codant pour une protéine de réponse au choc thermique, heat-shock protein)^{13,14} (tableau 1). Certains clusters ont été définis avec un nom d'espèce incluant *Enterobacter asburiae* (cluster I), *Enterobacter kobei* (cluster II), *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae* sous-espèce *cloacae*, cluster XI et *E. cloacae* sous espèce *dissolvens*, cluster XII), *Enterobacter ludwigii* (cluster V), et *Enterobacter hormaechei*. Ce dernier a été subdivisé en 3 sous espèces : *E. hormaechei oharae* (cluster VI), *E. hormaechei hormaechei* (cluster VII) et *E. hormaechei steigerwaltii* (cluster VIII). Les Clusters III, IV, IX et les séquences regroupées dans le cluster XIII n'ont pas de nom d'espèces attribué¹⁵.

Les ECC sont des bactéries commensales du tractus digestif de l'homme et des animaux. Elles sont retrouvées dans les selles, mais aussi de façon ubiquitaire dans les eaux d'égouts, le sol, et les produits laitiers. Ce sont des bactéries pathogènes opportunistes et 3 clusters (III, VI et VIII) sont plus fréquemment retrouvés responsables d'infections et d'épidémies hospitalières¹⁶.

Tableau 1 : Répartition des clusters et des espèces du complexe *Enterobacter cloacae* en utilisant la technique de séquençage de gène *hsp 60*¹⁴

Cluster	Species
I	<i>E. asburiae</i>
II	<i>E. kobei</i>
III	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>hoffmannii</i>
IV	<i>E. roggkampii</i>
V	<i>E. ludwigii</i>
VI	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i> , <i>E. hormaechei</i> subsp. <i>xiangfangensis</i>
VII	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>hormaechei</i>
VIII	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i>
IX	<i>E. bugandensis</i>
X	<i>E. nimipressuralis</i>
XI	<i>E. cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>
XII	<i>E. cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i>
XIII	<i>E. cloacae</i> sequence crowd

II. La résistance naturelle ou intrinsèque

La résistance naturelle ou intrinsèque affecte d'emblée toutes les souches d'une même espèce. Elle est stable, transmise à la descendance mais pas ou peu transmissible par transfert horizontal. La résistance intrinsèque à un antibiotique ou à une famille d'antibiotiques de différentes souches et espèces bactériennes n'est associée à aucune exposition d'antibiotique¹⁷. La connaissance de la résistance naturelle est importante pour l'identification des bactéries, l'antibioprophylaxie et l'antibiothérapie.

Par exemple, l'ordre des *Enterobacterales* est classiquement regroupé en 7 groupes selon la production de β -lactamases (Tableau 2).

Groupe 0 : (*Salmonella spp.*, *Proteus mirabilis*) avec une absence de gène codant pour une β -lactamase.

Groupe 1 : (*E. coli*, *Shigella spp.*) avec une céphalosporinase non inductible.

Groupe 2 : (*K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter koseri*) avec une production de pénicillinase de bas niveau, chromosomique et constitutive.

Groupe 3 : (*Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Hafnia alvei* ...) avec une production de céphalosporinase à bas niveau, inductible par les β -lactamines.

Groupe 4 : (*Yersinia enterocolitica*, *Serratia fonticola*) produisant une pénicillinase de bas niveau plus une céphalosporinase de bas niveau.

Groupe 5 : (*Proteus vulgaris*, *Proteus penneri*) produisant une céphalosporinase (céfuroximase) inductible

Groupe 6 : (*Kluyvera spp.*, *Rahnella spp.*, *Citrobacter sedlakii*) produisant une BLSE chromosomique de bas niveau

Tableau 2. Résistances naturelles aux β -lactamines chez l'ordre des *Enterobacterales*

Antibiotique	Groupe						
	0	1	2	3	4	5	6
Amoxicilline	S	S/I	R	R	R	R	I/R
Amoxicilline + AC	S	S/I	S	R	R	S	S/I
Ticarcilline	S	S	R	S	R	S	I/R
Ticarcilline + AC	S	S	S	S	S	S	S
Pipéracilline	S	S	I	S	I	S	I
Pipéracilline + TZ	S	S	S	S	S	S	S
C1G	S	S/I	S	R	R	R	I/R
C2G	S	S	S	S/I/R	S/I	R	I/R
Céfoxitine*	S	S	S	S/I/R	S	S	S
C3G	S	S	S	S	S	S	S/I
C4G	S	S	S	S	S	S	S/I
Carbapénèmes	S	S	S	S	S	S	S

AC : acide clavulanique ; TZ, tazobactam, C1G, C2G, C3G, C4G : céphalosporines de 1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème}, et 4^{ème} génération, respectivement. *, céphamycine
S/I/R, sensible/intermédiaire/résistant

Les entérobactéries peuvent aussi être naturellement résistantes à certains antibiotiques dû à l'imperméabilité de leur membrane externe¹⁸ (figure 1). Les pompes à efflux bactériennes qui transportent activement de nombreux antibiotiques hors de la cellule peuvent contribuer de manière importante à la résistance intrinsèque des bactéries à Gram négatif à de nombreux antibiotiques¹⁷. Lorsqu'elles sont surexprimées, les pompes à efflux peuvent également conférer une plus grande résistance aux antibiotiques¹⁹.

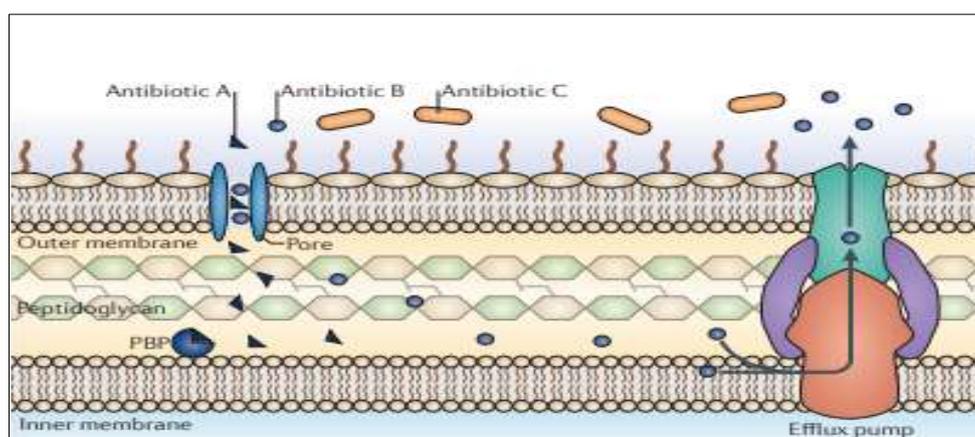


Figure 1. Mécanismes intrinsèques de résistance de la résistance aux β -lactamines par défaut d'accumulation.

L'exemple présenté sur la figure 1 est celui des β -lactamines dont les cibles sont les protéines liant la pénicilline (PLP ou PBP, pour Penicillin Binding Protein). L'antibiotique A peut

pénétrer dans la cellule par une porine de la membrane externe, atteindre sa cible et inhiber la synthèse du peptidoglycane. L'antibiotique B peut aussi entrer dans la cellule via une porine, mais contrairement à l'antibiotique A, il est efficacement éliminé par un mécanisme d'efflux actif. L'antibiotique C ne peut pas traverser la membrane externe et ne peut donc pas accéder aux cibles, les PBP¹⁷.

III. La résistance acquise

1. Supports génétiques de la résistance acquise

Chez les bactéries, les gènes de résistance aux antibiotiques sont portés par des réplicons (chromosome et plasmide). Chez les entérobactéries, les supports génétiques de la résistance sont souvent associés à des éléments génétiques mobiles (EGM) capables de mobiliser les gènes de résistance soit au niveau²⁰ :

- Intracellulaire : séquences d'insertion, transposons ou cassettes des intégrons (EGM non autonomes). La résistance acquise concerne une fraction des souches d'espèces naturellement sensibles, à la suite d'évènements génétiques. Elle est variable et limite le spectre d'activité initiale aux antibiotiques d'une espèce bactérienne donnée. Le mécanisme génétique de la résistance acquise est du à la survenue de mutations ou à l'acquisition de gènes, qui rendent la bactérie résistante à un antibiotique ou une famille d'antibiotiques particulier¹⁸.

De nombreux mécanismes de résistance acquis ont été observés chez les entérobactéries. Ils peuvent être chromosomiques ou plasmidiques. L'émergence des résistances est en relation avec la pression de sélection par les antibiotiques.

- Intercellulaire : plasmides conjugatifs ou mobilisables, ou bien les éléments intégratifs conjugatifs (ICE)²¹ qui incluent les transposons conjugatifs. Ces derniers peuvent être aussi non conjugatifs, mais mobilisables (IME, integrative mobilizable elements) (figure 2).

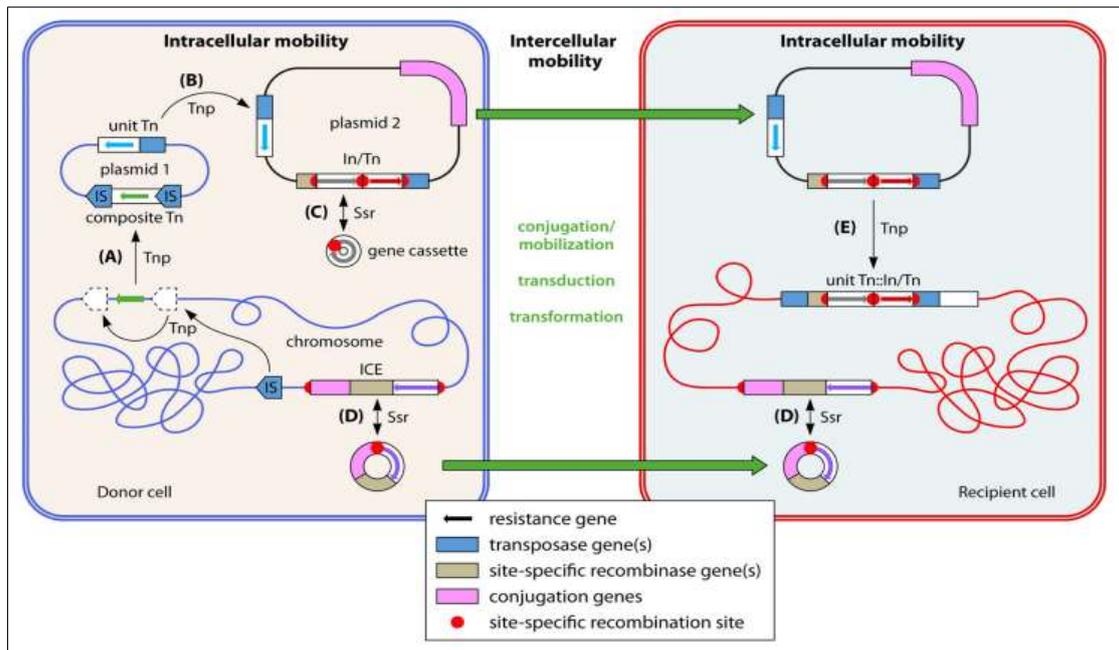


Figure 2. Résumé des principaux mécanismes de mobilisation des gènes de résistance chez les entérobactéries²⁰.

a) La résistance chromosomique

Elle résulte d'une mutation rare, plus ou moins spontanée et stable. L'antibiotique révèle souvent la mutation de résistance en sélectionnant les bactéries mutantes résistantes. La transmission de la résistance chromosomique est dite verticale ('bactérie-mère à bactéries-filles').

b) La résistance plasmidique

Les plasmides sont des molécules d'ADN bicaténares, le plus souvent circulaires et extra-chromosomiques, capables d'auto-réplication. Certains plasmides sont conjuguatifs et sont capables de transférer d'une bactérie donatrice vers une bactérie réceptrice. Les plasmides se divisent en groupes d'incompatibilité (groupe Inc) selon leurs modes de répllication et de régulation de la répllication. Les plasmides conjuguatifs se caractérisent par des structures modulaires, comprenant un module de conjugaison codant pour des gènes *tra*, dont certains vont permettre la synthèse d'un système de sécrétion de type IV (ou pilus sexuel), une origine de transfert reconnue par une relaxase qui, après coupure simple brin, reste fixée de manière covalente sur l'extrémité 5' d'un brin formant l'ADN qui sera transféré au travers du pilus sexuel de conjugaison. Les plasmides se distinguent donc par leur mobilisation, leur nombre de copies, leur spécificité d'hôte. Ils ne sont pas essentiels à la survie de la bactérie, mais la présence de certains gènes localisés sur leur plasmides peuvent leur conférer un avantage

sélectif et des fonctions permettant une meilleure adaptation de la bactérie hôte à son environnement²², comme la résistance aux antibiotiques, toxines, adhésines, chaînes métaboliques supplémentaires... Les plasmides conjugatifs ont un rôle prépondérant dans l'évolution des bactéries de par leur capacité à échanger de gènes.

Un nombre considérable de plasmides conjugatifs ont été séquencés. Un exemple de structures de plasmides est présenté sur la figure 3²³.

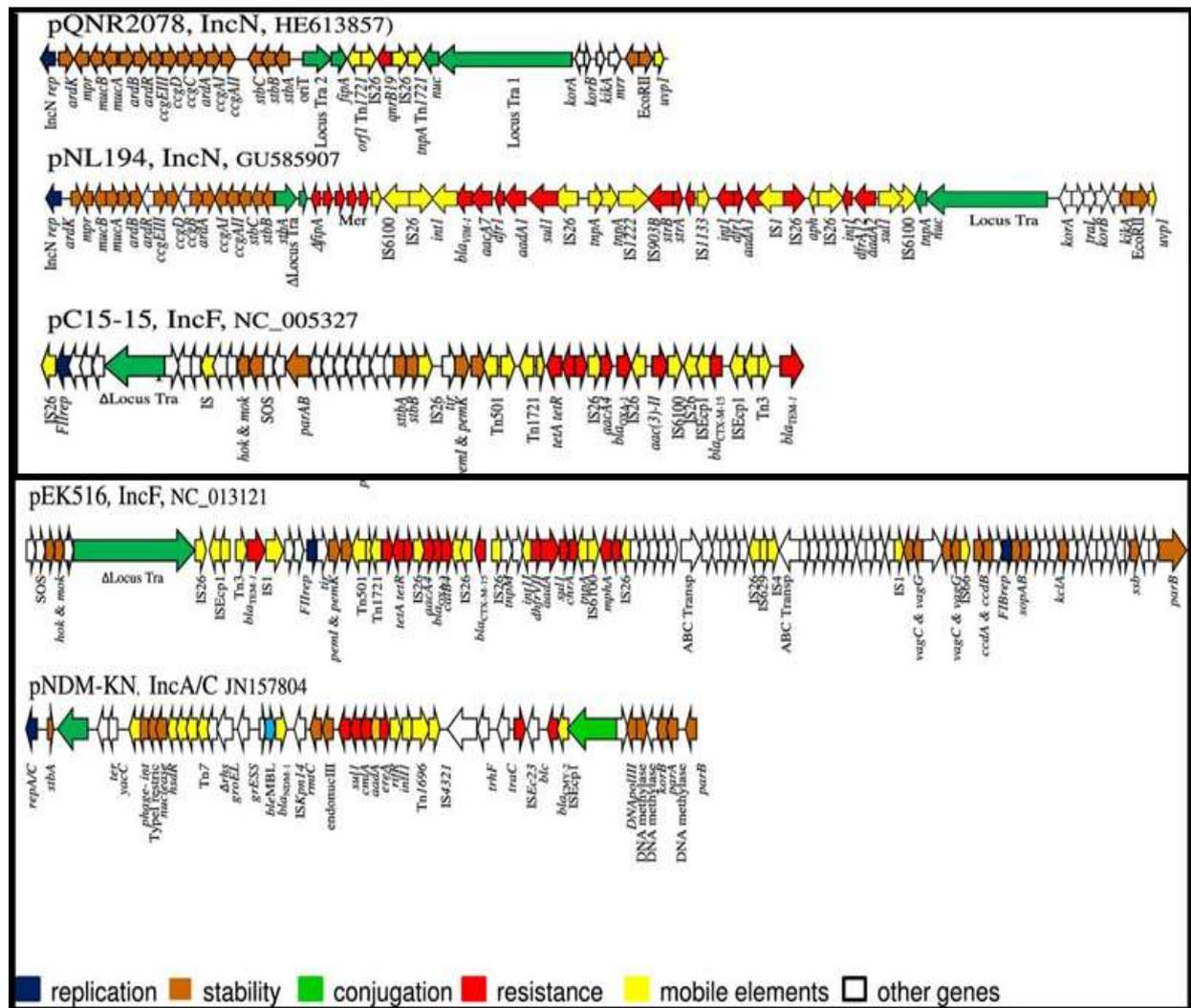


Figure 3. Principales caractéristiques structurales des plasmides IncN, IncF et IncA/C. Le locus *tra* est indiqué par des flèches vertes. Les gènes de résistance sont indiqués par des flèches rouges, à l'exception du gène codant pour la carbapénémase *bla*_{NDM-1} qui est indiqué en bleu. Les gènes associés à des éléments génétiques mobiles (transposons et séquences d'insertion) sont montrés en jaune. Les autres gènes sont indiqués par les cases colorées comme suit: violet, gène de la réplicase *repA*; orange, gène pour des enzymes de restriction et méthylation ; blanc, autres gènes plasmidiques²³.

IV. La résistance adaptative

La résistance adaptative de la bactérie est dictée par l'expression différentielle de certains de ses gènes, lui permettant de répondre à des contraintes du milieu extérieur. Cela peut entraîner des modifications du mode de vie, telles que la formation de cellules persistantes ou des biofilms, ou encore induire des résistances transitoires à des composés toxiques¹⁸.

La connaissance des mécanismes moléculaires de la résistance et de la résistance adaptative est importante, car elle permet le développement de nouvelles thérapies pour lutter contre les bactéries multirésistantes aux antibiotiques.

V. Les mécanismes biochimiques de la résistance naturelle ou acquise aux β -lactamines chez les entérobactéries

Plusieurs mécanismes de résistance acquises aux β -lactamines ont été observés chez les entérobactéries et peuvent être regroupés en 3 grands types :

A. Défaut d'accumulation de l'antibiotique par diminution de la perméabilité et efflux actif

Les propriétés physico-chimiques des antibiotiques et la structure de la paroi bactérienne jouent un rôle important dans la résistance. La membrane externe, formée en partie de phospholipides, constitue une barrière contre les antibiotiques hydrophobes de haut poids moléculaire. Les molécules hydrophiles, de faible poids moléculaire, doivent traverser la voie de protéines membranaires que sont les porines, qui forment des canaux qui permettent le passage de molécules, incluant les β -lactamines (de taille inférieure à environ 600 Da) (figure 4). Des mutations qui affectent la structure des porines ou diminuent leur synthèse, peut entraîner la résistance à certains antibiotiques (résistance dite croisée).

Chez *E. coli*, il existe 2 principales porines, OmpC et OmpF²⁴. OmpF est une porine plus large que OmpC qui laisse pénétrer plus rapidement des molécules plus volumineuses. Elle est induite par l'insuffisance de nutriments. OmpC exclut les grosses molécules, notamment les antibiotiques et les détergents, ce qui réduit la sensibilité. OmpC est exprimé à la place de OmpF dans des conditions de stress²⁵. Ainsi, la perte de la porine OmpC réduit les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des différentes β -lactamines²⁶. Les mutants d'*E. coli* déficients en OmpF, présentent aussi une sensibilité diminuée aux quinolones²³.

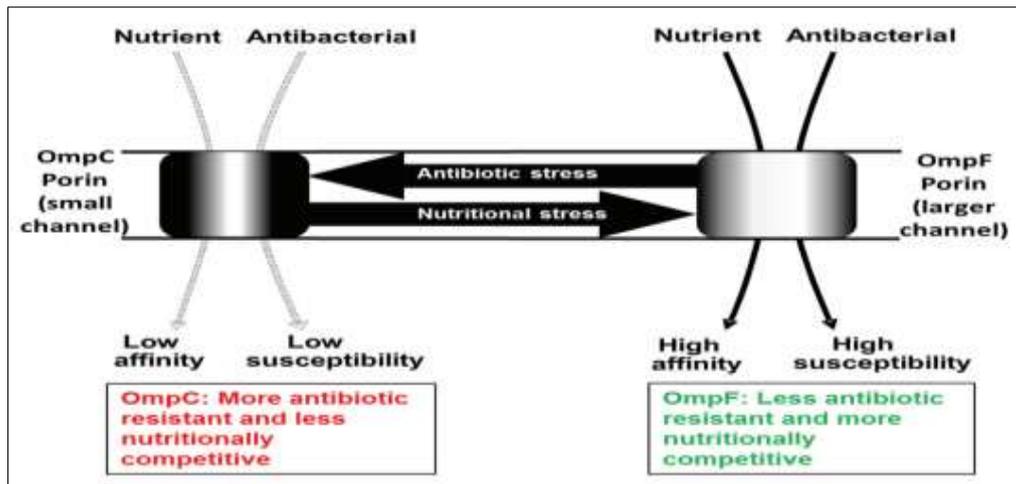


Figure 4. Les principales porines non sélectives de la membrane externe d'*E. coli*.

Les systèmes d'efflux chez les bactéries sont des mécanismes de transports actifs qui sont regroupés en 5 super familles : ABC transporteurs (ABC pour ATP Binding Cassette), MFS (pour Major Facilitator superfamily), SMR (pour Small Multidrug Resistance), MATE (pour Multidrug and Toxic Compound Extrusion) et RND (Resistance Nodulation cell Division). Chez les entérobactéries, la résistance aux β -lactamines par mécanisme d'efflux actif ne concerne que la super-famille, RND. Les gènes de ces systèmes d'efflux de type RND forment une structure tripartite²⁷. Ces gènes sont naturellement présents sur le chromosome de la bactérie et jouent un rôle majeur dans la résistance intrinsèque aux antibiotiques. Ils confèrent une résistance multidrogue à des antibiotiques et des toxines de structure chimiques différentes. Par exemple chez *E. coli*, on trouve le système AcrAB/TolC qui est composé du transporteur membranaire AcrB, d'une protéine de fusion AcrA et de la protéine de la membrane externe, TolC (figure 5). L'hyperexpression de ce mécanisme peut conduire à un phénotype de multirésistance aux β -lactamines, ainsi qu'aux quinolones et à d'autres composés (comme l'acriflavine)²⁸.

Tout d'abord, AcrB s'associe à AcrA pour former le complexe bipartite AcrAB. Ensuite, AcrA change sa conformation pour recruter TolC. Lorsque AcrB rencontre un substrat, la pompe adopte une conformation ouverte accompagnée d'une contraction le long du grand axe et le substrat est expulsé par le canal en dehors de la cellule²⁷.

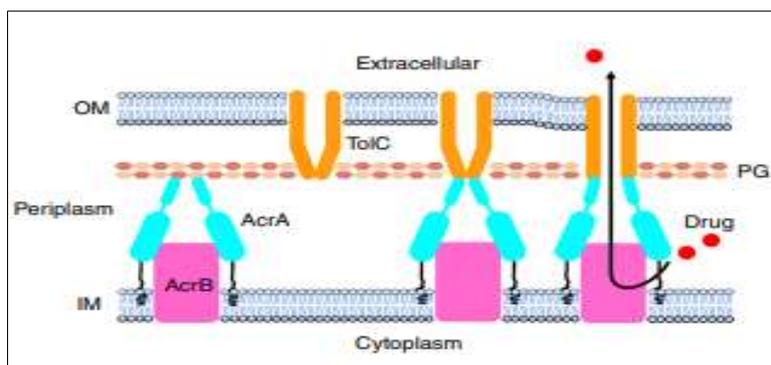


Figure 5. Schéma de l'assemblage et mécanisme de fonctionnement de la pompe AcrAB–TolC²⁷.

B. Modification de la cible des β -lactamines

La cible des β -lactamines sont des enzymes (transpeptidases, D-D carboxypeptidase) qui catalysent l'étape finale de la biosynthèse du peptidoglycane. On les appelle PLP (pour (Protéines Liant la Pénicilline) ou PBP (Penicillin Binding Proteins). La résistance aux β -lactamines par altération des PLP a été décrite chez de nombreuses bactéries. Il est à noter que ce mécanisme est très fréquent dans le genre *Staphylococcus*, qui a acquis un gène codant pour une nouvelle PLP (PLP2A) ayant peu d'affinité pour les β -lactamines. Chez les entérobactéries, le mécanisme est dû à :

- Une hyper-expression de la synthèse des PLP.
- Une diminution de l'affinité des PLP pour les bêta-lactamines. Les PLPs restent disponibles pour la synthèse du peptidoglycane.

Récemment, des nouvelles mutations dans le gène *mrdA* qui code pour la PBP2 ont été décrites chez *E. coli* et elles contribuent à une augmentation de la CMI des carbapénèmes²⁹.

C. Production d'enzymes inactivant les β -lactamines chez les BGN

1. Les Bêta-lactamines

Les β -lactamines constituent une vaste classe d'antibiotiques (il existe environ une quarantaine de molécules disponibles en France). Ce sont des antibiotiques dont la structure chimique est caractérisée par un cycle β -lactame, qui comprend le « pont β -lactame » : une fonction cétone au sein d'un hétérocycle azoté, responsable de l'activité de ces antibiotiques. Ces agents incluent 4 classes : pénicillines, céphalosporines, les monobactames, et carbapénèmes (Tableau 2).

Tableau 3. Les principales β -lactamines

Classe	Sous-classe	Exemple
Pénicillines	Pénicillines G et V	Benzylpénicilline, Phénoxyéthylpénicilline
	Pénicilline A (Aminopénicilline)	amoxicilline, ampicilline
	Amidinopénicilline	Mécilliname
	6 α -méthoxy pénicilline	Témocilline
	Uréidopénicilline	Pipéracilline
	Carboxypénicilline	Ticarcilline
	Pénicilline M	Méticilline, oxacilline, cloxacilline
Céphalosporines	C1G	Cefalotine, cefazoline
	C2G	Cefuroxime, céfixime, cefpodoxime céfoxitine*, céfotétan*
	C3G	Ceftriaxone, céfotaxime, ceftazidime
	C4G	Céfepime, céfpirome
Monobactame		Aztreonam
Carbapénèmes		Imipénème, ertapénème, méropénème
Autres	Inhibiteurs des β - lactamases**	acide clavulanique, tazobactam, sulbactam

C1G, C2G, C3G et C4G, céphalosporines de 1^{er}, 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} génération, respectivement
*, céphamycine

** , inhibiteurs de β - lactamases avec un noyau β -lactame dans leur structure

a) Mode d'action

Le mécanisme d'action des bêta-lactamines est d'inhiber la phase pariétale de la synthèse de la paroi bactérienne. Ces antibiotiques se fixent sur des enzymes (transpeptidases, DD-carboxypeptidases) appelées Protéines Liant la Pénicilline (ou PLP) impliquées dans la dernière étape de synthèse du peptidoglycane. Cette action est due à l'analogie structurale entre la liaison D-Alanyl-D-Alanine (DAla-DAla) du pentapeptide et le pont bêta-lactame des bêta-lactamines³⁰(figure 6). Cette inhibition entraîne la dérégulation des autolysines qui sont responsables de l'effet bactéricide de ces antibiotiques.

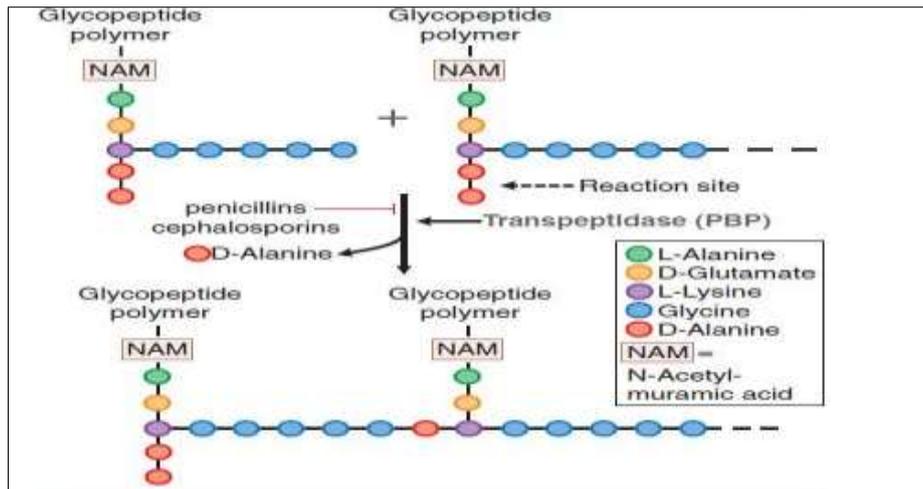


Figure 6. Mécanisme d'action des bêta-lactamines³¹

2. Production de β -lactamases

a) Mode d'action

Les β -lactamases sont des enzymes capables d'hydrolyser le pont β -lactame (figure 8), des β -lactamines, site de fixation des PLP, générant un produit inactif (figure 7)³⁰.

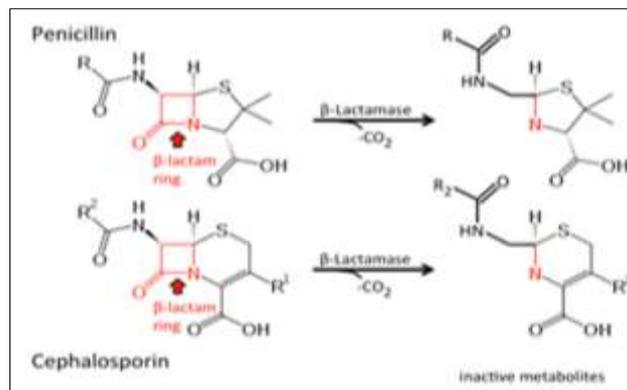


Figure 7. Mécanisme de résistance aux bêta-lactamines³⁰

Le pont β -lactame est indiqué en rouge. La flèche indique le pont β -lactame, site d'hydrolyse par les β -lactamases.

Les gènes des β -lactamases peuvent avoir comme support génétique, le chromosome. La présence de ces gènes chromosomiques peut être responsable de la résistance naturelle aux β -lactamines chez certaines espèces bactériennes (Tableau 4). Ces gènes peuvent être acquis (résistance acquise) et être localisés sur des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides conjugatifs.

La production de β -lactamases est le principal mécanisme de résistance chez les entérobactéries. Suite à l'utilisation massive des β -lactamines, des β -lactamases à large spectre (BLS), des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) et des céphalosporinases, et des carbapénémases ont émergé dans le monde et continuent à se diversifier.

b. Classifications des β -lactamases

Depuis 1940, un grand nombre de β -lactamases a été identifié et l'absence de nomenclature officielle a compliqué leur classification. Selon leur caractéristique enzymatique, les β -lactamases sont réparties en 2 grandes catégories : celles qui fonctionnent avec une sérine OH et celles qui ont besoin d'ion métallique (Zn^{2+}) dans leur site actif. Actuellement, 2 classifications sont unanimement acceptées. La classification d'Ambler³² est basée sur des critères moléculaires et les β -lactamases sont ainsi réparties en 4 groupes (A à D), en fonction d'homologies plus ou moins importantes des séquences peptidiques ou nucléotidiques, notamment au niveau du site actif. La classification de Bush et Jacoby³³ est basée sur des critères de profils de substrat et de sensibilité à certains inhibiteurs. Ainsi en fonction de leur profil de substrats, les β -lactamases qui ont une hydrolyse préférentielle pour les pénicillines sont dites pénicillinases. Celles qui hydrolysent davantage les céphalosporines sont qualifiées de céphalosporinases. Certaines enzymes ont pour substrats préférentiels des β -lactamines particulières : carbapénèmes (carbapénémases), carboxypénicillines (carbénicillinases), oxacilline (oxacillinases), céfuroxime (céfuroximases)... La classification de Bush et Jacoby³³ réparties aussi les β -lactamases en fonction de leur sensibilité à certains inhibiteurs, tels que l'acide clavulinique, l'EDTA et, plus récemment, de l'avibactam³⁴. Cette classification a un intérêt pratique car elle permet d'orienter en routine l'identification des β -lactamases à partir du phénotype de résistance aux β -lactamines des souches qui les produisent.

Les 2 classifications (celle d'Ambler et celle de Bush/Jacoby) se recoupent. Par exemple, le groupe 1 de Bush/Jacoby inclut des céphalosporinases résistantes à l'acide clavulinique correspondant à la classe C de Ambler. Le groupe 2 de Bush/Jacoby rassemble des enzymes de type de pénicillinases et des β -lactamases à spectre élargi, plus ou moins sensibles à l'acide clavulinique, qui appartiennent à la classe A d'Ambler ; les sous-groupes 2d, 2be et 2df, qui comprend les oxacillinases de la classe D de Ambler et dont certaines (2df) ont une activité sur les carbapénèmes, faisant exception. Le groupe 3 de Bush est réservé aux métallo-enzymes sensibles à l'EDTA qui constitue le groupe B de Ambler (figure 8).

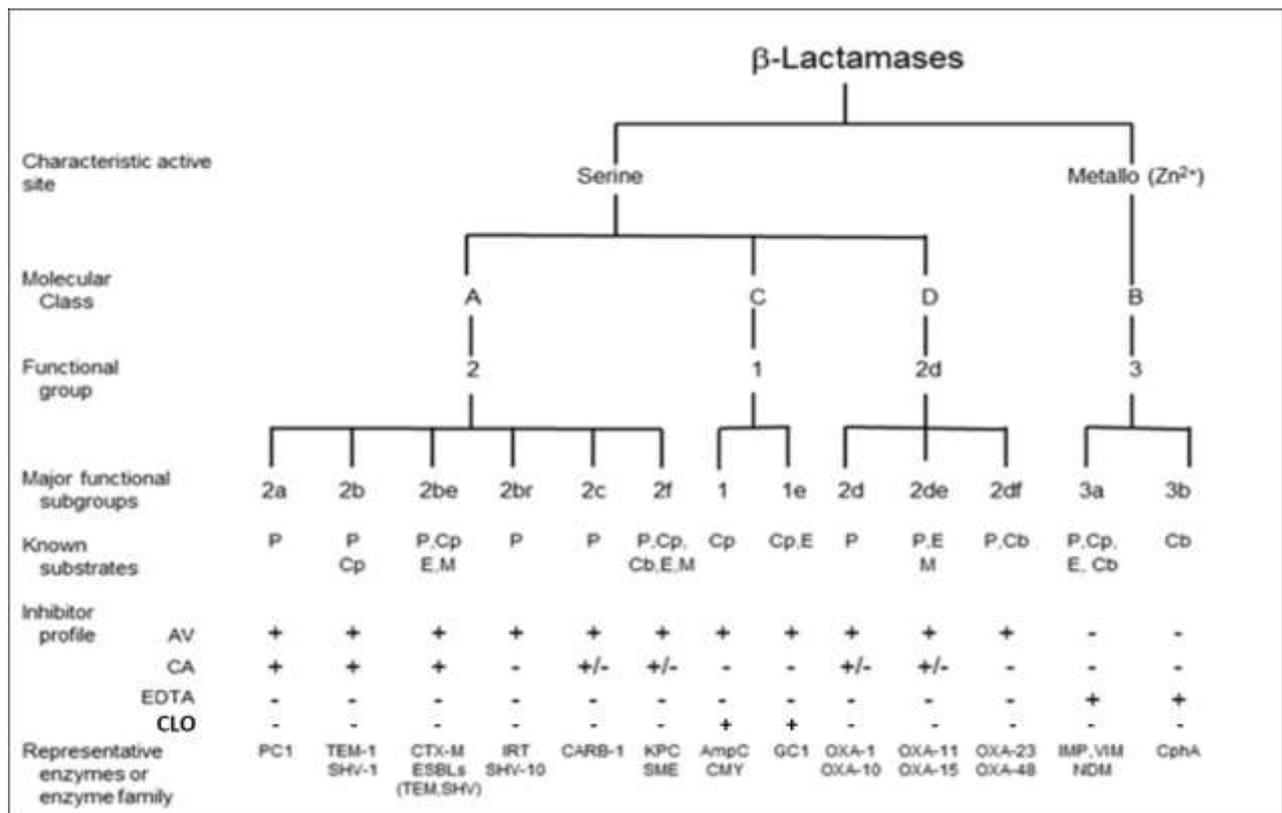


Figure 8. Relation moléculaire et fonctionnelle entre les β -lactamases³⁴

Avec CA, acide clavulanique, Cb, carbapénèmes, Cp, céphalosporines, E, céphalosporines à large spectre, M, monobactame, P, pénicillines, AV, avibactam, CLO, Cloxacilline

3. Description des β -lactamases les plus couramment rencontrées chez les entérobactéries

Seules seront décrites, par la suite, les β -lactamases les plus souvent retrouvées chez les entérobactéries.

a) β -lactamases du groupe 1 (classe C de Ambler)

Les céphalosporinases chromosomiques appartenant au groupe 1 de la classification de Bush (classe C de Ambler), sont le plus souvent des enzymes spécifiques d'espèces retrouvées chez des bacilles à Gram négatif³⁴. Ces enzymes hydrolysent préférentiellement les céphalosporines de 1^{ère} génération (C1G) comme la céfalotine. Lorsqu'elles sont produites en grande quantité, elles entraînent une résistance à toutes les β -lactamines excepté les carbapénèmes.

Ces enzymes sont inhibées par la cloxacilline et l'avibactam, mais pas par l'acide clavulanique et l'EDTA (Figure 8). C'est le cas des céphalosporinases AmpC retrouvées chez de nombreuses entérobactéries (*E. coli*, *Enterobacter* spp.) et *Pseudomonas aeruginosa*. Dès

1989, des céphalosporinases plasmidiques ont émergé chez des souches d'entérobactéries. Pour un certain nombre d'entre elles, des homologues avec des céphalosporinases chromosomiques précédemment décrites ont été retrouvés. Ainsi, les gènes chromosomiques codant pour les enzymes de type AmpC, qui font partie du patrimoine génétique de certains bacilles à Gram négatif, ont été transloqués sur des plasmides qui ont secondairement diffusé chez d'autres espèces bactériennes. Depuis la découverte de la première céphalosporinase plasmidique, MIR-1, d'autres enzymes ont été identifiées, principalement chez *K. pneumoniae*. Ainsi, plus d'une vingtaine de céphalosporinases plasmidiques ont été rapportées à ce jour et sont divisées en 5 à 6 groupes en fonction de leur homologie avec les différentes enzymes chromosomiques dont elles dérivent. Ce sont les enzymes CMY-2, LAT-1, BIL-1 (homologies avec l'enzyme AmpC de *Citrobacter freundii*), MIR-1, ACT-1 (AmpC d'*Enterobacter cloacae*), DHA-1 (AmpC de *Morganella morganii*), ACC-1 (AmpC d'*Hafnia alvei*), MOX-1 (AmpC d'*Aeromonas*)^{35,36}. Elles confèrent un phénotype de résistance analogue à celui d'une hyperproduction. Leur diffusion est mondiale avec une fréquence variable entre les différents gènes, *bla*_{CMY-2} étant le plus répandue³⁶.

b) β -lactamases du groupe 2 (classe A de Ambler, sauf 2d, 2de et 2df)

Ce groupe hétérogène, qui comprend des enzymes plus ou moins sensibles à l'acide clavulanique et résistant à l'EDTA, est subdivisé en 8 classes (2a, 2b, 2be, 2br, 2c, 2d, 2e et 2f). Chez les entérobactéries, les enzymes qui sont le plus souvent rencontrées sont des enzymes de type TEM, SHV, CTX-M et KPC.

** Classe 2b* (β -lactamases à large spectre ou BLS)

Les β -lactamases de la classe 2b sont qualifiées de BLS car elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines, mais affectent également les céphalosporines de 1^{ère} et, à un moindre degré, de 2^{ème} génération (C1G et C2G). Ce sont les β -lactamases acquises les plus fréquentes des entérobactéries. Les enzymes les plus communes de cette classe sont TEM-1, TEM-2 et SHV-1.

** Classe 2be* (β -lactamases à spectre élargi ou BLSE)

La classe 2be est réservée aux BLSE, définies comme des enzymes inactivant les pénicillines et les céphalosporines, y compris les céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G), telles que la céfotaxime et la ceftazidime, ainsi que les monobactames (aztréonam).

Certaines enzymes dérivent des BLS de type TEM-1, TEM-2 et SHV-1 par des mutations ponctuelles qui modifient la conformation du site actif en augmentant les capacités hydrolytiques de l'enzyme. Au cours des dernières années, de nombreuses BLSE non dérivées de TEM et SHV ont été identifiées, comme par exemple les enzymes de type GES-1, VEB-1, PER-1... Ce sont surtout les BLSE de type CTX-M qui ont émergé depuis le début des années 2000 et sont devenues pandémiques partout dans le monde. Ces enzymes et l'épidémiologie des entérobactéries qui les hébergent seront décrites dans le paragraphe suivant.

** Classe 2bf*

Ces β -lactamases de classe A appartenant à la sous-classe 2bf sont des enzymes à spectre élargi qui hydrolysent également les carbapémènes. Parmi ces carbapénémases, on retrouve les enzymes KPC (*Klebsiella pneumoniae* productrice de carbapénémase) qui sont les plus fréquentes dans le monde entier ³⁷.

** Classe 2d (Oxacillinases, enzymes de type OXA, classe D de Ambler)*

Les enzymes de la classe 2d sont des oxacillinases (OXA) généralement peu sensibles à l'acide clavulanique. Leur spectre peut être étendu par des mutations ponctuelles, comme pour les BLSE des familles TEM et SHV. Les β -lactamases de type OXA sont surtout fréquentes chez *P. aeruginosa*, et occasionnellement rencontrées chez les entérobactéries. Les oxacillinase de type 2df, telle que OXA-48, confèrent une résistance à bas niveau aux carbapénèmes.

c) Les β -lactamases du groupe 3 : métalloenzymes (classe B de Ambler)

Ce groupe comprend des β -lactamases dont le site catalytique, contrairement aux autres β -lactamases, ne comporte pas de sérine OH, mais un ion métallique, le Zinc (Zn^{2+}). La chélation du Zn^{2+} par l'EDTA inhibe l'enzyme. Ces métallo-enzymes sont des carbapénémases à large spectre qui hydrolysent non seulement l'imipénème, mais aussi les pénicillines et les céphalosporines.

* Les métallo-enzymes acquises sont en pleine évolution. On les retrouve dans le groupe 3a. Ce sont essentiellement les enzymes de type IMP, et de type VIM que l'on retrouve chez de nombreuses espèces d'entérobactéries, ainsi que chez des bactéries opportunistes souvent responsables d'infections nosocomiales telles que *P. aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*. Une autre métallo-enzyme, dont la première (NDM-1, pour New-

Delhi Métallo-enzyme-1) a été isolée chez un patient suédois de retour d'Inde, et décrite en 2009. Depuis son extension est mondiale³⁸.

VI. Epidémiologie de la résistance aux β -lactamines par production de BLSE chez les entérobactéries

Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) constituent le mécanisme le plus important de la résistance aux céphalosporines chez les *Enterobacteriaceae*. Les BLSE confèrent une résistance aux pénicillines, aux céphalosporines à large spectre (céfotaxime, ceftriaxone, ceftazidime) et monobactame (aztréonam), mais peuvent être inhibées par des inhibiteurs de β -lactamase tel que l'acide clavulanique. Les entérobactéries productrices de BLSE n'ont pas cessé d'augmenter ces dernières décennies partout dans le monde. Elles sont classées par l'organisation mondiale de la santé comme des bactéries de priorité critique contre laquelle il est urgent de lutter. À ce jour, plusieurs BLSE sont les plus souvent retrouvées chez des bactéries isolées de patients.

A. BLSE de type TEM (TEMoneira, nom du patient)

Ce sont de β -lactamases de type TEM (classe A, Ambler) qui appartiennent à la classe 2be de Bush/Jacoby. Ces enzymes dérivent des BLS, TEM-1 et TEM-2. De très nombreux variants avec un phénotype de BLSE ont été décrits. Ils sont divisés en 2 groupes selon le type de mutations : mutations clés et mutations secondaires. Les mutations clés sont situées au niveau de site actif. Elles rendent l'enzyme capable d'hydrolyser les C3G et restent sensibles à l'action de l'acide clavulanique. Certaines mutations confèrent aux enzymes de type TEM, une résistance à l'acide clavulanique et sont appelées TRI (pour TEM résistantes aux inhibiteurs). Des mutations permettent aussi d'hydrolyser à la fois les C3G et de conférer la résistance à l'acide clavulaniques ont aussi été décrites^{30,39,40} (figure 9).

Jusqu'à la fin des années 1990, les BLSE de type TEM et SHV étaient principalement produites par *K. pneumoniae* et les *Enterobacter spp*, responsables d'infections nosocomiales⁴¹. Depuis 2000, la fréquence des BLSE type TEM est en nette diminution, et est maintenant faible par rapport aux BLSE de type CTX-M. En Europe, les BLSE de type TEM les plus fréquentes sont les TEM-24. Dans une récente étude française de Robin *et al.*⁴², la fréquence des BLSE de type TEM est de 3.5% avec 3.4% de TEM-24, chez le complexe *E. cloacae* (figure 10).

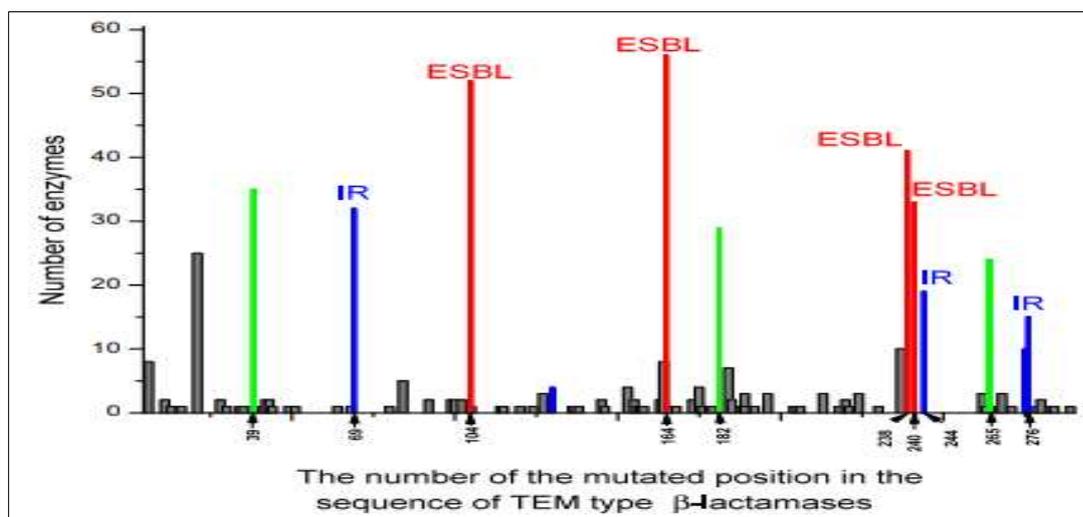


Figure 9. Des positions mutées dans la séquence de β -lactamases de type TEM et le nombre d'enzymes substituées à ces positions.

Les β -lactamases de type TEM sont des enzymes de 289 acides aminés. La fréquence des résidus mutants responsables des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) est marquée en rouge, l'apparition des résidus mutants responsables des enzymes résistantes aux inhibiteurs (IR) est indiquée en bleu et l'apparition des mutations secondaires les plus courantes est indiquée en vert⁴⁰.

B. BLSE de type SHV (SuLfHydryL VARIABLE)

Ces enzymes dérivent par mutations ponctuelles de la BLS, SHV-1. Depuis leur apparition en 1983 (SHV-2), de nombreux variants ont été décrits à ce jour.⁴³ Les BLSE de type SHV, comme celles de type TEM, appartiennent au groupe 2be de la classification de Bush/Jacoby et possèdent le même spectre d'activité. Les BLSE les plus fréquemment rencontrées au niveau mondial, sont SHV-5, SHV-2, SHV-2a et SHV-12⁴³.

Les gènes *bla_{SHV-3}* et *bla_{SHV-4}* n'ont été détectés que sporadiquement depuis leur première description. Le gène *bla_{SHV-3}* semble être limité géographiquement aux États-Unis où il a été détecté chez des souches d'*E. coli* d'origine animale, et associé à d'autres gènes de résistance aux antibiotiques tels que *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{CTX-M-24}*, *bla_{CMY-2}* et/ou *bla_{TEM-1}*. Le gène *bla_{SHV-4}* a également été identifié chez *E. aerogenes* et *C. diversus* dans différents pays^{43,44}. La plupart des autres BLSE de type SHV sont des cas sporadiques. Dix-sept variants se retrouvent exclusivement dans les infections dues à *K. pneumoniae*. Ces variants ont été décrits dans le monde entier (Brésil, Portugal, Algérie, États-Unis, Tunisie, Pays-Bas, France, Afrique du Sud, Colombie et Chine) et sont principalement associés à des plasmides⁴³. Le gène *bla_{SHV-12}*

est souvent trouvé chez le complexe *E. cloacae* avec une prévalence de 37.9 % en France (figure 10).

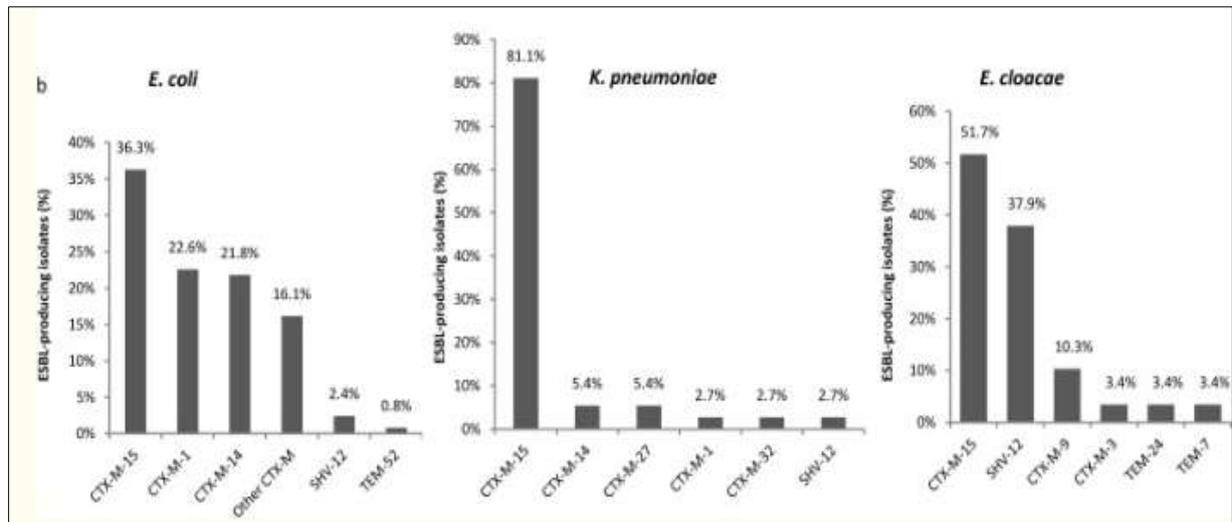


Figure 10. Diversité des BLSE chez les *Enterobacteriaceae* isolés à partir d'échantillons cliniques dans 18 hôpitaux français (n = 200) ⁴²
Avec *E. coli* (n = 124), *K. pneumoniae* (n = 37) et *E. cloacae* (n = 29).

C. BLSE de type CTX-M (Céfotaximase-Munich)

1. Classification des BLSE de type CTX-M

Les enzymes CTX-M sont parmi les BLSE les plus fréquentes au niveau mondial et les plus souvent retrouvées chez les bactéries à Gram négatif. Leur impact au niveau clinique est important⁴⁵⁻⁴⁷. Elles sont appelées aussi céfotaximases car elles hydrolysent préférentiellement le céfotaxime plutôt que la ceftazidime. Certaines CTX-M, avec des mutations dans leur site actif, telles que CTX-M-15⁴⁸, CTX-M-16⁴⁹, CTX-M-19⁵⁰, et CTX-M-27 présentent une efficacité catalytique accrue pour la ceftazidime comparée aux autres CTX-M⁵¹. Les BLSE sont habituellement classés en 5 groupes phylogénétiques distincts basés sur leur homologies de séquences en acides aminés : CTX-M du groupe 1 (ou CTX-M-G1), CTX-M-G2, CTX-M-G8, CTX-M-G9, CTX-M-G25 ⁵² (figure 11). Plus récemment, une BLSE de type CTX-M-45 a été caractérisée et ne peut être classée dans aucun des groupes précédemment cités⁵². Ces groupes diffèrent les uns des autres par plus de 10% de divergence dans leur séquences en acides aminés et chaque groupe contient des variants qui diffèrent par moins de 5% de divergence⁵². Les enzymes CTX-M sont ~35% identiques à la β -lactamase, TEM-1.

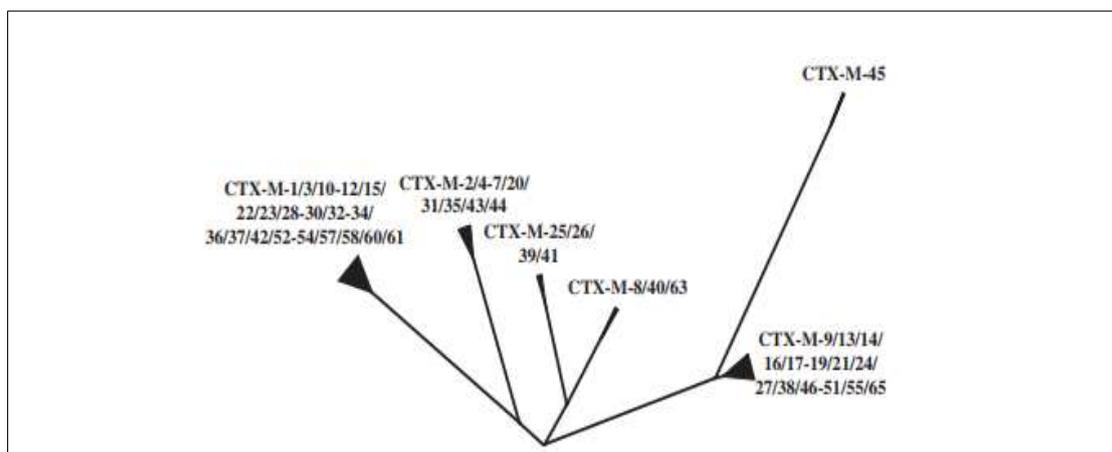


Figure 11. Les six sous-lignées (ou groupes) connues de β -lactamases de type CTX-M, présentées dans un diagramme en arborescence qui reflète la similarité au niveau de la séquence des acides aminés⁵².

Les triangles noirs à la fin de chaque branche indiquent la présence de variants alléliques mineurs dans le groupe correspondant. L'arbre a été construit avec le programme TREEVIEW (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>), sur la base d'un alignement multiple des séquences CTX-M disponibles au public (<http://www.lahey.org/Studies/>). Le degré de divergence de la séquence d'acides aminés entre les différents groupes varie de 9,3% à 32% ou 25%, en ne considérant pas l'enzyme CTX-M-45 la plus divergente, soit $\leq 3,5\%$ dans chaque groupe. CTX-M-14 est identique à CTX-M-18 et seul le premier est répertorié. Toho-1 correspond à CTX-M-44, Toho-2 à CTX-M-45, UOE-1 à CTX-M-15 et UOE-2 et Toho-3 à CTX-M-14.

Les progéniteurs des gènes codant pour les CTX-M ont été identifiés sur le chromosome de *Kluyvera spp.* Elles sont des entérobactéries environnementales rarement isolées en bactériologie médicale. Les sources des gènes CTX-M des groupes 1 et 2 et pour celles des groupes 8 et 9 sont *K. ascorbata* et *K. georgiana*, respectivement. L'origine des gènes CTX-M des groupes 25 et 45 reste inconnue⁴⁶.

2. Chronologie de l'émergence des BLSE de type CTX-M

En 1986, une souche d'*E. coli* résistante au céfotaxime été isolée de la flore fécale d'un chien résistante au céfotaxime au Japon. Cette souche produisait une BLSE non-TEM, non-SHV, appelée FEC-1⁵³. En 1989, une souche clinique d'*E. coli* résistante au céfotaxime, qui produisait une BLSE non-TEM, non-SHV, a été appelée CTX-M-1, en référence à son activité hydrolytique contre le céfotaxime⁵⁴. Parallèlement, une dissémination de souches de *Salmonella spp.* résistantes au céfotaxime a émergé en Amérique du Sud^{55,56}. En 1992, le même type de BLSE a été signalé dans la souche clinique d'*E. coli*, isolée début 1989 en France, chez un patient de nationalité italienne⁵⁷. En 1996, une enzyme apparentée au MEN-1

(homologue à 83%) a été décrite, appelée Toho-1, qui a été produite par une souche d'*E. coli* résistante au céfotaxime isolée au Japon⁵⁸.

En 1996, le séquençage de 2 gènes non-TEM et non-SHV codant pour une BLSE a révélé que CTX-M-1 étaient identique à MEN-1 et le variant Toho-1, isolé d'une souche de *Salmonella* isolée en Argentine en 1990⁵⁹, a été désigné comme CTX-M-2. En Pologne, un variant du CTX-M-1 a été identifié et nommé CTX-M-3 chez différents membres de la famille des *Enterobacteriaceae* isolés en 1996⁶⁰. Quelques années plus tard, le séquençage du gène codant pour le FEC-1 a montré que l'enzyme FEC-1 diffère de l'enzyme CTX-M-3 par seulement 2 substitutions, dans le peptide signal⁴⁵.

3. Épidémiologie des entérobactéries productrices de CTX-M

Les BLSE CTX-M constituent une famille hétérogène, la diffusion chez les entérobactéries a explosé de façon extrêmement rapide dans différentes zones géographiques^{46,61} (figure 12).

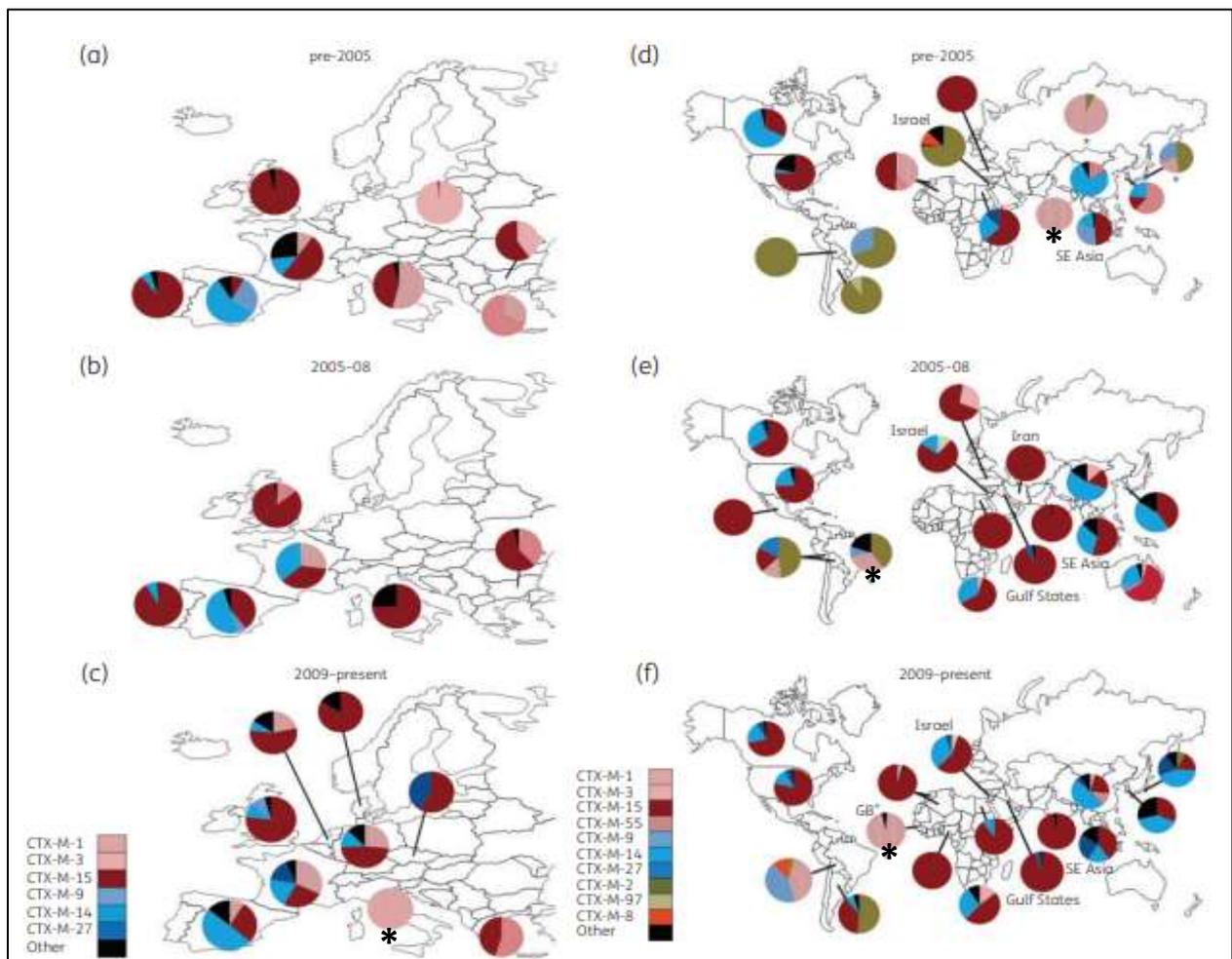


Figure 12. Distribution mondiale des types CTX-M⁶²

Distribution sur 3 périodes de BLSE de type CTX-M en Europe (a)(b) (c) et pour le reste du monde (d)(e)(f). Les données incluent les isolats hospitaliers et communautaires. Les CTX-M de groupe 1 apparaissent rose-rouge : CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-55 et CTX-M-15, en bleu : CTX-M-9, CTX-M-14, et CTX-M-27, en vert : CTX-M-2 et CTX-M-97, en orange (CTX-M-8) et les autres, en noir. Les données indiquées par un astérisque n'ont pas été subdivisées selon les variants. Pour certains pays, aucune donnée n'est disponible.

La répartition globale des variants CTX-M est complexe. Cependant, CTX-M-15 est le variant dominant dans la plupart des régions du monde (Figure 11), excepté en Chine, Asie du Sud-Est et Sud-Ouest, Corée du Sud, Japon et Espagne, où se sont les variants du groupe 9, (CTX-M-14) qui sont dominants. CTX-M-2 est prédominante en Argentine (Amérique du Sud).

La fréquence des entérobactéries résistantes aux C3G (essentiellement par production de BLSE) est importante, principalement chez *E. coli* et *K. pneumoniae* (figure 13). En Europe, les données de fréquence sont disponibles sur le site "European Antimicrobial Resistance Surveillance" ; (EARS-Net http://www.ecdc.europa.eu/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/).

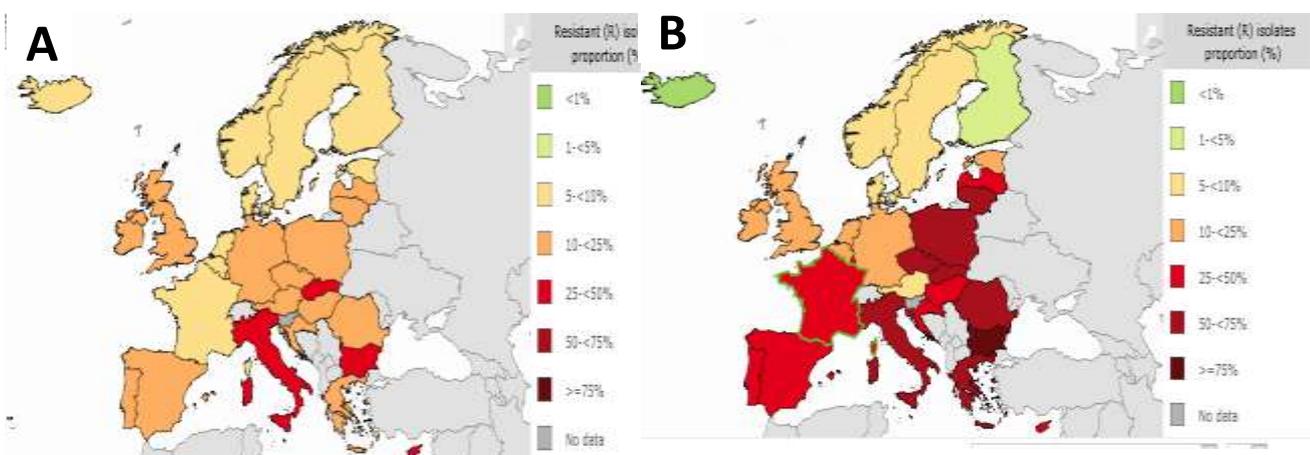


Figure 13. Carte de l'Europe montrant les données 2018 sur les fréquences d'*E. coli* (A) et de *K. pneumoniae* (B) résistants aux C3G.

Depuis 2008, un clone d'*E. coli* virulent de phylogroupe B2 et appartenant à la séquence type ST131, a émergé et a été disséminé au niveau mondial, que ce soit en milieu hospitalier ou dans la communauté. Ce clone B2-ST131, et en particulier dans le sous-clade ST131-C2, est souvent associé avec la présence du gène *bla*_{CTX-M-15}⁶³. Le gène *bla*_{CTX-M-15} est associé avec d'autres gènes de résistance à des antibiotiques, permettant de qualifier la bactérie comme

bactérie multirésistante aux antibiotiques (BMR) et même de bactérie hautement résistante émergente (BHRe) (selon le guide français du Haut Conseil de Santé Publique, 2013).

Cependant, d'autres gènes de CTX-M génétiquement divergents sont également présents dans le clone B2-ST131, tels que les variants de type *bla*_{CTX-M-14/14 like}^{64,65}. Un sous-groupe d'*E. coli* produisant la BLSE, CTX-M-27 (enzyme CTX-M appartenant au groupe 9, variant de CTX-M-14), nommé ST131-C1-M27, a émergé plus récemment^{66,67}.

Les gènes *bla*_{CTX-M} ont été principalement disséminés via de multiples événements de transfert de gènes horizontaux^{67,68} et sont souvent localisés sur des plasmides conjugatifs, en particulier des plasmides de type multiréplicon IncFII hébergeant des réplicons FIA/FIB, qui portent également d'autres gènes de résistance⁶⁸. En Tunisie, plusieurs études ont signalé la présence de BLSE chez les entérobactéries⁶⁹.

La dissémination importante de BLSE a favorisé l'utilisation de carbapénèmes et par conséquent favorisé la diffusion de bacilles à Gram négatif producteurs de carbapénémases.

D. Epidémiologie des entérobactéries productrices des carbapénémases

Les *Enterobacteriaceae* résistantes aux carbapénèmes (CRE, pour Carbapenem Resistant Enterobacteria) sont apparues comme une menace majeure de santé publique (BHRe), car peu d'antibiotiques restaient disponibles sur de telles souches.

Les carbapénèmes ont été introduits à la fin des années 1980, contre les infections causées des souches d'entérobactéries et en particulier *K. pneumoniae* produisant des BLSE. Malheureusement, au début des années 1990, les *Enterobacteriaceae* développant une résistance aux carbapénèmes par production de carbapénémase sont apparues au Japon, suivi des pays voisins.

Les carbapénémases les plus couramment rencontrées chez les entérobactéries appartiennent soit à la classe A (ou classe 2f), comme les enzymes de type KPC, soit à la classe D (ou classe 2df) comme les enzymes de type OXA-48, soit à la classe B (classe 3a) comme les métallo-enzymes de type VIM, IMP et NDM. Il existe de rares cas de β -lactamases de classe C (CMY-10) qui hydrolysent l'imipénème⁷⁰.

Les enzymes de type KPC, OXA-48 et NDM sont les plus représentées aux États-Unis, en France et en Inde, respectivement^{38,71}.

La répartition des carbapénémases selon les espèces d'entérobactéries est détaillée sur la figure 14⁷¹.

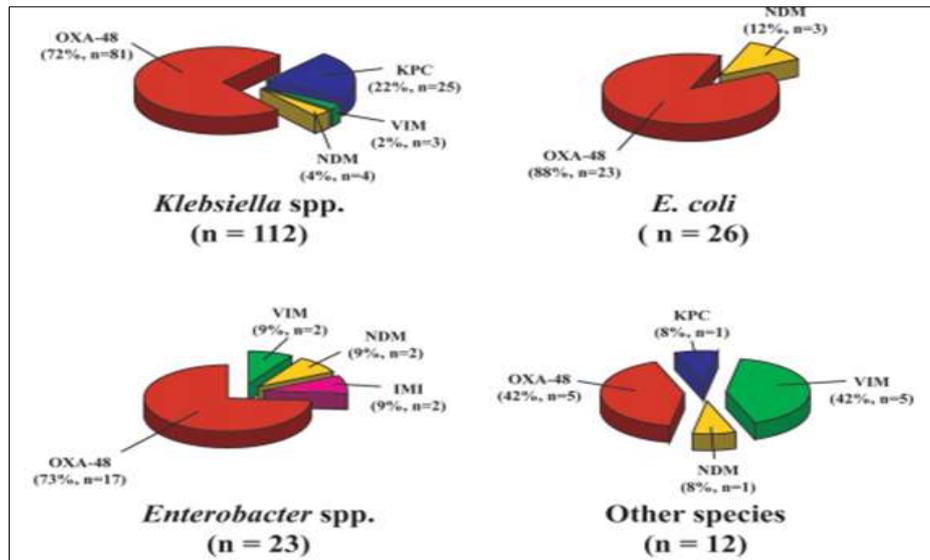


Figure 14. Répartition des différents types de carbapénémases parmi les Entérobactéries productrices de carbapénémases dans le monde⁷¹

Divers tests phénotypiques et génétiques ont été proposés et validés pour la détection rapide des CRE. Les tests phénotypiques détectent l'activité de la carbapénémase, soit en inhibant leur activité avec des inhibiteurs de carbapénémases, ou en détectant l'hydrolyse de carbapénèmes par des carbapénémases⁷².

Ces classes ont la plus grande importance clinique parmi les agents pathogènes nosocomiaux.

1. Les carbapénémases de classe A

Les carbapénémases de classe A hydrolysent tous les carbapénèmes et sont inhibées partiellement par l'acide clavulanique. Plusieurs carbapénémases ont été décrites chez les entérobactéries. Certaines sont codées par des gènes chromosomiques, comme NmcA (Non Métallo-enzyme Carbapénémase A), SME (*Serratia marcescens* enzyme) et SFC-1 (*Serratia fonticola* Carbapenemase-1).

D'autres ont leurs gènes portés par des plasmides, IMI (Imipenem-hydrolysing β -lactamase) et GES (spectre étendu guyanais). Parmi les carbapénémases de classe A porté par des plasmides, on retrouve les enzymes de type KPC (*Klebsiella pneumoniae* productrice de carbapénémase), une des familles de carbapénémases parmi les plus fréquentes et menaçantes

dans le monde entier ³⁷(figure 15). Les enzymes de type KPC ont provoqué des épidémies dans de nombreux pays d'Asie, d'Amérique du Nord et d'Europe, ainsi qu'en Afrique³⁷ .

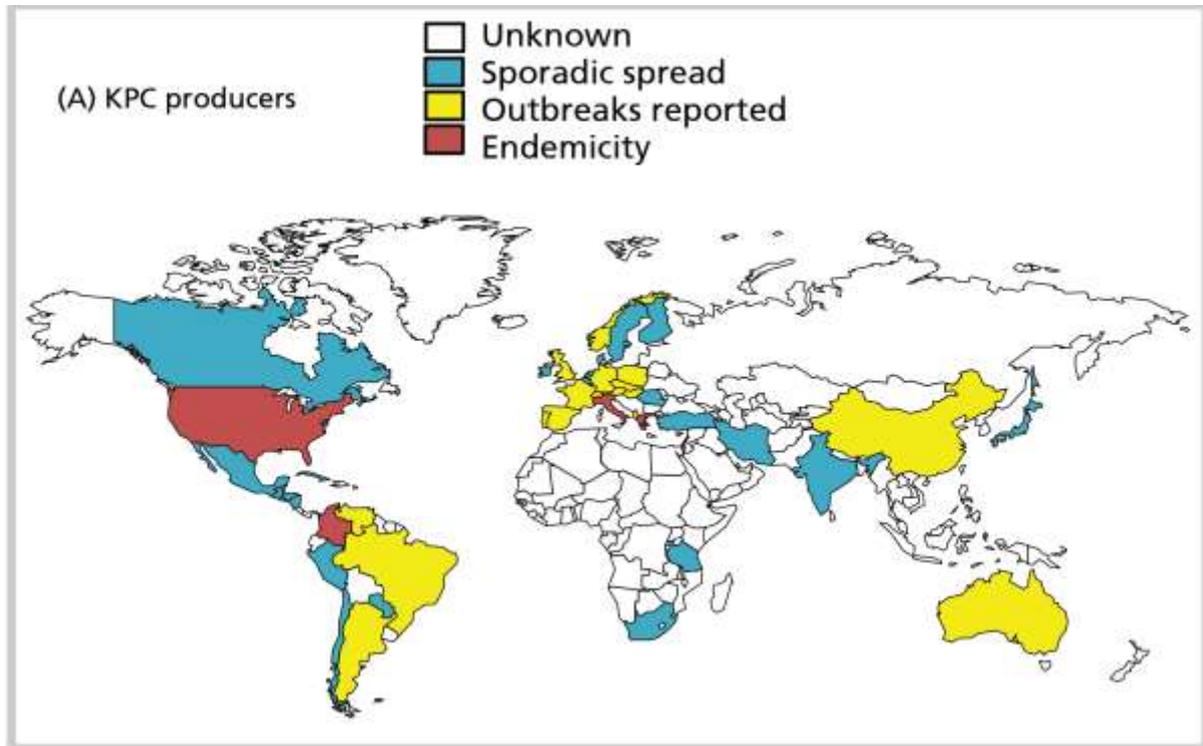


Figure 15. Distribution mondiale de carbapénémases KPC chez *K. pneumoniae* ³⁷.

Les clones de *K. pneumoniae* produisant des enzymes KPC ont disséminé au niveau international dans plusieurs zones géographiques. Ils appartiennent à différentes séquences types, et diffèrent selon leurs contenus plasmidiques. Cependant, un élément génétique mobile, le transposon Tn4401 est souvent trouvé associé au gène *bla*_{KPC} ⁷³.

2. Carbapénémases de classe B

Ces enzymes sont aussi appelées Métallo- β -lactamases (MBLs) et appartiennent à la classe B qui regroupe des β -lactamases capables d'hydrolyser les carbapénèmes par un mécanisme dépendant d'ion métallique comme le Zinc. Elles sont donc sensibles aux agents chélateurs de cation divalent tel que l'EDTA. Les métallo- β -lactamases les plus courantes sont les carbapénémases de type New-Delhi métallo- β -lactamase (NDM), de type *Pseudomonas* résistant à l'imipénème (IMP) et de type VIM (Verona integron-encoded metallo- β -lactamase). Les gènes codant pour les enzymes IMP et VIM sont souvent situés en tant que cassettes de gènes dans diverses structures d'intégrons⁷⁴.

Le gène bla_{NDM-1} a été détecté pour la première fois en 2008 chez une souche de *K. pneumoniae* d'un patient suédois de retour d'Inde (New-Delhi)⁷⁵. Cette enzyme a progressivement disséminé chez d'autres entérobactéries et dans divers pays. Les gènes bla_{NDM} sont dominants dans les isolats de *K. pneumoniae* et d'*E. coli*, mais ont également été trouvés chez des *A. baumannii* et *P. aeruginosa* (figure 16). Des études ont confirmé une haute prévalence de gène bla_{NDM-1} dans des pays d'Asie, des Balkans et en Chine⁷⁶.

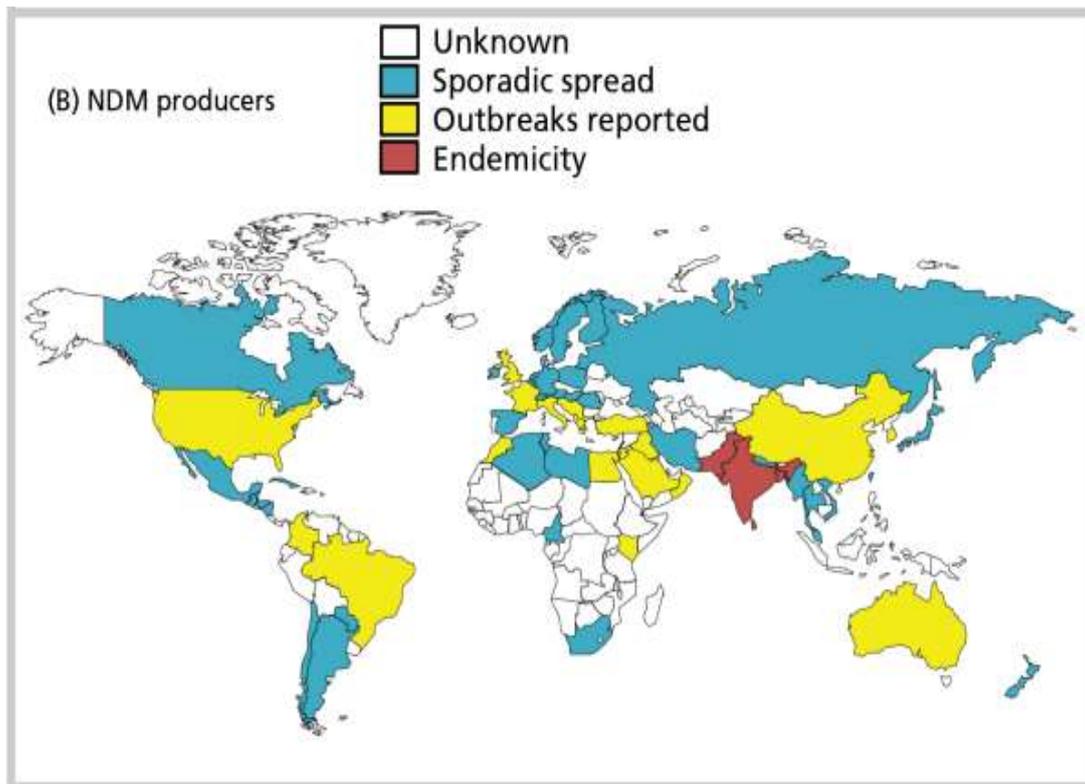


Figure 16. Distribution mondiale de carbapénémases de métallobactamases de New Delhi chez les entérobactéries et *P. aeruginosa*³⁷

En 2018, 24 variants NDM avaient été identifiés dans plus de 60 espèces réparties dans 11 familles bactériennes³⁸ (figure 17).

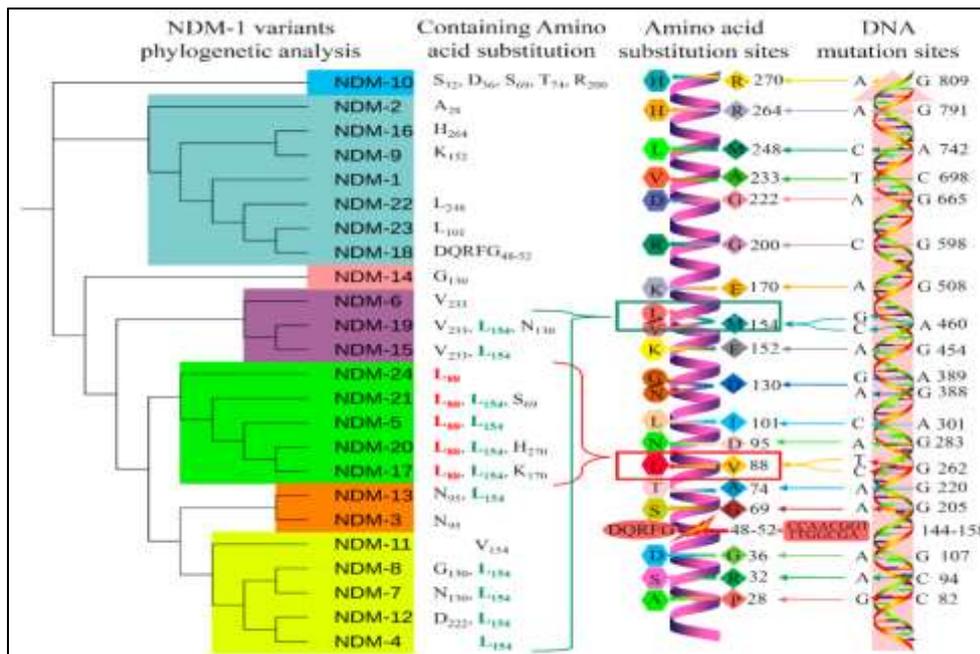


Figure 17. Analyse phylogénétique des variants de métallo- β -lactamase-1 (NDM-1).

Les groupes phylogénétiques sont répartis selon des couleurs différentes : par exemple, le groupe NDM-24 est coloré en vert.

Les gènes bla_{NDM} sont souvent associés avec les gènes de BLSE, tels que les gènes bla_{CTX-M} et bla_{SHV} et d'autres gènes de résistance comme aux aminosides, aux quinolones et aux macrolides. Les gènes bla_{NDM} sont localisés sur différentes plasmides conjugatifs appartiennent à des groupes d'incompatibilité distincts tels que IncF, IncHI1, IncL/M, et IncA/C⁷⁷.

3. Carbapénémases de classe D

Les carbapénémases du type OXA (oxacilline) telles que OXA-48, ont une faible activité vis-à-vis des carbapénèmes. Ces enzymes sont faiblement inhibées par l'EDTA ou l'acide clavulanique. Le gène bla_{OXA} a été décrit pour la première fois par Paton *et al*⁷⁸ et l'enzyme a été purifiée à partir d'une souche d'*A. baumannii* multirésistante, isolée en 1985 d'un patient Écossais. Les gènes bla_{OXA} ont une capacité à muter rapidement et à élargir leur spectre d'activité. Les enzymes OXA se retrouvent surtout dans des bactéries non-fermentantes, telles qu'*A. baumannii* et *P. aeruginosa*. OXA-23, OXA-24/40 et OXA-58-like sont communément retrouvées chez *A. baumannii*, mais pas chez *P. aeruginosa*. Une étude de Mathers *et al.*⁷⁹ a montré une détection fréquente de ces enzymes de classe D dans la famille des *Enterobacteriaceae*, ce qui en fait une menace et un problème de santé publique majeur dans le monde entier, en particulier des enzymes OXA-48 et ses dérivés (eg, OXA-181 and OXA-

232). Actuellement, le gène *bla*_{OXA-48} (et ses dérivés) est le plus commun et le plus répandu chez *K. pneumoniae* et se retrouve très fréquemment en Turquie, au Moyen-Orient, en Afrique du Nord et en Europe⁸⁰. La dissémination de ce gène est favorisée par sa localisation sur des plasmides conjugatifs. L'efficacité de transfert horizontal de ce gène a conduit à des épidémies dans plusieurs pays^{37,81} (figure 18).

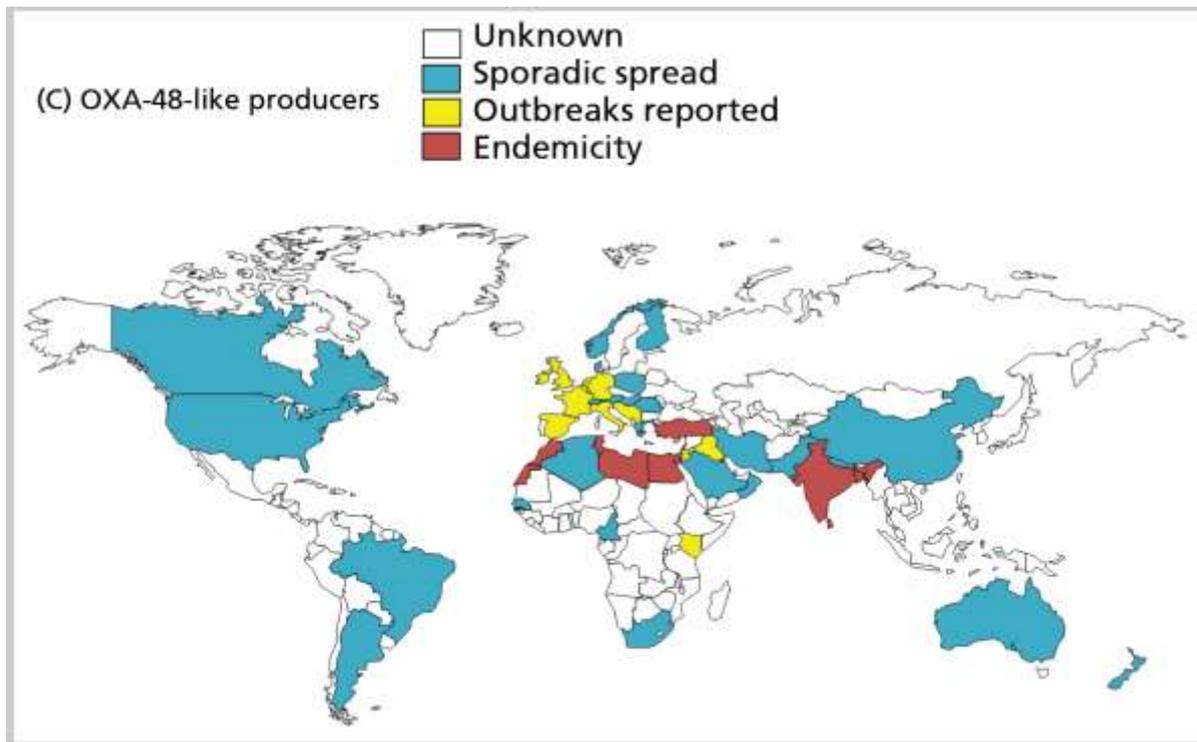


Figure 18. Distribution mondiale de carbapénémases type oxacillinase OXA-48 chez les entérobactéries et *P. aeruginosa*³⁷.

Contexte de l'étude de la 1^{ère} partie

Chez les entérobactéries, la résistance aux C3G par production de BLSE et la résistance aux carbapénèmes par production de carbapénémases a été étudiée en Tunisie dans le milieu hospitalier⁸²⁻⁸⁴, mais peu de données sont disponibles dans le milieu de la communauté. Deux études épidémiologiques dans différentes régions géographiques en Tunisie ont été réalisées lors ce travail. L'une a été réalisée à Djerba et l'autre, à Sfax et Tunis (figure 19).



Figure 19. Carte géographique de la Tunisie avec les différentes régions où les échantillonnages ont été réalisés

Lors d'une première étude réalisée en Septembre 2016 durant une période de 1 mois, 30 entérobactéries consécutives ont été isolées à partir d'urines de 30 patients de la communauté et provenant d'un laboratoire privé d'analyses médicales de Djerba. Parmi ces 30 entérobactéries collectées, 2 souches étaient résistantes aux C3G (prévalence de 6,7%). Aucune n'était résistante aux carbapénèmes. Les 2 souches, Eh22 et Eh23 multirésistantes, appartenaient au complexe *Enterobacter cloacae* (ECC, pour *Enterobacter cloacae* Complex). Elles ont été isolées respectivement chez un enfant de 5 mois et chez une femme de 32 ans.

Lors d'une deuxième étude réalisée sur une période de 2 mois (Décembre 2017 à Janvier 2018), un total de 200 cultures positives isolées d'urines ont été collectées. Parmi elles, 170 entérobactéries ont été identifiées dont 52 provenaient de patients de la communauté. Elles avaient été collectées dans 2 laboratoires privés d'analyses médicales à Sfax (Laboratoires, CA et CB). Un total de 118 entérobactéries a également été inclu dans cette étude et ont été obtenus d'urines de patients hospitalisés dans 3 hôpitaux : 1 à Sfax (H1, polyclinique de 60 lits) et 2 à Tunis (H2, hôpital général de 100 lits et H3, hôpital psychiatrique de 640 lits). Ces souches ont été incluses afin de vérifier si des liens épidémiologiques pouvaient être retrouvés entre les souches de la communauté et les souches hospitalières, durant la même période.

Matériels et méthodes

VII. Souches bactériennes étudiées

A. Milieux de culture

L'isolement des souches a été effectué sur milieu Luria-Bertani (LB). Le criblage de souches résistantes aux C3G a été réalisé en milieu gélosé Mueller-Hinton (MH) ajusté en cations (CA-MHB, Biorad).

Le milieu MH additionné d'antibiotiques a aussi été utilisé pour les expériences de conjugaison (voir partie Analyse des plasmides).

La détermination des CMI (Concentrations Minimales Inhibitrices) à la colistine a été réalisée avec le milieu liquide MH, selon les recommandations et les critères d'interprétation du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (<https://www.sfm-microbiologie.org/2019/01/07/casfm-eucast-2019/>).

B. Identification bactérienne

L'identification des entérobactéries a été réalisée par les laboratoires hospitaliers et privés par différentes méthodes, incluant des tests classiques (galerie API 10S, BioMérieux). Elle a été confirmée au Laboratoire de l'Université de Bordeaux (UMR 5234 / cellule de Transfert) par spectrométrie de masse, utilisant la technique MALDI-TOF/MS (ou matrix-assisted laser desorption-ionization – time of flight / mass spectrometry) (Bruker Daltonics). Les entérobactéries qui ont donné des résultats discordants entre les tests classiques et le MALDI-TOF ont été confirmés par le séquençage partiel de l'ADN ribosomal 16S après amplification par PCR et séquençage à l'aide des amorces 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et 1489R (5'-TACCTTGTTACGACTTCA-3'). Le séquençage a été réalisé par la société Eurofins et les séquences ont été analysées comme décrit au Paragraphe F.

C. Antibiogrammes et détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

Les profils de sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries ont été déterminés par la méthode standard de diffusion à l'aide de disques, sur gélose Mueller-Hinton (MH, Bio-Rad). En bref, une suspension bactérienne a été réalisée avec une densité correspondant à un indice

de McFarland de 0,5 (mesuré à l'aide d'une densimat, BioMérieux), puis écouvillonnée sur la surface d'une gélose MH. Les disques d'antibiotiques déposés ont été les suivants (charge du disque en µg) : ampicilline (10), amoxicilline-acide clavulanique (30), ticarcilline (75), ticarcilline- acide clavulanique (85), pipéracilline (30) , pipéracilline-tazobactam (36), mecilliname (10), temocilline (30), céfalexine (30), céfoxitine (30), céfixime (5), céfuroxime (30), ceftriaxone (30), ceftazidime (10), céfépime (30), aztréonam (30), imipénème (10), méropénème (10), ertapénème (10), gentamicine (10), tobramycine (10), amikacine (30), acide nalixidique (30), ciprofloxacine (5), ofloxacine (5), colistine (50), co-trimoxazole (25), triméthoprim (5), fosfomycine (200), nitrofurantoïne (100) (Bio-Rad). Les résultats ont été interprétés selon les critères du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (<https://www.sfm-microbiologie.org/2019/01/07/casfm-eucast-2019/>). Pour les 2 souches du complexe d'*Enterobacter cloacae*, l'antibiogramme a été effectué sur un milieu MH supplémenté en cloxacilline à 250 mg/l, pour inhiber la(es) céphalosporinase(s). Les isolats ont été criblés pour la production de BLSE par un test de synergie à double disque, qui permet de visualiser la présence d'une BLSE en montrant la présence d'une synergie entre le disque d'une C3G (comme le céfotaxime) et le disque d'amoxicilline-acide clavulanique. Pour les isolats présentant une résistance accrue aux carbapénèmes, un test de sensibilité avec l'EDTA (dépôt sur le disque d'imipénème d'un volume de 10 µL d'une solution d'EDTA à 200 mM) a été réalisé pour la détection de la métallo-carbapénémase.

D. Caractérisation moléculaire des gènes de β-lactamase

1. Extraction d'ADN total

a) ADN extrait après ébullition

L'extraction d'ADN total (génomique et plasmidique) des entérobactéries a été réalisée après une ébullition à 100°C d'une suspension de colonies bactériennes dans un volume de 100 µl d'eau stérile (correspondant à un trouble léger) pendant 5 min. C'est une technique d'extraction rapide.

b) ADN extrait en utilisant un tampon salin (NaCl 5M)

Cette technique d'extraction est basée sur une lyse des bactéries dans un tampon salin (tampon SET : Tris-HCl 1M pH7,5 ; EDTA 200 mM ; NaCl 5M) en présence de 1/10 du volume de SDS 10% et de 10 µg/ml final de lysozyme. Après incubation 1h à 37°C, le mélange a été traité par une solution (volume à volume) de chloroforme/alcool isoamylique

(24/1 ; v/v). La précipitation des acides nucléiques a été réalisée en ajoutant 0,7 volume d'isopropanol. Le culot a été resuspendu dans de l'eau ultrapure stérile et l'échantillon a été traité par la RNase A (10 µg/ml). L'ADN a ensuite été quantifié à une longueur d'onde de 260 nm en utilisant un spectrophotomètre (Nanodrop 2000, ThermoFischer).

2. Extraction plasmidique utilisant une technique de lyse alcaline

C'est une technique qui dérive de la méthode de lyse alcaline (ou technique miniscreen), et elle a été utilisée pour extraire les plasmides de grande taille (> 12,5 kpb) des souches du complexe d'*E. cloacae* ou à partir des transconjugants. A partir d'une culture bactérienne de 16h réalisée en milieu liquide (10 à 50 ml, milieu MH), le culot obtenu après centrifugation a été repris dans un 1/10 du volume de la culture dans un tampon TGE (Tris HCl 25mM, pH 8,3 ; Glucose 50mM ; EDTA 10mM). Les bactéries ont été lysées dans 1/5 du volume par une solution contenant du SDS à 1 % (p/v) en présence de NaOH (0,2 M), pendant 5 à 8 min maximum, à +4°C. Cette solution a été neutralisée par addition de 1/6 du volume d'acétate de potassium 3M pH 5,0, et placée 5 min dans la glace. Les acides nucléiques ont été extraits par une solution de PCIH (phénol/chloroforme/alcool isoamylique/hydroxyquinoléine : 48/48/4/0,1 v/v/v/p). Après récupération de la phase aqueuse, les acides nucléiques ont été précipités par 2 volumes d'éthanol (95%) froid (au moins 2h à -80°C), puis récupérés par centrifugation à 14000 g à +4°C. Le culot a été lavé par un volume d'éthanol à 70% froid à même température, puis séché et repris dans de l'eau ultrapure (ou eau MilliQ) stérile.

E. Amplification par Polymerase Chain Reaction (PCR)

Après extraction, l'ADN total de toutes les entérobactéries résistantes a été criblé pour détecter les gènes des β-lactamases les plus couramment rencontrés dans ces bactéries. Plusieurs amplifications par « PCR multiplexage » ont été réalisées. Une amplification qui permet de rechercher les gènes des enzymes TEM, SHV et OXA-1 like a été effectuée, ainsi qu'une autre PCR multiplex pour la détection des gènes de CTX-M des 5 groupes: groupe 1, groupe 2, groupe 8, groupe 9 et groupe 25⁸⁵. Les gènes de principales céphalosporinases plasmidiques (ACC, FOX, MOX et DHA) et de carbapénémases (OXA-48, KPC, GES, VIM, IMP, NDM) ont également été recherchés selon des protocoles déjà décrits ^{86,87}. Certains gènes *bla*_{CTX-M} et *bla*_{NDM} ont été réamplifiés en utilisant des amorces plus externes qui permettent d'amplifier le gène en entier.

Les amplifications par PCR ont été effectuées à l'aide du protocole utilisant la GoTaq® DNA polymérase et son tampon ou la polymérase Fusion, selon les recommandations du fournisseur (Promega). Les cycles d'amplification ont été réalisés dans le thermocycler, MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad), soit selon les protocoles bien établis déjà décrits ⁸⁸, soit selon les conditions décrites dans le Tableau 4.

Tableau 4. Conditions des cycles d'amplification par PCR

Etape	Température	Durée	
Dénaturation initiale	94°	10 min	
Dénaturation	94°	1 min	30 à 35 cycles
Hybridation des amorces	X ^{oa}	1 min	
Elongation	72°	1 min / kb ^b	
Terminaison de la synthèse des brins	72°	10 min	

X^{oa}, température d'hybridation des amorces selon la température de fusion des amorces(Tm)
^b, Temps d'élongation selon la taille du fragment à amplifier.

F. Mise en évidence de l'ADN après électrophorèse en gel d'agarose

Des migrations de l'ADN après électrophorèse en gel d'agarose (% variant de 0,8% à 1,5%) ont été réalisées pour contrôler la qualité et la taille de l'ADN extrait (extraction plasmidique) ou de l'ADN amplifié. L'électrophorèse a été réalisée dans du tampon TBE 1X (Tris-HCl 90 mM ; acide borique 90 mM ; EDTA 2,5 mM ; pH 8,0), sous une tension d'environ 3 V/cm. L'ADN coloré à l'aide du SYBR® Safe DNA Gel Stain (ThermoFisher) a été visualisé en lumière bleue (UVI-Blue Transilluminator, UVITEC), puis photographié à l'aide du logiciel Gel Smart (Clara Vision) par le biais du système d'acquisition d'images Gel Smart (Clara Vision). Les tailles des fragments de restriction sont comparées à celles d'un marqueur de poids moléculaire (1kb DNA ladder, Promega).

G. Purification de l'ADN amplifié pour le séquençage

Deux méthodes ont été utilisées.

La première consiste à découper une bande de gel d'agarose contenant l'ADN d'intérêt. Un kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) a été utilisé selon les recommandations du fournisseur. Il consiste, après avoir fondu l'agarose en présence d'une solution de Guanidine thiocyanate (à 50°C pendant 5 à 10 min), à placer la solution sur une

matrice de silice sur laquelle va se fixer l'ADN. Après plusieurs lavages, l'ADN est récupéré par élution dans de l'eau ultra pure.

La deuxième technique utilisée pour purifier les produits PCR et les débarrasser des amorces en excès, a été réalisée des colonnes de gel filtration (Illustra Microspin™ S-400 HR columns, GE Healthcare).

H. Réactions de séquençage

Le séquençage a été effectué par la Société Eurofins (Ebersberg, Allemagne) et l'analyse informatique des données a été effectuée sur le site informatique Blast (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

VIII. Typage moléculaire des souches d'entérobactéries

A. Analyse des pulsotypes après digestion par une enzyme de restriction et électrophorèse en champs pulsé

La technique d'électrophorèse en champs pulsé (PFGE, pour « Pulsed Field Gel Electrophoresis ») est une technique d'électrophorèse en gel d'agarose 1% qui permet de séparer les fragments d'ADN de grandes tailles (entre 50 à 500 kpb). Elle permet de déterminer la clonalité des souches de même espèce, en comparant leurs pulsotypes. Elle est réalisée après une lyse "douce" des bactéries pour ne pas casser l'ADN, et après digestion par une enzyme de restriction qui génère de fragments de grandes tailles (faible nombre de sites de coupure). En bref, une suspension bactérienne est insérée dans un petit bloc ("plugs") d'agarose à 2%. Après lavage (tampon de suspension : 50 mM Tris pH 7,2 ; 10 mM EDTA; 20 mM NaCl) et lyse (tampon de lyse : Tris 10 mM pH 7,2, 50 mM NaCl; 0.2 % Na-laurylsarcosine deoxycholate, 0.5 %, Na-laurylsarcosine et 50 µg/mL lysosyme) en présence de protéinase K (0.2 % Na-laurylsarcosine deoxycholate, 100 mM EDTA pH 8, 1 % Na-laurylsarcosine, 20 µg/mL protéinase K) pendant 16h à 50°C, les blocs ont été de nouveau lavés (20 mM Tris pH 8, 50 mM EDTA,) pour éliminer la protéinase K puis mélangés pendant 16h à 37°C à une enzyme de restriction (*XbaI* pour les souches d'*E. coli* et de *K. pneumoniae*, et *SpeI* pour les souches du complexe *E. cloacae*). L'ADN a été séparé après électrophorèse en champ pulsé réalisée en tampon TBE 1X at 6 V/cm avec un temps de pulse entre 2 à 40 sec, et en utilisant l'appareil CHEF™DRIII (Bio-Rad, CHF, pour « Contour-

clamped Homogeneous Electric Field »). Après une migration de 20 h (à 14°C), l'ADN contenu dans le gel a été coloré à l'aide d'une solution de bromure d'éthidium (2 mg/ml) pendant 30 min et visualisé sous UV (GelDoc, Bio-Rad).

B. Détermination des phylogroupes génétiques d'*E. coli*

Les isolats d'*E. coli* ont été classés dans des groupes phylogénétiques différents : A, B1, B2 ou D selon la procédure développée par Clermont *et al.*⁸⁹. Cette détermination consiste à rechercher par amplification par PCR des gènes impliqués dans la virulence : *chuA* (gène nécessaire pour le transport), *yjaA* (gène codant pour une fonction inconnue) et *tspE4.C2* (gène qui code pour une estérase lipase).

C. Multi Locus Sequence Typing (MLST)

La MLST est une technique d'épidémiologie moléculaire basée sur la détermination du Séquence Type (ST), qui a été utilisée dans cette étude pour typer des souches d'*E. coli*, *K. pneumoniae* et du complexe *E. cloacae*. Les gènes de ménage utilisés et l'analyse des combinaisons alléliques afin de déterminer le type de ST sont définis sur des bases de données qui sont, respectivement, pour :

E. coli : http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/allele_st_search, avec les gènes analysés suivants : *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*.

K. pneumoniae : <http://www.pasteur.fr/mlst/>, pour les gènes *rpoB*, *gapA*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *infB*, *tonB* (méthode décrite par Diancourt *et al.*,⁹⁰)

E. cloacae complexe : <http://pubmlst.org/ecloacae/>, pour les gènes *dnaA*, *fusA*, *gyrB*, *leuS*, *pyrG*, *rplB* et *rpoB* (Miyoshi-Akiyama *et al.*,⁹¹).

D. Détermination des clades et sous-clades chez *E. coli* ST 131

Les clades et sous-clades B, C, C1, C1-M27 et C2 chez *E. coli* ST 131 ont été déterminées par PCR avec des amorces spécifiques décrites par Matsumura *et al.*⁶⁶. Puis les amplicons obtenus ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5%, et classés dans les différentes clades et sous-clades par comparaison avec les résultats décrits dans la figure 17.

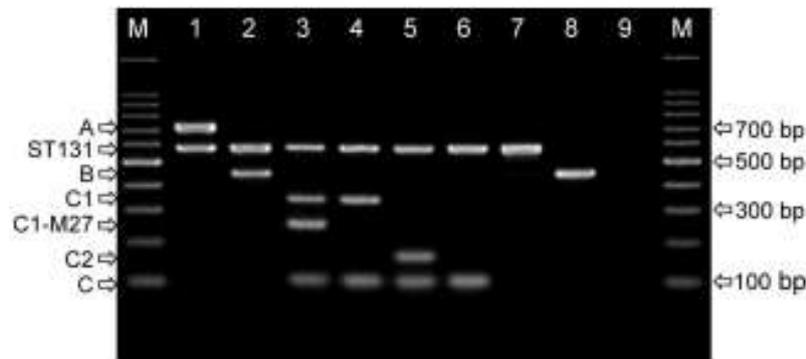


Figure 20. Electrophorèse sur gel d'agarose des amplicons PCR du clade ST131⁶⁶

IX. Analyse des plasmides

A. Conjugaison

La transférabilité des gènes codant pour les β -lactamases (BLSE, carbapénémase) a été étudiée par des expériences de conjugaison sur filtre. Deux souches réceptrices ont été utilisées, soit *E. coli* K12 résistante à la rifampicine et à l'acide nalidixique (Rif^R-Nal^R), soit *E. coli* C600 résistante à l'azide de sodium. Après une culture en phase exponentielle (DO₆₀₀ nm, 0,5) en milieu liquide MH de la souche donatrice (*E. coli*, *K. pneumoniae* ou *E. cloacae* complexe) et de la souche d'*E. coli* réceptrice, un mélange (0,5 ml de la souche donatrice et 1 ml de la souche réceptrice) a été centrifugé. Le culot, repris dans un volume de 50 μ l de milieu MH, a été déposé sur un filtre de conjugaison (filtre Millipore, 0,22 μ m) placé sur une gélose MH. Après incubation (24h à 37°C), le filtre a été déchargé de ses bactéries dans 1 ml de milieu MH. Après une dilution de 10 fois, un ensemencement a été réalisé sur milieu MH sélectif, contenant de l'ampicilline (100 mg/l), de la céfotaxime (4 mg/l) et soit de l'acide nalidixique (50 mg/l) pour la sélection des transconjugants d'*E. coli* K12, soit de l'azide de sodium (300 mg/l) pour les transconjugants d'*E. coli* C600. La fréquence de conjugaison est donnée par le nombre de transconjugants par rapport au nombre de bactéries donatrices.

B. Analyse du contenu plasmidique et de la taille des plasmides après PFGE et digestion à la nucléase S1

Le protocole utilisé est le même que celui décrit précédemment (Paragraphe IX-A) à la différence que l'endonucléase de restriction est remplacée par la nucléase S1 (enzyme qui digère l'ADN simple brin). La nucléase S1 (1U/plug) est incubée pendant 45 min pendant

37°C. La nucléase S1 permet de linéariser les plasmides et ainsi d'évaluer leur taille après PFGE, en comparaison à un marqueur de taille.

C. Analyse des plasmides

Les principaux groupes d'incompatibilité (Inc) plasmidiques retrouvés chez les entérobactéries et contenant des gènes de résistance aux antibiotiques sont : FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-I- γ , L / M, N, P, W, T, A / C, K, B / O, X, Y, F et FIIA. Une méthode de typage du réplicon (PBRT), basée sur des amplifications par PCR permettant d'identifier ces groupes Inc, a été utilisée selon un protocole établi⁸⁸.

Les plasmides d'incompatibilité du groupe IncF ont été davantage caractérisés à l'aide du schéma de typage de ce réplicon décrit sur un site dédié: <https://pubmlst.org/plasmid/primers/incF.shtml>. Le séquençage a été réalisé par la méthode dérivée de Sanger par la société Eurofins Genomics. Les séquences nucléotidiques ont été comparées avec les séquences des gènes disponibles dans la base de données du site NCBI (National Center for Biotechnology Information) grâce au programme d'alignement BLAST.

D. Séquençage de plasmide conjugatif par une technique de séquençage next génération (NGS)

Après extraction du contenu plasmidique, l'ADN a été quantifié en fluorimétrie (PicogreenTM) et le ratio : 260/280 nm obtenu en utilisant le Nanodrop, était compris entre 1,8 et 2,0.

Le séquençage a été réalisé par la Plateforme génomique de l'Université de Bordeaux. À partir de l'échantillon, une fragmentation de l'ADN total a été réalisée par sonication, puis une librairie a été réalisée en utilisant le kit Illumina Truseq Nano, avec 100 ng de matériel, et le séquençage sur la plateforme IlluminaTM MiSeq.

Un total de de 259 000 reads paired-end (2x250pb) a été obtenu, et ils ont été assemblés avec différents logiciels bioinformatiques tel que VistaTools for Comparative Genomics, PlasmidSPAdes <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27466620>), logiciel Unicycler (<https://github.com/rrwick/Unicycler>), permettant d'effectuer des étapes de "bridging".

Puis, pour l'assemblage final des contigs, des amplifications des PCR en utilisant plusieurs couples d'amorces ont été utilisés (Tableau 5).

Tableau 5. Amorces des jonctions de plasmide IncHI2

amorces	Séquences (5' →3')
J0_C1_Deb_R	GGTACTGAATGTCAGTATC
J1_C1_Fin_F	AGATTCAGCTGAAGCCTG
J1_C2_deb_R	CCATAAGCATAAAATCTAAAGC
J2_C2_FinF	ACAGCGTATCCGCAAATTG
J2_C11_deb_R	CATTC CCTACCTCATTAAATC
J3_C11_Fin_F	CCTGAACTGCATGCTATAG
J3_C9_Deb_R	GCGGTCTATTTGCACAAC
J5_C7_EreAfinF	CAGCCTGGTTGCCCTATAG
J5_C6_Sapc_FinRev	GCTGTCGATCCCTTCACTG
J6_C3_debR	AGGATTATGTAAGATCAGCG
J7_C3_finF	GCAAAATTACTGCATCGCA
J7_C14_debR	CATAGCGCGGACATCTG
J8_C14_FinF	TGCATTGTTTCGGCGTTAAC
J8_C5_debR	GGTTAACTTCATCCAATGTG
C3_debR	CTACTGCATTGCGATGCAG
C7_22_F1	AGATATATCATGAAAGGCTGGC
J_C7_22_R1	CGAGCCCAGCATGTCTGC
J_C3_F1	CAGGGAGGAAGAAACCGC
C3_Fin_F1	GTCGGAATAGAATTTAGGCTC
C14_deb_R1	GGACATCTGAATTGAGCCAC
C14_Fin_F1	TTGTTTTCAGTCGGAGGAAAG
C5_deb_R1	CGGACATTACAACCTTGCTA
C5_Fin_F1	TGTCAGAAAATCGCGGTC
C13_deb_R1	ATTGCCTTATTCGCTGCAAA
C13_Fin_F1	CCGGTCGCTTTTTGGTATTG
C12_deb_R1	TTTTCTGAGCCATCTGTGGC
C12_Fin_F1	AAATCACCAGATTCTCCGCC
C17_deb_R1	GCCATACCTGCAAGCACTTT
C17_Fin_F1	ATGACACCATAGCCGCCCTG
C15_deb_R1	CTGTTTGCGGCGGTTGCGTT
C6_Fin_F1	TTCGGCCTCACGGCTGCAAT
C10_deb_R1	CTGGTGATTGTGCGCGCCGGA
C10_Fin_F1	AGTGATGATGGTGAGCAGGC
C18_deb_R1	TCACCAGATCCAGCAACGCT
J_F1	GCAGACATGCTGGGCTCG
J_F2	GGCACTGTTGCAAATAGTCG
J_R1	AAGTTAGCGATGAGGCAGCC
J_R2	TTGGCGGCGTTGAACAGCTT
J_F3	AAGCTGTTCAACGCCGCCAA
J_F4	TCAACATCAAGCACGTCCGC
J_R3	AACACGACGGCAGCCGTTAC
J_R4	TCCGGCGTCTGAATGGGATT
J_F5	AATCCCATTAGACGCCGGA
J_F6	CTCTATATTCGCGGTTCCAGC
J_R5	TTTCAGCGTTGCTGGCTCCC
J_R6	CCACGCACCTGGTCAAGAAA
J_F7	TTTCTTGACCAGGTGCGTGG
J_F8	GGCAAAGGTAGGCGGCTGAT
J_R7	CATGACCGGACACTTTGCGT
J_R8	GGCACTGTTGCAAATAGTCGG
C18_FINF	CAGCTGATGTGTGATAACATACTG
C0_F1	CCGGATACGGTGGCTTAAATAC
C0_R1	GTATTTAAGCCACCGTATCCGG
C0_intF1	GAGGTGCAGCTTACGGCACT
C0_intR2	CGTTTTCAGAAGGCACTGTTGC
C10-intF1	CGGTTATTGATGCGGCACTG

Résultats

La première partie de cette thèse avait pour but de montrer la présence d'entérobactéries multirésistantes aux antibiotiques dans le milieu communautaire en Tunisie, où elle est peu documentée.

X. Première étude épidémiologique (Septembre 2016, Djerba)

A. Identification biochimique et moléculaire de 2 souches du complexe

E. cloacae

En Septembre 2016, parmi une collection de 30 souches d'entérobactéries isolées d'urines consécutives de patients provenant d'un laboratoire privé d'analyses médicales à Djerba, 2 souches (Eh22 et Eh23) ont été identifiées comme résistantes aux C3G. Aucune résistance aux carbapénèmes n'a été détectée dans cette étude. Eh22 et Eh23 isolés chez des patients (respectivement chez un enfant de 5 mois, le 01/09 et chez une femme de 32 ans, le 20/09) avaient d'abord été identifiées comme *K. pneumoniae* par les techniques biochimiques (galerie API 10S). Par la technique MALDI-TOF, elles appartenaient au complexe *Enterobacter cloacae*. Cette dernière identification a été confirmée par l'analyse de la séquence de l'ADNr 16S. *E. cloacae* complex (ECC, pour *Enterobacter cloacae* Complex) est un groupe hétérogène qui est composé de 13 clusters (C-I to C-XIII). Le séquençage du gène *hsp60* (heat-shock protein-60) permet de classer les ECC dans l'un de ces complexes¹³. Cette analyse a montré que Eh22 et Eh23 appartenaient au cluster C-VIII, *Enterobacter hormaechei* subspecies *steigerwaltii*. Dans la littérature, il a été décrit que les souches de cluster C-VIII, ainsi que 2 autres clusters (C-III et C-VI), sont les souches les plus prévalentes dans les échantillons d'origine clinique⁹².

B. Etude de la clonalité des isolats Eh22 et Eh23 par analyse de leur pulsotype et de leur séquence type

L'analyse après PFGE en utilisant l'enzyme *SpeI* a montré que les pulsotypes des 2 isolats de cluster C-VIII étaient identiques (figure 21). Eh22 et Eh23 sont donc des souches clonales.



Figure 21. Analyse des pulsotypes (enzyme Spe1) des souches Eh22 et Eh23

L'analyse par MLST (Multilocus Sequence Typing) a révélé que Eh22 et Eh23 possédaient la même séquence type, ST177, un simple variant de ST93.

a) Sensibilité aux antibiotiques

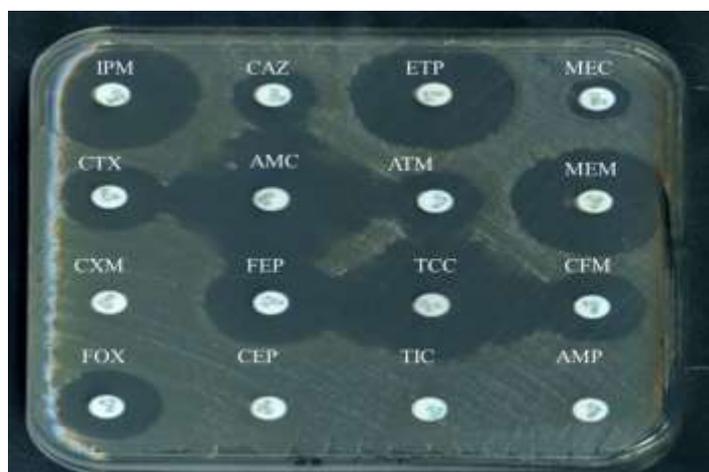
Ces 2 souches présentaient des antibiogrammes identiques. L'antibiogramme par la méthode de diffusion en gélose utilisant 32 disques d'antibiotiques de l'une des 2 souches (Eh22) est présenté sur la figure 22.



AMP : ampicilline, AMC : amoxicilline-acide clavulanique, TIC : ticarcilline, TIC : ticarcilline- acide clavulanique, PIP : pipéracilline, PPT : pipéracilline-tazobactam, MEC : méccilliname, TGC : tigecycline, FOX : céfoxitine, CFM : céfixime, CXM : céfuroxime, CTX : céftriaxone, CAZ : ceftazidime, CEF : céfépime, ATM : aztréoname, IMP : imipénème, ETP : ertapénème, GMI : gentamicine, TMN : tobramycine, AKN : amikacine, NAL : acide nalixidique, CIP : ciprofloxacine, OFX : ofloxacine, CST : colistine, SXT : co-trimoxazole, TET : triméthoprim, FSF : fosfomicine, FTN : nitrofurantoïne

Figure 22. Antibiogramme de la souche Eh22 (méthode de diffusion sur milieu MH)

Selon les recommandations du CA-SFM/EUCAST, ces souches étaient résistantes à toutes β -lactamines testées, excepté aux carbapénèmes (imipénème et ertapénème). Elles restent également sensibles à l'association pipéracilline-tazobactam. Eh22 et Eh23 étaient catégorisées comme sensibles à la fosfomycine, aux quinolones et fluoroquinolones et à l'amikacine. Les souches ont été catégorisées intermédiaires à la nétilmicine. Ces isolats étaient sensibles à la colistine après détermination de la CMI en milieu liquide (CMI, 0,125 mg/l). L'antibiogramme montrait une image de synergie entre des céphalosporines à large spectre (ceftotaxime ou céfépime) ou l'aztréonam avec des disques contenant de l'acide clavulanique suggérant la présence d'une (/de) BLSE(s) dans ces isolats (figure 22). Un antibiogramme réalisé en présence de cloxacilline (inhibition de céphalosporinase), permet de confirmer la présence de cette image de synergie (figure 23).



AMP : ampicilline, AMC : amoxicilline-acide clavulanique, TIC : ticarcilline, TCC : ticarcilline- acide clavulanique, CEP : céfopérazone, MEC : mécilliname, FOX : céfoxitine, CFM : céfixime, CXM : céfuroxime, CTX : céftriaxone, CAZ : céftazidime, CEP : céfépime, ATM : aztréonam, IMP : imipénème, ETP : ertapénème, FEP : céfépime

Figure 23. Antibiogramme de la souche Eh22 réalisé sur une gélose MH contenant 250 mg/l de cloxacilline

b) Analyse de la présence de gènes de β -lactamase

Après analyse par PCR et séquençage, 4 gènes codant pour des β -lactamases ont été détectés : la BLS, TEM-1, 2 BLSE, CTX-M-3 et SHV-12, et une céphalosporinase DHA-1.

c) Analyse du support des gènes de résistance des isolats Eh22 et Eh23

(1) Expériences de conjugaison

La fréquence de conjugaison avec les souches donatrices (Eh22 et Eh23) et en utilisant la souche réceptrice d'*E. coli* K12 (Rif^RNal^R) était de 1×10^{-8} après sélection des transconjugants sur milieu contenant de l'ampicilline (100 mg/l). Les antibiogrammes des transconjugants Tc22 (isolat Eh22) et Tc23 (isolat Eh23) étaient identiques et montraient la

présence d'une image de synergie (résultats non montrés). L'analyse par PCR de l'ADN de ces 2 transconjugants, a révélé la présence de gènes des β -lactamases (gènes *bla*) : TEM-1, des 2 BLSE, CTX-M-3 et SHV-2 et de la céphalosporinase DHA-1. Les résistances au chloramphénicol, tétracycline, sulfaméthoxazole/triméthoprim, et aux aminosides (GTN, gentamicine, tobramycine et nétilmicine) ont également co-transférés avec les gènes *bla*, dans ces transconjugants. Cette analyse démontre le caractère conjugatif de la plupart des résistances aux antibiotiques retrouvées les souches Eh22 et Eh23 (excepté la résistance à la nitrofurantoïne).

(2) Recherche de principaux plasmides retrouvés chez les entérobactéries

La présence de plasmides a donc été recherchée. En utilisant la méthode PBRT⁸⁸, un plasmide de groupe d'incompatibilité, IncHI (IncHI2, après analyse du plasmide séquencé, voir paragraphe suivant) a été détecté dans les isolats Eh22 et Eh23 ainsi que dans leurs transconjugants.

La linéarisation des plasmides de haut poids moléculaire, par la S1 nucléase et leur séparation par PFGE a permis de montrer la présence chez Eh22 de 3 plasmides : d'environ 300 kpb, et de ~ 100 kpb et de ~ 90 kpb (Figure 23). Un résultat identique a été retrouvé chez Eh23 (résultat non montré). L'analyse PFGE-S1 nucléase montre que Tc22 et Tc23 (transconjugants d'*E. coli* K12) possèdent 2 plasmides : 300 kpb et 100 kpb. Afin d'essayer de séparer ces 2 plasmides, une seconde conjugaison a été réalisée en utilisant le transconjugant Tc22 (*E. coli* K12), comme souche donatrice et d'*E. coli* C600, résistante à l'azide de sodium comme souche réceptrice. Une fréquence de conjugaison plus élevée ($\sim 10^{-4}$) que précédemment a été obtenue. L'analyse par PFGE-S1 nucléase a révélé que les 2 plasmides (300 et 100 kbp) étaient toujours présents dans ce tranconjugant Tc22 (C600) (Figure 24).

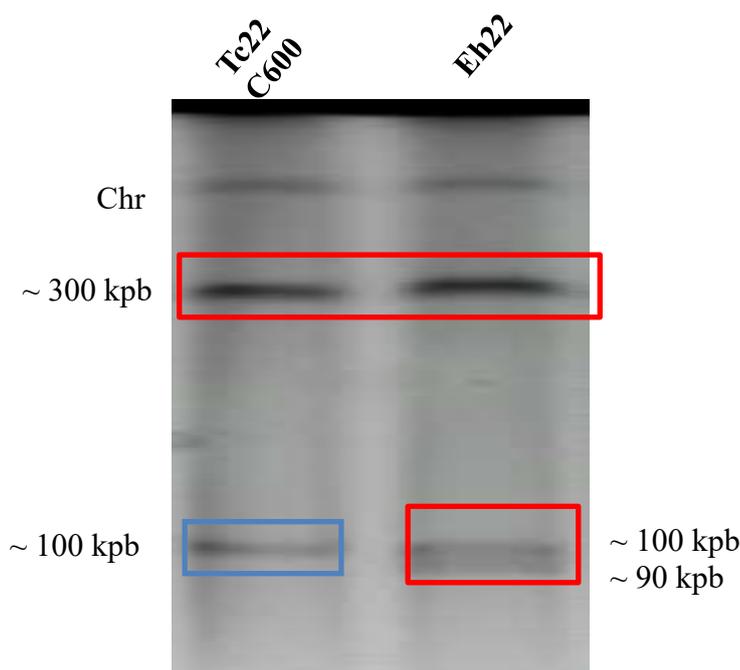


Figure 24. PFGE-S1 nucléase de Eh22 et du Tc 22(C600)

Il semble donc difficile de séparer ces 2 plasmides par conjugaison. Après recherche dans la littérature et après analyse dans les banques de données, nous n'avons trouvé aucun plasmide de type IncHI portant les 4 gènes de β -lactamases identifiés précédemment par PCR. Il était donc intéressant de vérifier si ces résistances pouvaient être portées par un même plasmide et ensuite de séquencer entièrement ce plasmide.

d) Amplifications par PCR réalisées à partir d'agarose découpé sur le gel de PFGE-S1 nucléase

A partir de la piste Tc22 (C600) du gel obtenu après PFGE-S1 et visualisé sous UV après coloration au bromure d'éthidium, de l'agarose contenant soit la bande à 300 kpb (bande 1), ou soit la bande de 100 kpb (bande 2 cadre bleu, figure 24), a été découpé et les ADN ont été extraits (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit, Macherey-Nagel). Après amplifications, les résultats ont montré la présence sur le plasmide de 300 kpb (bande 1), des 4 gènes de résistances : *bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{SHV-12} et *bla*_{DHA-1} (Figure 25) et du gène du réplicon IncHI2. Aucune amplification n'a été obtenue avec la bande 2 (résultats non montrés). Ce résultat suggère que les gènes des β -lactamases précédemment mis en évidence sont localisés sur le plasmide de 300 kpb (pTc-300).

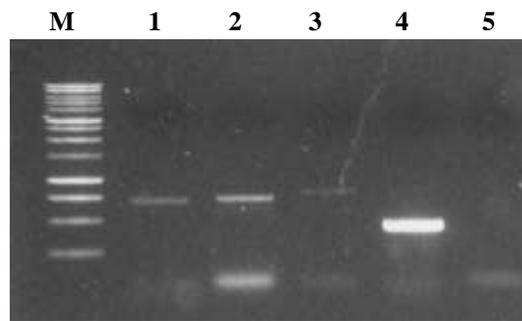


Figure 25. Résultats de l'électrophorèse sur gel d'agarose des amplicons obtenus après amplification des gènes des β -lactamases

blaCTX-3 (piste 1), blaSHV-12 (piste 2) blaTEM-1 (piste 3) et blaDHA-1 Piste M, marqueur de taille. Piste 5, contrôle négatif (bande d'agarose découpée sur la piste Tc22, cadre bleu sur la figure 23, seul le résultat négatif obtenu avec les amorces spécifiques du gène blaDHA-1 est montré).

e) Séquençage par la technique Illumina et analyse du plasmide pTc300 (IncHI2)

Le plasmide pTc300 a été séquençé par la méthode de Séquençage Nouvelle Génération (NGS, next generation sequencing) utilisant la méthode Illumina (Plate-forme génomique de l'université de Bordeaux). L'assemblage a été réalisé à l'aide des logiciels : PlasmidSPAdes et Unicycler.

Le séquençage de plasmide pTc22, a permis obtenir au final 30 contigs (C1 à C30), dont 5 ont été éliminés (C4, C8, C16, C19 et C21, car ils provenaient de contamination d'ADN génomique : soit d'*E. coli* C600, soit d'une contamination par l'ADN de Staphylocoque de la flore cutanée). Parmi les 25 contigs restants, 18 ont été pris en compte car de taille allant 97,243 kb (contig C1) à 645 pb (contig C25). Les 7 autres petits contigs (taille < 645 pb) se recoupaient avec d'autres contigs. En effet, un certain nombre d'entre eux (~ 800 pb à 1,5 kb), contenaient des séquences d'insertion, comme par exemple le contig C24 qui code pour la transposase TnpA de l'IS26 (profondeur, depth=7.36x, comparée aux autres contigs). Cette IS est présente en plusieurs exemplaires sur pTc300.

Ainsi, l'analyse du plasmide pTc300 a confirmé qu'il était de type IncHI2 et appartenait à séquence type ST1 (selon les séquences des loci *smr0018* et *smr0019*⁹³). Il présentait des similitudes avec un plasmide de 444 kpb (p-444) identifié chez une souche de *Salmonella* spp. (Genbank N° CP028197).

Outre les 4 gènes de β -lactamases précédemment identifiés, le plasmide pTc300 portait aussi un gène *qnrB4*, qui confère une résistance à bas niveau aux quinolones. Ce gène est

probablement exprimé à bas niveau chez Eh22 et Eh23 car les souches étaient catégorisées sensibles aux quinolones. D'autres gènes de résistances ont été identifiés : gènes *catIII* (A-2 chloramphenicol O-acetyltransferase, résistance au chloramphénicol), *dfraI9* (dihydrofolate réductase, résistance au triméthoprim), *sulI* (dihydroptéroate synthase, résistance aux sulfamides), aux tétracyclines (gène d'efflux, *tetD*), gènes de résistance aux aminosides [acétyl ou phosphotransférases : *aac(6')IIc*, *aac(3)II*, *aph(3'')Ib*] ...

Il est aussi à noter qu'un gène *etpA* a été retrouvé sur le plasmide pTc300 (pTc22/*E. coli* C600) et sur le plasmide p444. Récemment, nous avons pu préciser que ce gène *etpA* était identique au gène *mcr-9* qui code pour une éthanolamine transférase qui transfère un groupement cationique (phosphoéthanolamine) sur le lipide A du lipopolysaccharide (LPS) et confère la résistance à la colistine (voir Partie 2). Là aussi, comme pour *qnrB4*, le gène *mcr-9* présente probablement un promoteur faible et ce gène ne doit probablement pas ou peu s'exprimer chez les souches Eh22 et Eh23 car elles sont sensibles à la colistine (CMI, 0,125 mg/l).

En s'aidant de la séquence du plasmide p-444, tous les contigs ont pu être reliés, après vérification par PCR et séquençage, sauf à un seul endroit (contig C6). Le plasmide p-444 possède 144 kpb supplémentaires qui ne sont pas présents sur pTc300 et ne contiennent ni le gène *bla_{CTX-M-3}*, ni le gène *bla_{DHA-1}*, mais un gène *qnrB2* dans un environnement différent du gène *qnrB4*.

Ainsi à ce jour, un fragment constitué du contig C6 (13 752 pb) avec en aval les contigs C22 (Δ QacSul1, 1105 pb) et C25 (*orf5*, 645 pb) et en amont le contig C15 (*ISCR1*, 2162 pb) n'a pas pu être formellement situé au niveau du reste du plasmide, même en utilisant des amplifications avec des polymérases (PhusionTM) dites "long range", qui sont capables d'amplifier de grands fragments. Le contig C6 contient les gènes *qnrB4* et *bla_{DHA-1}* probablement sur un intégron complexe de classe 1 et présente une identité de séquence de 83% avec un plasmide de *Cronobacter sakazakii* souche GZcsf-1 plasmid pGW1 (N° GenBank, CP028197) : séquence insertion ***ISCR1***, *sapC*, *sapBA*, *ydeJ*, ***qnrB4***, ***pspABCD***, ***ycjW***, ***bla_{DHA-1}***, ***ampR*** (*lysR regulator*), ***ΔqacEsul1***, *orf5*, TnpA IS110-like *merRTPCADE*, TniA, IS3. Les gènes soulignés en gras sont retrouvés dans une même configuration sur le fragment de 17 664 kpb sur pTc300.

Si on place "arbitrairement" ce fragment de 17 664 kpb entre le contig C7 (intégron de classe 1 contenant les gènes : *intI1*, *aac(6')IIc*, *ΔereA*, *aac(3)II*, *arr* (résistance à la rifampicine), *orf* de fonction inconnue, *ereA*, *ΔqacSul1*) et le contig C3 (58,471 kpb), on obtient un plasmide

ayant une taille de 296 550 pb, compatible avec la taille d'environ 300 kbp estimé après PFGE-nucléase S1.

Une analyse préliminaire utilisant le logiciel : VistaTools for Comparative Genomics montre la comparaison entre le plasmide p-444 et le plasmide pTc300 (ou pTc2, sur la figure 26).

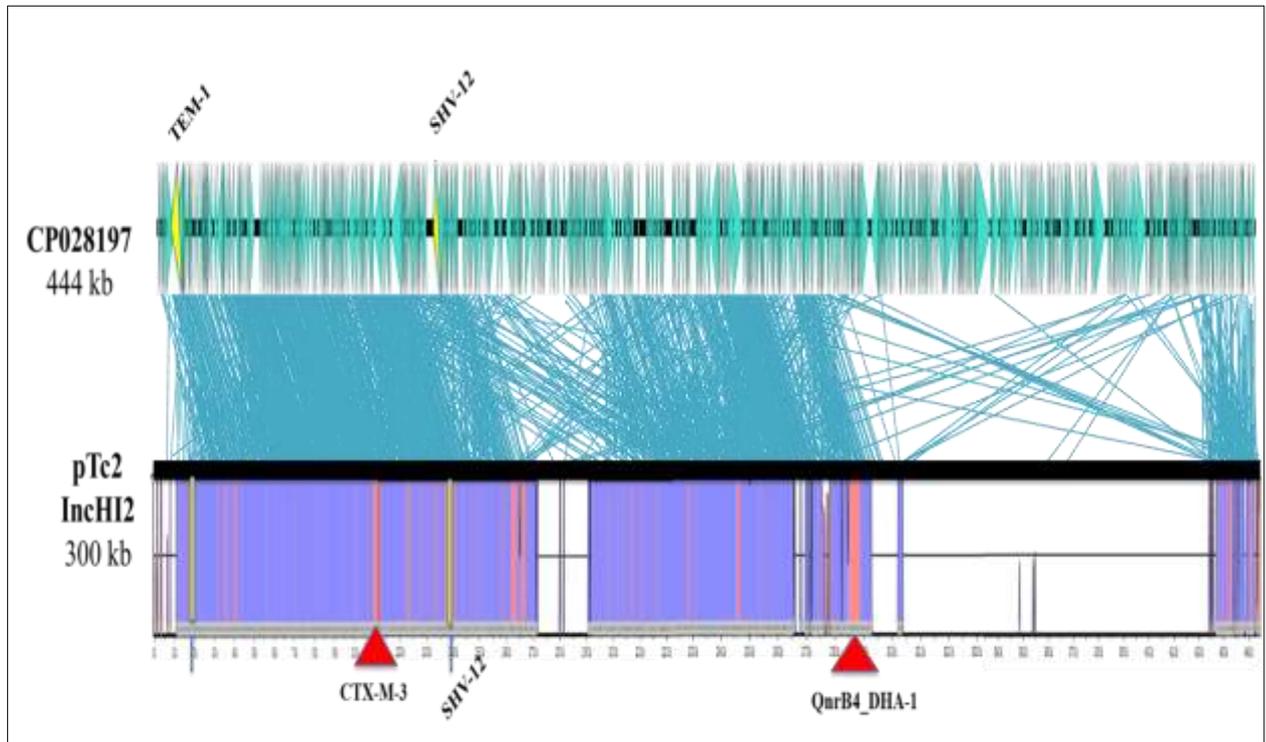


Figure 26. Analyse du plasmide pTc300 comparé à un plasmide de 444 kpb, p-444 (CP028197) isolé de *Salmonella* spp (VistaTools for Comparative Genomics).

Discussion

La dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif, est un problème majeur de santé publique. Cette propagation est due en grande partie à l'acquisition de gènes par transferts horizontaux, et plus particulièrement par acquisition de plasmides conjugatifs chez les entérobactéries⁷⁷.

En Tunisie, la présence d'entérobactéries multirésistantes productrices de BLSE a été bien documentée à l'hôpital, mais moins de données sont disponibles dans le milieu communautaire. Au cours de ce travail, une prévalence de 6,7% a été retrouvée en 2016 (2 souches sur 30 collectées) à Djerba. Les 2 souches retrouvées étaient reliées, et appartenaient au complexe C-VIII des *Enterobacter cloacae* Complexe (ECC). Nous n'avons pas pu analyser rétrospectivement le dossier de ces 2 patients. Il est possible qu'ils aient été hospitalisés dans les mois qui précèdent leur prélèvement. Les souches d'*Enterobacter* spp. sont souvent décrites lors d'épidémies d'infections nosocomiales. Cependant, récemment, les souches d'ECC ont émergé comme des pathogènes majeurs impliqués dans des infections acquises dans la communauté, causant de fréquentes pneumonies, infections urinaires ou bactériémies⁹⁴. Il a été suggéré que les isolats d'ECC retrouvés lors d'infections nosocomiales pouvaient représenter un échantillonnage de la diversité des ECC commensaux retrouvés dans la communauté⁹⁴. Des études montrent aussi leur présence chez des animaux de compagnies dans divers pays de monde (Australie⁹⁵, France⁹⁶, et en Allemagne⁹⁷).

Dans ce travail, la souche d'*E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* identifiées chez les 2 patients, appartenait à la séquence type, ST177 (simple variant des ST93, ST294 and ST828, eBURST v3 analysis). Peu de souches ST177 ont été décrites dans la littérature. Elles ont été essentiellement identifiées sur le continent asiatique, Chine et Corée de Sud⁹⁸, et elles étaient associées avec des carbapénémases de type KPC-2 et/ou NDM-1⁹⁸.

Notre étude a eu aussi pour objectif de caractériser le plasmide de type IncHI2 (300 kpb) hébergé dans cette souche d'*E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* et support de la résistance de nombreux gènes, en particulier de 4 gènes de β -lactamases, dont 3 confèrent une hydrolyse aux céphalosporines à large spectre (*bla*_{CTXM-3}, *bla*_{SHV12} et *bla*_{DHA-1}). Un variant *mcr-9*, très récemment décrit dans la littérature, a été trouvé sur le plasmide p300. Les gènes *mcr* codent pour une éthanolamine transférase qui transfère un groupement cationique (phosphoéthanolamine) sur le lipide A du LPS, et confère la résistance à la colistine (voir

Partie 2). Comme ceux décrits dans la littérature chez *E. coli*, ECC et *Salmonella spp.*⁹⁹, le gène *mcr-9* présent sur p300 ne confère pas la résistance à la colistine chez Eh22 et Eh23 et chez les transconjugants d'*E. coli* : il n'est probablement pas exprimé. On retrouve un environnement génétique comparable avec une IS5 en amont du gène *mcr-9* qui est peut-être responsable de la mobilisation de ce gène.

Les plasmides de type IncHI2 sont parmi les plasmides le plus prévalents et décrits comme support de différents gènes de la résistance chez entérobactéries¹⁰⁰. Ce sont en général des plasmides conjugatifs de grande taille (supérieure à 250 kpb), qui mobilisent aussi des gènes de résistance aux métaux lourds, en plus des gènes de résistance aux antibiotiques. Il a été montré que les plasmides IncHI2-ST1 jouent un rôle essentiel dans l'évolution des phénotypes de résistance au sein de souches pathogènes du complexe *Enterobacter cloacae*^{101(p2)}. Plusieurs études ont montré la présence de gènes codant pour les β -lactamases, comme *bla*_{SHV-12} et *bla*_{CTX-M-15}, sur des plasmides IncHI2 sous-type ST1 de taille comprise entre 290 et 340 kb chez *E. cloacae*¹⁰²⁻¹⁰⁴. Mais les plasmides IncHI2-ST1 jouent aussi un rôle important dans la diffusion de gènes codant pour des carbapénémases comme les enzymes de type NDM, IMP, VIM, KPC et OXA-48 et dans l'évolution des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes (CRE)¹⁰⁵.

Les plasmides conjugatifs chez les entérobactéries contiennent de nombreux éléments génétiques mobiles (EGM), comme sur le plasmide pTc300. On retrouve un transposon unitaire de la famille Tn3 associé au gène *bla*_{TEM-1}. Ce transposon a été localisé dans 2 zones différentes du plasmide pTc300. Les membres de la famille Tn3 sont connus pour conférer une immunité de transposition, mais des recombinaisons homologues entre des éléments apparentés peuvent se produire, créant des éléments hybrides²⁰. On retrouve également une séquence *ISEcp1* reliée au gène *bla*_{CTX-M-3}, une IS26 associée au gène *bla*_{SHV-12}. Le gène *bla*_{DHA-1} est souvent retrouvé, comme sur pTc300, sur des intégrons complexes avec en amont la présence d'une *ISCR1* (ou orf513). Le gène *bla*_{DHA-1} a été décrit sur des plasmides de type IncHI2, et sur d'autres plasmides associé avec un gène *qnrB*, en particulier *qnrB4*, suggérant un possible ancêtre commun et une évolution conjointe de ces 2 gènes¹⁰⁶.

La présence de très nombreux EGM, tels que l'IS26 et de nombreux remaniements génétiques, a conduit à complexifier l'agencement des contigs obtenus lors du séquençage Illumina. Malgré de nombreuses PCR pour essayer d'assembler ces contigs, une zone n'a pas pu être reliée au reste du plasmide. Il sera nécessaire, d'effectuer un séquençage par une autre

méthode (séquençage par la technique Nanopore, Minion générant de séquences d'environ 50 kpb) pour obtenir une séquence finalisée et correctement agencée du pTc300.

L'analyse du plasmide pTc22 de 300 kpb a révélé de fortes similitudes avec un plasmide de 444 kpb isolé de *Salmonella spp.* Néanmoins, en plus des gènes *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-12} et le gène *mcr-9*, les gènes *bla*_{CTX-M-3} et *bla*_{DHA-1} étaient aussi présents. A notre connaissance, c'est la première fois qu'un plasmide de type IncHI2 portant ces 4 gènes et contenant un gène *mcr-9* est décrit chez une souche du complexe *E. cloacae*.

Conclusion

A la fin de l'année 2016, 2 isolats d'*E. hormaechei*, entérobactérie fréquemment isolée lors d'infections nosocomiales, ont été collectés chez 2 patients de la communauté en Tunisie (Djerba). Eh22 et Eh23 étaient reliées et appartenaient à la Séquence Type ST177. Peu de souches d'origine clinique d'*E. hormaechei* ST177 ont été décrites dans la littérature, principalement sur le continent asiatique et associées avec des carbapénémases. Il serait intéressant de vérifier si de telles souches ne sont pas trouvées dans d'autres environnements en Tunisie (hôpitaux, milieux vétérinaires...). Le fait de retrouver de telles bactéries multirésistantes dans la communauté incite à instaurer une surveillance et à mettre en place de moyens pour prévenir leur dissémination.

XI. Deuxième étude épidémiologique : Décembre 2017-Janvier 2018, Sfax et Tunis

A. Collecte et identification des souches

Ce travail a été effectué en collaboration avec le Dr. Rahma TRABELSI et le Pr. Radhouane GDOURA (unité LR17ES06, Laboratoire de recherche de Toxicologie, Microbiologie Environnementale et Santé, Université de Sfax).

Un total de 170 entérobactéries isolées lors d'infections urinaires a été collecté de la période de Décembre 2017 à Janvier 2018 (2 mois). Elles se répartissaient en 118 souches provenant de laboratoires hospitaliers (3 hôpitaux, H1 à H3) et 52 souches, de 2 laboratoires de ville (CA et CB). Les souches ont été collectées dans 2 régions géographiques différentes, Sfax et Tunis ; la distance entre les 2 villes étant d'environ 270 km (figure 17). Une polyclinique (H1, 60 lits) est située à Sfax, avec des échantillons prélevés principalement chez des patients d'une unité d'urologie. Les 2 autres hôpitaux sont situés à Tunis (H2, hôpital régional et H3, clinique psychiatrique). Les 2 laboratoires privés (CA et CB) sont localisés à Sfax. Les souches provenant des milieux hospitaliers sont issues d'un échantillonnage aléatoire. Il a été vérifié postérieurement que les isolats inclus dans l'étude provenaient de patients différents (Tableau 6).

Tableau 6. Répartition des 170 entérobactéries identifiées lors d'infections urinaires en fonction de leur site de prélèvements et de la présence de BLSE

Souches	Hôpital			Communauté	
	H1	H2	H3	CA	CB
<i>E. coli</i>	40 (3)	15 (3)	15 (1)	10 (1)	30 (7)
<i>K. pneumoniae</i>	20 (1)	10 (0)	10 (0)	5 (3)	5 (4)
<i>E. cloacae</i> complexe	4 (0)	2 (0)	2 (0)	0 (0)	2 (0)

Les chiffres entre parenthèse montrent le nombre de souches productrices de BLSE.

L'identification des souches, initialement réalisée en utilisant des galeries API 10S, a été reconfirmée par la technique MALDI-TOF. Seule une souche de *K. pneumoniae* (souche

18TA) avait été mal identifiée (API 10S, *E. cloacae complexe*). Cette souche ne produisait pas d'uréase, et son identification, vérifiée après PCR et séquençage du DNA ribosomal 16S, a confirmé l'espèce *K. pneumoniae*.

B. Recherche de la présence de BLSE et/ou carbapénémase

Le premier objectif a été de rechercher la présence de BLSE et/ou carbapénémase dans les 170 souches collectées par la méthode de l'antibiogramme de diffusion en milieu gélosé MH. Un test de synergie (technique des doubles disques) entre un disque de céphalosporine à large spectre et un disque contenant l'acide clavulanique a permis de mettre en évidence 23 entérobactéries productrices de BLSE (15 *E. coli* et 8 *K. pneumoniae*). L'une des souches de *K. pneumoniae* (18TA) était, en plus, résistante aux carbapénèmes avec des diamètres d'inhibition à l'imipénème, ertapénème et méropénème de 19, 16 et 14 mm, respectivement. L'utilisation de disques combinés contenant de l'imipénème avec ou sans EDTA a suggéré la présence d'une métallo-carbapénémase (augmentation du diamètre d'inhibition de plus de ≥ 7 mm en présence d'EDTA) dans cette souche.

C. Répartition des entérobactéries productrices de BLSE

1. En milieu hospitalier

La répartition des entérobactéries productrices de BLSE (E-BLSE) en fonction des hôpitaux est donnée dans le tableau 5. Les E-BLSE ont été recueillies chez des patients présentant un sexe ratio de 1. L'échantillonnage des urines positives ayant été réalisé de façon aléatoire, des taux de prévalence peuvent être calculés. Bien que ces chiffres ne soient qu'une indication car le nombre d'E-BLSE collectées est trop faible pour être suffisamment représentatif, ces données conduisent à des taux de prévalence des BLSE-E de 6,25% pour H1 (polyclinique), 11,1% pour H2 (hôpital régional) et 3,7% pour H3 (clinique psychiatrique). En ce qui concerne le taux de souches d'*E. coli* productrices de BLSE, les données sont les suivantes : 7,5% (H1), 20% (H2) et 6,6% (H3).

2. Au niveau de la communauté

Au cours de la même période de 2 mois, parmi les 52 entérobactéries qui ont été recueillies dans les urines de sujets de la communauté à Sfax, 15 sont des E-BLSE (4, dans le Laboratoire CA et 11, dans le laboratoire CB) (Tableau 6). Toutefois, le taux de prévalence des BLSE ne peut pas être calculé car un biais de sélection des souches avait été introduit, les

échantillons n'ayant pas été choisis de façon totalement aléatoire. Comme les souches productrices de BLSE sont souvent multi-résistantes, les pourcentages de 26,7% (CA) et 29,7% (CB) ne reflètent pas de la réalité des taux de prévalence dans cet environnement (Tableau 6).

D. Analyse des gènes codant pour les BLSE et profils de résistance aux antibiotiques des E-BLSE

Souches d'*E. coli* BLSE +

Toutes les 15 souches d'*E. coli* productrices de BLSE étaient sensibles à la céfoxitine (céphamycine) et carbapénèmes. Elles étaient également sensibles à la fosfomycine. Deux isolats étaient résistants à la nitrofurantoïne (Tableau 7). Tous les *E. coli* étaient résistants au cotrimoxazole (sulfaméthoxazole-triméthoprim) et tous, à l'exception de deux isolats, étaient résistants aux fluoroquinolones. Ils présentaient différents phénotypes d'aminosides (résistance à la gentamicine, à la tobramycine et à l'amikacine, respectivement 26%, 47% et 20%) (Tableau).

Comme indiqué dans le Tableau 7, les 15 *E. coli* producteurs de BLSE ont donné des amplifications positives en PCR avec des amorces spécifiques des gènes *bla*_{CTX-M}. De façon surprenante, près de la moitié des souches (7 sur 15, soit 47%) ont présenté des amplifications positives à la fois pour CTX-M de groupe 1 et CTX-M du groupe 9. Ce sont surtout des *E. coli* venant des laboratoires de ville (4 souches sur 7). Cinq *E. coli* ont un seul gène codant pour une CTX-M du groupe 1 et les trois restants portent des gènes *bla*_{CTX-M} du groupe 9. Six souches possèdent des β -lactamases du type OXA-1 et 4 autres isolats ont présenté des β -lactamase du type TEM-1, y compris un qui portait ces 2 enzymes (Tableau 7).

Tableau 7. Caractéristiques des 15 *E. coli* productrices de BLSE analysées dans cette étude

N° isolat ^(a)	Localisation ^(b)	Contenu en β-lactamase	Résistances co-associées ^(c)	Groupe virulence /ST	Pulsotype	group Inc plasmid et pMLST ^c
35SR	Sfax/CB	CTX-M-15 CTX-M-27 OXA-1-like	GTA FQ SXT TMP	B2/ST131-C2	E-1	F31:A4:B1/W
17J	Sfax/CB	CTX-M-15 CTX-M-27 OXA-1-like	TA FQ SXT TMP	B2/ST131-C2	E-1	F31:A4:B1
17MA	Sfax/CB	CTX-M-27	FQ SXT TMP	B2/ST131-C1-M27	E-1	F1:B20
151	Tunis/H2	CTX-M-27	FQ SXT TMP	B2/ST131-C1-M27	E-1	F1:B20
307	Tunis/H2	CTX-M groupe 1 TEM-like OXA-1-like	GTA FQ SXT TMP	B2	E-3	FII:FIA
67HR	Tunis/H3	CTX-M groupe 1 OXA-1-like	T(A) FQ SXT TMP	B2	E-4	FII/FIB/Y
917	Sfax/CB	CTX-M-15 CTX-M-27 OXA-1-like	GT FQ SXT TMP	A/ST617	E-2	F31:A4:B1/N
46SR	Sfax/CB	CTX-M-15 CTX-M-27 OXA-1-like	GT FQ SXT TMP NI	A/ST617	E-2	F31:A4:B1/N
33.2	Sfax/H1	CTX-M-1 et M-9 groupes TEM-Like	GT FQ SXT TMP NI	A	E-5	FII :FIB/W/X
724	Tunis/H1	CTX-M-1 groupe	FQ SXT TMP	A	E-6	FII : FIB/Y
286	Tunis/H2	CTX-M-1 groupe	FQ SXT TMP	A	E-7	FII/FIB/Y
101.1	Sfax/CA	CTX-M-1 et M-9 groupes	FQ SXT TMP	B1	E-8	FIB
58	Sfax/H1	CTX-M-1 et M-9 groupes TEM-like	SXT TMP	B1	E-9	FIB/W/N/Y
17G	Sfax/CB	CTX-M-1 groupe TEM-like	FQ SXT TMP	B1	E-10	FIB/W/N/Y
18AF	Sfax/CB	CTX-M-9 groupe	SXT TMP	D	E-11	NT ^(d)

^{a)} Numéro d'identification de l'isolat

^(b) H, Hôpital (Hospital ou clinique) ; C, communauté

^(c) GT(A), gentamicine, tobramycine, et amikacine (les parenthèses indiquent un faible niveau de résistance); FQ, fluoroquinolones; SXT, co-trimoxazole; TMP, triméthoprim; NI, nitrofurantoïne

^(d) NT, non typable selon la PBRT procédure (Carattoli 2005)⁸⁸

Souches de *K. pneumoniae* BLSE +

Parmi les 8 *K. pneumoniae* productrices de BLSE, toutes les souches ont été collectées chez des patients de la communauté à Sfax, à l'exception d'une souche (Kp115) qui provenait de l'hôpital, H1. Les résistances associées aux autres familles d'antibiotiques, étaient variées (Tableau 8), parmi lesquelles : la résistance aux fluoroquinolones (6 souches sur 8) ; au co-trimoxazole (4 sur 8), aux aminosides (4 souches résistantes à la gentamicine, dont 2 associées à la résistance à la tobramycine et amikacine), et au nitrofurantoïne (2 souche sur 8). Toutes les souches contenaient un seul gène *bla*_{CTX-M} de groupe 1.

Six *K. pneumoniae* portaient également le gène *bla*_{OXA-1}, dont 4 était aussi associés au gène *bla*_{TEM-1} (Tableau 8).

Tableau 8. Caractéristiques des 8 *K. pneumoniae* productrice de BLSE analysées dans cette étude

N° d'isolat ^(a)	Sfax localisation ^(a)	Contenu en β-lactamases ^(b)	Résistances co-associées ^(a)
115	H1	CTX-M-1 group OXA-1-like	FQ
96.1	CA	CTX-M-1 group OXA-1-like	SXT
57	CA	CTX-M-1 group OXA-1-like TEM-like	G FQ SXT
39/GB	CA	CTX-M-1 group OXA-1-like TEM-like	-
18TA (ST147) ^(c)	CB	CTX-M-15 NDM-1 OXA-1-like TEM-like	GT FQ SXT TMP NI
48SR	CB	CTX-M-1group OXA-1-like	GTA FQ SXT TMP NI
17MZ	CB	CTX-M-1 group TEM-like	G FQ
18CT	CB	CTX-M-1 group OXA-1-like TEM-like	FQ

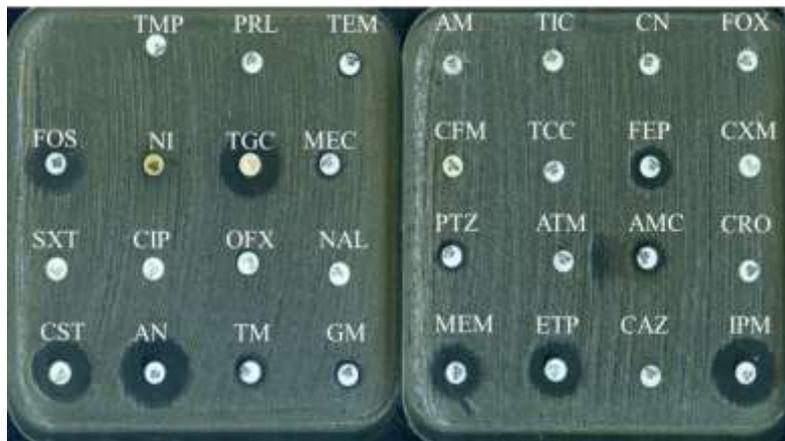
^(a) Abréviations définies dans le Tableau 6

^(b) Toutes les souches de *K. pneumoniae* ont donné une amplification positive avec les amorces spécifiques des gènes *bla*_{SHV} qui a été attribué au gène de la β-lactamase chromosomique, naturellement présente chez cette espèce.

^(c) Séquence type de l'isolat 18TA

Souche de *K. pneumoniae*, 18TA

La souche n°18TA, dont l'antibiogramme est présenté sur la figure 26, a été fournie par le laboratoire CB. Cette souche a montré, en plus de la présence d'un gène CTX-M de groupe 1 qui après caractérisation s'est avéré être la β-lactamase CTX-M-15, un phénotype de résistance au carbapénème. Après PCR et séquençage, la présence de la métallo-enzyme NDM-1 a été confirmée.



AM : ampicilline, TIC: ticarcilline, CN: céfalexine FOX: céfoxitine, CFM: céfixime, TCC: ticarcilline - acide clavulanique, FEP: céfépime, CXM : cefuroxime, PTZ : pipéracilline+ tazobactam, ATM: aztréonam, AMC: amoxicilline - acide clavulanique, CRO : ceftriaxone, MEM: méropénème, ETP: ertapénème, CAZ : ceftazidime, IPM: imipénème, TMP: triméthoprim, PRL: pipéracilline, TEM: témocilline, FOS: fosfomycine, NI: nitrofurantoïne, TGC: tigécycline, MEC: mécollinamide, SXT : cotrimoxazole, CIP: ciprofloxacine, OFX : ofloxacine, NAL: acide nalidixique, CST: colistine, AN: amikacine, TM : tobramycine, GM : gentamicine

Figure 27. Antibiogramme de la souche de *K. pneumoniae* 18TA

E. Etude de la clonalité des souches par PFGE et MLST

Les 15 *E. coli* producteurs de CTX-M appartenaient principalement au groupe phylogénétique B2 (40%), suivis des groupes A (33,3%), B1 (20%) et D (6,7%) (Tableau 7). Les 15 *E. coli* ont été distribuées en 11 profils de PFGE (pulsotypes E-1 à E-11, Tableau 7 et figure 28).

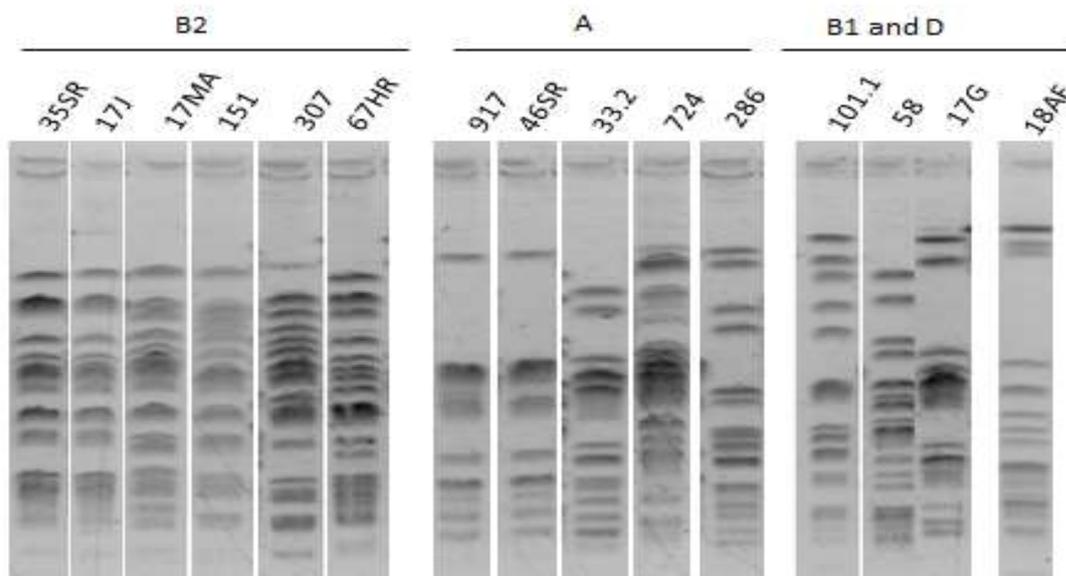


Figure 28. Pulsotype (XbaI) des souches d'15 *E. coli* productrices de BLSE

Quatre isolats du phylogroupe B2 ont présenté un pulsotype similaire E-1 (souches n° 35SR, 17J, 17MA et 151)(figure 28, pistes 1 à 4) et 2 isolats du phylogroupe A (souches n° 917 et 46SR)(figure 27, pistes 7 et 8) présentaient un profil identique, E-2. Pour confirmer la relation phylogénétique de ces 6 souches, un typage MLST a été effectué et a montré que les 2 isolats

du profil E-2 sont inclus dans la séquence type, A-ST617. Les 4 *E. coli* du profil E-1 appartenaient au clone B2-ST131 (Tableau 7). Parmi ces 4 *E. coli* B2-ST131, 2 portaient une CTX-M-27, et les 2 autres présentaient à la fois CTX-M-15 et CTX-M-27. Dans la littérature, les *E. coli* ST131-B2 ayant l'enzyme CTX-M-27 sont souvent situés dans la sous-classe C1-M27⁶⁶.

Pour vérifier le(s) sous-clade(s) des 4 *E. coli* B2-ST131 de notre étude, portant à la fois CTX-M-15 et/ou CTX-M-27, 2 autres souches d'*E. coli* B2-ST131 identifiées dans un hôpital de Tunis lors d'une enquête précédente (Décembre 2014 à Février 2015)⁸³, ont été incluses comme contrôle : l'un avec CTX-M-15 (souche n°59) et l'autre avec CTX-M-27 (souche n° 89). Les isolats portant uniquement la BLSE, CTX-M-27 (n°17MA et n°151 et la souche témoin n° 89) appartenaient au clade C1-M27. Les 2 souches présentant à la fois CTX-M-15 (groupe 1) et CTX-M-27 (groupe 9) appartenaient au sous-groupe ST131-C2, comme la souche contrôle (n° 59) qui ne contenait que CTX-M-15.

Concernant les souches de *K. pneumoniae*, seul l'isolat de *K. pneumoniae* n°18TA a été davantage caractérisé par typage. Cette souche présentant la BLSE CXT-M-15 et la carbapénémase NDM-1, appartenait à la séquence type, ST147.

F. Typage plasmidique

Les plasmides d'*E. coli* ont été typés par la technique PBRT, basée sur l'amplification par PCR⁸⁸. La plupart d'entre eux appartenait au groupe d'incompatibilité IncFII (Tableau 7). Un schéma de sous-typage de ce multiréplicon utilisant une formule FAB (FII:FIA:FIB) a été réalisé pour 6 isolats d'*E. coli*. Les 2 isolats A-ST617 (pulsotype E-2) et 2 autres, B2-ST131-C2 (profil E-1) hébergeaient le même réplicon de formule, F31:A4:B1 (Tableau 7). Aucun des gènes de BLSE dans ces 4 souches d'*E. coli* n'a pu être transféré par conjugaison. D'autres plasmides ont également été retrouvés dans ces 4 isolats : IncN, dans les isolats n° 917 et n°46SR et IncW, dans l'isolat n°35SR.

Les 2 autres *E. coli* B2-ST131-C1-M27 contenaient un plasmide IncFII de formule F1:B20 qui n'a pas pu être transféré par des expériences de conjugaison.

Concernant l'analyse des plasmides des souches de *K. pneumoniae*, le type des plasmides n'a pas été effectué. Cependant, et contrairement aux 6 *E. coli* précédemment testés, tous les gènes *bla* et certaines co-résistances présents dans *K. pneumoniae* n° 18TA (GT SXT TMP)

ont été transférés par conjugaison dans la souche réceptrice d'*E. coli* C600 résistante à l'azide (figure 28).



AM : ampicilline, TIC: ticarcilline CN: céfalexine
 FOX: céfoxitine, CFM: céfixime, TCC: ticarcilline -
 cide clavulanique, FEP: céfépime, CXM :
 cefuroxime, PTZ : pipéracilline-tazobactam, ATM:
 aztréonam, AMC: amox- acide clavulanique, CRO:
 ceftriaxone, MEM: méropénème, CAZ :
 ceftazidime, IPM: imipénème, TMP: triméthoprim,
 PRL: pipéracilline, TEM: témocilline, FOS:
 fosfomycine, NI: nitrofurantoïne, TGC: tigecycline,
 MEC: mécollinamide, SXT : cotrimoxazole, CIP:
 ciprofloxacine, OFX : ofloxacine, NAL: acide
 nalidixique, CST: colistine, AKN: amikacine, TMN:
 tobramycine, GM : gentamicine

Figure 29. Antibiogramme du transconjugant Tc18TA (*E. coli* C600)

Discussion

La présence de BLSE CTX-M et de carbapénémases telles que NDM-1 dans des isolats d'origine cliniques d'entérobactéries a été rapportée de plus en plus fréquemment dans le monde, y compris en Tunisie^{62,69,107}. Durant cette étude de 2 mois, le taux de prévalence des entérobactéries productrices de BLSE collectées dans les urines de patients hospitalisés dans 3 hôpitaux situés dans 2 zones géographiques de la Tunisie variait de 11,1% à 3,7%. Même si ces taux reflètent des données collectées sur un petit nombre de souches, ils concordent avec celles décrites dans la littérature qui ont montré des taux variables en fonction des facteurs de risque d'acquisition des BLSE-E^{108,109}. En effet, il semble logique que la prévalence soit plus élevée dans un Hôpital régional (H2) que dans une clinique psychiatrique (H3).

En Tunisie, peu d'études incluant des analyses moléculaires des E-BLSE sur des infections acquises dans la communauté ont été rapportées¹⁰⁷. Cependant, plusieurs rapports concernant des patients ambulatoires et/ou l'analyse du portage fécal d'entérobactéries réalisée lors de l'admission à l'hôpital ont mis en évidence la présence d'entérobactéries productrices de CTX-M dans la communauté tunisienne^{83,107}. Nos résultats corroborent une des ces études qui a pointé le nombre important de souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE comparé à celles d'*E. coli* dans la communauté en Tunisie (notre étude) ou à l'admission à l'Hôpital⁸³.

Néanmoins, l'une des principales constatations de nos travaux est la forte proportion d'*E. coli* qui produisent simultanément 2 BLSE, CTX-M du groupe 1 et CTX-M du groupe 9. Certaines études, principalement réalisées sur le continent asiatique, ont mentionné quelques isolats d'*E. coli* ou de *K. pneumoniae* avec CTX-M-55 et CTX-M-14 ou CTX-M-15 et CTX-M-14. Mais ces souches n'étaient pas majoritaires dans leurs études^{48,66}.

A notre connaissance, cette étude est aussi la première description d'*E. coli* portant CTX-M-15 et CTX-M-27. Ces 2 enzymes ont une substitution Asp240 en Gly dans leur site actif, qui augmente leurs activités hydrolytiques vis-à-vis de la ceftazidime, comparé à des variants sans cette substitution^{51,110}; suggérant qu'une pression de sélection élevée avec la ceftazidime pourrait favoriser l'émergence de tels isolats.

Nous rapportons la présence de ces 2 enzymes dans 2 souches clonales d'*E. coli* résistantes aux fluoroquinolones (soit 4 isolats appartenant à 2 ST différents). Deux d'entre elles étaient associées au clone ST131, pandémique et virulent, appartenant au groupe phylogénétique B2. Des études récentes utilisant l'analyse de la séquence du génome entier ont révélé que ce

ST131 était composé de différentes lignées ou clades: A/H41, B/H22 et C/H30; avec le nombre H qui fait référence à l'allèle *fimH* qui correspond le plus souvent à chaque clade^{111,112}. Depuis les années 2000, le clade C est devenu la lignée prédominante parmi les isolats ST131^{66,68}, surtout les isolats des sous-groupes C1 et C2 résistants aux fluoroquinolones. Le sous-groupe C2 (également appelé H30Rx), est souvent associé au gène *bla*_{CTX-M-15}⁶³. Récemment, un sous-groupe C1 associé au gène *bla*CTX-M-27, nommé C1-M-27, a été décrit sur le continent asiatique et signalé avec une augmentation alarmante en Europe^{65,66}. La présence de *E. coli* 025b-H30x ST131 contenant CTX-M-27 a été décrite en Tunisie à partir d'échantillons humains⁸³, ainsi que dans des échantillons d'origine animale et dans des eaux usées^{112,113}; suggérant une telle émergence peut également se produire dans ce pays. En utilisant l'identification récente des sous-groupes par les amplifications PCR, nous avons confirmé que *E. coli* ST131 produisant CTX-M-27 appartient au sous-groupe C1-M-27, de la même manière que la souche contrôle d'*E. coli* n°89 collectée dans un hôpital de Tunis lors d'une enquête en 2014-2015⁸³. En utilisant cette procédure, nous avons montré que les 2 *E. coli* ST131 provenant de la communauté à Sfax portant à la fois CTX-M-15 et CTX-M-27 étaient phylogénétiquement plus proches du sous-groupe C2 que du sous-groupe C1, de la même manière que l'isolat contrôle de *E. coli* avec le seul CTX-M-15 souche n° 59⁸³. Ainsi, nos données suggèrent une acquisition supplémentaire de CTX-M-27, dans la sous-classe pandémique du sous-groupe C2. Des enzymes CTX-M-15 et M-27 ont également été trouvées dans une autre souche clonale d'*E. coli* appartenant au groupe phylogénétique A et ST617 (complexe clonal 10, CC10). Les souches d'*E. coli* ST617 productrices de CTX-M-15 sont également répandues au niveau international et ont été décrites aussi bien au cours d'infections humaines, ainsi que chez des souches commensales d'*E. coli* isolées dans des échantillons humains, animaux et alimentaires¹¹³.

La dissémination des gènes *bla*_{CTX-M} est très souvent médiée par les plasmides conjugatifs, en particulier de type IncF, souvent porteurs du gène *bla*_{CTX-M-15} ou de plus en plus souvent du gène *bla*_{CTX-M-27}, chez *E. coli* B2-T131. Dans notre étude, les souches *E. coli* A-ST617 et la sous-classe C2 B2-ST131 présentaient la même combinaison du multiréplicon IncF (FII: FIA: FIB), c'est-à-dire. F31:A4:B20, suggérant un possible transfert de plasmide dans ces 2 souches clonales. Cependant, dans nos expériences de laboratoire, aucune conjugaison n'a été observée. Un plasmide similaire (F31:4:B1) portant le *bla*_{CTX-M-15} a régulièrement été identifié chez des isolats d'*E. coli* ST617 et ST131 en Tunisie et dans différents pays du monde, et dans divers échantillons^{20,114}. Il sera intéressant de séquencer entièrement les plasmides de ces

2 clones (A-ST617 et C2 B2-ST131) afin d'analyser leur relation génétique ainsi que leur évolution, et de déterminer si l'acquisition de CTX-M-27 dans ces plasmides portant CTX-M-15 pourrait être le résultat d'événements indépendants. Ces données pourraient contribuer à améliorer les connaissances sur l'évolution des *E. coli* ST131 et des réplicons qui leur sont associés.

Un deuxième plasmide de type IncF (F1:B20) a été identifié parmi 2 autres souches ST131 appartenant au clade C1-M27. Dans la littérature, un plasmide F1:A2:B20 est fortement associé aux isolats du clade C1-M-27¹¹⁴. A notre connaissance, des réplicons F1:B20, sans FIA, ont été signalés sur la base de données pMLST (<https://pubmlst.org/plasmid>), mais leur description dans la littérature reste très sommaire.

Enfin, une autre information importante obtenue lors de cette étude a été la mise en évidence d'une souche de *K. pneumoniae* de séquence type ST147 possédant la carbapénémase NDM-1 chez une patiente de la communauté en Tunisie. Un rapport récent a indiqué la présence de *K. pneumoniae* ST147 productrice de NDM-1 chez un patient hospitalisé à l'hôpital Sahloul, Sousse (Tunisie)^{82,84}. Mais, à notre connaissance, c'est la première description d'une telle souche dans la communauté tunisienne (cette information a été soumise au Journal of Global Antimicrobial Resistance sous le N° D-19-00908 et sous le titre : "First description of NDM-1 positive *Klebsiella pneumoniae* in the Tunisian community").

Conclusion

Nous rapportons, pour la première, fois la présence de CTX-M-15 et de M-27 dans 2 ST différentes d'*E. coli*, y compris ST131 qui est une lignée virulente et prédominante parmi les *E. coli* extra-intestinaux et qui joue un rôle majeur dans la diffusion mondiale des BSLE CTX-M.

Nous décrivons aussi pour la première fois, la présence du clone ST147 de *K. pneumoniae* producteur de NDM-1 dans la communauté tunisienne.

Il est urgent de surveiller ces clones émergents multi-résistants aux antibiotiques et de mettre en œuvre des programmes préventifs visant à limiter leur diffusion.

First description of NDM-1 positive *Klebsiella pneumoniae* in the Tunisian community

Amel MHAYA^{1,2#}, Rahma TRABELSI^{3#}, Fatima M'ZALI⁴, Dominique BEGU¹, Slim TOUNSI², Radhouane GDOURA³, Corinne ARPIN^{1*}

#, A. M. and R. T., Equal contribution

*, Corresponding author: Corinne Arpin, E-mail: corinne.arpin@u-bordeaux.fr

Affiliations:

1, University of Bordeaux, UMR CNRS 5234, 146 rue Léo Saignat, Bordeaux Cedex, 33076, France.

2, Biotechnology Center of Sfax, Laboratory of Biopesticides, B.P 1177 Sfax 3018, Tunisia.

3, Department of Life Sciences, Research Laboratory of Environmental Toxicology-Microbiology and Health (LR17ES06), Faculty of Sciences, University of Sfax, Sfax, Tunisia.

4, University of Bordeaux, Aquitaine Microbiologie, Bordeaux, France.

Sir,

Multidrug-resistant bacteria especially carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* are a major public health threat worldwide. As part of a collaborative monitoring program, our laboratory at the University of Bordeaux has received a collection of multi-drug resistant strains in order to further characterize their β -lactamase content. They were sent from private laboratories of Tunisia and were collected from community patients suffering from urinary tract infections.

In this context, a multidrug resistant isolate 18TA has been collected in January 2018 in Sfax region, from urine of a 45-year old female with no previous hospitalization during the preceding month and no recent foreign travel prior to strain isolation.

The strain 18TA had been firstly classified as *Enterobacter spp.* by biochemical tests (API 10S gallery). After control by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-Of-Flight/Mass Spectrometry (MALDI-TOF/MS, Brüker Daltonics), and confirmation by PCR amplification and sequencing of rDNA 16S, 18TA was re-identified as *Klebsiella pneumoniae*.

Using the Multilocus Sequence Typing analysis (<http://bigsd.bpasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>), 18TA belonged to the sequence type, ST147.

Antimicrobial susceptibility testing using 32 antibiotics was determined by the agar disk diffusion method on Mueller-Hinton (MH) agar plates (Bio-Rad) according to the recommendations of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (<https://www.sfm-microbiologie.org/2019/01/07/casfm-eucast-2019/>). The strain 18A exhibited decreased susceptibilities to all tested β -lactams (amoxicillin, amoxicillin-clavulanate, ticarcillin, ticarcillin-clavulanate, piperacillin, piperacillin-tazobactam, temocillin, cephalexin, mecillinam, cefoxitin, cefuroxime, ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone, cefepim, aztreonam), including the carbapenems with a diameter to imipenem, ertapenem and meropenem of 19, 16 and 14 mm, respectively. The imipenem-EDTA combined disk diffusion test revealed to be positive since the inhibition zone increased by ≥ 7 mm with the imipenem-EDTA disk compared to the imipenem disk alone, suggesting the presence of a metallo-carbapenemase¹¹⁵. Furthermore, the double-disk synergy test (between amoxicillin-clavulanate and broad-spectrum cephalosporins) showed the presence of an extended-spectrum β -lactamase (ESBL) phenotype. This strain carried other multiple antibiotic resistances which therefore limited the therapeutic options, *ie.* resistant to

aminoglycosides (gentamicin, tobramycin, and netilmicin), quinolones and fluoroquinolones (nalidixic acid, ciprofloxacin and ofloxacin), sulfamethoxazole/trimethoprim and trimethoprim, fosfomycin and nitrofurantoin. The transferability of the carbapenemase-encoding gene was studied by conjugation assays using an azide-resistant mutant of *Escherichia coli* C600 as recipient strain. The selection was performed on MH agar plates supplemented with sodium azide (300 mg/l) and either ampicillin (100 mg/l) or ertapenem (4 mg/l). A transconjugant (Tc-18TA) was selected which contained all resistances listed above, except the resistances to quinolones/fluoroquinolones, fosfomycin and nitrofurantoin. After extraction, total DNA of 18TA and Tc-18TA were screened using different multiplex PCR amplifications for TEM-, SHV- and OXA-1-like enzymes, groups -1, -2, -9, -18, -25 CTX-M β -lactamases and for carbapenemase genes (OXA-48-like, KPC, GES, VIM, IMP, NDM), as described elsewhere¹¹⁶. In both 18TA and its transconjugant, the results showed the presence of 4 β -lactamases: TEM-like and OXA-1-like, CTX-M ESBL belonging to group 1 and NDM carbapenemase. After amplification and sequencing of the entire genes, the results confirmed the co- presence of TEM-1, OXA-1, CTX-M-15 and NDM-1 β -lactamases in the host cell background. A SHV gene was found in 18TA but not in Tc-18TA and it was attributed to the chromosomally encoded species-specific enzyme of *K. pneumoniae*.

K. pneumoniae-NDM-1 positive strains have been previously described in Tunisia, but from hospitalized patients^{115–119}. This report is the first description of *K. pneumoniae* carrying the carbapenemase NDM-1 in the Tunisian community setting. It confirms that NDM-1 and in particular the ST147 *K. pneumoniae*-NDM-1 positive clone has become endemic in this country¹¹⁹. Thus implementation of adequate infection control measures and uninterrupted active surveillance programs both hospital and community settings are crucial to prevent the introduction and dissemination of NDM-type enzymes in this region.

Acknowledgments. We thank Sabine Aillerie and Nathalie Peyron for their technical contribution.

Competing interests. None declared

Ethical approval. Not required.

References

- [1] Izdebski R, Bojarska K, Baraniak A, Literacka E, Herda M, Żabicka D, et al. NDM-1- or OXA-48-producing *Enterobacteriaceae* colonising Polish tourists following a terrorist attack in Tunis, March 2015. Euro Surveill 2015;20:21150. doi: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2015.20.23.21150>
- [2] Maamar E, Ferjani S, Jendoubi A, Hammami S, Hamzaoui Z, Mayonnove-Coulangue L, et al. High Prevalence of Gut Microbiota Colonization with Broad-Spectrum Cephalosporin Resistant *Enterobacteriaceae* in a Tunisian Intensive Care Unit. Front Microbiol 2016;7:1859. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01859>
- [3] Ben Nasr A, Decré D, Compain F, Genel N, Barguelli F, Arlet G. Emergence of NDM-1 in association with OXA-48 in *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia. Antimicrob Agents Chemother, 2013; 57:4089–4090. doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.00536-13>
- [4] Mansour W, Grami R, Jaidane N, Messaoudi A, Charfi K, Ben Romdhane L, et al. Epidemiology and Whole-Genome Analysis of NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* KP3771 from Tunisia. Microb Drug Resist 2019;25:644–651. doi: <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0204>
- [5] Messaoudi A, Haenni M, Mansour W, Saras E, Bel Haj Khalifa A, Chaouch C, et al. ST147 NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* spread in two Tunisian hospitals. J Antimicrob Chemother 2017;72:315–316. doi: <https://doi.org/10.1093/jac/dkw401>

Chapitre 2 : Analyse de la résistance à la colistine d'une souche d'*Enterobacter hormaechei* subsp *steigerwaltii* : comparaison avec une souche de *K. pneumoniae* délétée pour le gène *mgrB*

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction

Depuis une décennie, l'augmentation de bactéries pan-résistantes a conduit à la réutilisation d'antibiotiques anciens, comme les polymyxines [polymyxine B et polymyxine E (colistine)]. La colistine est un lipopeptide cyclique polycationique qui désorganise la membrane externe des bactéries à Gram négatif. En médecine humaine, la colistine avait été écartée des protocoles de soins depuis les années 1980, en raison de sa toxicité rénale. Elle a été réintroduite et prescrite pour le traitement d'infections humaines sévères liées à des bactéries résistantes à toutes les autres options thérapeutiques. Elle est donc considérée comme l'un des antibiotiques de dernier recours pour le traitement des infections graves causées par des bactéries à Gram négatif multirésistantes aux antibiotiques (MDR), en particulier des bactéries telles que *K. pneumoniae*, *A. baumannii* et *P. aeruginosa*, résistantes aux carbapénèmes¹²⁰.

En médecine vétérinaire, la colistine a été largement utilisée chez les animaux pour le traitement des infections gastro-intestinales à *E. coli* et *Salmonella enterica*, en particulier chez les volailles et les porcs^{121,122}. Elle avait aussi été utilisée comme facteur de croissance¹²³. L'utilisation excessive de la colistine, principalement en médecine vétérinaire, a conduit à une augmentation de la pression de sélection et à l'émergence des souches résistantes à la colistine chez les bacilles à Gram négatif.

XII. Les polymyxines

La colistine ou polymyxine E est un peptide antimicrobien cationique appartenant à la famille des polymyxines. Elle a été isolée en 1947 d'une bactérie de l'environnement *Paenibacillus polymyxa subsp. colistinus*¹²⁴. La structure chimique des polymyxines est similaire à celle des peptides antimicrobiens cationiques (CAMP), tels que la défensine et la gramicidine. Les polymyxines sont constituées d'un heptapeptide cyclique possédant une chaîne latérale tripeptidique acylée à l'extrémité N-terminale par une chaîne d'acide gras. La colistine et la polymyxine B ne diffèrent que par un seul acide aminé dans le noyau peptidique, avec une phénylalanine dans la polymyxine B et une leucine dans la colistine en position 6 (figure 30).

La polymyxine B est administrée directement en tant qu'antibiotique actif, alors que la colistine est administrée en tant que précurseur de médicament inactif, appelé colistiméthate qui est une prodrogue inactive et moins toxique partiellement hydrolysée in vivo en colistine.

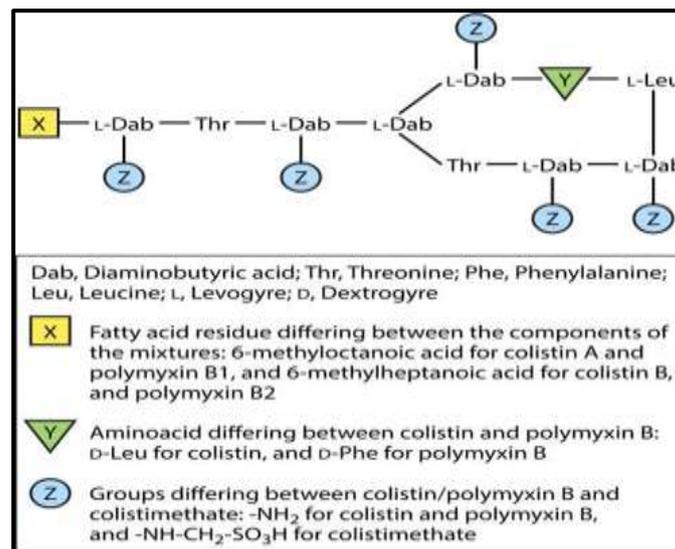


Figure 30. Structure de la colistine et polymyxine B¹²⁵

A. Mécanismes d'action des polymyxines

La cible des polymyxines est la membrane externe des bactéries à Gram négatif qui possèdent sur sa face externe du LPS. Le LPS est constitué de lipide A et possède 2 résidus glucosamine liés à des acides gras et phosphorylés. Il est donc chargé négativement et ces charges négatives sont stabilisées par des cations divalents (Mg²⁺ et Ca²⁺). L'interaction électrostatique survenant entre les résidus α,γ -diaminobutyrique de la colistine chargée

positivement sur un côté et le LPS chargé négativement de l'autre côté, est résumé en 4 étapes:

Étape 1 : Les polymyxines ciblent la membrane externe des bactéries à Gram négatif.

Étape 2 : Les polymyxines chargées positivement déplacent les cations divalents (Mg^{2+} et Ca^{2+}).

Étape 3 : Les polymyxines affaiblissent la stabilité de la membrane externe, entraînant une augmentation de la perméabilité membranaire, une fuite du matériel cellulaire et ainsi la lyse de la bactérie

Étape 4 : Les polymyxines pénètrent dans la membrane interne et inhibent l'enzyme respiratoire NDH-2¹²⁶ (figure 31).

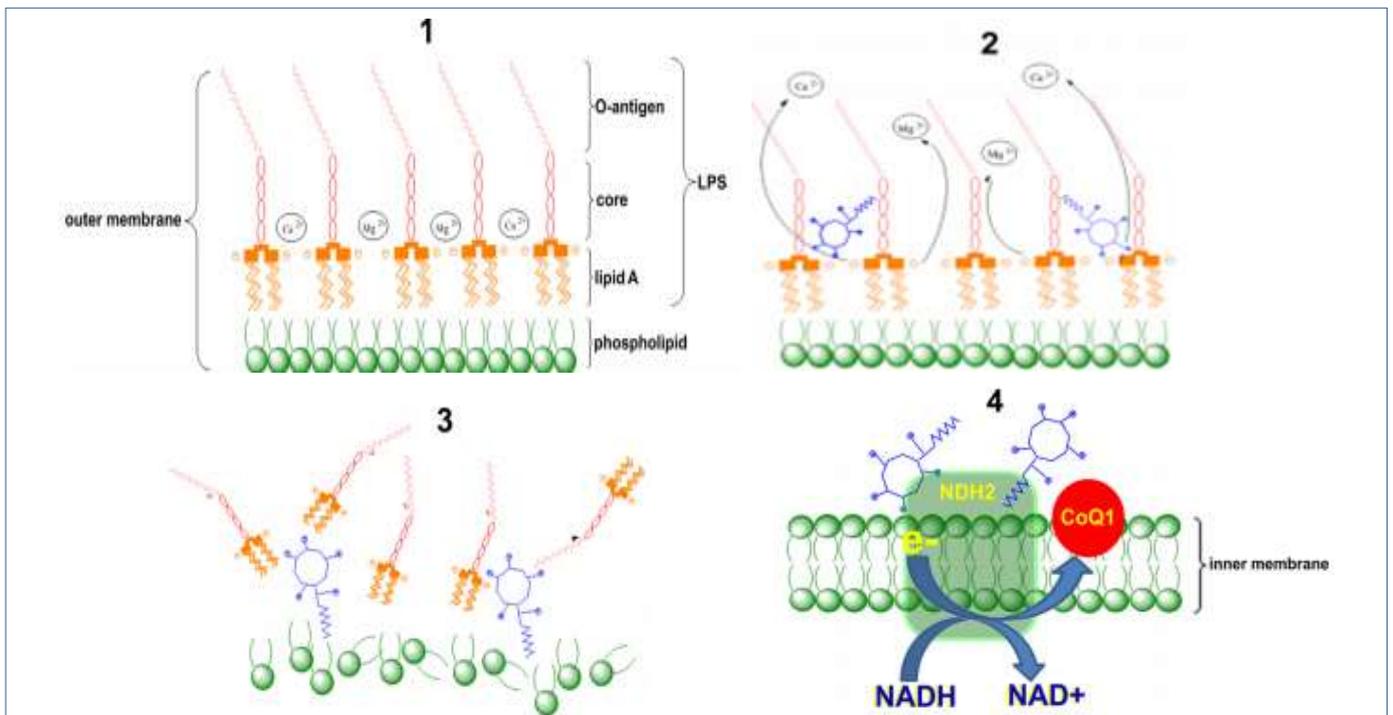


Figure 31. Schéma illustrant le mode d'action présumé des polymyxines au niveau des membranes interne et externe des bactéries à Gram négatif.

B. Mécanismes de résistance de la colistine

1. Résistances naturelles à la colistine

Bacillus polymyxa est une espèce productrice des polymyxines. Elle produit naturellement une enzyme, la colistinase, pour l'hydrolyser, ce qui lui confère une résistance naturelle à la colistine.

Au niveau de l'ordre des *Enterobacterales*, chez les *Proteus mirabilis* et *Serratia marcescens*, la résistance naturelle aux polymyxines est liée à l'expression constitutive de l'opéron *arnBCADTEF* et/ou du gène *eptB*, provoquant l'addition de groupements cationiques sur les phosphates du lipide A : phosphoéthanolamine (pEtN) et/ou de 4-amino-4-désoxy-L-arabinose (L-Ara4N). Cette modification augmente la charge du LPS, qui est la cible initiale des polymyxines, et donc diminue sa fixation, donnant lieu à la résistance intrinsèque de ces espèces¹²⁵.

2. Résistances acquises à la colistine chez les entérobactéries

a) Résistances chromosomiques

La résistance acquise aux polymyxines a été identifiée chez plusieurs genres d'*Enterobacteriaceae*, tels que *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter* et *Salmonella*. Des mécanismes de résistance à la colistine ont été bien identifiés chez certaines espèces bactériennes, comme *K. pneumoniae*. Le plus courant est la modification du LPS par l'addition de groupements cationiques : phosphoéthanolamine (pEtN) et/ou 4-amino-4-désoxy-L-arabinose (L-Ara4N). Un seul mécanisme transférable de résistance a été identifié jusqu'à présent : les gènes *mcr*.

La plupart des mécanismes de résistance acquise sont des mutations chromosomiques. Plusieurs gènes sont impliqués directement ou indirectement dans l'addition de pEtN et de L-Ara4N, tels que le gène *pmrC* et l'opéron *pmrHFIJKLM*, qui sont des gènes impliqués directement dans la modification du LPS (figure 32).

La synthèse des groupements cationiques L-Ara4N et de pEtN est contrôlée par des systèmes de régulation à 2 composants (TCRS), tels que PmrA/PmrB et PhoP/PhoQ. D'autres TCRS interviennent dans la régulation des gènes impliqués dans la modification du LPS comme CrrA/CrrB (CrrAB) chez *K. pneumoniae* et ParR/ParS (ParRS) chez *Pseudomonas*

aeruginosa etc... Les TCRS sont aussi les systèmes de défense pour la bactérie. Ils sont activés lorsqu'elle est phagocytée par des macrophages.

D'autres gènes sont impliqués indirectement dans l'addition de L-Ara4N et de pEtN. Le gène *mgrB* qui code pour la protéine MgrB, intervient dans la régulation du système *PhoP/PhoQ*. Deux gènes connecteurs *pmrD* et *crrC* ont aussi été décrits chez *K. pneumoniae*. Le premier connecte les TCRS *PmrAB* et *PhoPQ*, et le deuxième connecte les systèmes *CrrAB* et *PmrAB* (figure 32).

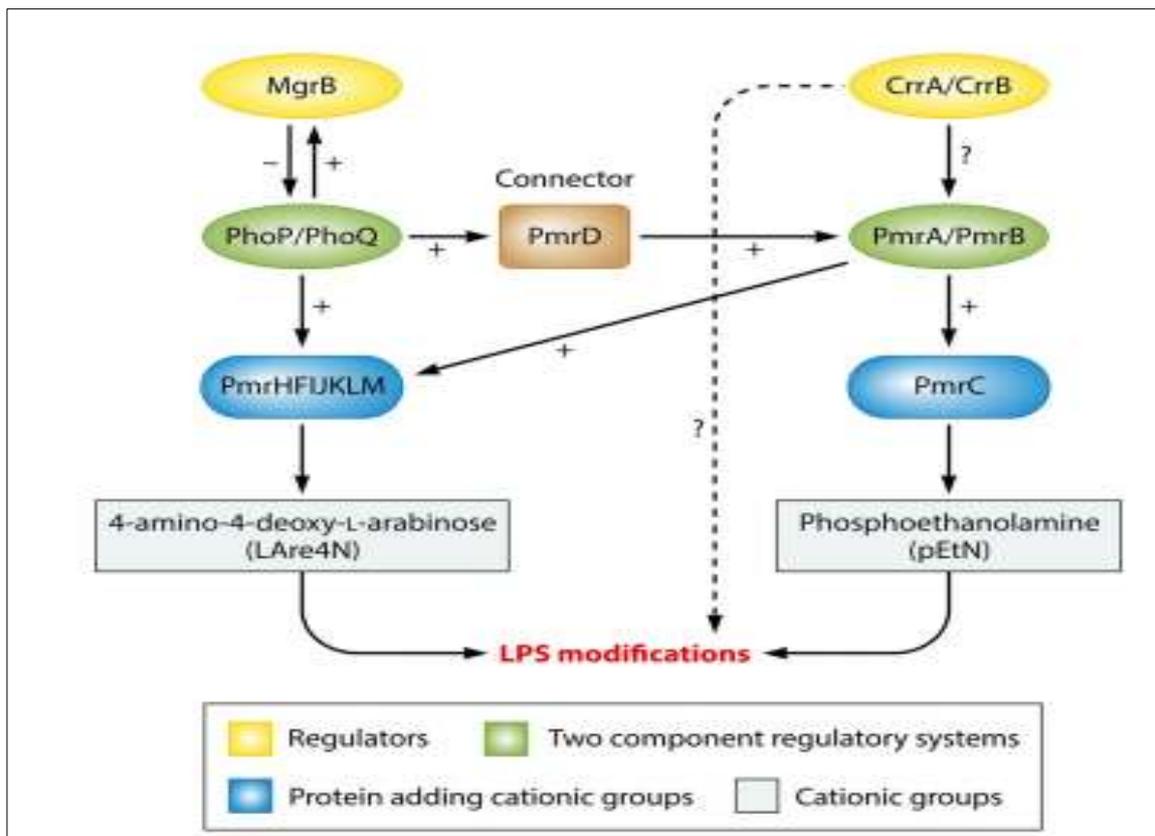


Figure 32. Voies de régulation des modifications du LPS chez *K. pneumoniae*¹²⁵

(1) Gènes impliqués dans la modification du LPS

(a) Système à deux composants PhoP/PhoQ

Les protéines PhoQ et PhoP ont été largement étudiées chez de nombreuses bactéries, y compris *Salmonella typhimurium* et *E. coli*. Le système PhoQ/PhoP est stimulé par des concentrations faibles en magnésium extracellulaire ou par la présence de certains peptides antimicrobiens cationiques. Dans ces conditions, il régule de nombreux gènes indispensables pour la croissance, ainsi que des gènes supplémentaires importants pour la virulence.

PhoQ est un senseur (ou capteur) qui possède une activité kinase qui répond aux stimuli extérieurs, en phosphorylant son partenaire *PhoP*. Une fois phosphorylé, *PhoP*-P agit comme un activateur de transcription qui va activer de nombreux gènes et opérons, en particulier l'opéron *pmrHFJJKLM* qui produit le groupement cationique L-Ara4N (figure 31)¹²⁷. Plusieurs études ont montré que des mutations dans ce système à deux composants sont responsables de la résistance acquise à la colistine chez *K. pneumoniae*. L'activation constitutive de PhoP/PhoQ provoque une synthèse permanente de L-Ara4N et sa fixation sur le lipide A et une résistance à la colistine (Figure 33)¹²⁷.

(b) Gène *mgrB*

MgrB est un régulateur du TCRS, PhoPQ. Il a été bien décrit chez *K. pneumoniae*. C'est une petite protéine transmembranaire régulatrice (47 acides aminés). La transcription de *mgrB* est activée après phosphorylation de PhoP (*PhoP*-P) et agit en augmentant la transcription du gène *mgrB*.

MgrB interagit avec le domaine périplasmique de PhoQ. Le senseur PhoQ est une protéine ayant 2 activités (kinase et phosphatase). La protéine *MgrB* régule négativement le système PhoPQ, en réprimant la phosphorylation de PhoP, probablement en inhibant l'activité de la kinase PhoQ et/ou en stimulant son activité phosphatase. *MgrB* permet un rétrocontrôle négatif (ou boucle de rétroaction) dans le circuit de signalisation PhoQ/PhoP

MgrB est largement conservé entre plusieurs espèces d'entérobactéries¹²⁷ (figure 33). Cependant, le gène *mgrB* n'a pas d'homologue chez *Erwinia* ou *Pseudomonas*, bien que les espèces de ces 2 genres possèdent *phoP* et *phoQ*¹²⁷.

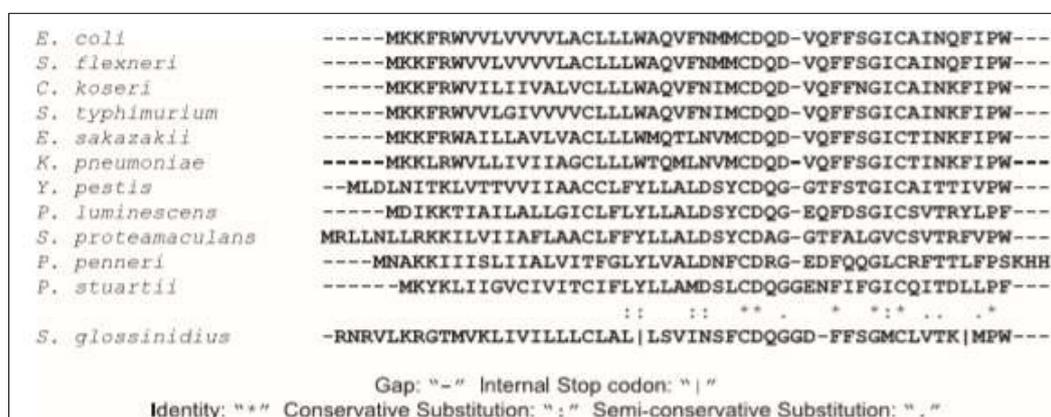


Figure 33. Alignement de différents *MgrB* identifiés à partir de séquences génomiques de bactéries de l'ordre des *Enterobacterales*¹²⁷

L'insertion d'éléments génétiques mobiles tels que les IS, des délétions, des mutations non-sens et des substitutions (figure 34) dans le gène *mgrB* ont conduit à la résistance acquise à la colistine chez *K. pneumoniae* et *E. aerogenes*^{125,128,129}.

L'inactivation de *mgrB* conduit à une surexpression (« up-regulation ») du système PhoPQ qui produit en permanence *PhoP*-phosphorylé, qui augmente la transcription et donc l'activation de l'opéron *pmrHFIJKLM*, conduisant à la production de LAra4N responsable de la résistance acquise à la colistine

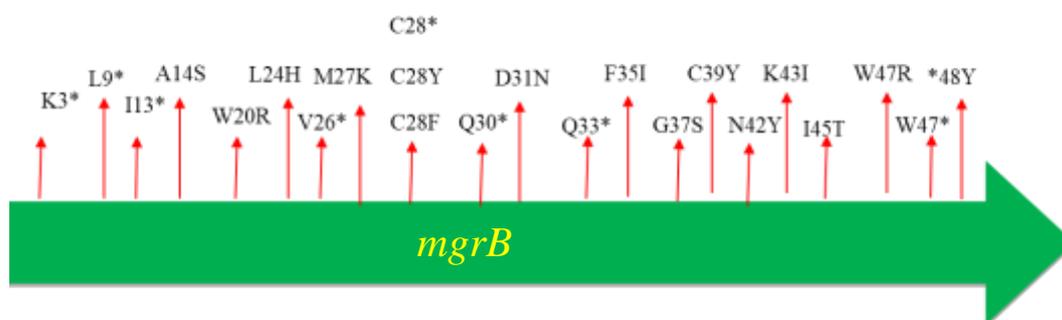


Figure 34. Mutations chromosomiques dans le gène *mgrB* et les changements dans la protéine MgrB (47 acides aminés) responsables de la résistance acquise à la colistine (avec * : codon stop)¹²⁵

La séquence en amont du gène *mgrB* est une région promotrice qui intervient dans la régulation de ce gène. Chez *E. coli*, il a été montré que cette région contient 2 "box" qui sont des sites de fixation de PhoP-phosphorylé qui active la transcription du gène *mgrB*¹³⁰.

(c) Système à deux composants PmrA/PmrB

Les 2 gènes *pmrA* et *pmrB* sont activés par divers signaux environnementaux, notamment des cations trivalents (Fe^{+3} et Al^{+3}) et un pH acide modéré, qui déclenchent l'autophosphorylation du domaine cytoplasmique du PmrB. Les systèmes à 2 composants PmrAB et PhoPQ sont aussi activés lorsque les bactéries sont phagocytées par les macrophages, permettant ainsi la survie des bactéries.¹³¹

PmrB, aussi appelée BasS, est une protéine kinase senseur membranaire dont l'activité tyrosine kinase active PmrA, aussi appelée BasR. PmrA phosphorylé à son tour active la transcription des opérons *pmrCAB* et *pmrHFIJKLM* et du gène *pmrE*. L'activation du

système à 2 composants PmrA/PmrB est donc impliqué dans la modification du LPS par addition de pEtN et l-Ara4N¹³¹.

Des mutations spécifiques dans les gènes *pmrA* et *pmrB* ont été décrites comme responsables de la résistance acquise à la colistine chez *K. pneumoniae*, *E. aerogenes* et *Salmonella enterica* (Figure 35)^{125,132-134}.

(d) Le gène pmrC

Le gène *pmrC* est l'un des gènes de l'opéron *pmrCAB* qui code non seulement pour PmrA et PmrB (voir paragraphe précédent), mais aussi la protéine PmrC. La protéine régulatrice PmrA phosphorylée active son propre opéron et aussi la transcription du gène *pmrC*, qui code pour une phosphotransférase qui ajoute le pEtN sur le LPS (figure 35)^{125,131}.

(e) L'opéron pmrHFIJKLM

L'opéron *pmrHFIJKLM* (également appelé opéron *arnBCADTEF* ou *pbgPE*) code pour un total de 7 protéines. L'opéron *pmrHFIJKLM* est responsable de la synthèse du groupe l-aminoarabinose (l-Ara4N) et de sa fixation sur le lipide A (Figure 35)¹²⁵.

(f) L'opéron CrrAB

L'opéron *CrrAB* code pour un autre TCRS : la protéine régulatrice *CrrA* et la protéine senseur kinase *CrrB*. Il n'est pas présent chez toutes les souches de *K. pneumoniae*, et son rôle physiologique reste encore inconnu. Cependant plusieurs mutations qui inactivent le gène *crrB* sont impliquées dans l'acquisition de la résistance à la colistine. Elles conduisent à une activation constitutive de l'opéron *pmrAB* par l'intermédiaire d'un connecteur *CrrC*, entraînant l'activation de l'opéron *pmrHFIJKLM* et des gènes *pmrC* et *pmrE*, entraînant par conséquent la production de l-Ara4N et de pEtN responsables de l'acquisition de la résistance à la colistine¹³⁵ (figure 35).

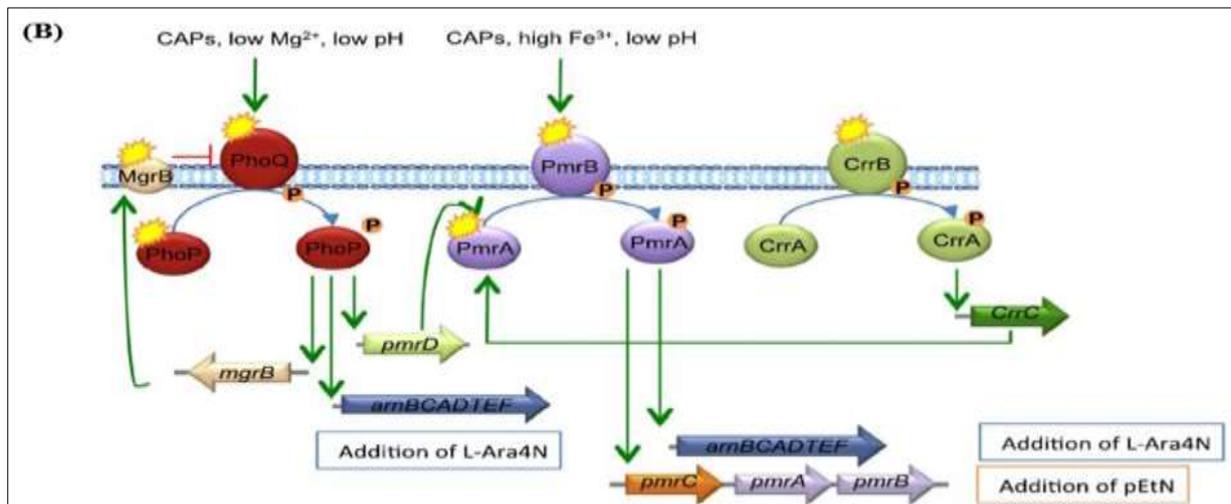
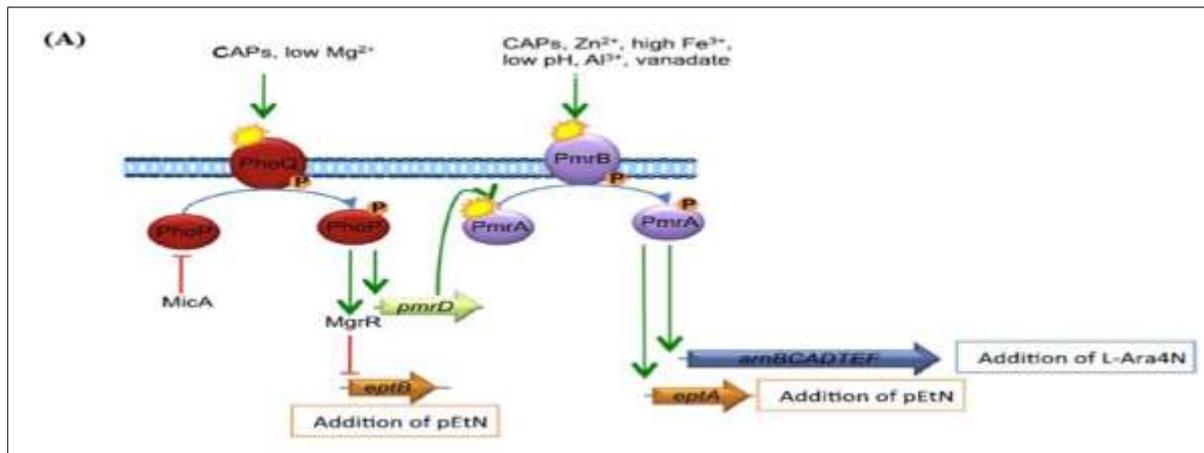


Figure 35. Régulation des gènes impliqués dans la résistance à la colistine chez les entérobactéries comme *E. coli* (A) et *K. pneumoniae* (B)¹³⁶.

(g) Gènes connecteurs des systèmes à deux composants

(h) Le gène *pmrD*

PmrD est une protéine connecteur qui relie les systèmes à deux composants *PhoP/PhoQ* et *PmrA/PmrB* chez *S. enterica*, *E. coli*, *K. pneumoniae* (figure 36). A une faible concentration de Mg^{2+} , la transcription de *PmrD* est activée par *PhoP*-phosphorylé. La protéine *PmrD* se lie à la protéine régulatrice *PmrA* phosphorylée (*PmrA*-P) pour la protéger de la déphosphorylation par la protéine *PmrB*, et ainsi maintient *PmrA*-P active.^{137,138}

D'autres résultats suggèrent qu'il existerait une deuxième voie d'activation de *pmrD* en absence de son principal activateur de transcription, *PhoP*-P. Ceci souligne l'importance des

modifications du lipide A par pEtN et LARA4N à de faibles concentrations de Mg^{2+} et la nécessité du maintien PmrD pour leur addition au lipide A¹³⁷.

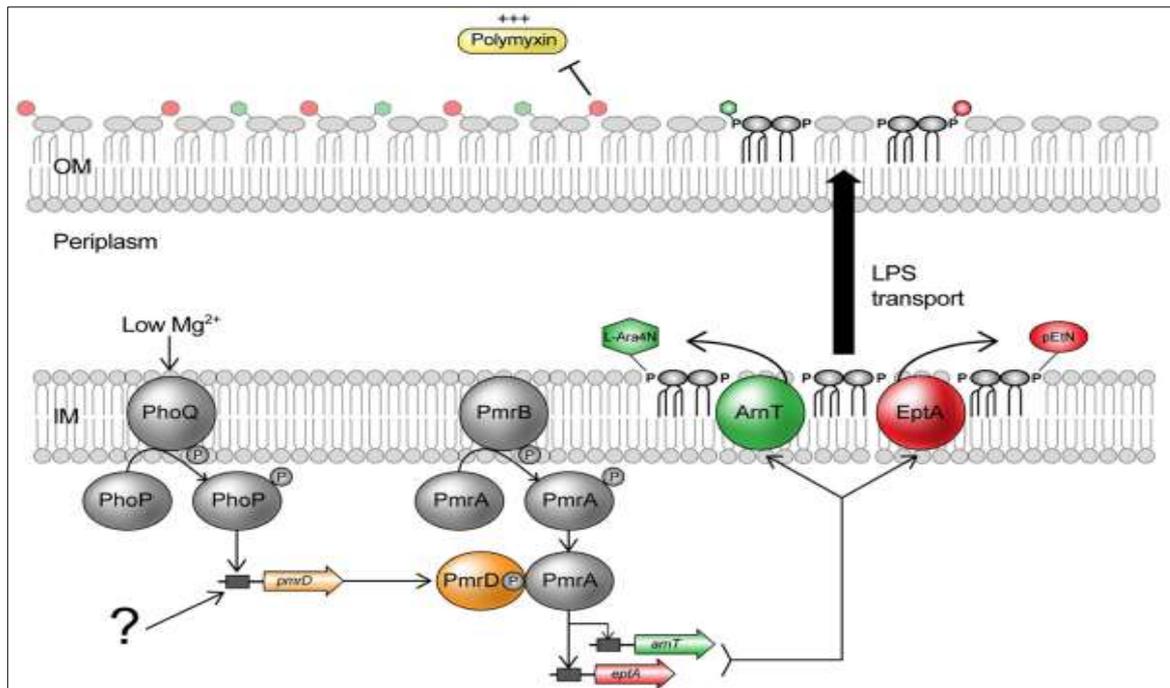


Figure 36. Modèle de régulation croisée entre PhoPQ et PmrAB médiée par PmrD

Le capteur à membrane interne PhoQ est activé par de faibles concentrations en Mg^{2+} ou des peptides antimicrobiens cationiques (CAMP) dans le périplasm. Il s'autophosphoryle puis active le régulateur de la réponse cytosolique, PhoP, qui augmente la transcription du gène *pmrD*. La protéine PmrD se lie à PmrA-phosphorylé, un régulateur de réponse associé au capteur PmrB. PmrD inhibe mécaniquement la déphosphorylation de PmrA par PmrB, permettant la transcription continue de gènes dépendants de PmrA, y compris *eptA* et *arnT*. En fin de compte, PmrD promeut l'addition de pEtN et de L-Ara4N au lipide A dans des conditions d'activation de PhoPQ, conduisant à une résistance aux polymyxines. Des résultats suggèrent l'implication d'un deuxième système (point d'interrogation) capable d'activer PmrD dans un double mutant *phoPQ* d'*E. coli*¹³⁷.

(i) Le gène *crrC*

Le gène *crrC* a été trouvé chez de nombreuses bactéries à Gram négatif, telles que *E. coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella variicola*, *Enterobacter cloacae* spp. et *Shigella flexneri*. Les protéines CrrC, chez ces bactéries, partagent au moins 45% d'homologie de la séquence d'acides aminés. Cependant, la fonction de CrrC reste inconnue chez ces bactéries. Le gène *crrC* permettrait à une connexion indirecte entre les 2 systèmes à deux composants CrrAB et

PmrAB chez *K. pneumoniae*. Le système à 2 composants CrrAB activerait le système à 2 composants PmrAB par l'intermédiaire du gène *crrC*¹³⁵ (figure 37).

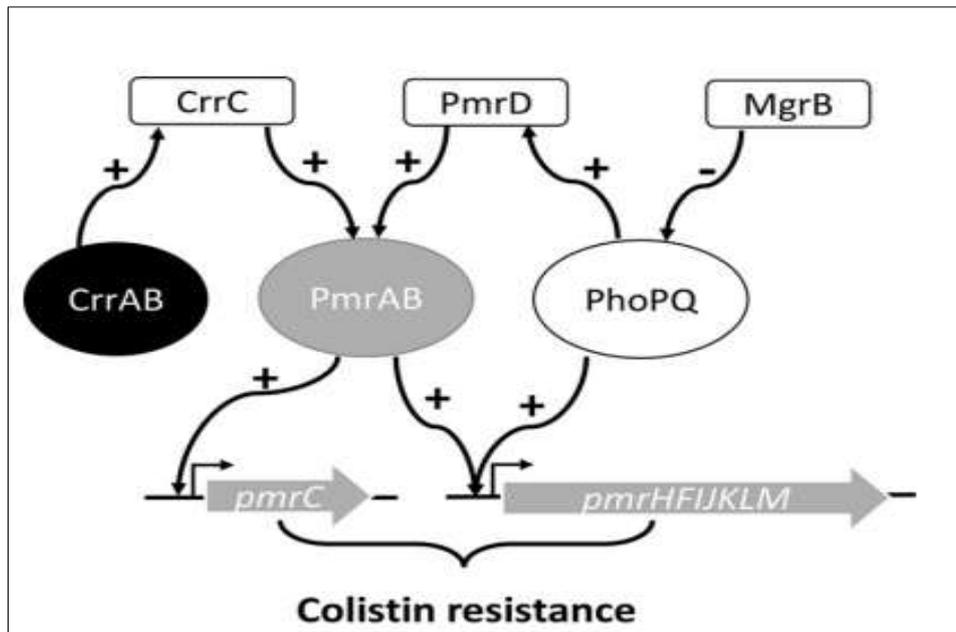


Figure 37. Modèle de résistance à la colistine induite par CrrC chez *K. pneumoniae*¹³⁵

(2) Autres mécanismes impliqués dans la résistance à la colistine

(a) Pompes d'efflux

Le rôle des pompes d'efflux est encore peu connu dans la résistance à la colistine. Cependant quelques études ont montré leur implication dans la résistance à la polymyxine E chez *K. pneumoniae*. Des mutations ont été observées dans des pompes d'efflux MDR, telles que AcrAB et KpnEF, qui diminuent la CMI à la colistine chez cette espèce¹³⁹⁻¹⁴¹. Dans une étude, les auteurs¹⁴² ont montré que l'ajout d'inhibiteurs de pompes dépendant du gradient de protons comme le carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) à faible dose au milieu de culture pouvait diminuer de manière significative les CMI des souches résistantes à la colistine et inhiber partiellement ou totalement la recroissance d'une sous-population résistante à la colistine. Le CCCP peut supprimer et inverser la résistance à la colistine chez d'autres bactéries à Gram négatif MDR, comme *A. baumannii* et *Stenotrophomonas maltophilia*¹⁴².

(b) Rôle de la capsule dans la résistance à la polymyxine

Il a également été observé que les polysaccharides capsulaires (CPS) jouent un rôle direct dans la résistance aux peptides antimicrobiens, y compris les polymyxines B et E, en réduisant leurs interactions avec la membrane externe de la bactérie, principalement par la régulation positive des gènes de biosynthèse capsulaire. Chez *K. pneumoniae*, une augmentation de la production des CPS à sa surface est capable de piéger ou de lier les polymyxines, réduisant ainsi leur quantité à la surface de la bactérie, entraînant une résistance accrue à ces antibiotiques^{143,144}. Cependant, le rôle de la capsule dans l'acquisition de la résistance à la polymyxine reste en discussion, car d'autres études ont montré que la capsule ne contribuerait pas à la résistance aux peptides antimicrobiens, y compris la polymyxine B^{145,146}.

D'autres études ont montré que le gène *ugd* joue un double rôle dans les biosynthèses des CPS et de L-Ara4N, rendant *E. coli* résistante aux peptides antimicrobiens cationiques¹⁴⁷.

(c) Implication des porines

Chez *Salmonella enterica*, il a été montré que le gène *ydeI* est régulé par les 2 systèmes PhoP/PhoQ et PmrA/PmrB, qui confèrent comme discuté précédemment une résistance aux peptides antimicrobiens cationiques en modifiant le LPS. *YdeI* et *YgiW* se localisent dans le périplasme où ils pourraient interagir respectivement avec les porines *OmpD* et *OmpF* pour augmenter la résistance bactérienne aux peptides antimicrobiens¹⁴⁸.

(d) Autres modifications de LPS

D'autres autres gènes, tels que le gène *lpxM*, ont été décrits comme impliqués dans la résistance à la colistine chez *K. pneumoniae*. *LpxM* est responsable de la modification du LPS par acétylation et par conséquent des mutations dans ce gène conduisent à une acquisition de la résistance à la colistine¹⁴⁹. Le gène *yciM* intervient aussi dans la régulation de la synthèse du LPS chez *K. pneumoniae*. Des mutations dans ce gène conduisent à une résistance à la colistine, probablement par une augmentation de la production du LPS¹⁴⁹.

b) Résistance plasmidique à la colistine

Jusqu'à la fin 2015, la résistance à la colistine était uniquement associée à des changements au niveau de gènes ou de régions régulatrices localisés sur le chromosome bactérien^{139,150}. A cette date, un gène de résistance à la colistine, appelé *mcr-1*, a été décrit pour la première fois sur un plasmide conjugatif de la bactérie *E. coli*¹⁵¹. Cette souche avait été isolée en avril

A ce jour, d'autres gènes *mcr* ont été observés, mais leur origine serait différente : *mcr-1* provient probablement d'une espèce de *Moraxella*¹⁶⁰ tandis qu'une autre espèce de *Moraxella*, *Moraxella pluranimalium*, serait le progéniteur probable de *mcr-2*¹⁶¹. Le gène *mcr-3* proviendrait des *Aeromonas* spp.^{162,163} tandis que l'origine de gène *mcr-4* serait des bactéries du milieu aquatique du genre, *Shewanella* spp.¹⁶⁴. Les origines des gènes *mcr* (*mcr-5* à -8) restent encore inconnus.

Récemment, un nouveau gène *mcr-9* a été identifié chez *S. enterica* sérotype Typhimurium, sensible à la colistine, isolé chez un patient américain en 2010¹⁶⁵. Ce gène *mcr-9* a aussi été identifié dans une souche d'*E. coli* résistante à la colistine et a révélé une fonction similaire à celle de *mcr-1*, en ajoutant un groupe phosphoéthanolamine au lipide A⁹⁹. Cette protéine Mcr-9 partage de 33% à 65% d'identité avec les autres enzymes de type Mcr plasmidique (Mcr-1 à -8) identifiées chez les *Enterobacteriaceae* (figure 39).

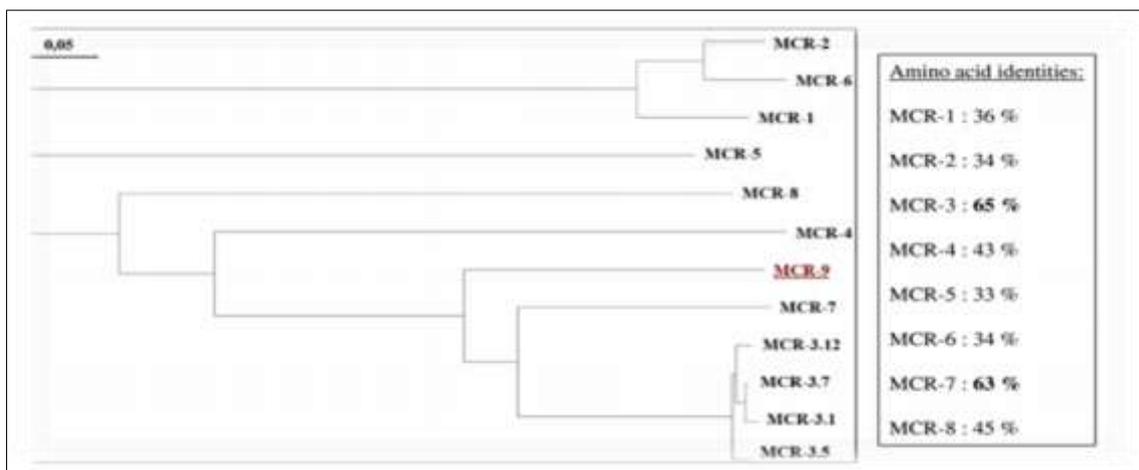


Figure 39. Arbre phylogénétique obtenu pour les phosphoéthanolamines transférases de type Mcr identifiées par la méthode de la distance en utilisant l'algorithme Neighbor-Joining (logiciel SeaView, version 4)⁹⁹

Mcr-9 partage une identité de 84% avec un gène chromosomique de *Buttiauxella gaviniae*. Ce gène n'était ni exprimé, ni inductible chez son hôte d'origine qui est sensible aux polymyxines⁹⁹.

Ainsi, les gènes *mcr* peuvent circuler sous forme silencieuse, restant non détectés à moins d'être induits par la colistine. Ces résistances plasmidiques suggèrent la possibilité d'acquisition et de diffusion rapide de la résistance à la colistine.

La forte prévalence d'isolats d'*E. coli* producteurs de *mcr*, en particulier *mcr-1* chez les animaux, peut s'expliquer par l'utilisation importante de la colistine en médecine vétérinaire^{121,166}. Chez l'homme, la prévalence des souches productrices de *mcr* semble être plus limitée, car de nombreuses études rapportent une faible prévalence du gène *mcr-1* chez les *Enterobacteriaceae* d'origine clinique^{125,167}. D'autre part, la prévalence des gènes *mcr-2* à -9 chez l'homme reste encore inconnue, même s'il y a quelques rapports concernant principalement les isolats d'animaux.

3. L'hétérorésistance à la colistine chez les entérobactéries

XIII. Définition et mécanisme d'hétérorésistance à la colistine

L'hétérorésistance à la colistine est définie lorsqu'une sous-population de la bactérie montre une résistance à cet antibiotique alors que le reste de la population y est sensible. Ainsi, l'ensemble de la population bactérienne ne réagit de la même façon, à la colistine¹⁶⁸.

Cette hétérorésistance peut être détectée en utilisant des tests *in vitro* classiques de détermination de la sensibilité aux antibiotiques¹⁶⁹, tels que l'utilisation d'E-test, ou après visualisation de puits manquants sur une gamme de CMI déterminée par la micro-méthode en milieu liquide¹⁷⁰. Un arbre décisionnel pour la détermination de l'hétérorésistance et de ces critères d'interprétation sont présentés sur la figure 40¹⁷¹.

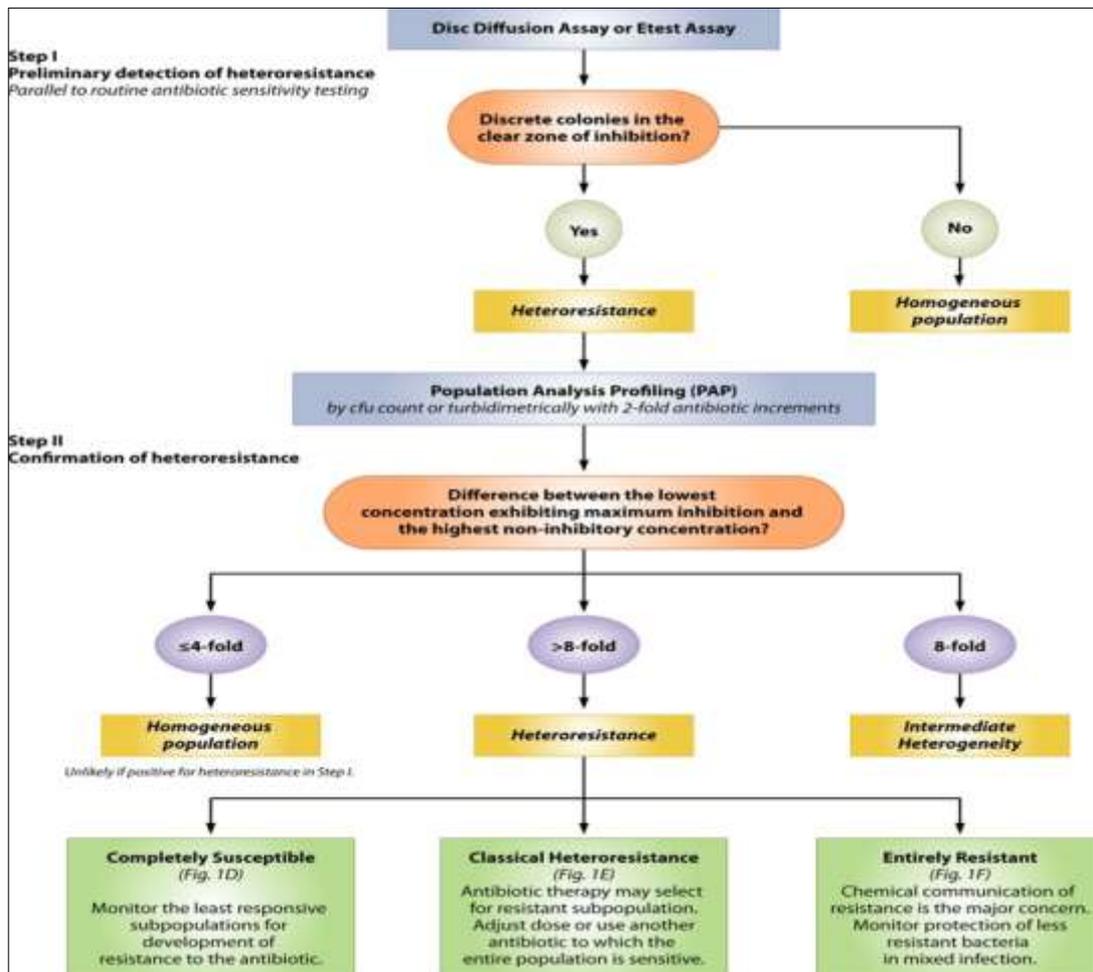


Figure 40. Détermination de l'hétérorésistance et les critères d'interprétation¹⁷¹

Des mutations dans le système *phoP/Q* ont été associées non seulement à la résistance à la colistine chez *K. pneumoniae*, mais aussi à l'hétérorésistance, conduisant à des échecs thérapeutiques par colistine chez les souris traitées¹⁷². D'autres études ont montré que l'hyperexpression du système d'efflux *acrAB-TolC*, qui était induite par le régulon SoxRS, était associée à l'hétérorésistance à la colistine chez *Enterobacter asburiae* and *Enterobacter cloacae*¹⁷³.

Jusqu'à récemment, peu de travaux avaient été décrits sur l'hétérorésistance chez les *Enterobacter* spp. Comme indiqué dans le chapitre 1, le complexe *Enterobacter cloacae* (ECC) est composé de 13 clusters (désignés C-I à C-XIII). Certains clusters : I, II, IV, VII, IX, X, XI et XII présentent un phénotype d'hétérorésistance naturelle à la colistine.¹⁷⁰

Très récemment, une étude a montré que l'expression de l'opéron *pmrHFIJKLM*, sous la régulation du système PhoP/PhoQ, et de façon indépendante au système PmrAB, était responsable de l'hétérorésistance naturelle chez une souche de complexe XI, d'*E. cloacae* sous espèce *cloacae*¹⁷⁰. Une autre étude récente a montré qu'une petite protéine codée par le gène *ecr*, Ecr de localisation membranaire, représente un nouveau mécanisme d'hétérorésistance à la colistine chez la souche WCHECI-1060 d'*Enterobacter*, appartenant à une nouvelle espèce proche d'*Enterobacter roggenkampii*¹⁷². Ces auteurs ont montré que les gènes *phoP*, *dedA(Ecl)* et *tolC* étaient nécessaires pour l'hétérorésistance à la colistine chez cette espèce d'*Enterobacter* et qu'en présence d'Ecr, l'expression de *phoP* et donc de l'opéron *arnBCADTEF*, étaient significativement augmentées¹⁷⁴ (figure 41).

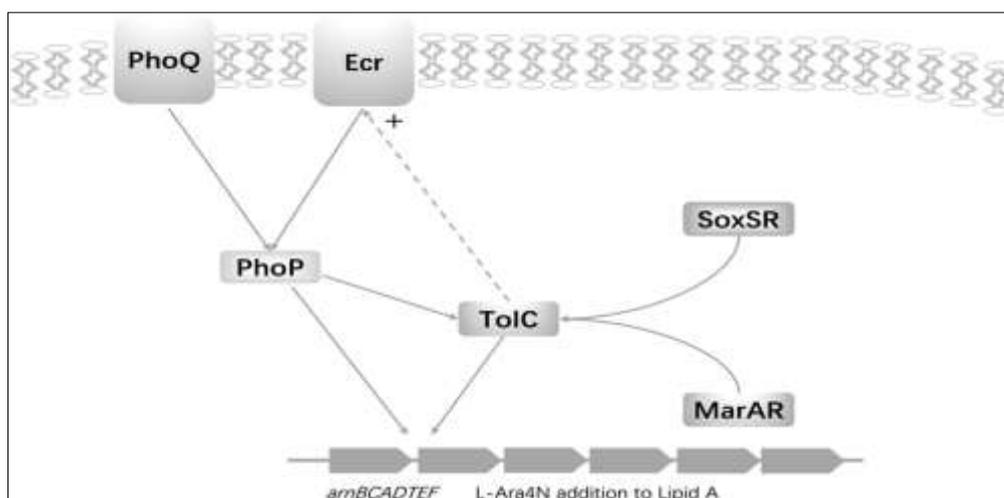


Figure 41. Mécanisme d'hétérorésistance à la colistine médié par Ecr chez une souche d'*Enterobacter* spp¹⁷⁴

OBJECTIF DU CHAPITRE 2

L'augmentation de la résistance chromosomique, ainsi que la dissémination mondiale de la résistance plasmidique à la colistine nécessite une surveillance. Chez les entérobactéries, la plupart des études sur la résistance à la colistine ont été décrites chez *K. pneumoniae*, *Salmonella* spp. et *E. coli*. Jusqu'à récemment, peu de travaux avaient été publiés sur la résistance à la colistine chez les *Enterobacter* spp.

L'objectif de cette étude a été de sélectionner un mutant, Eh22Mut (CMI, 32 mg/l), à partir de la souche multirésistante non hétérorésistante, d'*E. hormaechei steigerwaltii* (cluster VIII), Eh22, étudiée précédemment (chapitre 1). Cette souche a été renommée ici, Eh22wt (wt, pour wild-type), car elle est sensible à la colistine (CMI, 0,125 mg/l). L'analyse du mécanisme de sa résistance à la colistine a conduit à montrer la présence d'une mutation dans le gène *mgrB*. Nous avons complété cette souche avec le gène *mgrB* sauvage, en comparant avec des expériences similaires chez *K. pneumoniae*.

Des expériences préliminaires ont été initiées pour étudier la zone promotrice en amont de *mgrB* chez ces 2 espèces et d'élucider son impact sur la résistance à la colistine.

Par ailleurs, à notre connaissance, plusieurs rapports décrivent le mécanisme d'hétérorésistance chez *Enterobacter* spp., sans spécifier une concentration de colistine seuil qui déclencherait ce mécanisme^{175,176}. En revanche, ces concentrations sont indiquées pour l'hétérorésistance chez *A. baumannii*, où l'apparition de ces sous-populations serait déclenchée entre 3 à 10 µg/ml de colistine, tandis que les CMI des souches testées variaient de 0,25 à 2 mg/l¹⁷⁷. En utilisant des souches hétérorésistantes décrites dans la littérature par Guerin et al.¹⁷⁰, nous avons essayé de mettre en évidence si une telle concentration seuil pouvait être mise en évidence.

Matériels et méthodes

XIV. Matériel

A. Souches utilisées dans cette étude

Une souche non hétérorésistante à la colistine d'*E. hormaechei steigerwaltii*, de cluster VIII, nommée Eh22wt (wild-type car sensible à la colistine), a été utilisée dans cette étude. Elle provient d'un patient de la communauté (Djerba, Tunisie). Elle a été identifiée par différentes méthodes, incluant la technique de MALDI-TOF et le séquençage du rDNA 16S. L'appartenance à un cluster a été déterminée par séquençage partiel d'un fragment de 273 nucléotides du gène de ménage, *hsp60* (Heat-shock Protein-60)^{13,170}. Cette souche Eh22wt, était multirésistante aux antibiotiques, en raison de la présence d'un plasmide IncHI2 conjugatif portant différents gènes de β -lactamases incluant, *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{SHV-12}, *bla*_{DHA-1} et d'autres gènes résistants aux antibiotiques, comme le gène *qnrB4* (voir partie 1). Récemment, le gène *mcr-9* a été identifié dans cette souche. Il ne s'exprime pas, probablement en raison d'un promoteur faible.

Deux souches de *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes par production de la carbapénémase NDM-1 ont aussi été incluses dans l'étude. Elles ont été isolées chez une même patiente à 2 mois d'intervalle. Elles sont clonales comme démontrée lors d'une étude précédente, avec un pulsoptype similaire et une même séquence type, ST15¹⁷⁸. La première souche Kp5196 est sensible à la colistine et la deuxième, Kp5241 était en plus résistante à la colistine

Une souche d'*E. coli* DH5 α (ThermoFisher) a été utilisée pour les expériences de clonage du gène *mgrB*.

Pour l'étude de la concentration seuil en colistine déclenchant l'hétérorésistance chez ECC, une collection de 11 isolats d'origine clinique de complexe *E. cloacae* non apparentés provenant de plusieurs hôpitaux français a été inclus dans l'étude (don du Dr. Guerin et publiées précédemment¹⁷⁰). La souche Eh22wt a aussi été incluse dans cette partie de l'étude.

Une souche d'*E. coli* ATCC 25922 a été utilisée comme souche témoin lors de la détermination des CMI à la colistine.

B. Plasmides vecteurs utilisés

Pour la complémentation avec le gène *mgrB*, le plasmide pB a été utilisé. Il est constitué du vecteur pBR322 de 4,4kpb (New England Biolabs), plasmide à faible nombre de copies (~ 15-20 copies par cellule), qui porte un gène de résistance à la tétracycline. Le plasmide pB porte aussi un gène de résistance au triclosan, gène *mfabI*, qui a été inséré entre les sites de restriction *ScaI* et *PvuI* du vecteur pBR322, inactivant le gène de la β -lactamase, *bla*_{TEM-1}¹⁷⁹. Il est utilisé pour les expériences de transformation/complémentation des bactéries *E. coli* et Eh22. Une concentration de 4 mg/l et 0,5 mg/l de triclosan est utilisée pour la sélection et la maintenance du plasmide, respectivement.

Le plasmide pGEM-T EasyTM (Promega) a été utilisé pour sous-cloner les produits de PCR et réaliser les étapes de mutagenèse, avant de les transférer après vérification par séquençage, dans le site *EcoRI*, du plasmide pB.

XV. Méthodes de bactériologie et biologie moléculaire

A. Sélection de mutants par le test de PAP (Population Analysis Profil)

Comme décrit par Guérin *et al.* (2016)¹⁷⁰, l'analyse du profil de population (PAP) a été réalisée en étalant un inoculum élevé (~ 10¹⁰ cfu) sur milieux gélosés Luria Bertani (LB Lennox Agar) contenant de 2 jusqu'à 32 mg/l de colistine (gamme de multiple de 2).

Pour déterminer le seuil de déclenchement de l'hétérorésistance chez les 11 souches ECC de différents clusters¹⁷¹, des concentrations (de multiple de 2) allant de 0,25 à 64 mg/l de colistine ont été utilisées selon le schéma de la figure 42. Le test de PAP a été réalisé 3 fois pour chaque souche.

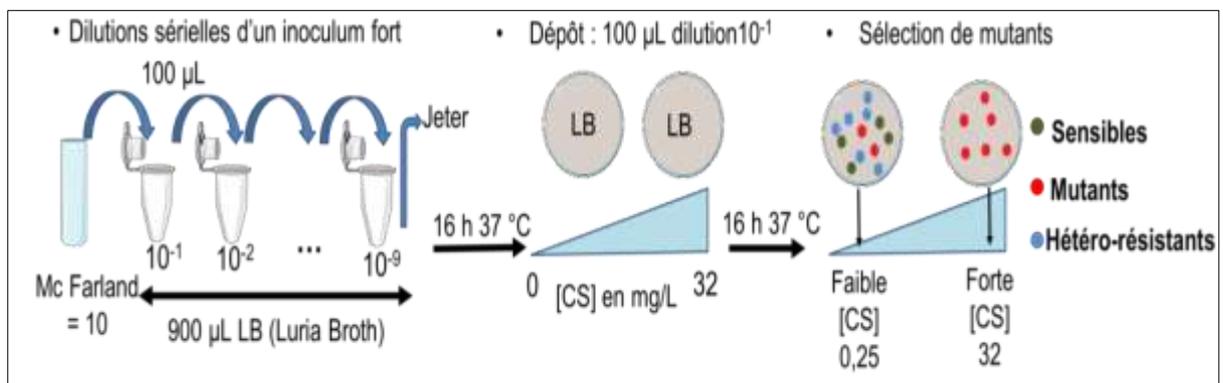


Figure 42. Sélection de mutants par le test de PAP (Population Analysis Profil)

B. Détermination de la résistance à la colistine

La détermination des CMI de la colistine des souches et des mutants a été réalisée selon la méthode standard de micro-dilution en milieu liquide Mueller-Hinton ajusté en cations divalents (MH-CA, Bio-Rad), selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, CA-SFM (<http://www.sfm-microbiologie.org>). Les CMI de chaque souche ont été réalisées au moins 3 fois lors d'expériences indépendantes. Les CMI de la colistine ont été interprétées selon les normes du CA-SFM (2019) : les isolats ayant une CMI de colistine inférieure ou égale à 2 µg/ml sont classés comme sensibles, alors que ceux dont la CMI était supérieure à 2 µg/ml sont catégorisés résistants.

Pour les souches hétérorésistantes, des "sauts de puits" ont été visualisées par la technique de micro-dilution en milieu liquide MH-CA. Les bandelettes d'E-test de colistine (E-test, bioMérieux), ont été utilisées pour déterminer la CMI et/ou pour visualiser le phénotype d'hétérorésistance à la colistine. Le E-test est une technique de diffusion en milieu gélosé MH-CA permettant de mesurer la CMI : une zone d'inhibition en ellipse de la croissance bactérienne se forme autour de la bandelette. La CMI correspond à la valeur lue à l'intersection de la culture bactérienne et de la bandelette. L'hétérorésistance est révélée par la présence de colonies "squatteuses" dans la zone d'inhibition.

C. Amplification par PCR et séquençage

Des amplifications par PCR des gènes *pmrA*, *pmrB*, *phoP*, *phoQ* et *mgrB* ont été réalisées à partir d'ADN obtenu après ébullition de lysats des souches d'*E. hormaechei steigerwaltii* (Eh22) de phénotype sauvage et muté, ainsi des 2 souches *K. pneumoniae* et sur les souches d'ECC fournies par le Dr Guerin¹⁷⁰.

Les amplifications ont été effectuées avec des oligonucléotides spécifiques (Tableau 9). Les fragments d'ADN amplifiés ont été purifiés à l'aide de colonnes Microspin Sephadryl S-400 (Amersham Biosciences). Le séquençage a été réalisé par la méthode de Sanger par la société Eurofins Genomics. Les séquences nucléotidiques ont été analysées sur le site Web du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) par le programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Tableau 9. Liste des amorces utilisées pour tester la résistance à la colistine

Nom	Séquences	Gènes
<i>mgrB</i> _EclF	CCGAATTCAGTAACTCACC	<i>mgrB</i> (<i>E. cloacae</i> complexe)
<i>mgrB</i> _EclR	ACGCAGTGAAACAAGTGC	
<i>phoQ</i> _Ecl_F	GGCCAAAAATGACTTCCAT	<i>phoQ</i> (<i>E. cloacae</i> complexe)
<i>phoQ</i> _Ecl_R	CGAATTACGCTAAATGAAAGG	
<i>phoP</i> _Ecl_F	GGCGCAATATCCCTTTCAT	<i>phoP</i> (<i>E. cloacae</i> complexe)
<i>phoP</i> _Ecl_R	CTATTCATACCATTTATAAAG	
<i>pmrA</i> _EclF	TGGCATTTCGTGCAGTATCTTTCC	<i>pmrA</i> (<i>E. cloacae</i> complexe)
<i>pmrA</i> _EclR	AACCATTAATCGCCGCGC	
<i>pmrB</i> _EclF	TACTCCTGGCAGGACGATCC	<i>pmrB</i> (<i>E. cloacae</i> complexe)
<i>pmrB</i> _EclR	ACGACGACTGGGATGAAGAC	
K <i>pmgrB</i> -112_S	ACGTTTTGAAACAAGTCGATGAT	<i>mgrB</i> (<i>K. pneumoniae</i>)
K <i>pmgrB</i> +87_AS	AGTAACTCACTCATTTCACCA	
K <i>pmgrB</i> -257_S	ACGTTTTCCTCACTGTGG	
K <i>pmgrB</i> +249_AS	GCGCATTCTGCCGCTT	
KpEE_ <i>mgrB</i> _F	GGCTATGGCGAGGATAATGAG	
KpEE_ <i>mgrB</i> _R	GCTGTGATGTAAGCGTCTGGTG	
<i>pmrA</i> ext F	CAT TTC CGC GCA CTG TCT GC	<i>pmrA</i> (<i>K. pneumoniae</i>)
<i>pmrA</i> ext R	CAG CTT TCA GTT GCA AAC AG	
<i>pmrB</i> ext F	ACC TAC GCG AAA AGA TTG GC	<i>pmrB</i> (<i>K. pneumoniae</i>)
<i>pmrB</i> ext R	GAT GAG GAT AGC GCC CAT GC	
<i>phoP</i> ext F	GAG CTT CAG ACT ACT ATC GA	<i>phoP</i> (<i>K. pneumoniae</i>)
<i>phoP</i> ext R	GGG AAG ATA TGC CGC AAC AG	
<i>phoQ</i> ext F	ATA CCC ACA GGA CGT CAT CA	<i>phoQ</i> (<i>K. pneumoniae</i>)
<i>phoQ</i> ext R	CAG GTG TCT GAC AGG GAT TA	

D. Purification des plasmides

Les plasmides ont été extraits et purifiés à l'aide du Nucleospin plasmid kit conformément aux recommandations du fournisseur (Malcherey-Nagel). La quantité et qualité de l'extraction plasmidique a été dosée par nanodrop et après électrophorèse sur gel d'agarose à 0,9%.

E. Réalisation de mutants de délétion

Des mutants de délétion de l'une ou des 2 séquences directement répétées (ou DR pour, "Direct Repeats"), localisées dans la région en amont des gènes *mgrB* des souches d'*E. hormaechei steigerwaltii* et de *K. pneumoniae*, sensibles à la colistine ont été réalisés. Les plasmides pG (pG, pour pGEM-T EasyTM) contenant soit le gène *mgrB* sauvage d'*E. hormaechei*, Eh22wt (plasmide pG-Ehwt), soit le gène *mgrB* sauvage de la souche *K. pneumoniae* Kp5196 (plasmide pG-Kpwt) ont été utilisés comme matrice. Des délétions soit de la séquence DR1 ou soit de la séquence DR2, ont été effectuées en une seule étape avec des amorces spécifiques pour chaque souche (Eh et Kp5196) (Tableau 11)

Le double mutant DR1/DR2 a été réalisé avec les amorces delDR2 en utilisant le simple mutant pG-*mgrB* délété pour DR1 (pG-Eh Δ DR1) comme matrice. Les différentes délétions ont été réalisées à l'aide de la Pfu Turbo (1 unité/mélange réactionnel) et selon les recommandations du fournisseur (Agilent). Un total de 19 cycles a été effectué, avec des étapes de dénaturation à 95°C pendant 30sec, des étapes d'hybridation des amorces entre 52° et 55°C pendant 30 sec et des étapes d'extension/polymérisation à 68°C pendant 7 minutes. Une étape terminale d'extension de 10 minutes à 68°C a été réalisée. Le mélange réactionnel a ensuite été traité avec 5 unités de DpnI (Promega) 60 min à 37°C pour éliminer la matrice.

F. Transformation dans la bactérie *E. coli* DH5 alpha

Les produits de PCR des gènes *mgrB* obtenus après ligation dans le plasmide pGEM-T EasyTM, ainsi que les différentes constructions obtenues après mutagénèse (voir paragraphe précédent), ont été utilisées pour transformer des bactéries *E. coli* DH5 alpha chimiocompétentes par une méthode thermique (42°C pendant 90 sec). La préparation des cellules chimiocompétentes d'*E. coli*, a été la même que celle décrite plus loin pour les souches d'*E. hormaechei steigerwaltii*. La sélection des plasmides recombinants effectués à partir du plasmide pGEM-T EasyTM a été réalisée sur un milieu gélosé LB (concentré 2x, LB2x), additionnée d'ampicilline à 100 mg/l.

Après vérification des constructions par séquençage en utilisant l'amorce universelle SP6 (voir séquence du vecteur pGEM-T EasyTM, Promega), les gènes *mgrB* et *mgrB* délétés en amont (Δ DR1, Δ DR2 et Δ DR1/DR2) ont été digérés par l'enzyme *EcoRI* qui permet de ressortir les gènes du vecteur. Puis après une étape d'extraction et de purification à partir de gel d'agarose (kit d'extraction de gel Macherey-Nagel, voir matériel et méthode du chapitre 1), ils ont été insérés et ligués dans le site unique *EcoRI* du plasmide pB (conférant la résistance

au triclosan et à la tétracycline) linéarisé et déphosphorylé. Après transformation de la bactérie *E. coli* DH5 alpha et sélection sur milieu gélosé LB contenant de la tétracycline à 15 µg/ml, les plasmides ont été extraits et vérifiés (digestion par EcoRI et électrophorèse en gel d'agarose et après séquençage en utilisant les amorces Tetra-161_S ou tetra + 95_AS)(Tableau 11).

G. Préparation de cellules chimiocompétentes *E. cloacae*

Les bactéries ont été cultivées à 37°C, avec agitation jusqu'à une densité optique (DO) de 0,5 à 600 nm. Après centrifugation (15 min à 8000 g), les cellules contenues dans le culot ont été resuspendues dans un tampon RF1 (Tableau 10) et maintenues pendant 20 min à une température de 4°C avant d'être de nouveau centrifugées et resuspendues dans un tampon RF2 (Tableau 9).

Tableau 10. Tampons pour préparer les cellules chimiocompétentes

Tampon RF1 (pour 1 litre) :		Tampon RF2 (pour 1 litre) :	
RbCl (100 mM)	12 g	MOPS (10 mM)	20 ml de 0,5M à pH 6,8
MnCl ₂ , 4H ₂ O (50 mM)	9,9 g	(Ajuster le MOPS à pH 6,8 avec NaOH)	
Acétate de K ⁺ (30 mM)	30 ml d'une solution à	RbCl (10 mM)	1,2 g
1 M, pH 7,5		CaCl ₂ , 2H ₂ O (75 mM)	11 g
CaCl ₂ , 2H ₂ O (10 mM)	1,5 g	Glycérol (15%)	150 ml
Glycérol (15%)	150 g (150 ml)		
pH 5,8 (avec de l'acide acétique 0,2 M)			

H. Préparations de cellules électrocompétentes de *K. pneumoniae*

Une culture bactérienne de *K. pneumoniae* a été incubée à 37°C sous agitation, jusqu'à l'obtention d'une DO de 0,7 à 600 nm, puis la suspension bactérienne a été immédiatement refroidie. Après centrifugation, les cellules ont été lavées à une température de 4°C, à 3 reprises avec de l'eau ultrapure (MilliQ). Le dernier lavage permet de concentrer les cellules (au moins 100x) dans un minimum de volume d'eau contenant 10% de glycérol, permettant de conserver des aliquots de cellules électrocompétentes à -80°C.

I. Transformation dans les souches résistantes à la colistine

Les extraits d'ADN plasmidique contenant les différentes constructions *mgrB* insérés dans la même orientation dans le plasmide pB, ont été utilisées pour transformer les souches Eh22mut ou Eh22wt chimiocompétentes par choc thermique (42°C pendant 90 sec) ou par

électroporation (Kp5241). L'électroporation a été réalisée à l'aide du Gene Pulser II (Bio-Rad) (200 Ohms, 25µF et 12,5 Kv/cm).

Les transformants ont été sélectionnés sur gélose MH contenant 4 mg/l de triclosan, après incubation 24 h à 37°C.

Tableau 11. Amorces utilisées pour les étapes de sous-clonage et de clonage chez Eh22 et *K. pneumoniae*

Amorces PCR	Séquences	Tm(a)
<i>mgrB</i> -EclF	CCGAATTCAGTAACTCACC	50,4 °C
<i>mgrB</i> -EclR	ACGCAGTGAAACAAGTGC	54 °C
<i>KpmgrB</i> -112_S	ACGTTTTGAAACAAGTCGATGAT	55,3 °C
<i>KpmgrB</i> +87_AS	AGTAACTCACTCATTTACCA	54 °C
<i>EhmgrBdel</i> DR1_S	CTGTTGAAGGTAGCCCCTGTTTAA	61 °C
<i>EhmgrBdel</i> DR1_AS	TTAAACAGGGGCTACCTTCAACAG	61 °C
<i>EhmgrBdel</i> DR2_S	ACAGTTAGCCCCAAGATAACCGTG	62,7 °C
<i>EhmgrBdel</i> DR2_AS	CACGGTTATCTTGGGGCTAACTGT	62 °C
<i>EhmgrBdel</i> DR2/DR1_S	AAGGTAGCCCCAAGATAACCGTGA	62,7 °C
<i>EhmgrBdel</i> DR2/DR1_AS	TCACGGTTATCTTGGGGCTACCTT	
<i>KpmgrB</i> -112_S	ACGTTTTGAAACAAGTCGATGAT	55,3 °C
<i>KpmgrB</i> +87_AS	AGTAACTCACTCATTTACCA	54 °C
<i>KpmgrBdel</i> DR1_S	CCTTTCGTAATAGCCGCGGTTTAA	61 °C
<i>KpmgrBdel</i> DR1_AS	TTAAACCGCGGCTATTACGAAAGG	61 °C
<i>KpmgrBdel</i> DR2_S	GTTAGCCGCAAGAAGGCC	58,2 °C
<i>KpmgrBdel</i> DR2_AS	GGCCTTCTTGCGGCTAAC	58 °C
<i>KpmgrBdel</i> DR2/DR1_S	GTAATAGCCGCAAGAAGGCCGT	62,1 °C
<i>KpmgrBdel</i> DR2/DR1_AS	ACGGCCTTCTTGCGGCTATTAC	62 °C
Tetra-161_S	TTCCCCGAAAAGTGCCAC	56 °C
Tetra+94_AS	CGGAATGGACGATATC	49,2

(a), Tm, température de fusion (ou melting)

Résultats

Etude d'un mutant *mgrB* chez *E. hormaechei steigerwaltii*

XVI. Sélection du mutant Eh22-mut d'*E. hormaechei steigerwaltii*

La souche Eh22-wt présente une CMI de la colistine de 0,125 mg/l, sans phénomène d'hétérorésistance comme décrit précédemment (Guérin, 2016). En utilisant l'analyse PAP, un mutant résistant à la colistine, nommé Eh22-Mut, a été sélectionné à basse fréquence ($\sim 10^{-9}$) sur milieu gélosé LB contenant 8 mg/l de colistine. La MIC de colistine de Eh22-Mut était de 32 mg/l.

L'analyse de séquence des gènes *pmrA*, *pmrB*, *phoP* et *phoQ* n'a révélé aucune différence entre Eh22-wt et Eh22-Mut. En revanche, la région amplifiée de *mgrB*, composée de 113 pb en amont du codon d'initiation (GTG) et de 144 pb correspondant à son cadre de lecture ouvert (Figure 43), a montré une délétion d'une adénine dans la région codante de gène *mgrB* d'Eh-Mut, entraînant la formation d'une protéine tronquée de 6 acides aminés au lieu de 47 acides aminés pour MgrB sauvage.



Figure 43. Séquences de la région codante et en amont du gène *mgrB* d'Eh22-wt

Les répétitions directes (DR) potentielles de liaison de la protéine PhoP-phosphorylée sont indiquées en vert et par des flèches. Elles ont été définies par comparaison avec d'autres entérobactéries (Ninagawa et al. 2003)¹³⁰. Le +1 (début de transcription) est aussi indiqué en vert. La région -10 du promoteur putatif et du site de liaison aux ribosomes (RBS) sont soulignés. Le codon d'initiation de MgrB est indiqué en gras et son cadre ouvert de lecture est montré en italique. Une suite de 7 adénines est encadrée. Cette séquence n'est que de 6 adénines pour Eh22-Mut (données non présentées).

XVII. Probable délétion de gène *mgrB* de la souche *K. pneumoniae* 5241

L'amplification des gènes *pmrA*, *pmrB*, *phoP* et *phoQ* n'a révélé aucune différence entre les 2 souches de *K. pneumoniae*, Kp5196 et Kp5241, respectivement sensible (2 mg/l) et résistante (64 mg/l) à la colistine¹⁷⁸. En revanche, aucune amplification de *mgrB* n'a pu être détectée chez Kp5241, suggérant une délétion de ce gène contrairement à la souche sensible, Kp5196 pour laquelle un produit d'amplification de la taille attendue est obtenu (figure 44). De tels évènements génétiques ont déjà été décrits comme responsable de la résistance à la colistine chez *K. pneumoniae*¹²⁸.

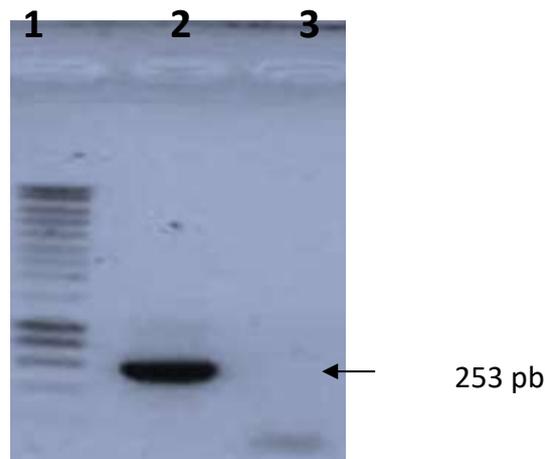


Figure 44. Amplification de gène *mgrB* avec les amorces *KpmgrB*-112_S et *KpmgrB*+87_AS (Tableau 11)

Piste 1, marqueur de taille ; piste 2, Kp5196 CsS ; Piste 3, Kp5241 CsR

XVIII. Complémentation d'Eh22-Mut avec le gène *mgrB* sauvage d'Eh22-wt et complémentation de Kp5241 avec le gène *mgrB* sauvage de Kp5196

Pour confirmer si la mutation dans le gène *mgrB* était impliquée dans la résistance à la colistine, le gène *mgrB* sauvage de Eh22-wt a été introduit dans Eh22-Mut (plasmide pB-Ehwt). Pour valider la procédure et l'utilisation du plasmide pB (résistance au triclosan), des expériences ont été réalisées en parallèle en transformant Kp5241 avec le plasmide pB-Kpwt (*mgrB* de Kp5196).

Les transformants ont été sélectionnés sur milieu MH agar contenant 4 mg/l de triclosan. Puis des CMI de la colistine par la microméthode en milieu liquide MH contenant avec 0,5 mg/l triclosan (pour assurer la maintenance du plasmide) ont été réalisées (au moins 3 expériences indépendantes).

Comme montré dans le Tableau 12, la moyenne des CMI de la colistine obtenue pour les transformants de Eh22-Mut avec le plasmide pB-Ehwt ont été de 0.062 mg/l (écart-type de 0,045). La diminution de la résistance à la colistine était de 258 fois (0.062 mg/l *versus* 16 mg/l avec le plasmide pB sans *mgrB* ou avec le gène *mgrB* muté) (Tableau 11). Pour les transformants de Kp5241 avec le plasmide pB-Kwt, la diminution des CMI de la colistine est du même ordre de grandeur (290 fois, soit de 0,11 mg/l *vs* 32 mg/l). Ces expériences de complémentation confirment que le changement dans *mgrB* chez ces 2 souches était responsable de la résistance à la colistine.

Tableau 12. Valeurs de CMI de colistine de souches et de transformants d'*E. hormaechei* et *K. pneumoniae* contenant différentes constructions du gène *mgrB*.

Plasmides	CMI de la colistine (mg/l) des souches et transformants (écart-type) ^(a, b)			
	<i>E. hormaechei</i>		<i>K. pneumoniae</i>	
	Eh22-wt	Eh22-Mut	Kp5196	Kp5241
-	0,125 ^(c)	32 ^(c)	2 ^(c, d)	64 ^(c, d)
pB	-	16 (0) ^(e)	-	32 (0)
pB-Ehwt	-	0,062 (0,045)	-	0,11 (0,026)
pB-EhΔDR1	-	0,20 (0,29)	-	0,10 (0,036)
pB-EhΔDR2	-	0,20 (0,29)	-	0,10 (0,036)
pB-EhΔDR1/DR2	-	1,25 (0,5)	-	10,0 (3,7)
pB-Kpwt	-	0,043 (0,023)	-	0,11 (0,031)
pB-KpΔDR1	-	0,11 (0,018)	-	0,10 (0,036)
pB-KpΔDR2	-	0,11 (0,018)	-	0,25 (0)
pB-KpΔDR1/DR2	-	0,38 (0,48)	-	10,66 (3,58)

(a), Moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes, (b) l'écart-type est indiqué entre parenthèse (c) Valeurs obtenues sans triclosan. Pour les autres expériences, les valeurs sont obtenues avec une concentration finale de 0,5 mg/l de triclosan (utilisée pour la maintenance plasmidique), (d) Valeurs CMI selon Arpin et al.¹⁷⁸, (e) Plasmide sans le gène *mgrB* ou avec son propre gène *mgrB* muté, -: non déterminé.

XIX. Complémentation croisée du gène chez les 2 souches Eh22-mut et Kp5241

MgrB est conservé chez les Entérobactéries, comme montré dans l'étude de Lippa et al.¹²⁷. Dans la figure 45, l'alignement des séquences protéiques entre Eh22wt et Kp5196 révèle une différence de 12 acides aminés, avec une identité de 74% et une similarité de 93%. La région en N-terminal qui correspond au domaine transmembranaire est la moins conservée.

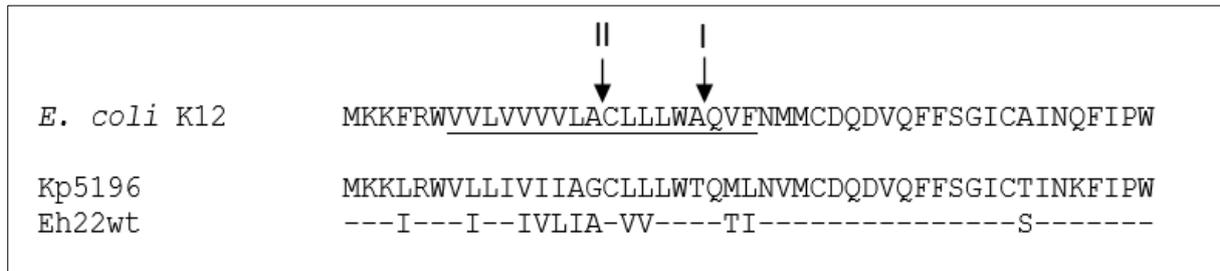


Figure 45. Comparaison de MgrB chez Kp5196, Eh22wt et *E. coli* K12.

Chez *E. coli*, la région d'un domaine potentiel transmembranaire est soulignée. Les flèches marquées I and II montrent un potentiel signal de sites de clivage de type I et II¹²⁷.

La complémentation croisée entre ces 2 espèces a été réalisée et les résultats ont montré des CMI comparables (Tableau 12) : la CMI moyenne de Eh22-Mut avec le plasmide pB-Kpwt, est de 0,043 mg/l (diminution de 372 fois), et celle de Kp5241 avec le pB-Ehwt est de 0,11 mg/l (diminution de 290 fois). Les différences d'acides aminés ne jouent aucun rôle dans la résistance à la colistine.

XX. Etude de la séquence en amont du gène *mgrB* chez *E. coli* Eh22-wt et Kp5196

Pour essayer de comprendre le rôle de la région en amont du gène *mgrB* chez *E. hormaechei steigerwaltii*, des expériences préliminaires ont été réalisées.

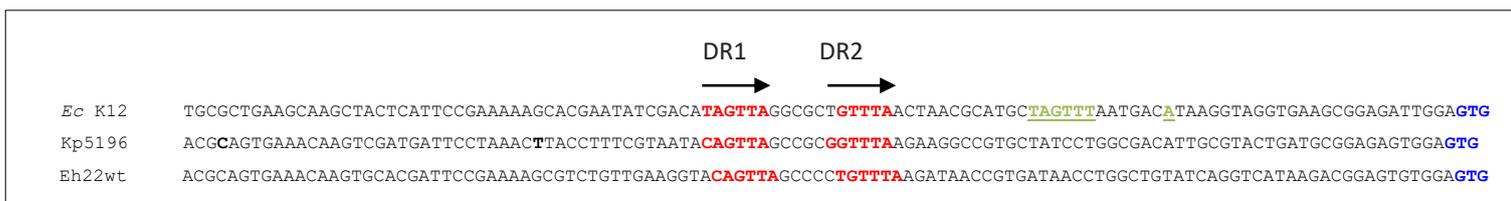


Figure 46. Alignement des régions en amont du gène *mgrB* chez *E. coli* souche K12 (Ec K12), Kp5196 et Eh22wt

Les séquences DR1 et DR2 sont notées en rouge et indiquées par des flèches en haut de la figure. La séquence -10 du promoteur et le +1 de transcription chez *E. coli* sont notés en vert et souligné. Les codons d'initiation sont notés en bleu.

Chez *E. coli*, il a été démontré expérimentalement que cette région en amont du gène *mgrB* présente des séquences de fixation pour le régulateur PhoP-phosphorylé, appelées séquences (ou box) DR1 et DR2 (figure 46). Le +1 de transcription chez *E. coli* a aussi été déterminé expérimentalement (figure 46). Pour vérifier l'impact de la délétion des séquences DR1 et DR2 chez Eh22wt et Kp5196, différentes constructions ont été effectuées (figure 47).

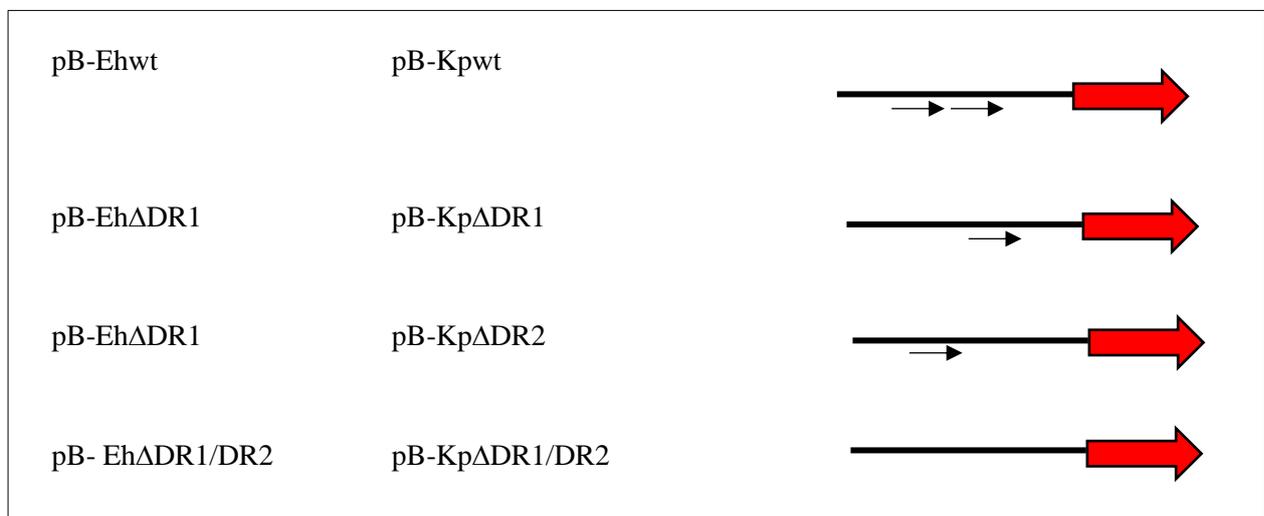


Figure 47. Schéma des différentes constructions comprenant les délétions des séquences DR1 ou DR2 ou DR1/DR2

Comme indiqué dans le Tableau 12, chez Kp5241, les délétions d'une seule des 2 régions ne semble pas (DR1) ou peu (DR2, 2 fois) affecter les CMI en comparaison avec la région non mutée : 0,10 mg/l pour pB-KpΔDR1 et 0,25 mg/l pour pB-KpΔDR2 *versus* 0,11 mg/l pour pB-Kpwt.

Chez Eh22-Mut, la délétion d'une seule région (DR1 ou DR2) augmente les CMI de 3 fois : 0,2 mg/l au lieu de 0,062 mg/l (Tableau 12). L'impact des 2 délétions DR1 et DR2 est plus importante chez Kp5241 (CMI, 10,66 mg/l au lieu de 0,11 mg/l pour pB-Kpwt). La souche est 100 fois moins sensible. Chez Eh22-Mut, (CMI, 1,25 mg/l au lieu de 0,062 mg/l pour pB-Ehwt), elle est seulement 20 fois moins sensible (Tableau 12).

Quand on compare les complémentations croisées, les résultats sont similaires chez Kp5241, que ce soit avec pB-Kp Δ DDR1/DR2 ou pB-Eh Δ DDR1/DR2 ; les CMI sont augmentées de 100 fois. Au contraire chez Eh22-Mut, avec pB-Kp Δ DDR1/DR2, la CMI n'est augmentée que de 8 fois alors qu'avec son propre gène (pB-Eh Δ DDR1/DR2), elle augmente de 20 fois (Tableau 12). Ces résultats pourraient suggérer un rôle différent des séquences DR1 et DR2 chez ses 2 espèces

XXI. Etude de l'hétérorésistance chez différentes ECC (*E. cloacae* complexe)

A. Analyse de souches appartenant à différents clusters

Une étude de Guérin *et al.*¹⁷⁰ publiée en 2016, décrivait que les clusters III, VI et VIII des complexes d'*E. cloacae*, très souvent retrouvés en clinique, n'étaient pas concernés par l'hétérorésistance. Elles sont catégorisées comme souches sensibles après des fréquences de mutations élevées pour certains de ces clusters.

Nous avons refait les tests de PAP avec 7 souches de clusters III, VI et VIII. Nos résultats confortent les données de Guérin *et al.*¹⁷⁰, à l'exception de la souche CAE 43(cluster III) et CAE 15 (cluster VIII), qui peuvent être touchées par le mécanisme d'hétérorésistance (Tableau 13).

La gamme de concentrations de colistine utilisée pour déterminer les fréquences de mutations ainsi que le phénotype d'hétérorésistance variait entre 0,25 mg/l et 64 mg/l (gamme de raison 2 de colistine), contrairement à l'étude de Guérin *et al.*¹⁷⁰ où la gamme de concentration de colistine testée variait entre 2 mg/l et 64 mg/l.

Tableau 13. Fréquences de mutation chez 7 souches d'ECC appartenant à des clusters 'cliniques'

Cluster III clinique			Cluster VI clinique		Cluster VIII clinique	
CAE 43	CAE 165	CAE 42	CAE 44	CAE 160	CAE 15	CAE 102
S	S	S	S	S	S	S
+++	+	+	+	+	+++	+

Avec S : sensible, +++ : fréquence de mutation élevée, + : fréquence de mutation faible.

Nous pensons que ce mécanisme d'hétérorésistance a pu être sélectionné par de faibles concentrations en colistine, entre 0,25 et 2 mg/l. C'est pour cette raison que Guérin *et al*¹⁷⁰ ne l'a pas sélectionné.

Par la méthode E-test, la souche CAE 15 sauvage et la souche CAE 15 hétérorésistante présentent un phénotype identique (figure 48).

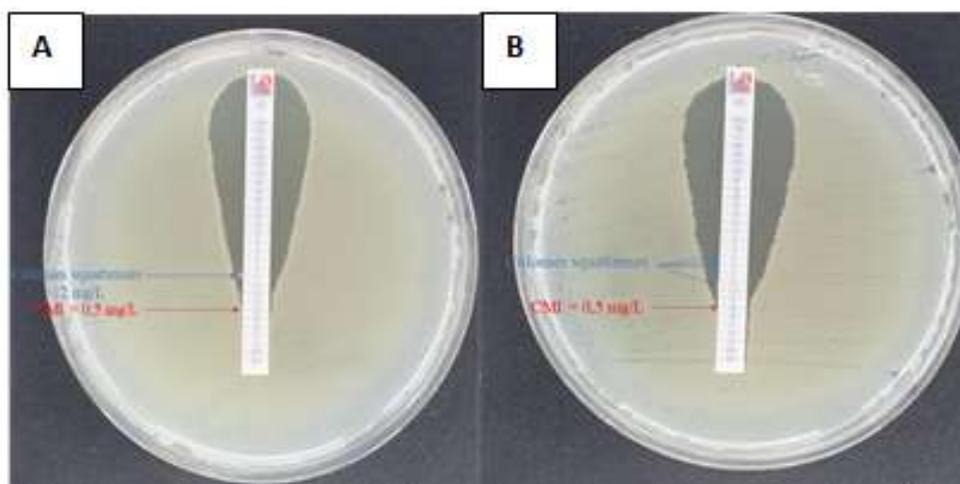


Figure 48. E-test à la colistine pour les souches CAE 15 sauvage (A) et CAE 15 hétérorésistante (B), flèche bleue : colonies « squatteuses » < 2 mg/l de colistine, flèche rouge : CMI= 0,5 mg/l de colistine.

Par contre, lors de la CMI en milieu liquide, des "sauts de puits" ont été constatés pour ces souches (CAE 15 et CAE 43).

On constate également que ces 2 souches présentant un phénotype d'hétérorésistance déclenché par une faible concentration en colistine, sont également des souches pour lesquelles une fréquence de mutation élevée à été retrouvée (Tableau 13). Une probable corrélation existe entre une forte fréquence de mutation à fortes concentrations en colistine et la présence d'hétérorésistants obtenus à faibles concentrations

Ainsi, nos résultats de CMI montrent que certaines souches de clusters d'origine clinique C-III et C-VIII peuvent être touchés par le phénomène d'hétérorésistance (Tableau 14).

Tableau 14. Profil des souches de clusters cliniques du complexe d'*E. cloacae*

[CS] au PAP mg/l	Cluster III clinique CAE 43	Cluster VI clinique CAE 42 CAE 44		Cluster VIII clinique CAE 15
0,25	-	-	-	HR/R/S
0,5	HR	S	S	S/HR
1	R/HR	S	S	S/HR/R
2	R	-	-	R/HR
4 à 32	R	-	-	R
Fréquence de mutation	+++	+	+	+++

Après un test de PAP (concentration en colistine de 0,25 jusqu'à 32 mg/l.
Souche S ; sensible, R ; résistante, HR ; hétérorésistante.

Discussion

Depuis sa réintroduction pour le traitement d'infections humaines sévères liées à des bactéries résistantes à toutes les autres options thérapeutiques, telles que des souches de *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes, des résistances à la colistine ont été de plus en plus décrites¹²⁹. Elles ont aussi été documentées chez des souches du complexe *Enterobacter cloacae* qui sont des bactéries pathogènes opportunistes très souvent associées à des infections associées aux soins chez des patients immunodéprimés^{37,120}.

L'inactivation de gène *mgrB*, codant pour un régulateur à rétro-action négative du système de signalisation *phoQ/phoP*, a été précédemment montré comme étant responsable de la résistance à la colistine chez des souches de *K. pneumoniae*, et notamment chez des souches multi-résistantes productrices de carbapénémases¹²⁹.

Dans ce travail, nous avons étudié une souche isolée chez un patient ayant une infection urinaire. Cette souche Eh22, multirésistante aux antibiotiques, appartient au complexe C-VIII des ECC, *E. hormaechei steigerwaltii*, et a très souvent été retrouvée en clinique. Eh22 n'était pas hétérorésistante et sa fréquence de mutation était faible ($\sim 10^{-9}$). Comme les mécanismes de l'hétérorésistance ont été étudiés chez une souche de complexe XI¹⁷⁴, nous avons voulu nous focaliser sur une souche de complexe VIII, non hétérorésistante, et étudier le(s) mécanisme(s) qui lui permettent de conférer la résistance à la colistine.

Ainsi un mutant (Eh22-Mut) a été obtenu et nous avons démontré par des expériences de complémentation que la résistance à la colistine était due à une mutation dans le gène *mgrB*.

A notre connaissance, c'est la première fois qu'une mutation dans ce gène associé à la résistance à la colistine est montrée chez le genre *Enterobacter* spp. Le gène *mgrB* joue un rôle dans l'acquisition de la résistance à la colistine chez les souches du complexe VIII. Il serait intéressant de vérifier son importance chez des souches d'autres complexes.

Les résultats obtenus avec la stratégie adoptée sont similaires à ceux réalisées chez une souche d'origine clinique de *K. pneumoniae* avec un gène *mgrB* délété (Kp5241). Chez cette espèce bactérienne, le rôle de MgrB dans la résistance a déjà été décrit¹²⁹, et nos résultats confortent les données de la littérature et le rôle important du gène *mgrB* dans la résistance à la colistine.

Ainsi, les souches du complexe VIII d'*E. cloacae*, malgré l'absence décrite de connecteur PmrD^{137,170} qui est présent chez *E. coli* et *K. pneumoniae*, sont capables d'être résistantes par manque de MgrB.

La complémentation croisée de MgrB entre les espèces *K. pneumoniae* et *E. hormaechei steigerwaltii* n'a pas montré une différence au vu des résultats de CMI. Nos données confirment que les 12 différences de séquences protéiques observées entre ces deux espèces ne sont pas critiques pour la fonction de MgrB.

L'approche expérimentale réalisée dans ce travail est la complémentation du gène *mgrB* exprimé sous la dépendance de son propre promoteur.

La zone en amont de gène *mgrB* contient un promoteur putatif, identifié *in silico* dans plusieurs études chez *K. pneumoniae*¹²⁹. Cependant nous avons délété une autre zone démontré expérimentalement chez *E. coli* par Minagawa *et al.*¹³⁰ comme étant une zone promotrice et un site de fixation de PhoP-P (figure 35). La simple délétion DR1 ou DR2, que ce soit chez *E. hormaechei steigerwaltii* ou chez *K. pneumoniae*, semble altérer légèrement la régulation de gène *mgrB* chez les 2 espèces. Cependant, la double délétion des 2 box, DR1 et DR2 augmente significativement la résistance chez ces 2 espèces.

Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour savoir si cela est dû à la non fixation de la protéine régulatrice PhoP-phosphorylée, ou une altération de la région promotrice, ou le 2, ou peut-être lié à un autre mécanisme de régulation.

Concernant l'étude sur l'hétérorésistance, il a été décrit dans la littérature que les souches appartenant aux complexes C-VIII, C-III et C-VI, sont les plus fréquemment retrouvées dans des échantillons humains d'origine clinique^{92,170}. D'après Guérin *et al.*¹⁷⁰, l'hétérorésistance à la colistine peut être reliée aux clusters. Les souches d'ECC de clusters I, II, IV, VII, IX, X, XI et XII sont habituellement hétérorésistantes, tandis que celles de clusters III, V, VI, VIII et XIII ont été classés comme sensibles et non hétérorésistantes.

Cependant, dans notre étude, 2 souches de cluster V et VIII ayant une forte fréquence de mutation ($\sim 10^{-7}$), ont permis de sélectionner des souches hétérorésistantes à la colistine par le test de PAP¹⁷⁰. Nous avons sélectionné ces hétérorésistants à des faibles concentrations de colistine : 0,25 mg/l jusqu'à 2 mg/l, contrairement aux données publiés par Guérin *et al.* (2 mg/l jusqu'à 64 mg/l de colistine). Nos données préliminaires (faible nombre de souches) tendent à montrer une corrélation entre une forte fréquence de mutation et l'apparition d'hétérosistance chez quelques souches de clusters cliniques.

Par ailleurs, cette sélection (test de PAP) a été réalisée sur milieu gélosé LB, comme préconisé par Guerin *et al.*¹⁷⁰. Des expériences préliminaires semblent indiquer que l'utilisation de géloses MH (avec des différences dans les concentrations en fer et magnésium qui sont moins élevées que dans le milieu LB) ne permet pas de sélectionner de souches

hétérorésistantes (données non montrées). Ainsi, nos résultats sembleraient indiquer que l'apparition d'hétérorésistance serait due non seulement à une concentration faible de colistine et aussi dépendant des conditions du milieu.

Des données récentes sur l'analyse du mécanisme de l'hétérorésistance d'une souche d'ECC de cluster XI montrent l'implication du système PhoPQ dans l'hétérorésistance qui agit de manière indépendante de PmrAB^{170,180}. Il a été démontré que chez *E. coli*, de faibles concentrations en Mg²⁺ permettent de stimuler le senseur PhoQ qui va activer *phoP*¹²⁷. Des expériences complémentaires utilisant des milieux avec des concentrations connues en ions Mg²⁺ seraient intéressantes pour évaluer les concentrations déclenchant ce mécanisme d'hétérorésistance chez les ECC.

Conclusion

Le mécanisme de résistance à la colistine a été bien étudié chez plusieurs entérobactéries, mais reste moins bien connu chez les souches du complexe *E. cloacae*. Nous décrivons pour première fois que le gène *mgrB* est impliqué dans la résistance à la colistine chez une souche de cluster VIII, cluster très souvent retrouvé en clinique.

Même si des expériences complémentaires sont nécessaires, nos données indiquent aussi que certaines régions en amont du gène *mgrB* sont critiques et interviennent probablement dans la régulation de ce gène, aussi bien chez ECC de cluster VIII que chez *K. pneumoniae*.

L'étude préliminaire sur l'hétérorésistance montrerait que les souches d'ECC associées à une forte fréquence de mutation sont hétérorésistantes, et qu'il serait possible de déclencher l'hétérorésistance de certaines souches en les sélectionnant sur une faible concentration en colistine (concentration subinhibitrice) et en présence d'une forte concentration en magnésium.

Chapitre 3: Les bactériocines ou bactériocines-like, une alternative potentielle aux traitements par les antibiotiques

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction

L'utilisation massive et le mésusage des antibiotiques en santé humaine et animale a conduit à l'émergence de bactéries multirésistantes (BMR), voire pan-résistantes qui rendent les traitements antibiotiques inefficaces⁴. En 2014, l'organisation mondiale de la santé (OMS) a publié un rapport ("Résistance aux antimicrobiens : rapport mondial sur la surveillance") qui fait le point sur l'ampleur inquiétante des BMR au niveau mondial. En 2015, l'OMS adopte un plan d'action mondial pour combattre la résistance aux antibiotiques et a établi une liste d'agents pathogènes prioritaires pour la recherche et développement de nouveaux agents antimicrobiens. Parmi les bactéries de niveau 1 (niveau critique), on retrouve les bacilles à Gram négatif comme *A. baumannii* et *P. aeruginosa* résistants aux carbapénèmes et les entérobactéries ; comme *E. coli* et *K. pneumoniae* producteurs de BLSE et de carbapénémase.

Une des voies de recherche pour combattre ces BMR serait de trouver de nouvelles classes de molécules (ou antibiotiques) en faisant appel à la capacité de certaines bactéries à produire naturellement des substances antibactériennes telles que les bactériocines¹⁸¹⁻¹⁸³. Des données sur la recherche des bactériocines et leurs applications en médecine préventive et/ou thérapeutique offre une alternative prometteuse.

Des bactéries productrices de bactériocines ont été isolées de plantes, eaux, sols, animaux, nourriture. Généralement les bactériocines sont produites par des bactéries à Gram positif et sont inhibitrices d'autres souches à Gram positif, et sont souvent moins efficaces contre les souches à Gram négatif. Les bactéries lactiques sécrètent souvent des bactériocines appartenant à la classe des lantibiotiques et d'autres petits peptides linéaires (classe IIa). D'autres bactéries à Gram positif comme le groupe *Bacillus cereus*, en particulier *Bacillus thuringiensis*, qui synthétise aussi des composés ayant une activité antimicrobienne contre les insectes, apparaissent comme une voie attrayante pour l'obtention de bactériocines (ou de bactériocin-like inhibitrice substances) montrant de nouvelles activités¹⁸⁴.

XXII. Les bactériocines

A. Définition

Une bactériocine est un peptide synthétisé par des bactéries présentant une activité inhibitrice contre des bactéries à Gram positif et à Gram négatif et, dans une moindre mesure, contre les champignons. Les bactériocines sont habituellement produites en réponse à un stress comme le manque de nutriments ou la surpopulation, aboutissant à l'élimination rapide (en tuant ou bloquant la croissance) des autres micro-organismes présents dans le même environnement. Cette réponse à un environnement défavorable permet à la bactérie productrice de survivre et cela lui confère un avantage sélectif vis-à-vis des autres populations bactériennes

L'efficacité antimicrobienne des bactériocines a été montrée expérimentalement par la mise en évidence *in vitro* et *in vivo* de leur capacité à inhiber directement le développement de souches bactériennes pathogènes¹⁸⁵. Le pouvoir anti-infectieux des bactériocines associé à leur faible toxicité a suscité un vif intérêt pour leur utilisation dans le milieu industriel. Ainsi, plusieurs bactériocines, comme la nisine et la pédiocine, ont été extraites et purifiées pour être utilisées comme agents de conservation des produits alimentaires^{186,187}. Des bactériocines purifiées, ou des probiotiques produisant des bactériocines, ont aussi montré leur capacité à réduire le nombre de bactéries pathogènes ou à modifier la composition du microbiote intestinal chez des modèles animaux, tels que les souris, les poulets et les porcs^{188,189}.

B. Classification

Les bactériocines constituent un groupe hétérogène de peptides qui varient considérablement selon leur poids moléculaire, leur structure, leurs propriétés biochimiques, leur spectre et mode d'action. Cette grande disparité a rendu leur classification difficile. Plusieurs classifications ont été proposées et jusqu'à 5 classes principales de bactériocines ont été évoquées^{190,191}. Cotter et al.¹⁸² ont révisé cette classification et suggéré 3 classes des bactériocines (Tableau 15). Nous nous baserons sur cette classification qui divise les bactériocines en 2 classes principales : la classe I des lantibiotiques contenant de la lanthionine et la classe II, des bactériocines non-lanthionines. Une troisième classe d'hydrolases du peptidoglycane hydrolabile de grande taille est appelée «bactériolysines». (anciennement classée en bactériocines de classe III).

Tableau 15. Classification des bactériocines selon Cotter et al ¹⁸²

Classification	Remarques / suggestions	Exemples
Classe I		
bactériocines contenant de la lanthionine / lantibiotiques	Comprend à la fois un à 2 peptides. Les lantibiotiques; jusqu'à 11 sous-classes ont été proposé	Un seul peptide: nisine, mersacidine, la lacticine 481; 2 peptides: lacticine 3147, cytolysine
Classe II		
bactériocines ne contenant pas de lanthionine	Classe hétérogène de petits peptides; comprend des substances apparentées à la pédiocine (sous-classe des bactériocines), bi-peptide (bactériocines de la sous-classe b), cyclique (sous-classe c; anciennement classe V), non-pédiocine peptides linéaires simples (sous-classe d)	Classe IIa: pédiocine PA1, la leucocine A; classe IIb: lactacine F; classe IIc: entéroccine AS48, reutérine 6; classe IId: lactococcine A, divergicine A
Bactériolysines		
Protéines lytiques non bactériocines ‡	Grandes protéines thermolabiles, souvent de la muréine (peptidoglycane) hydrolase	lysostaphine, entérolysine A

1. Les différentes classes de bactériocines

a) Les bactériocines de classe I : les lantibiotiques

La classe 1 se compose de lantibiotiques qui sont des petits peptides de taille inférieure à 5 kDa (longueur de 19 à 38 acides aminés) contenant des acides aminés soufrés comme la lanthionine ou d'autres, comme la β -méthyllanthionine, déhydroalanine, déhydrobutyrine Ces résidus inhabituels résultent de modifications post-traductionnelles ^{192,193}. Les lantibiotiques sont synthétisés sous forme de pro-peptides inactifs, puis modifiés post-traductionnellement par déshydratation des acides aminés et/ou formation de ponts thioéthers pour générer des résidus d'acides aminés inhabituels. La formation de ponts covalents entre les acides aminés entraîne des «anneaux» internes et donne aux lantibiotiques leur structure caractéristique (figure 49).

Les antibiotiques sont stables à la chaleur. Elles sont produites par des bactéries à Gram positif, notamment les genres *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*¹⁹⁴.

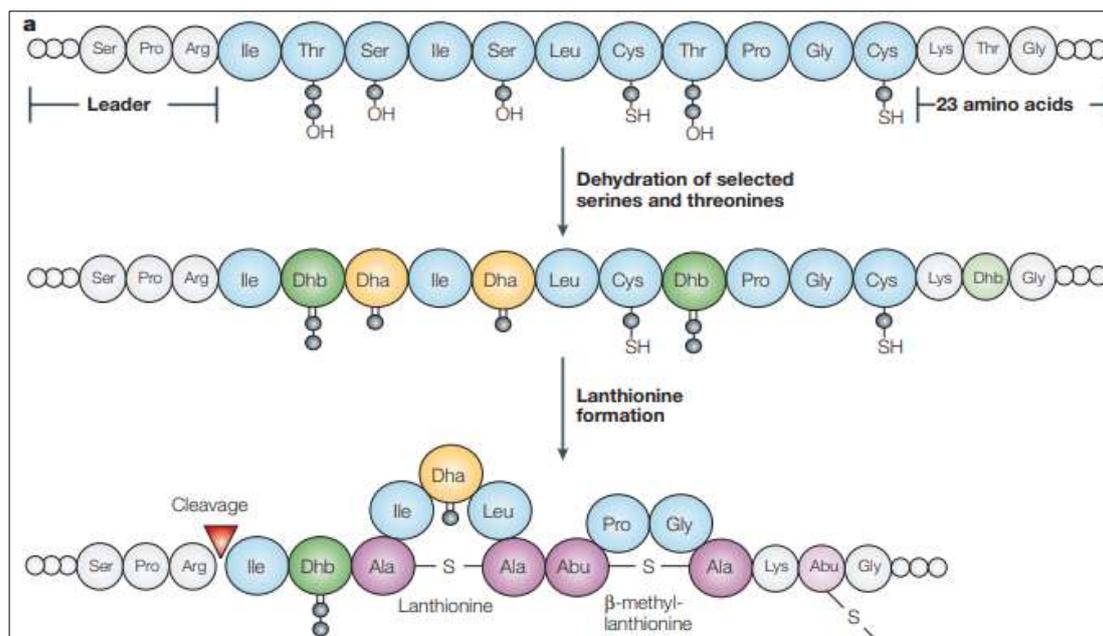


Figure 49. Synthèse de lanthionine et structure de lantibiotique

Des résidus de lanthionine se forment lorsqu'une sérine enzymatiquement déshydratée (déhydroalanine, Dha) se condense avec le groupe sulfhydryle d'une cystéine voisine (Cys). Cela forme un pont entre les deux résidus, créant ainsi un anneau dans le peptide ou le lantibiotique modifié. Quand les partenaires sont la thréonine (Thr) et la cystéine, le nouveau résidu est une β -méthyllanthionine. La lanthionine contient des ponts de β -méthyllanthionine qui sont indiqués en violet sous les noms Ala-S-Ala (alanine-S-alanine) et Abu-S-Ala (aminobutyrate-S-alanine).

Les lantibiotiques peuvent être divisés en fonction de leur structure, en 6 sous-classes selon Patricia Alvarez-Sieiro *et al* 2016¹⁹⁵. Cette classe englobe tous les peptides qui subissent une modification enzymatique au cours de la biosynthèse, ce qui fournit des molécules avec des acides aminés rares qui ont un impact sur leurs structures et propriétés (par exemple, lanthionine, hétérocycles, glycosylation)¹⁹⁵.

- La sous-classe Ia comporte des lantibiotiques (jusqu'à 34 acides aminés) cationiques hydrophobes, amphiphiles allongés (par exemple, nisine) qui agissent par la formation de pores, conduisant à la dissipation du potentiel membranaire et l'efflux de petits métabolites
- La sous-classe Ib regroupe des lantibiotiques globulaires chargés négativement ou sans charge (jusqu'à 19 acides aminés) (par exemple, mersacidine). Elle a été définie à l'origine pour des lantibiotiques qui agissent par inhibition enzymatique

Cependant, la structure complexe des lantibiotiques rend difficile leur sous-classement. Certains auteurs les subdivisent en 11 sous-groupes basés sur les séquences des pro-peptides non modifiés¹⁹⁶.

D'autres auteurs les ont classées selon leur mécanisme d'action, bien que le mécanisme d'action précis n'ait pas encore été élucidé pour un certain nombre de lantibiotiques. Par des analyses de modélisation moléculaire, il est devenu évident que la cible comme le Lipide II est impliqué dans le mode d'action de certains lantibiotiques et donc il a été utilisée comme base pour la classification¹⁹⁷⁻¹⁹⁹. Par exemple, la liaison de la nisine au lipide II facilite un double mécanisme d'action à la fois sur la synthèse du peptidoglycane et sur la formation de pores^{197,200}. L'extrémité C-terminale des lantibiotiques est impliquée dans la formation de pore qui s'insère dans la membrane plasmique^{200,201}. Dans le cas de la nisine, un pore hétéromoléculaire se forme constitué de 8 molécules de nisine et de 4 molécules de lipide II (figure 50)¹⁹⁴. Après avoir formé des pores, le complexe nisine-lipide II inhibe la synthèse du peptidoglycane par encombrement stérique^{194,199}. L'activité combinée de ces modules contribue à expliquer l'activité très élevée de quelques lantibiotiques (figure 50).

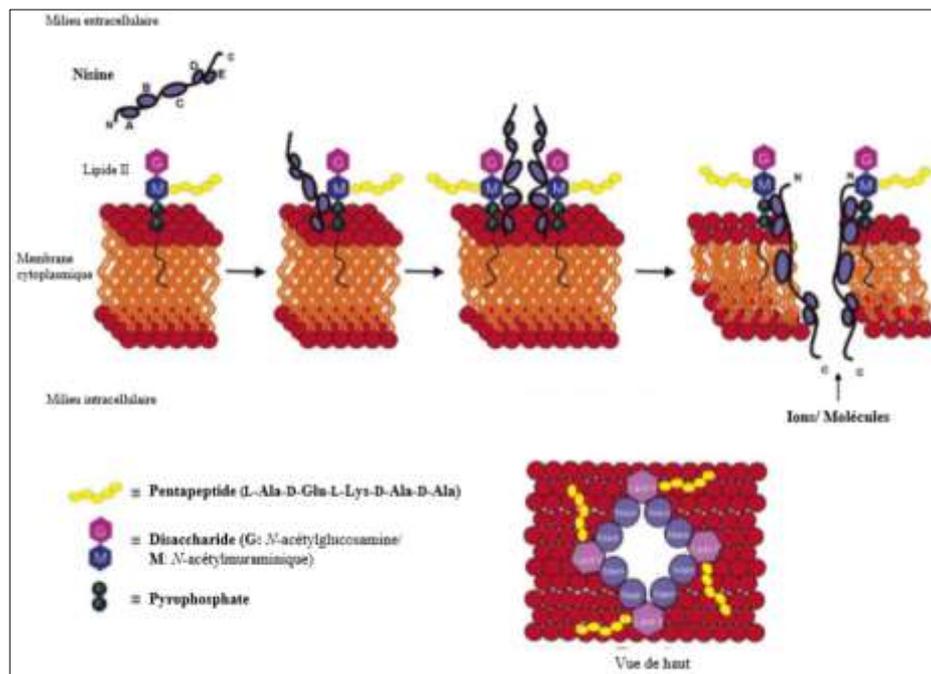


Figure 50. Formation de pores membranaires par le complexe nisine-lipide II selon Chatterjee C. et al.,¹⁹⁴.

Chez les lantibiotiques comportant deux peptides («two-peptides lantibiotics») le mécanisme d'action se fait en 2 étapes. Par exemple, pour la lacticine 3147 (figure 51), le premier peptide LtnA1 interagit tout d'abord avec le lipide II pour former un complexe et ensuite, LtnA2 est recruté pour former des pores et inhiber la synthèse de la paroi bactérienne^{200,202}.

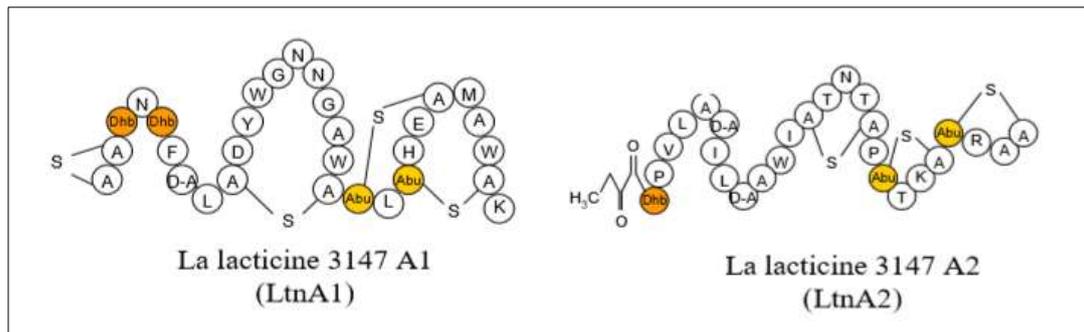


Figure 51. Structure d'un lantibiotique à deux peptides « two-peptides » comme la lacticine 3147²⁰³

(1) Mécanismes de détection et de régulation de la synthèse des lantibiotiques

La machinerie nécessaire à la production de lantibiotiques est généralement sous la dépendance d'un ensemble de gènes avec des séquences conservées, regroupés en au moins 2 opérons, au sein desquels les gènes sont regroupés selon leur fonction (figure 52). Dans certains cas, les opérons de biosynthèse des lantibiotiques sont similaires entre différentes espèces, ce qui signifie qu'une bactériocine peut agir à la fois comme une molécule de signalisation inter et intraspécifique.

Comme précisé précédemment, les lantibiotiques, sont synthétisés comme des pro-peptides puis sont sécrétés dans le milieu extérieur où ils subissent des modifications post-traductionnelles pour être actifs (figure 52).

Souvent, la production de lantibiotiques est régulée par le système de Quorum Sensing, un mécanisme enclenchant l'expression des gènes en fonction de la densité de la population bactérienne dans le milieu²⁰⁴. Les bactéries productrices de lantibiotiques peuvent détecter leur propre bactériocine, activant ainsi leur surproduction.

Les systèmes à deux composants constituent un des mécanismes essentiels qu'utilisent les bactéries pour percevoir et s'adapter à des changements environnementaux. Des systèmes à deux composants détectent les lantibiotiques matures permettant la production d'un signal cellulaire (activateur de transcription) qui augmente la production de lantibiotique et génère un processus d'autoinduction.

Pour résister à l'activité de leurs lantibiotiques, les bactéries peuvent produire des peptides d'immunité exprimés à la surface membranaire qui se lient à la bactériocine et/ou exprimer des transporteurs de type ABC qui empêchent l'accumulation de lantibiotiques dans la surface bactérienne (figure 53) ²⁰⁵.

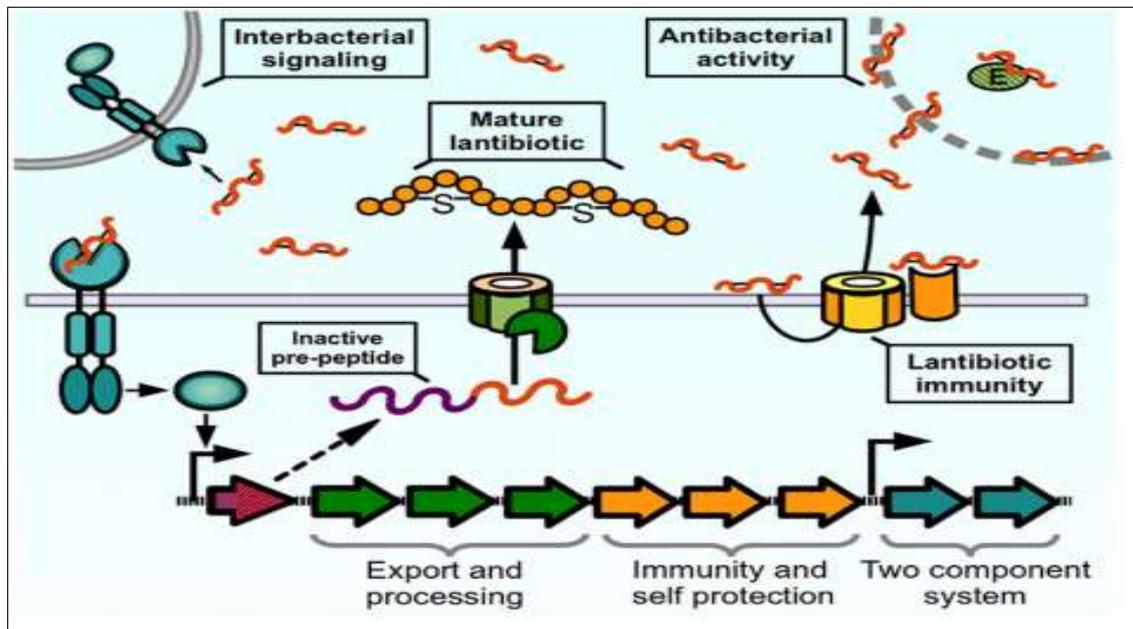


Figure 52. Systèmes de régulation lantibiotiques: modèle de production et détection

Le pré-peptide lantibiotique est synthétisé, exporté, clivé et modifié par la formation de ponts thiosulfure et la déshydratation des acides aminés. Puis, le lantibiotique mature peut exercer son effet antibactérien sur les bactéries sensibles, soit en ciblant la membrane cytoplasmique soit en inhibant l'activité de enzymes cibles. Les bactéries productrices de lantibiotiques expriment une protéine d'immunité membranaire pour lier leur lantibiotique apparenté ou pour la réexporter via un ABC transporteur. Des systèmes à deux composants détectent les lantibiotiques et déclenchent l'activation d'un ensemble de gènes de biosynthèse des lantibiotiques dans les régions productrices et voisines chez les bactéries ²⁰⁶.

b) Les bactériocines de classe II

Les bactériocines de classe II ne contiennent pas de lanthionine, ni d'acides aminés post-traductionnellement modifiés. Les plus courantes sont de petits peptides thermostables de taille inférieure à 10 kDa.

La majorité des bactériocines de classe II sont actives avec des concentrations de l'ordre du nanomolaire, induisant une perméabilisation de la membrane et en provoquant une fuite de molécules chez les bactéries cibles (figure 48).

Comme précédemment indiqué pour les bactériocines de classe I, leur nature hétérogène rend difficile leur classification donc plusieurs classes ont été suggérées^{207,208}. Selon Cotter et al, les bactériocines de classe II peuvent être subdivisées en 2 sous-classes (IIa et IIb)¹⁸².

(1) Les bactériocines de sous-classe IIa

(a) Structure des bactériocines de sous-classe IIa

Les bactériocines IIa sont de type pédiocine et ont un spectre d'activité étroit, toutes actives contre *L. monocytogenes*^{209,210}. Elles possèdent de 37 à 48 résidus et elles ont un pont disulfure et peuvent en avoir un 2^{ème} dans leur partie C-terminale qui stabilise leur structure tertiaire et leur confère une meilleure activité antimicrobienne, une meilleure résistance aux hautes températures, et un spectre d'action plus large. La région N-terminale, hydrophile, est conservée. Elle est appelée box "pédiocine" et contient un motif d'acides aminés YGNGVXCXXXVXV (dans lequel X est n'importe quel acide aminé)^{211,212}. Cette région facilite la liaison non spécifique à la surface de la cible^{213,214}. Les domaines qui sont situés après une région charnière sont moins conservés et déterminent le spectre d'activité antimicrobienne qui a servi de base pour subdiviser les bactériocines. La spécificité de la cible est déterminée par le domaine C-terminal¹⁹⁸ (figure 53).

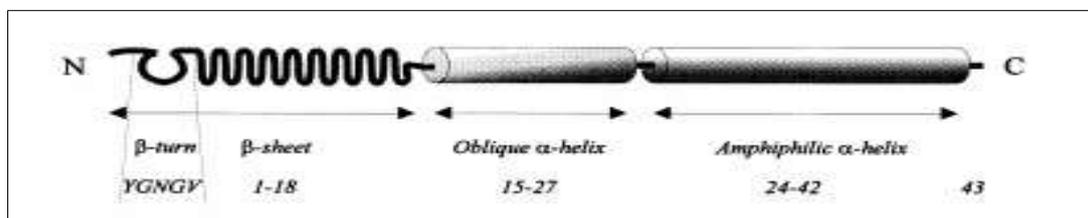


Figure 53. Représentation schématique de la structure d'une bactériocine modèle de classe IIa et ces domaines structuraux prédits²¹⁵.

(b) Immunité des producteurs des bactériocines de sous-classe IIa

Les bactéries lactiques qui produisent des bactériocines de classe IIa produisent aussi des protéines d'immunité²¹⁶⁻²¹⁹. Plusieurs études ont suggéré que les bactéries lactiques produisant des bactériocines possèdent généralement un ou plusieurs gènes d'immunité contre les bactériocines de classe IIa.

Les protéines immunitaires produites par des bactéries productrices de bactériocines de classe IIa sont composées de 88 à 114 acides aminés. Ces protéines fournissent une immunité totale contre la bactériocine de l'hôte et semblent également fournir une protection «partielle» contre des bactériocines autres que la classe IIa²¹².

Une étude comparative de Eijsink *et al.* ²¹², a permis d'identifier une douzaine de protéines d'immunité putatives de bactériocine classe IIa, et a montré que l'homologie entre ces protéines était étonnamment faible. Ces gènes présentent différents degrés d'homologie, ils peuvent aussi avoir différents niveaux d'expression²¹². Cette faible similarité a également été observée par Aymerich *et al.* ²²⁰. De plus, une forte similarité entre les protéines d'immunité n'est pas nécessairement reliée à une plus grande similitude entre les bactériocines correspondantes, suggérant que les protéines d'immunité n'interagissent pas directement avec leurs bactériocines respectives, mais interagissent indirectement par le biais d'une cible commune, ou «récepteur» (figure 54) dont l'existence a été suggérée pour la protéine d'immunité à la lactococcine A^{221,222}. Malgré les faibles similitudes de séquences entre les protéines d'immunité protectrices, plusieurs caractéristiques communes ont été observées. Ce sont des molécules cationiques et principalement hydrophiles^{212,219,223,224}. Une certaine similitude a été retrouvée par les prédictions de leur structure secondaire, en grande partie montrant une structure hélicoïdale^{225,226,212}. Ces protéines d'immunité sont dépourvues de segments transmembranaires, ce qui suggère que ces molécules sont soit sécrétées à l'extérieur, soit retenues à l'intérieur de la cellule^{212,219,223,224}.

Une étude de Abdel-Dayem *et al.*, ²²⁴, a montré que la majeure partie de la protéine d'immunité MesI de la mésentéricine Y105 se trouve dans le compartiment cytoplasmique et seule une faible proportion était détectée dans la membrane. Des données similaires ont été rapportées par Quadri *et al.*, ²¹⁹ pour la protéine d'immunité CbiB2 de la carnobactériocine B2. Ces expériences ont montré que la carnobactériocine B2 présentait une faible nocivité pour CbiB2 et qu'aucune interaction directe ne se produisait en solution aqueuse entre les 2 protéines. Ces observations suggèrent que les protéines d'immunité des bactériocines de la classe IIa seraient de préférence des molécules intracellulaires libres, ce qui empêcherait l'action de la bactériocine (figure 54).

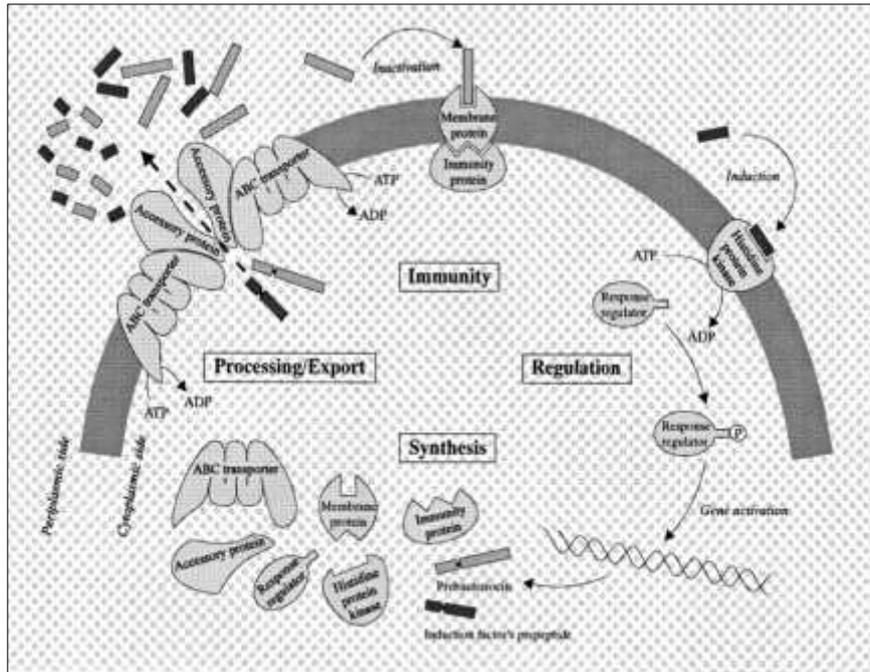


Figure 54. Machines suggérées pour la production de bactériocines de classe IIa: synthèse, traitement, excrétion et immunité²¹⁵.

(2) Les bactériocines de classe IIb

Les bactériocines de classe IIb nécessitent l'association de 2 peptides pour être actives (figure 55). Le mécanisme d'action implique la dissipation du potentiel membranaire, la fuite d'ions et/ou une diminution des concentrations en ATP intracellulaires²²⁷. Ces peptides présentent une activité bactériocine faible, voire nulle, lorsqu'ils sont testés individuellement. Bien que les membres de ce sous-groupe soient relativement hétérogènes, il a été proposé de les subdiviser en peptides de type E (E, pour « Enhancing » ou renforcé) où l'association des 2 peptides augmente mutuellement leur activité et de type S (S pour « Synergy » ou synergique)²²⁸, où ils sont complémentaires (plantaricine EF, lactocine 705, lactococcine MN...).

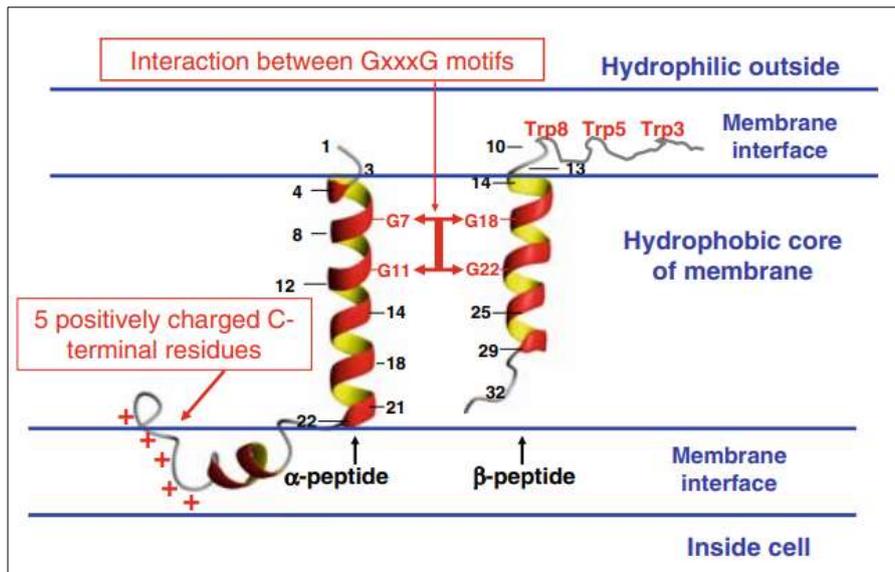


Figure 55. Représentation schématique d'un modèle structural de la lactococcine G et son orientation dans la membrane des cellules cibles.

Les 2 peptides interagissent grâce au motif $G_{7xxx}G_{11}$ du peptide alpha et le motif $G_{18xxx}G_{22}$ de peptide beta et forment un domaine trans-membranaire structuré en hélice – hélice²²⁹.

D'autres types de bactériocines de classe II ont été décrites qui ne peuvent pas être rangées dans les sous-classes IIa et IIb, et sont parfois classées dans les bactériocines de classe IIc (anciennement classe V), comme la plantaricine A, lactococcine A, lactococcine Elles sont peu caractérisées et ont une structure cyclique^{230,231}

(3) Bactériolysines (anciennement classe III)

Les bactériocines de classe III se composent de peptides de poids moléculaire \geq à 25 kDa et ils sont généralement thermolabiles. Heng et al.²³² ont subdivisé cette classe de bactériocines en 2 sous-classes distinctes: les enzymes bactériolytiques (ou bactériolysines) et les protéines antimicrobiennes non lytiques. Les staphylocoques produisent des bactériolysines, dont la lysostaphine est considérée comme le prototype. La lysostaphine, une enzyme extracellulaire sécrétée par des souches de *Staphylococcus simulans biovar staphylolyticus*, était probablement la première staphylococcine découverte (bactériocine produite par des staphylocoques). Son activité bactéricide contre les staphylocoques repose sur sa capacité à cliver le peptidoglycane présent dans les parois des cellules bactériennes²³³ (figure 57).

Ces protéines ont également une structure modulaire et un domaine catalytique à l'extrémité N-terminale qui présente une homologie avec les endopeptidases, et une extrémité C-terminale qui possède probablement le site de reconnaissance de la cible²³⁴. Contrairement

aux «vraies» bactériocines, elles n'ont pas toujours de gènes d'immunités spécifiques qui accompagnent les gènes structurels de la bactériocine.

c) **Récapitulatif sur le mode d'action des bactériocines**

Les bactériocines ont différents mécanismes d'action: soit elles vont altérer la perméabilité membranaire des bactéries, soit inhiber la synthèse de leurs peptidoglycanes, soit encore agir en détruisant les liaisons peptidiques entre les peptidoglycanes.

Les bactériocines de Classe I (lantibiotiques) interagissent avec les membranes cellulaires par interactions électrostatiques ou par liaison à des récepteurs spécifiques. Ces interactions permettent de former des pores larges et non-spécifiques à la surface des cellules cibles, causant un efflux rapide des composés cytoplasmiques (ions, ATP, acides aminés...). Elles détruisent donc les bactéries en augmentant leur perméabilité membranaire.

Les bactériocines de Classe II agissent de la même manière, en provoquant la perméabilisation de la membrane, ce qui conduit à la mort cellulaire.

Pour la Classe III, le mode d'action est complètement différent. En effet, elles agissent par hydrolyse des liaisons peptidiques du peptidoglycane des bactéries sensibles.

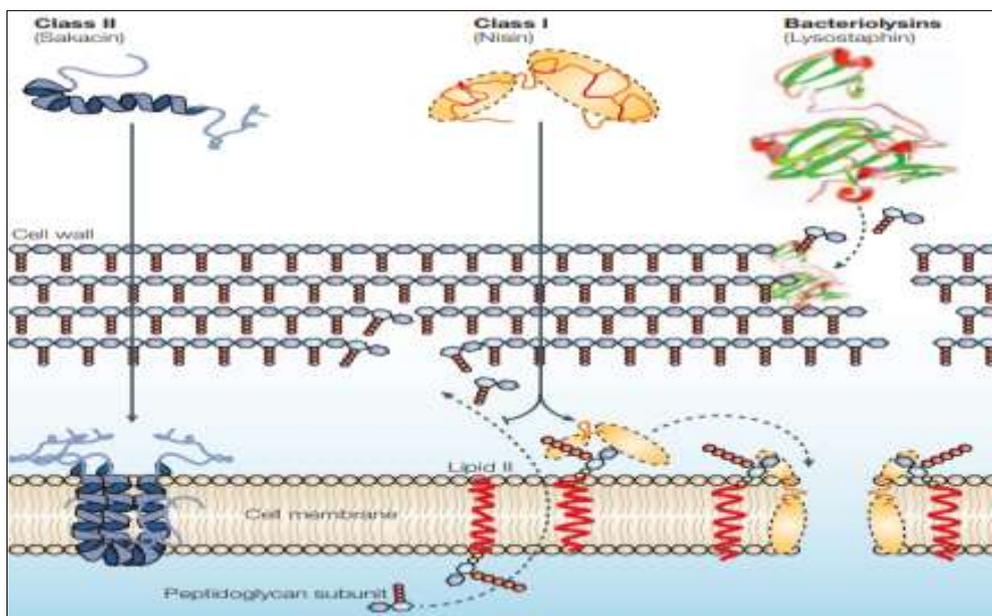


Figure 56. Récapitulatif du mode d'action des bactériocines¹⁸².

XXIII. *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (souvent abrégé en *Bt*) a été découverte en 1902 au Japon, lors d'une infection à *Bombyx mori* (vers à soie)²³⁵. C'est un bacille à Gram positif, aérobic facultatif, ubiquiste et sporulé. *B. thuringiensis* est très souvent utilisé pour ses propriétés insecticides. En effet, elle a la particularité de synthétiser, lors de la sporulation, des cristaux protéiques, tels que Cry (aussi appelés delta-endotoxines), Vip et Cyt qui ont une activité biocide sur les insectes. D'autres parasporines ont été développées pour leur activité biocide contre certains types de cellules cancéreuses. Certaines souches de *Bt* synthétisent également des composés avec des propriétés de bactériocines, dont certaines ressemblent aux lantibiotiques, qui sont des bactériocines décrites chez les bactéries lactiques¹⁸⁴.

A. Taxonomie

Bt, qui appartient au genre *Bacillus*, est membre du groupe *Bacillus cereus*, qui contient également *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides* et *Bacillus anthracis*.

B. Habitat

B. thuringiensis, bactérie formant des spores, survit dans diverses niches écologiques comme le sol, qui est son réservoir le plus important. Elle se retrouve sur les plantes, en particulier sur les tubercules, rhizomes, rhizosphères, et sur les invertébrés du sol, comme les vers, insectes et nématodes. *B. thuringiensis* peut coloniser l'intestin de ces invertébrés. C'est aussi une bactérie entomopathogène qui est capable d'infecter et de tuer certains insectes. Les tiques et les acariens sont des hôtes de cette bactérie, mais les mécanismes de l'infection restent inconnus.

Elle joue un rôle bénéfique dans l'écosystème car en colonisant les rhizosphères, elle protège les plantes de certains herbivores et aide la plante à se développer²³⁶. *B. thuringiensis* a été retrouvée dans les eaux douces et les boues activées. Elle peut persister dans cet environnement, et se retrouver sur les plantes aquatiques et sédiments. C'est une bactérie saprophyte que l'on retrouve dans les matières fécales et les cadavres d'invertébrés et de vertébrés. Les excréments d'animaux qui se nourrissent de plantes ou d'insectes contaminés peuvent servir de source de nutriments pour sa croissance.

La figure 57 résume les différentes niches écologiques de *B. thuringiensis* et sa dispersion dans l'environnement²³⁷.

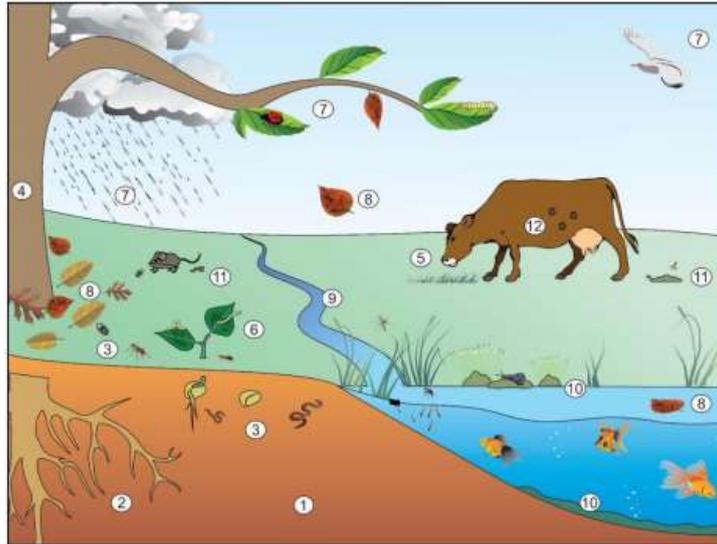


Figure 57. Vue simplifiée du mode de vie complexe de *B. thuringiensis* dans différentes niches environnementales²³⁷

C. Cycle de vie

Bt est généralement présent dans l'environnement sous forme de spores²³⁸. Une fois qu'elle pénètre dans l'organisme des invertébrés, elle se propage et diffuse dans son hôte. Les spores se retrouvent au niveau de l'appareil digestif, puis circulent dans le sang ou l'hémolymphe, où les spores germent et passent au stade végétatif. Lorsque l'hôte meurt d'une septicémie, les bactéries qui résident sur son cadavre se multiplient jusqu'à l'épuisement de nutriments (stress), puis repassent à la sporulation²³⁹.

Son cycle de vie se résume donc en 4 phases : (i) la formation d'un sporange qui renferme une spore de Bt, et un cristal, c'est l'état de dormance de la bactérie. (ii) La 2^{ème} phase est l'autolyse de sporange et la libération des composants quand il se trouve dans un milieu propice. (iii) La 3^{ème} phase est la formation de la cellule végétative. La spore peut germer et redonner la bactérie Bt, et enfin (iv) la dernière phase est la prolifération dans les conditions favorables. Bt se multiplie jusqu'à épuisement des substances organiques avant de revenir à l'état de spores (figure 58).

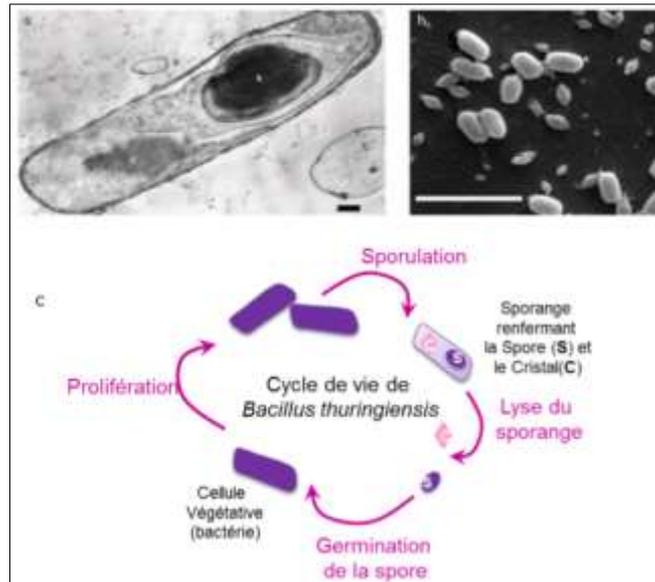


Figure 58. Cycle de vie de *B. thuringiensis*

a, image de microscopie électronique d'un sporange de Bt renfermant la spore ; (b) : photo de microscopie à balayage de spores et de cristaux de Bt²⁴⁰ ; c : schéma de cycle de vie de *B. thuringiensis*.

D. Culture et identification

Bt se cultive sur différents milieux synthétiques solides ou liquides contenant du glucose, des sels, de l'aspartate, du glutamate ou du citrate, et des acides organiques indispensables. On ne peut pas les remplacer par un mélange de vitamines ou du succinate²⁴¹. En situation de privation en certains nutriments essentiels, la sporulation de Bt peut être initiée²⁴².

B. thuringiensis ne peut être distingué de *B. cereus* par la production, lors du processus de sporulation, d'un ou plusieurs corps d'inclusions qui contiennent des substances toxiques (par exemples, toxines Cry) pour les invertébrés, principalement contre les insectes²⁴³.

L'amplification par PCR est maintenant largement utilisée pour l'identification des souches de *B. thuringiensis* produisant des insecticides ; l'identification des gènes de toxines permettant de prédire partiellement l'activité insecticide d'une souche donnée. Cette technique moléculaire, rapide et fiable, a largement supplanté les techniques biologiques pour la mise en place de collections de *B. thuringiensis*^{244,245}.

E. Facteurs de virulence

Les toxines protéiques et d'autres molécules produites par *B. thuringiensis* semblent être cruciales pour la virulence et l'infection des invertébrés. Certains facteurs montrent un effet cytotoxique alors que d'autres agissent comme des régulateurs de l'activité des toxines majeures.

1. Facteurs de virulence protéique

a) Chitinases de *B. thuringiensis*

Les chitinases sont des enzymes qui hydrolysent les liaisons glycosidiques β -(1→4) de la chitine. Les souches de *B. thuringiensis* productrices de chitinase possèdent souvent une activité fongicide²⁴⁶ et elles sont capables d'inhiber la croissance des champignons phytopathogènes, ce qui en fait un agent antimycotique prometteur pour les besoins de l'agriculture^{247,248}. Contrairement à leurs propriétés fongicides, le rôle insecticide des chitinases dans la virulence des souches de *B. thuringiensis* a longtemps été ignoré en raison de l'utilisation des toxines Cry²³⁵.

Dans la plupart des cas, les chitinases agissent en synergie avec les toxines de type Cry (cristaux) et d'autres facteurs de virulence chez *B. thuringiensis*. Il a été montré que la présence de chitinases double la toxicité de Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa et Cyt1Aa contre *Aedes aegyptii* (Diptère)²⁴⁹ et multiplie par 6, la toxicité de CryIC contre *Spodoptera littoralis*²⁵⁰. Cependant, il existe d'autres synergies analogues entre les chitinases et d'autres toxines de *B. thuringiensis* non identifiées²⁵¹, ce qui suggère que non seulement la famille Cry, mais également d'autres grandes classes de toxines *B. thuringiensis*, bénéficient de leur cytotoxicité sur fond de production de chitinase.

b) Métalloprotéases de *B. thuringiensis*

Après avoir pénétré dans la membrane péritrophique riche en chitine, les bactéries *B. thuringiensis* doivent surmonter plusieurs autres barrières enrichies en différentes protéines, telles qu'une couche de mucine, une lame basale et les cadhérines. Pour atteindre cet objectif, *B. thuringiensis* utilise de nombreuses métalloprotéases, protéases qui agissent en présence d'un ou de plusieurs ions métalliques, généralement ceux du zinc (II)²⁵².

L'une des classifications existantes divise toutes les métalloprotéases connues en deux sous-classes en fonction de la présence d'un ou deux ions métalliques dans le site catalytique²⁵³.

Malgré leur diversité structurale, les métalloprotéases monométalliques (un seul ion métallique) fonctionnent au même pH de 6,5²⁵³. Sur la base de la structure des motifs de liaison au métal, les métalloprotéases de zinc monométalliques sont divisées en cinq groupes. Celui de la zincine, se distinguant par le motif de liaison au métal consensus HEXXH, est le plus important²⁵⁴. Les zincines sont classées en cinq sous-groupes en fonction du résidu actif, les mét-zincines, le glu-zincines, les asp-zincines, les S2P-zincines et les métalloprotéases analogues à FtsH.

Une classification disponible sur la base de données MEROPS (<https://www.ebi.ac.uk/merops/index.shtml>) divise toutes les métalloprotéases connues en 103 familles, chaque nom de famille comprenant une lettre M signifiant 'métalloprotéase' et un numéro de famille²⁵⁵. En raison de leur variabilité structurale et fonctionnelle, les métalloprotéases sont des facteurs de virulence à la fois chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, mais aussi chez les champignons et les protistes pathogènes²⁵².

c) **Métalloprotéases de type Enhancine**

Les enhancines sont des métalloprotéases produites par un virus, *Trichoplusia ni* granulovirus (TnGV), et comportant un domaine de la famille M60²⁵⁶. Les enhancines leur servent principalement à digérer la matrice pérîtrophique afin de faciliter la transition des virions vers l'hémocèle²⁵⁷. Il a été démontré que les enhancines de ce virus ont une influence positive sur la virulence du *B. thuringiensis* chez au moins 6 espèces de lépidoptères²⁵⁸. Les gènes codant pour des protéines de type enhancine ont été trouvés dans plusieurs génomes de *B. cereus* et *B. thuringiensis*. Il a été démontré que ces gènes appartenaient au régulon PlcR (Phospholipase C Regulator), dont l'activité est déclenchée en fin de la phase exponentielle de croissance et est fortement atténuée lors du stade stationnaire en raison du régulateur de sporulation général Spo0A^{259,260}. Ces gènes sont appelés *bel* (pour *Bacillus* Enhancin-like). Les protéines Bel partagent 20 à 30% d'identité avec les séquences des enhancines de TnGV et fonctionnent de manière similaire en hydrolysant les mucines présentes dans l'intestin des invertébrés. Pour le moment, au moins une protéine de type *B. thuringiensis* similaire à une enhancine a été décrite²⁶¹; bien qu'elle partage 23–41% d'identité avec les enhancines virales, elle n'a pas montré une toxicité vis-à-vis des larves d'insectes.

d) Métalloprotéases InhA

Un autre exemple de métalloprotéases retrouvées chez *B. thuringiensis* est un groupe de 3 protéines ayant des fonctions similaires, appelé InhA (famille M6) et régulé par PlcR^{262 263}. InhA1 est capable d'hydrolyser des cécropines et des attacines, peptides antimicrobiens jouant un rôle clé dans la réponse immunitaire humorale des insectes²⁶⁴. InhA1 a une activité protéolytique de la matrice extracellulaire de l'hôte, y compris la lame basale de l'épithélium de l'intestin moyen, essentielle pour l'infestation de l'hémolymphe²⁶⁴. InhA2 et InhA3 ont des fonctions similaires à celles d'InhA1 et partagent une identité de séquence de 66% et 72% avec celui-ci, respectivement²⁶³. Contrairement à InhA1, InhA2 est nécessaire, mais pas suffisant pour affecter la virulence²⁶⁵. À son tour, InhA3 est incapable de protéolyser la cécropine, bien que ses propriétés protéolytiques générales soient préservées²⁶³.

e) Autres métalloprotéases de *B. thuringiensis* et leur association avec la formation de biofilm

Récemment, une nouvelle métalloprotéase de Bt, ColB, a été découverte²⁶⁶. ColB appartient à la famille M9, ou collagénase, qui inclut de nombreux facteurs de virulence de bactéries²⁶⁷. La présence de ColB améliore considérablement l'activité cytolytique de plusieurs toxines Cry, notamment Cry5Ba, Cry55Aa et Cry6Aa, contre *Helicoverpa armigera* et le nématode, *Caenorhabditis elegans*. ColB agit par protéolyse de 2 E-cadhérines induisant des contacts intercellulaires épithéliaux et par protéolyse du collagène de la lame basale, entraînant une dégradation de l'épithélium de l'intestin moyen²⁶⁸. ColB assure la transition de *B. thuringiensis* du tube digestif vers l'hémocèle de l'hôte et sa propagation ultérieure dans tout le corps de l'hôte. L'effet de la protéase de la famille Bmp1 M4, qui appartient également au régulon PlcR, est similaire à celui de ColB, bien que son implication dans la virulence de Bt n'ait été démontrée que pour les souches nématicides²⁶⁹.

Une protéase membranaire "coupant" la caséine (CCMP), ou la camélysine (CalY), constitue un autre exemple de métalloprotéases, agissant à pH neutre, de *B. thuringiensis*²⁷⁰. Selon la classification MEROPS, CalY appartient à la famille des métalloprotéases M73. Bien que CalY ait démontré une activité protéolytique contre une large gamme de protéines, notamment la caséine, l'actine et le collagène²⁷¹, il a également été démontré qu'elle participait à la formation de biofilm avec la protéine formant des fibrilles, TasA²⁷².

Les biofilms sont des communautés bactériennes flottant sur le milieu de culture ou collant sur des surfaces solides à l'aide d'une matrice extracellulaire forte, composée d'exopolysaccharides, de protéines et d'ADN extracellulaire²⁷³. Il est intéressant de noter que le composant protéique de cette matrice a tendance à former des amyloïdes, fibrilles extrêmement stables à structure spatiale très ordonnée²⁷⁴, chez de nombreuses bactéries, telles que *Bacillus*²⁷⁵ et *E. coli*²⁷⁶.

La formation de biofilms est une étape importante de la fixation de nombreux agents pathogènes sur des tissus de l'hôte²⁷⁷. CalY joue un rôle clé dans les 2 processus, dans l'adhésion aux cellules d'insectes et dans la formation de biofilms, ce qui en fait un facteur de virulence très important de *B. thuringiensis*²⁷². Outre l'implication dans la formation de biofilm, il a été démontré que CalY augmentait les propriétés cytolytiques des protoxines Cyt1Aa (de 40 à 70%) et Cyt2Ba (de 6% à 50%) dans les érythrocytes de lapin²⁷⁸.

f) Cytolysines

Une toxine apparentée appelée alvéolysine a été mise en évidence chez *B. thuringiensis*. Cette toxine avait été initialement découverte comme facteur de virulence de *Paenibacillus alvei*, une espèce proche au genre *Bacillus*²⁷⁹. La sphaéricolysine et l'alvéolysine appartiennent à une classe de toxines qui sont les cytolysines. Les cytolysines sont activées par une fonction thiol (TACY) et agissent par la formation de pores entraînant la lyse cellulaire²⁸⁰. Ces cytolysines ont souvent été décrites comme facteurs de virulence chez les bactéries à Gram positif²⁸⁰, alors que leur présence chez les bactéries à Gram négatif semble rare²⁸¹.

En effet, il a été démontré que la sphaéricolysine affecte 2 espèces phylogénétiquement éloignées telles que *Blattella germanica* (Blattodea: Ectobiidae) et *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae)²⁸².

2. Facteurs de virulence non protéiques de Bt

a) Zwittermycine A

Produite par plusieurs souches de *B. thuringiensis* et de *B. subtilis*, la zwittermycine A (ZwA) est un aminopolyol possédant des propriétés antibiotiques et antifongiques²⁸³. ZwA est constituée d'une partie urée-amide dérivée d'un acide aminé non naturel, l'albizzine et d'une partie diaminopentol. Elle présente une ressemblance structurale avec les polycétides (polyketides) dont beaucoup ont des activités antimicrobiennes.

La biosynthèse de ZWA est contrôlée par un groupe de gènes (9 cadres ouverts de lecture) sur un locus de 16 kb. Les protéines codées dans ces gènes forment un complexe macromoléculaire unitaire qui exploite toutes les étapes de la synthèse de l'antibiotique, y compris la formation de liaisons peptidiques extra-ribosomiques²⁸⁴. ZWA constitue le principal mécanisme d'autorésistance de *B. thuringiensis* à son propre antibiotique. Elle affecte un large spectre d'espèces bactériennes ainsi que certains eucaryotes, y compris les champignons phytopathogènes et les oomycètes²⁸⁵. Cependant, son mode d'action reste insaisissable. Bien que l'on sache que les souches résistantes d'*E. coli* possèdent des mutations dans les gènes *rpoB* et *rpoC* codant pour les sous-unités de l'ARN polymérase, aucun effet direct de ZWA sur la transcription ou à un autre stade du métabolisme de l'acide nucléique n'a été démontré²⁸⁶.

ZWA semble augmenter la virulence de *B. thuringiensis* et une surproduction de ZWA amplifie l'effet insecticide de souches de *B. thuringiensis* contre des Lépidoptères (*Spodoptera exigua* et *Heliothis armigera*)(Lepidoptera: Noctuidae)²⁸⁷.

b) β -exotoxines

Des toxines de faible poids moléculaires sont produites par certaines souches de *B. thuringiensis*, telles que les β -exotoxines²⁸⁸. En raison du maintien de leurs propriétés biocides après avoir été exposées à une température élevée, les β -exotoxines sont parfois appelées exotoxines thermostables de Bt, soulignant leur différence par rapport aux exotoxines protéiques thermolabiles. La fraction la plus répandue de cette classe est la thuringiensine ou Thu, également appelée β -exotoxine de type I²⁸⁹. La β -exotoxine de type II, découverte plus tardivement, constitue probablement un analogue similaire de l'uridine²⁹⁰. Sa biosynthèse est réalisée par un ensemble de 11 gènes, généralement situés sur des plasmides de grande taille²⁹¹. L'activité cytotoxique de la thuringiensine est probablement due à sa similarité structurelle avec l'ATP, car elle est capable de se lier aux sites de liaison à l'ATP de l'ARN polymérase provoquant une inhibition de la transcription^{292,293}.

3. Bactériocines produites par *B. thuringiensis*

a) Généralités sur la production de bactériocines chez *B. thuringiensis*

B. thuringiensis est considéré comme un organisme modèle pour la production de métabolites, elle est actuellement utilisée dans la lutte biologique contre l'invasion d'insectes dans les cultures agricoles. Mais *B. thuringiensis* synthétise également des bactériocines. En 1989,

Favret et Younsten²⁹⁴ ont rapporté la détection d'un peptide synthétisé par une souche de *B. thuringiensis*, appelé thuricine.

Jusqu'à présent, 18 bactériocines synthétisées par différentes souches de *B. thuringiensis* ont été identifiées. Parmi ces 18 bactériocines, se trouvent 5 substances inhibitrices qui ressemblent à des bactériocines et qui sont connues sous le nom de substances inhibitrices de type bactériocine (ou BLIS, pour bacteriocin-like inhibitor substance)²⁹⁵. Ces bactériocines et BLIS présentent surtout une activité inhibitrice contre des bactéries à Gram positif, mais aussi vis-à-vis de bactéries à Gram négatif et contre les champignons (voir Tableau 16). Salazar-Marroquín *et al.* (2016) ont classé les bactériocines produites par *B. thuringiensis* en 2 groupes selon leur poids moléculaire : groupes A et B. Le groupe A est composé des bactériocines avec un poids moléculaire inférieur à 5 kDa et le groupe B de plus de 5 kDa. Ils ont subdivisé le groupe A en deux types: AI, bactériocine avec un seul peptide et AII, bactériocine à deux peptides (deux composants)²⁹⁶. Il est à noter que la classification proposée par Salazar-Marroquín *et al.*(2016) ne répond pas aux critères de classification des bactériocines décrits par Cotter *et al.*¹⁸². Plusieurs bactériocines produites par *B. thuringiensis* ne sont pas purifiées et leurs structures restent encore inconnues.

Tableau 16. Classification des bactériocines produites par *B. thuringiensis* selon Salazar-Marroquín *et al.* ²⁹⁶

	Bacteriocin	Molecular mass (kDa)	Producer strain (subsp.)	
AI	Thuricin	0.950	HD2 (<i>thuringiensis</i>)	
	Thuricin S	3.137	HD198 (<i>entomocidus</i>) 9 (<i>entomocidus</i>) HD110 (<i>entomocidus</i>) HD125 (<i>tolworthy</i>)	
	Thuricin Bn1	3.139	Bn1 (<i>kurstaki</i>)	
	Thuricin H	3.140	SF361	
	Bacthuricin F4	3.160	BUPM4 (<i>kurstaki</i>)	
	Thuricin 17	3.172	Bt non- <i>Bradyrhizobium</i>	
	Entomocin 110	4.800	HD110 (<i>entomocidus</i>)	
	AII	Thuricin CD	Tm- α 2.760 Tm- β 2.860	DPC 6431
		Thuricin 439	(A) 2.919 (B) 2.803	B439
	BI	Morricin 269	~10.000	LBIT269 (<i>morrisoni</i>)
Kurstacin 287		~10.000	LBIT287 (<i>kurstaki</i>)	
Kenyacin 404		~10.000	LBIT404 (<i>kenyae</i>)	
Entomocin 420		~10.000	LBIT420(<i>entomocidus</i>)	
Tolworthcin 524		~10.000	LBIT524 (<i>tolworthy</i>)	
Tochicin		10.500	HD868 (<i>tochigiensis</i>)	
BacthuricinF103		~11.000	BUMP103	
Thuricin 7		11.600	BMG1.7	
Entomocin 9		12.400	HD9 (<i>entomocidus</i>)	

b) **Activité antimicrobienne de *B. thuringiensis* contre des bactéries à Gram positif**

Différentes bactériocines et BLIS synthétisées par *B. thuringiensis* ont été étudiées parmi lesquelles : thuricine, thuricine S, thuricine Bn1, thurincine H, bacthuricine Bt103, thuricine 7, entomocine 110, entomocine 9 et la CD thuricine.

La plupart de ces bactériocines et BLIS sont à large spectre et inhibent différentes espèces bactéries à Gram-positif, telles que certaines souches de *B. cereus*, qui synthétisent des toxines responsables de la diarrhée, et *Listeria monocytogenes* dont certains sérotypes sont responsables d'avortement et de méningites chez le nouveau-né ²⁹⁷.

Barboza-Corona *et al.*, ²⁹⁵ ont rapporté que des bactériocines et BLIS, telles que la thuricine, la thurincine H, la bacthuricine F4, mais aussi morricin 269, kurstacin 287, kenyacine 404, entomocine 420 et tolworthcine 524, peuvent représenter une option thérapeutique intéressante pour contrôler une bactérie problématique, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline ²⁹⁸.

c) Activité antimicrobienne de *B. thuringiensis* contre des bactéries à Gram négatif

Certains membres des BLIS ont une activité inhibitrice vis-à-vis de *Vibrio cholerae*, bactérie qui reste encore problématique surtout dans certaines zones géographiques¹⁸⁴. Les bactériocines et BLIS telles que bacthuricine F4, thuricine 7, morricine 269, kurstacine 287, kényacine 404, entomocine 420 et tolworthcine 524, ont un potentiel intéressant pour contrôler les bactéries à Gram négatif comme *E. coli* et *K. pneumoniae*, bactéries très souvent rencontrées en pathologie humaine, pouvant être multirésistantes aux antibiotiques²⁹⁶²⁹⁵.

d) Activité antimicrobienne de *B. thuringiensis* contre les champignons

Les champignons peuvent également être ciblés par certaines bactériocines produites par *B. thuringiensis*. Par exemple, la bactériocine Bn1 et l'entomocine 9 inhibent la croissance d'*Aspergillus niger*²⁹⁹ un pathogène opportuniste qui est fréquemment présent dans les infections de l'oreille humaine et responsable d'infections pulmonaires chez des personnes immunodéficientes¹⁸⁴.

e) Potentielles applications des bactériocines de *B. thuringiensis*

De par ses propriétés, *B. thuringiensis* est utilisée en agriculture. La recherche de production de bactériocines permet d'envisager aussi son utilisation pratique dans ce domaine. La Thuricine S est une bactériocine résistante à la chaleur et stable à une large gamme de pH. Elle inhibe non seulement les agents pathogènes à Gram positif, tels que *L. monocytogenes* et *B. cereus*, mais également un grand nombre d'agents pathogènes à Gram négatif comme *S. enterica subsp. enterica* et *P. aeruginosa*. L'utilisation de *B. thuringiensis* en tant qu'insecticide biologique, ainsi que des informations sur les bactériocines, comme la thuricine S, permettent son utilisation pratique en tant qu'agent antagoniste vis-à-vis des bactéries phytopathogènes telles que *Pseudomonas syringae*³⁰⁰. La Thuricine Bn1 est synthétisée par *B. thuringiensis subsp. kurstaki* Bn1. Elle présente des propriétés bifonctionnelles en agriculture. Cette souche est active contre les insectes car elle produit une protéine cristalline³⁰¹ et contre les bactéries phytopathogènes, grâce à la production d'une bactériocine.

D'autre part, le genre *Bacillus* comprend une grande variété d'espèces pouvant être utilisées en toute sécurité dans l'industrie. Par exemple, *B. thuringiensis* Bn1 qui produit la bactériocine Bn1 pourrait être utilisée comme conservateur alimentaire naturel³⁰². En outre, les bactériocines sont intéressantes en tant que biopréservatifs naturels pour le contrôle de la

dégradation et contre les bactéries pathogènes transmises par les aliments³⁰³. La Thurincine H inhibe la croissance de *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *Listeria innocua* et *Listeria ivanovii*³⁰⁴. bactéries retrouvées à la fois chez les animaux et les humains²⁹⁷, et peuvent parfois être pathogènes³⁰⁵.

La Bacthuricine F4 est une bactériocine stable au pH et à la température, ce qui indique que sa fonction bactéricide peut être préservée même dans des conditions extrêmes. Cela présente une caractéristique intéressante pour son utilisation dans l'agro-industrie. L'étude du spectre d'inhibition de cette bactériocine montre une activité contre d'autres souches bactériennes proche phylogénétiquement de *B. thuringiensis* et d'autres bactéries à Gram positif. Il est important de noter qu'il est très actif contre *B. cereus*, une des bactéries virulentes que l'on retrouve dans les produits agro-industriels³⁰⁶. Bien que cette bactériocine soit moins active contre les bactéries à Gram négatif, il est à noter que c'est la seule bactériocine produite par *B. thuringiensis*, qui présente une activité contre *K. pneumoniae*.

La Thuricine 17 a été isolée d'une bactérie Bt qui favorise la croissance des plantes. Il a été démontré que la Thuricine 17 augmentait la croissance des plantes. Ce peptide est stable à la chaleur et biologiquement actif à un pH compris entre pH 1,00 et 9,25. De plus, la thuricine 17 est la seule bactériocine de *B. thuringiensis* active contre *E. coli*³⁰⁷.

L'Entomocine 110 inhibe plusieurs bactéries à Gram positif, notamment *L. monocytogenes*, *Paenibacillus larvae* et d'autres espèces de *Bacillus*. *P. larvae* est une bactérie extrêmement importante dans le secteur de l'apiculture, car elle est responsable de la loque américaine, qui affecte les larves d'abeilles. La Tochinette présente une activité contre *B. cereus* et certaines sous-espèces de *B. thuringiensis*. Bien que son spectre d'activité ne soit pas clair, car il n'a pas été testé ni contre *L. monocytogenes* (comme pour la bacthuricine F4), ni sur *S. aureus* (comme pour la thuricine S, qui agit aussi sur *L. monocytogenes*). Pour cette raison, son application et son utilisation potentielle dans les traitements biomédicaux n'ont pas été complètement définies.

La Thuricine Bt103 présente un large spectre d'inhibition contre les bactéries associées et différents pathogènes transmis par les aliments, tels que *L. monocytogenes*, *B. cereus* et la bactérie à Gram négatif phytopatogène, *Agrobacterium tumefaciens*. Par la suite, Kamoun *et al.*³⁰⁸ ont montré que la bacthuricine Bt103 pouvait être appliquée sur de la viande de bœuf crue dans le but d'éviter la contamination par *L. monocytogenes*.

La Thuricine 7 est un candidat idéal pour être utilisée comme agent antimicrobien alimentaire afin de contrôler les contaminants bactériens à Gram positif, sans interférer avec la croissance des bactéries lactiques ¹⁸⁴.

L'importance et l'impact de l'entomocine 9 font de la souche HD9 de *B. thuringiensis* un microorganisme attractif pour les applications biotechnologiques en tant qu'agent antimicrobien dans les secteurs agroalimentaire et agricole ²⁹⁹.

L'efficacité de la thuricine CD contre les isolats d'origine clinique de *Clostridioides difficile* (ou *Clostridium difficile*), en particulier contre les souches virulentes, productrices de toxines, peut représenter un traitement potentiel le traitement de infections à *C. difficile* ³⁰⁹.

Les BLIS (Bacteriocin-like inhibitory substance) comprennent les morricin 269, kurstacin 287, kenyacine 404, entomocine 420 et tolworthcin 524, et ont été produites par les souches de *B. thuringiensis* isolées au Mexique. Ces BLIS ont démontré leur efficacité contre les bactéries à Gram positif et Gram négatif (*B. cereus* et *Vibrio cholerae*), y compris des agents pathogènes pour l'Homme, et différents types d'infections fongiques. De plus, l'activité des 5 BLIS mentionnées précédemment a été testée contre des isolats de *S. aureus* associés à une mammite bovine. Tous les isolats de *S. aureus* étaient sensibles aux 5 bactériocines de *B.thuringiensis*, principalement à la morricine 269 et à la kurstacine 287, suivies de la kenyacine 404, de l'entomocine 420 et de la tolworthcine 524²⁹⁵.

OBJECTIF DE LA PARTIE 3

Bien que les bactériocines, avec un potentiel élevé, soient essentiellement produites par des bactéries lactiques, les membres du genre *Bacillus*, en particulier *B. thuringiensis*, émergent pour la recherche de bactériocines présentant de nouvelles activités. Ces bactéries et les molécules produites par ces bactéries, sont de bons modèles d'étude dans la recherche et le développement de nouveaux antimicrobiens contre les BMR.

Dans le but de rechercher des substances à potentiels antimicrobiens pour lutter contre les bactéries multirésistantes de niveau 1 (critique) comme défini par l'OMS, l'objectif de ce travail a été, dans un premier temps, de tester différentes souches de *B. thuringiensis* contre la souche de *K. pneumoniae* multirésistante aux antibiotiques Kp5241. Cette souche est productrice de la carbapénémase NDM-1 et de la BSLE CTX-M-15¹⁷⁸.

Une des souches testées de *B. thuringiensis*, la souche BUMP103, a montré une activité d'inhibition de la croissance de Kp5241. Une précédente étude avait montré que la bactéricine Bt103 (peptide de ~ 11 kDa) sécrétée par cette même souche avait une activité de type « bactériocine » sur des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, comme *Agrobacterium tumefaciens*³⁰⁸. Sa séquence N-terminale étant disponible (18 acides aminés) et en partant de l'hypothèse que l'action sur la souche Kp5241 pouvait être due à ce peptide, une recherche *in silico* a été effectuée dans les banques de données génomiques. Un gène codant potentiellement pour ce peptide a été identifié dans une souche de *B. cereus* (WP_0167610.1). Ce gène a pu être amplifié par PCR à partir de la souche *B. thuringiensis* BUMP103 et cloné dans un vecteur d'expression. Après sécrétion de la protéine recombinante chez la bactérie *E. coli*, son activité a été testée sur Kp5241.

Matériels et méthodes

XXIV. Souches de *B. thuringiensis* étudiées

Six souches de *B. thuringiensis* isolées de sol Tunisien ont été utilisées dans cette étude. Elles proviennent de la collection du Laboratoire des Biopesticides du Centre de Biotechnologie de Sfax (Tunisie). Les souches Bt-2, Bt-4, Bt-7, Bt-19, Bt-27 et Bt-103 (encore appelée Bt-BUMP103) ont été testées contre la souche multi-résistante aux antibiotiques de *K. pneumoniae*, Kp5241 (voir partie 2).

XXV. Criblage de l'activité antimicrobienne de Bt

A. Méthode de diffusion à partir de puits (ou AWDA, pour agar well diffusion assay)³¹⁰

La méthode de diffusion à partir de puits a été réalisée sur un milieu gélosé de man, Rogosa et Sharpe (ou M.R.S., Oxoid). L'épaisseur de la gélose doit être de $5 \text{ mm} \pm 0,5 \text{ mm}$ (40 mL pour une boîte de 90 mm de diamètre). Puis, des puits de diamètre de 6 mm sont creusés dans la gélose laissant un fond d'au moins 2 mm. Une suspension bactérienne de la bactérie à tester, Kp5241, a été réalisée en solution NaCl à 0,9%, pour atteindre une turbidité équivalente à celle de l'étalon 0,5 de la gamme de McFarland (Densimat, BioMérieux), ce qui correspond à un inoculum d'environ $1 \text{ à } 2 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$ pour *K. pneumoniae*. Après avoir écouvillonné la totalité de la surface de la gélose dans 2 directions avec cette suspension, un volume de 500 μL des substances ou surnageants de bactéries Bt, à tester a été déposé dans les puits.

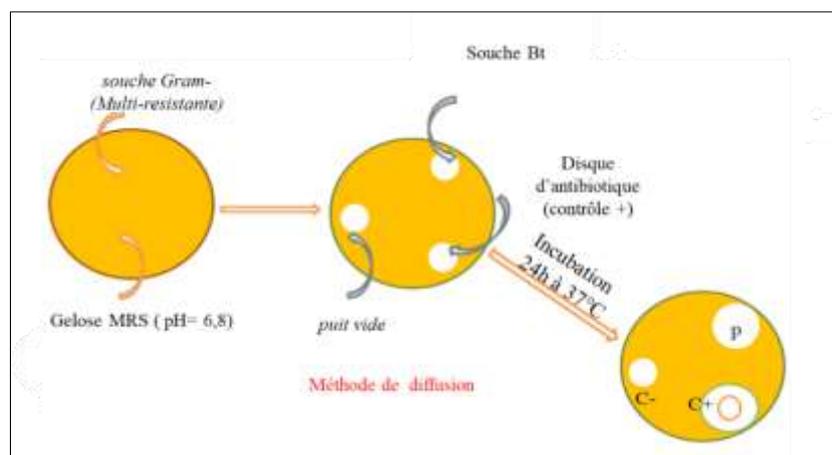


Figure 59. Méthode de diffusion sur milieu solide à partir de puits

Un disque d'antibiotique peut être utilisé comme contrôle positif et un puits contenant du milieu similaire, mais ne contenant pas la substance/souche à tester, comme contrôle négatif. Les géloses sont ensuite incubées pendant au moins 24h à 37°C en aérobiose. Des zones d'inhibition de croissance se forment autour du puits, en cas de réaction positive.

B. Méthode de diffusion à partir de disque

Cette méthode est similaire à celle de l'antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu gélosé, excepté le dépôt d'un disque stérile (papier buvard) sur lequel est déposé une suspension de 20 µL de la substance (bacthuricine recombinante Bt103) ou surnageant de souches de Bt. L'écouvillonnage de l'inoculum de la souche de Kp5241 à tester est réalisé avant le dépôt des disques selon la méthode décrite précédemment. L'incubation est réalisée à 30°C en aérobiose, pendant au moins 24h.

C. Recherche in silico des gènes candidats et de leur signal de sécrétion

A partir de la séquence N-terminale de 18 acides aminés (AVLPYDDVNITNTGILYE) de la bacthuricine 103 de la souche BUMP103 publiée par Kamoun et al. (2011)³⁰⁸, une analyse *in silico* de recherche dans les banques génomiques a été réalisée (NCBI BLAST), pour identifier un gène potentiel de la bacthuricine 103 par homologie de séquences protéiques. Le gène trouvé par cette stratégie a été nommé Bt103. Le signal de sécrétion de Bt103, chez les bactéries à Gram positif ou à Gram négatif a été prédit par le logiciel SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

D. Amplification par PCR du gène *bt103*

L'amplification du gène *bt103* par PCR a été réalisée en utilisant la GoTaq™ polymérase et selon le protocole préconisé par le fournisseur (Promega). Cette amplification a été effectuée à partir de l'ADN total (~ 1 à 10 ng/µL) de *B. thuringiensis* souche BUMP103 ou d'autres souches de *Bacillus*, obtenu après extraction par ébullition (30 min à 100°C). Les amorces (BcDUF5065atg_S/BcDUF5065taa_AS, avec S pour sens et AS, pour anti-sens) ont été dessinées à partir du gène codant pour "DUF5065 domain containing protein" de *B. cereus* taxon 86661 (N° GenBank, WP016107670), et permettent d'amplifier la région codante de 471 pb. Deux autres couples d'oligonucléotides ont été dessinés, plus en amont et en aval du gène afin de réaliser des PCR nichées. Le couples de primers, Bc-45_S et Bc+34_AS2 permettent d'amplifier 45 pb en amont du codon d'initiation (ATG) et 34 pb en aval du codon

stop (TAA), avec une taille attendue d'environ 550 pb et le couple d'amorces, Bc-119_S et Bc+120_AS, permet d'obtenir un amplicon de 700 pb, correspondant à 99 pb en amont du codon ATG et 120 pb en aval du codon stop du gène *bt103*. La séquence des amorces est donnée dans le tableau 17.

Tableau 17. Amorces utilisées pour amplifier le gène de la bacthuricine Bt 103

Amorces	Séquences (5'→3')	Température de fusion
BcDUF5065atg_S	ATGAAATTAGGAAAATTAGCA	51,4°C
BcDUF5065taa_AS	TACTTATTAATAGTGAAGAAATC	50,8°C
BcDUF5065-45_S	GATTATAATTATAGAAATATTTAG	47,3°C
BcDUF5065+34_AS2	CCCTATATGTTAAGGAAC	49,1°C
BcDUF5065-119_S	TGGGTGTATTTTCTTTCTATT	50,1°C
BsDUF5065+120_AS	CGAXTAGATAACTGAAGT	49,1°C

E. Clonage du gène la bacthuricine Bt103

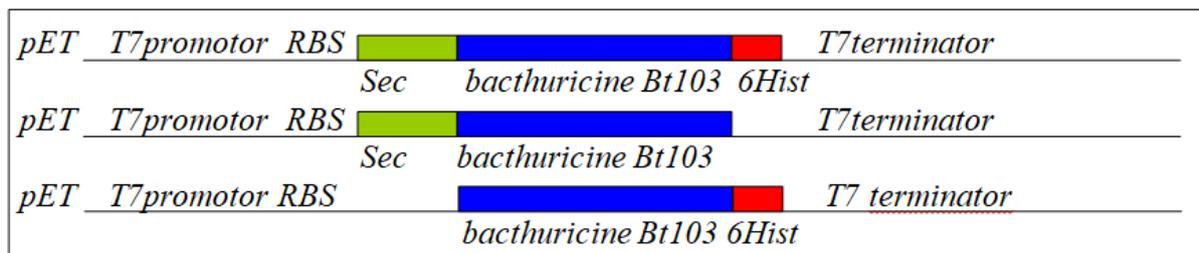
Un clonage du gène *bt103* a été effectué dans le vecteur pGEMT-EasyTM (Promega), après extraction de l'amplicon sur gel (kit Macherey-Nagel). Ce vecteur utilise la technique du "TA-cloning" pour faciliter l'insertion des produits de PCR dans le vecteur linéarisé et permet la sélection de colonies bleues/blanches sur milieu contenant du X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside). Le mélange de ligation a été fait selon les conditions du fabricant (Promega) et incubé à température ambiante pendant 16h. Après transformation de la bactérie *E. coli* DH5alpha, les colonies blanches ont été analysées (PCR sur colonies) en utilisant les amorces universelles T7 et SP6. La taille attendue du fragment amplifié a été déterminée après électrophorèse en gel d'agarose. L'insert contenu dans ces plasmides recombinants a été vérifié par séquençage (Eurofins Société).

Des sites de restrictions NdeI et XhoI ont été rajoutés en 5' et 3' du cadre de lecture afin de le sous-cloner dans le vecteur d'expression pET-32 (Novagen)

Plusieurs constructions ont été réalisées avec des amorces qui permettent d'amplifier le cadre ouvert de lecture du gène *bt103*, avec ou sans son signal de sécrétion et avec une amorce anti-sens, sans codon stop afin de produire une protéine recombinante comportant une séquence de 6 histidines, (ou Tag His, pour étiquette Histidine) (figure 60).

Afin de vérifier la fonctionnalité du signal de sécrétion de Bt103 (Gram positif) dans la bactérie *E. coli* (Gram négatif), le clonage du gène de la thioredoxine (TRX) a été réalisé. Il comporte en N-terminal, le signal de sécrétion du gène de la bacthuricine Bt103, et il est fusionné en C-terminal avec 65 résidus (TNPA65) incluant un tag 8Hist.

Ces constructions ont été utilisées pour transformer la souche *E. coli* BL21-pLysS (qui permet l'expression du gène sous l'induction de l'IPTG, 1mM final). La bactérie contient un plasmide (pLysS) qui permet d'éviter ou de réduire les fuites du promoteur pT7 (promoteur de la RNA polymérase du phage T7) avant induction par l'IPTG, et prévenir ainsi tout risque lié à la toxicité de la protéine recombinante. Les bactéries transformées ont été sélectionnées sur milieu solide LB contenant de l'ampicilline à 100 mg/l (sélection des plasmides pET32a(+)) et 34 mg/l de chloramphénicol (maintenance du plasmide pLysS).



Figures 60. Schéma du gène *bt103* (en bleu) et de son environnement dans le vecteur pET-32a(+) pour les différentes protéines de fusions réalisées

Sec (vert) : signal de sécrétion ; 6His (rouge) : étiquette Histidine, RBS : séquence de fixation aux ribosomes.

F. Prédiction *in silico* de la structure de la bacthuricine Bt103

Une prédiction de la structure secondaire de la bacthuricine Bt 103 à partir de sa séquence peptidique avec son signal de sécrétion et l'étiquette 6His a été réalisée par le logiciel psipred : (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/result/a8ccf08c-3a79-11e9-8747-00163e110593>).

Une prédiction de la structure tertiaire de la bacthuricine Bt103-6H a été réalisée par le Logiciel Phyre2 : (http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/phyre2_output/017240e7686e30d7/summary.html).

G. Production de la bacthuricine dans *E. coli* BL21-pLysS

Après vérification par séquençage, les constructions réalisées précédemment dans le plasmide pET-32a(+), ont été utilisées pour transformer *E. coli* BL21-pLysS et des cultures ont été réalisées afin de produire la protéine recombinante.

Les bactéries ont été cultivées à 37°C en milieu LB jusqu'au milieu de la phase exponentielle (DO_{600nm} de 0,5), puis de l'IPTG (1mM final) a été ajouté dans la culture pour induire l'expression de la bacthuricine (ou de la thiorédoxine-8H TNPA65 pour le contrôle de sécrétion), et une incubation pendant 16 h à 30°C a été effectuée à 30°C sous agitation (200 rpm).

Après centrifugation, le surnageant (protéine sécrétée) a été récupéré et passé au travers d'un filtre de 0,45 μ m (Millipore). Les surnageants de chaque échantillon ont été lyophilisés, puis remis en suspension dans du milieu de culture dans le but de les concentrer 20 fois.

Une autre stratégie pour concentrer les protéines du surnageant filtré a été de les précipiter avec une solution de sulfate d'ammonium à 50%, pendant 24 h à 4°C. Le culot contenant les protéines précipitées a été récupéré lors d'une étape de centrifugation (13 000 g, 20min 4°C). Le culot a ensuite été resuspendu dans un tampon 50mM HEPES pH7,5, 10% glycérol, 1mM DTT, 1mM EDTA. Puis cette suspension, très concentrée en sel, a été déposée sur une colonne Amicon3K (cutoff, 3kDa) pour éliminer le sulfate d'ammonium et pour la concentrer.

Pour extraire la protéine sans signal de sécrétion, les culots bactériens ont été remis en suspension dans un tampon de lyse (50 mM de Tampon phosphate, pH 7,8 ; 300 mM de NaCl, 1mM de β -mercaptoéthanol, 10% de glycérol, 1mg/ml de lysosyme contenant un cocktail d'anti-protéases (Complete Mini, EDTA-free Tablets, Roche), 1 mM de PMSF (fluorure de phénylméthylsulfonyl) et 2 μ g/mL de DNase. Après sonication des lysats (3 fois, 20 sec à 4°C), le surnageant a été récupéré après centrifugation à 17 000 g pendant 20 min à 4°C. Cette fraction soluble (FS) a été conservée à -20°C avant d'être analysée. Les culots ont été repris dans un tampon composé d'urée 8 M, 5% de SDS, 250 mM Tris-HCl, pH, 6,8 et 2% de β -mercaptoéthanol, et ce traitement permet de visualiser les protéines insolubles (FI, fraction insoluble).

H. Analyse des protéines

1. Electrophorèse des protéines SDS-PAGE

Les échantillons protéiques (surnageants de sécrétion, FS, FI) ont été séparés par SDS-PAGE, contenant 12% de polyacrylamide, selon le protocole décrit dans Sambrook et al ³¹¹. Un marqueur de taille Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) a été utilisé pour comparer les tailles des protéines étudiées. Une immersion du gel dans une solution de bleu de Coomassie pendant une nuit a été réalisée, puis une deuxième immersion dans une solution de méthanol 50% / acide acétique 10% pour décolorer le gel et visualiser les protéines.

2. Révélation par Western-Blot

Les protéines après SDS-PAGE ont été transférées sur une membrane PolyVinylDièneFluoride (PVDF, Thermo-Scientific). Le transfert (semi-sec) a été effectué pendant 15 à 20 min sous un ampérage de 115 mA.

Après saturation pendant 16h, de la membrane de PVDF par une solution de saturation (lait en poudre dans tampon PBS), la membrane a été incubée pendant 2 h dans la solution d'hybridation contenant l'anticorps primaire (anti-6His de souris, dilué au 1/2000^{ième}), puis après des étapes de lavage, une 2^{ème} incubation avec l'anticorps secondaire (anti-souris, dilué au 1/10000^{ème}) conjugué à la peroxydase marquée. La révélation de la membrane a été effectuée avec les réactifs ECL (Luminol et solution de peroxyde, BioRad) et en utilisant l'imager "ImageQuant LAS 4010 (BioRad).

Résultats

XXVI. Mise en évidence de l'activité d'inhibition de croissance de Bt BUMP103 vis-à-vis de Kp5241

En utilisant la méthode de diffusion à partir de puits (ou AWDA) et parmi les 6 souches de Bt testées, seule la souche Bt BUMP103 a montré une activité d'inhibition de la croissance de la souche Kp5241 de *K. pneumoniae* multirésistante aux antibiotiques. Ce test a été reproductible (Figure 61).



Figure 61. Deux tests AWDA indépendants de l'activité antibactérienne de Bt BUMP103 contre le bacille à Gram négatif, *K. pneumoniae* Kp5241. La zone d'inhibition (halo clair) est entourée d'un cercle rouge sur la figure.

XXVII. Recherche du gène codant pour la bacthuricine F013 par analyse *in silico*

Kamoun *et al.* en 2011³⁰⁸ ont montré que la souche de *B. thuringiensis* BUMP103 sécrète une protéine d'~ 11 kDa, appelée bacthuricine Bt103. Cette protéine purifiée par une stratégie mal détaillée dans la publication, a été séquencée par spectrométrie de masse et seuls les 18 premiers acides aminés ont été obtenus. Il a été montré que la bacthuricine Bt103 présentait une activité d'inhibition de la croissance de bactéries à Gram positif, telles que *L. monocytogenes* et *B. cereus* et présentait aussi une activité contre un bacille à Gram négatif appartenant au genre *Agrobacterium subsp*, une bactérie responsable de maladies chez les plantes. Aucune information n'est disponible sur le mode d'action de cette bacthuricine Bt103, mais Salazar-Marroquín *et al.*,²⁹⁶ dans une revue de la littérature publiée en 2016, la classent parmi les bactériocines de Bt, ayant un poids moléculaire de ~ 10 kDa.

Partant de l'hypothèse que cette bacthuricine Bt103 pouvait peut-être être responsable de l'activité observée sur la souche Kp5241, de *K. pneumoniae* multirésistante, la séquence N-terminale (AVLPYDDVNITNTGILYE) identifiée par Kamoun *et al.* ³⁰⁸, a été utilisée pour réaliser une recherche *in silico* d'homologie de séquences protéiques. Cette analyse a permis de mettre en évidence une protéine, "DUF5065 domain containing protein" identifiée chez *B. cereus* taxon 86661 (N° accession GenBank, WP016107670)

XXVIII. Recherche du gène *bt103*

L'amplification par PCR à partir d'ADN total de *B. thuringiensis*, avec les amorces dessinées à partir de la séquence nucléotidique du gène de *B. cereus* taxon 86661, montre une amplification de la taille attendue de 471pb chez *B. thuringiensis* BUMP103 (Figure 62, gauche).

Les 6 souches de *B. thuringiensis* utilisées dans notre étude, ainsi que 2 souches de *B. cereus*, ont aussi été testés par PCR avec les amorces Bc-45_S et Bc+34_AS2. Le résultat montre la présence de ce gène chez la souche de *B. thuringiensis* Bt4, mais pas chez les 4 autres souches (Bt2, Bt7, Bt19, Bt27) et les 2 souches de *B. cereus* testées (Figure 62, droite).

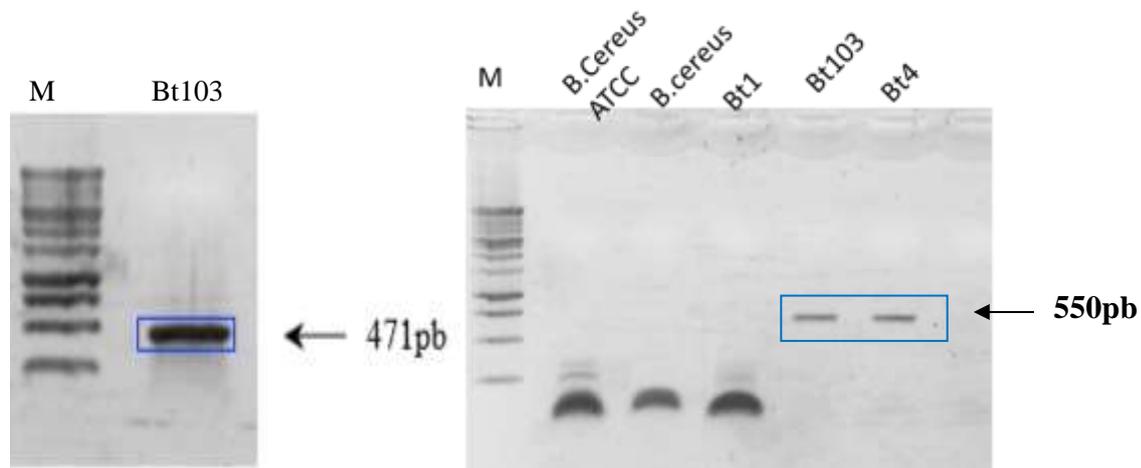


Figure 62. Amplification de gène de la bacthuricine Bt103 avec différentes amorces atg_S / taa_AS et -45_S/+34_AS2

Avec M : marqueur de taille, Bt: *B. thuringiensis*, Bt1: une souche contrôle négatif

XXIX. Analyse de la séquence du gène *bt 103*

Le gène *bt103* amplifié à partir de la souche *B. thuringiensis* BUMP103 a été cloné et séquencé. La séquence nucléotidique présente 100% d'identité avec le gène de *B. cereus* identifié *in silico*.

La séquence du gène *bt103* après sous-clonage dans le vecteur d'expression pET-32a(+), ainsi que la protéine de fusion générée sont montrés dans la figure 63.



Figure 63. Séquence nucléotidique (A) et peptidique (B) de la bacthuricine recombinante Bt103.

La séquence de la protéine est notée en rouge, avec en violet la séquence du signal de sécrétion putatif. La séquence de l'étiquette 6-Histidines est notée en orange. Les codons d'initiation et de terminaison sont encadrés.

XXX. Prédiction de signal de sécrétion de la bacthuricine Bt103

Le signal de sécrétion de la protéine Bt103 a été prédit *in silico* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), ainsi que son site de clivage chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. La prédiction de clivage de signal de sécrétion chez les 2 groupe est différente. Chez les bactéries à Gram positif, un clivage est prédit entre les acides aminés (aa) position 30 et 31 : MKLGKLLALV GALALGGLTAVGTINTPSASA

(figures 64A). Chez les bactéries à Gram négative, le clivage est prédit entre les acides aminés 21 et 22, libérant la séquence MKLGKLLALV GALALGGLTAVG (figure 64B).

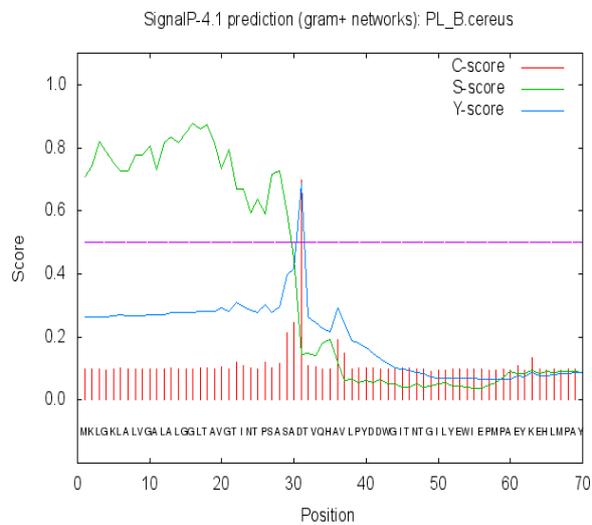
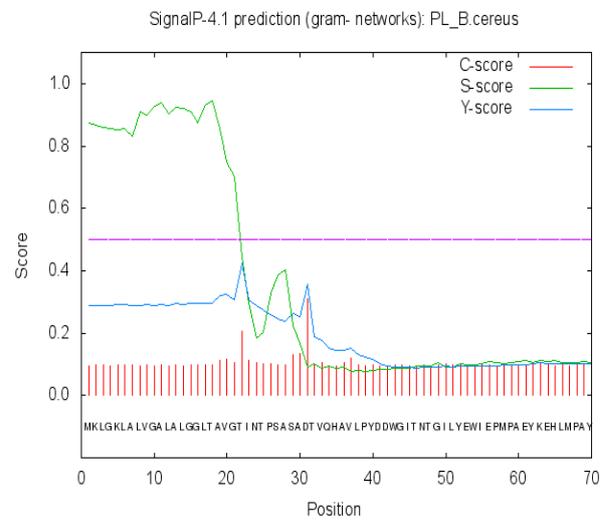
A**B**

Figure 64. Prédiction de signal de sécrétion et de son site de clivage chez les bactéries à Gram positif (A) et chez les bactéries à Gram négatif (B)

XXXI. Prédiction de la structure secondaire et tertiaire de la bacthuricine Bt103

La séquence peptidique de la bacthuricine Bt103-6H (avec l'étiquette Histidine) sécrétée est dépourvue de pont disulfure et présente une taille théorique de taille de 14.95 kDa

La prédiction de la structure secondaire par le logiciel Psipred a montré que la bacthuricine Bt103 sécrétée contient 2 hélices α et 6 feuillets β (figure 65). Les 2 hélices se localisent dans la séquence N-terminale de la bacthuricine tandis que les feuillets sont situés sur le reste de la séquence.

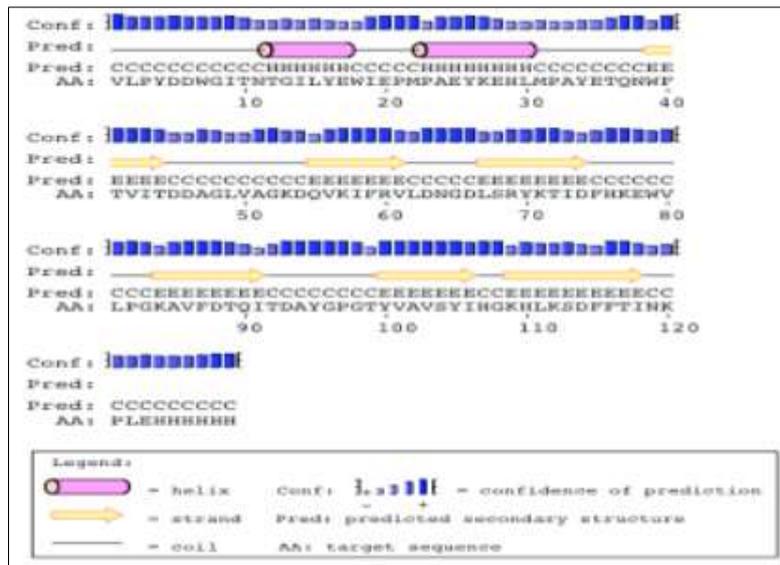


Figure 65. Prédiction de la structure secondaire de la bacthuricine Bt103

La prédiction par le logiciel Phyre2 de la structure tertiaire de la bacthuricine Bt103 a montré une organisation antiparallèle des feuilletts β (fig 66). Elle révèle 100% d'homologie de structure avec une protéine de *B. anthracis* (accession MTA01000023), malgré une identité de séquence primaire de seulement 43%. La région N-terminale présente également une homologie structurale avec un motif endoglucanase de *Eubacterium cellulosvens* (figure 66).

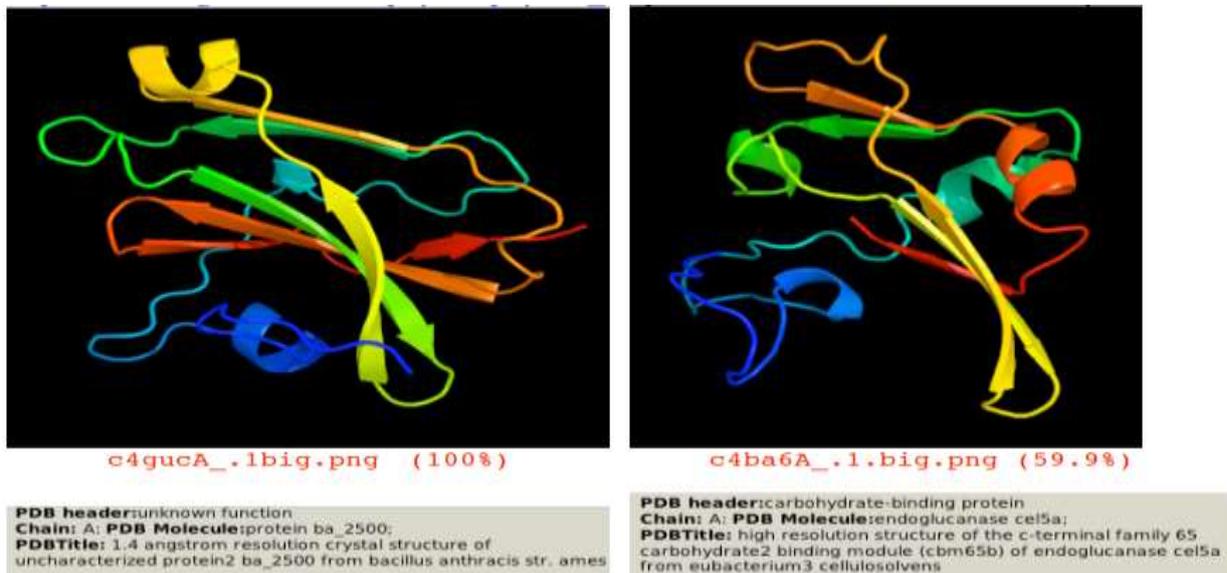


Figure 66. Prédiction de la structure tertiaire de la bacthuricine Bt103 par le logiciel Phyre2

XXXII. Analyse de la solubilité et de la sécrétion de la bacthuricine

Bt103 chez *E. coli* BL21-pLysS

La bacthuricine recombinante Bt103 (+ Tag His) sans signal de sécrétion (Bt103sec-, ~ 15 kDa) ou avec son propre signal de sécrétion (Bt103sec+, ~ 17 kDa) a été produite dans la bactérie *E. coli* BL21-pLysS. La thiorédoxine 8H TNPA65 (TRX), une protéine soluble, a été produite en parallèle sans (~22 kDa) ou avec (~ 27 kDa) le signal de sécrétion de Bt103 pour vérifier la fonctionnalité de ce dernier.

La figure 67 B a montré que la protéine Bt103 sans signal de sécrétion est faiblement soluble avec une taille attendue d'~ 15 kDa, contrairement à la thiorédoxine qui est produite dans les mêmes conditions en plus grande quantité. Il est à noter que sans le signal de sécrétion, cette protéine Bt103 n'est pas non plus, retrouvée dans la fraction insoluble.

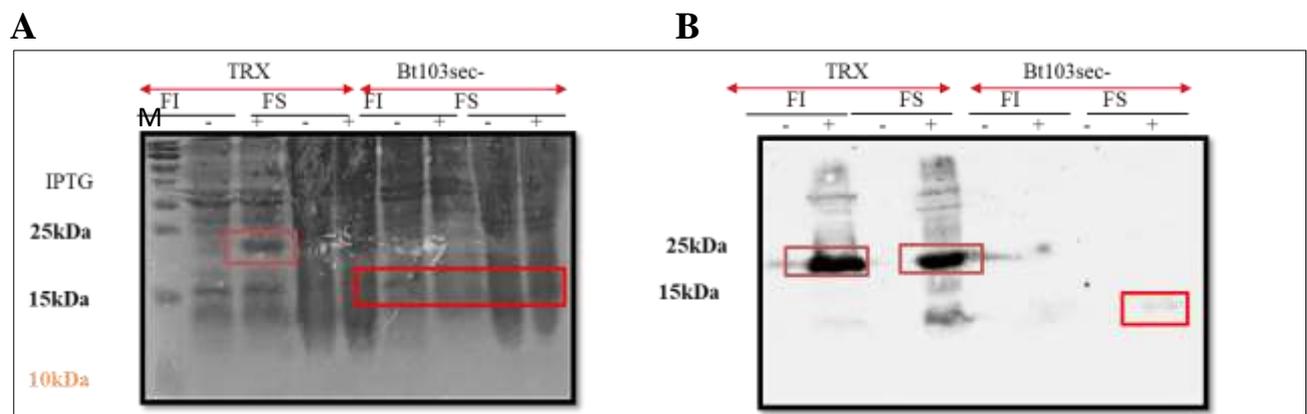


Figure 67. Test de solubilité de la bacthuricine Bt103 sans signal de sécrétion

A SDS-PAGE et coloration au bleu Coomassie des protéines

B Western-blot après marquage avec un anticorps anti-His

La zone où sont localisées les protéines d'intérêt est entourée en rouge.

TRX : protéine contrôle+, Bt103 sec- : bacthuricine sans signal de sécrétion, FI : fraction insoluble, FS : fraction soluble, - : sans induction avec IPTG, + : après induction avec 1mM d'IPTG et M : marqueur de taille.

La figure 68B montre que la protéine Bt103 avec son signal de sécrétion (~ 17 kDa) est soluble, et n'est pas détectée dans la fraction insoluble.

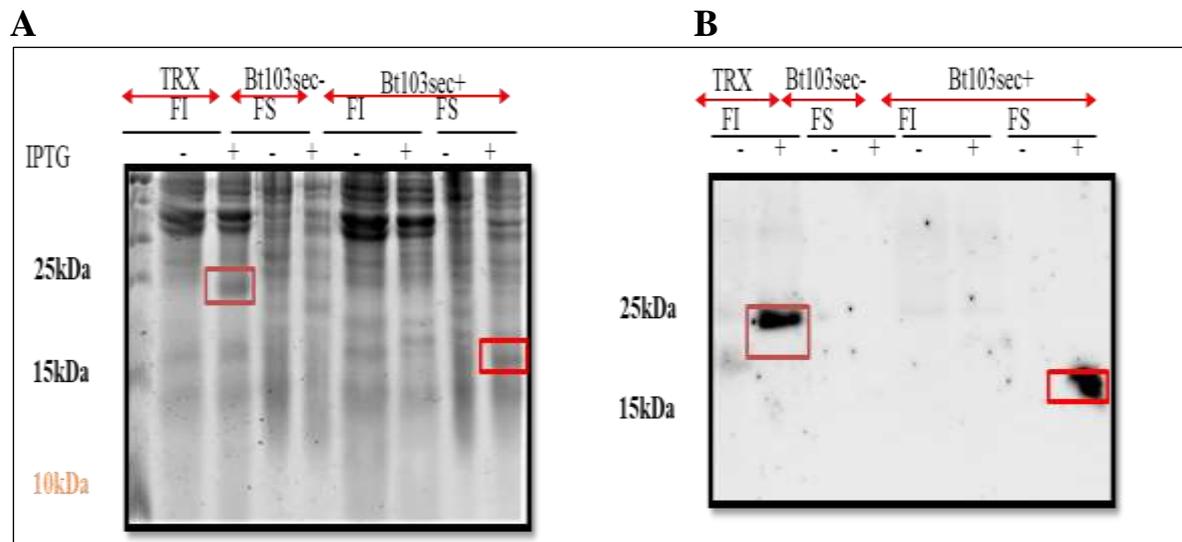


Figure 68. Test de solubilité de la bacthuricine Bt103 sans et avec signal de sécrétion

A SDS-PAGE et coloration au bleu Coomassie des protéines

B Western-blot après marquage avec un anticorps anti-His

La zone où sont localisées les protéines d'intérêt est entourée en rouge.

TRX : protéine contrôle + avec le signal de sécrétion de Bt103

Bt103 sec- et Bt103sec+, bacthuricine sans et avec signal de sécrétion, respectivement

FI : fraction insoluble, FS : fraction soluble, - : sans induction avec IPTG, + : après induction avec 1mM d'IPTG et M : marqueur de taille.

XXXIII. Analyse du surnageant de sécrétion d'*E. coli* BL21-pLysS avec Bt103

Les résultats présentés sur la figure 69 ont été obtenus avec la méthode de concentration du surnageant par lyophilisation. Un volume de 20 μ L a été déposé par puits correspondant à un volume de surnageant d'une culture de 2 ml.

La figure 69 montre que la protéine Bt103sec+ est visible dans le surnageant de sécrétion de culture, au contraire de la bacthuricine sans signal de sécrétion (Bt103sec-). La thioredoxine est également sécrétée avec le signal de la bacthuricine Bt103. Ainsi, le signal de sécrétion d'une bactérie à Gram positif (*B. thuringiensis*) permet son export dans le milieu extérieur chez une bactérie à Gram négatif (*E. coli*).

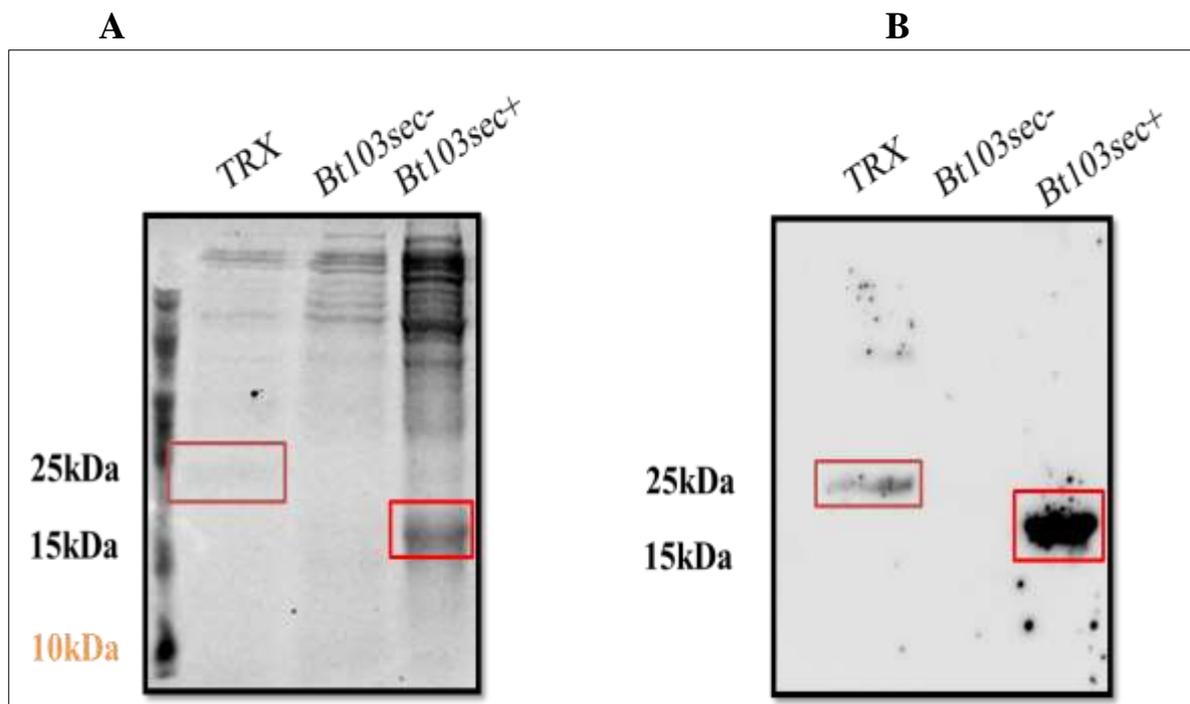


Figure 69. Analyse de la sécrétion de la bacthuricine Bt103 sans ou avec son signal de sécrétion

A SDS-PAGE et coloration au bleu Coomassie des protéines

B Western-blot après marquage avec un anticorps anti-His

La zone où sont localisées les protéines d'intérêt est entourée en rouge.

TRX : protéine contrôle+ avec signal de sécrétion, Bt103 sec+ : bacthuricine avec signal de sécrétion et Bt sec- : bacthuricine sans signal de sécrétion (contrôle -)

Résultats obtenus après induction à l'IPTG 1Mm final

XXXIV. Tests préliminaires d'activité de la bacthuricine recombinante Bt103

Avant de produire la protéine recombinante Bt103sec+ en grande quantité et de la purifier, nous avons voulu vérifier si elle était fonctionnelle. En effet, le clivage du signal de sécrétion ne s'est peut-être pas fait correctement et la présence de l'étiquette His modifie peut-être sa structure et son activité. Il est également possible qu'elle puisse subir des maturations post-traductionnelles qui ne se feraient pas correctement dans la bactérie *E. coli*.

La méthode de diffusion à l'aide de disque imbibé a été utilisée pour tester cette activité contre la souche de *K. pneumoniae* Kp5241. Des résultats préliminaires, présentés dans la figure 70, montrent une activité similaire du surnageant contenant la bacthuricine recombinante Bt103sec+ à celle de l'activité de surnageant de *B. thuringiensis* BUMP103.

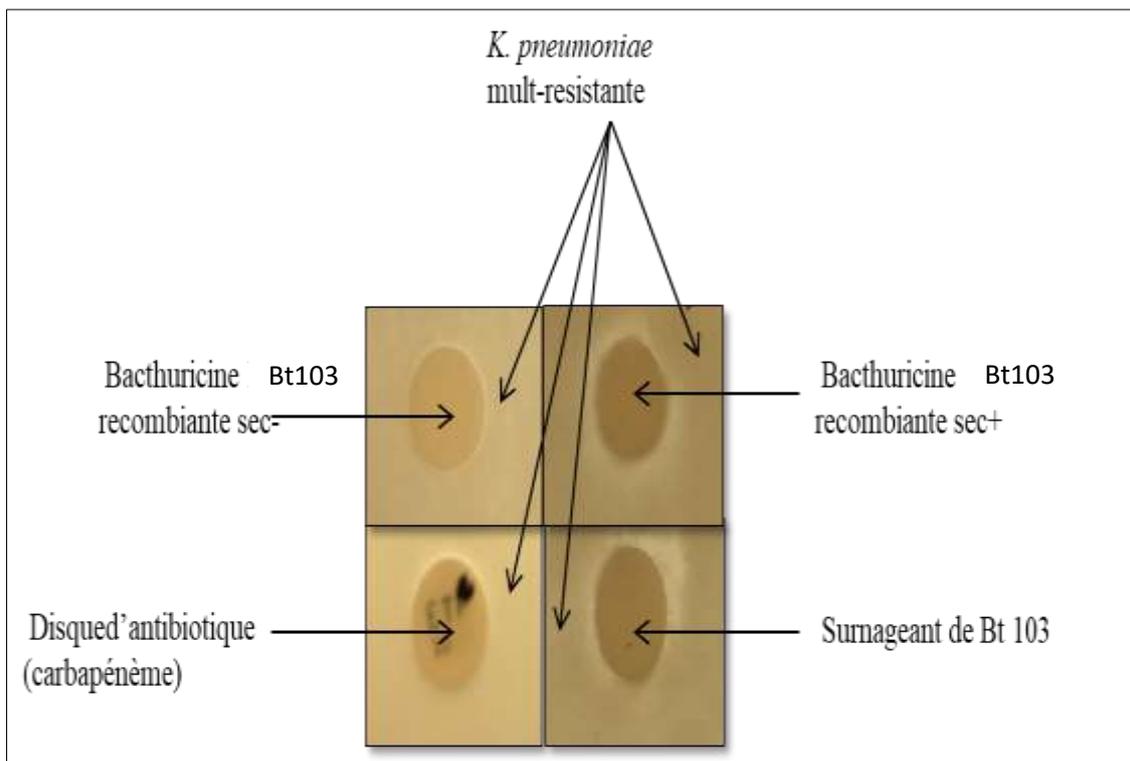


Figure 70. Test d'activité utilisant la méthode de diffusion à l'aide de disque imbibé avec signal de sécrétion (sec+) et sans signal de sécrétion (sec-)

Discussion

L'utilisation massive des antibiotiques, chez l'homme et les animaux, a conduit à l'émergence de bactéries multirésistantes aux antibiotiques (BMR). Le traitement par les antibiotiques des infections causées par ces BMR est problématique³¹². On estime qu'en Europe environ 25 000 personnes décèdent chaque année des suites d'infections causées par des BMR³¹³. L'augmentation de ces bactéries oblige à rechercher et à développer de nouvelles voies et de nouveaux agents antimicrobiens pour combattre ce fléau. L'utilisation de bactériocines pourrait constituer une alternative intéressante³⁰³.

Certaines molécules produites par *B. thuringiensis* s'inscrivent dans des stratégies de lutte contre les insectes, virus, champignons, parasites... D'autres ont montré des actions contre des cellules cancéreuses, ainsi que dans la modulation du système immunitaire¹⁸⁴. Certaines bactériocines de *B. thuringiensis* sont décrites comme ayant un large spectre d'activité contre les bactéries à Gram positif et négatif²⁹⁶.

Dans cette étude, nous avons testé 6 souches de *B. thuringiensis*, bactéries de l'environnement, isolées à partir du sol tunisien, contre une bactérie à Gram négatif multirésistante aux antibiotiques. Seule la souche BUMP103 a montré une activité intéressante contre Kp5241. La même souche BUMP103 a été testée par Kamoun et al³⁰⁸ et avait montré une activité contre *L. monocytogenes*, *B. cereus* et *A. tumefaciens*. Cependant aucune activité n'avait été trouvée contre des souches d'entérobactéries (*E. coli* et *K. pneumoniae*) sensibles aux antibiotiques actifs sur ces bactéries.

Dans ce travail, nous avons cloné le gène codant pour la bacthuricine Bt103 et pour la première fois nous avons obtenu la séquence peptidique en totalité, contrairement à l'équipe de Kamoun et al³⁰⁸. Nous avons identifié un peptide d'~ 15kDa (17 kDa avec le Tag His), appelé Bt103. Cependant, les prédictions des structures secondaires et tertiaires ne nous ont pas éclairé sur son mode d'action

La production d'une forme recombinante de Bt103 dans la bactérie *E. coli* BL21-pLysS a permis sa sécrétion. Elle semble avoir une activité sur la souche multirésistante Kp5241. Une fois purifiée et obtenue en plus grande quantité, il sera intéressant de vérifier son spectre d'activité et son action à la fois sur des souches d'entérobactéries résistantes et sensibles aux antibiotiques.

Si son activité se confirme, ce sera la première fois qu'on démontrera que ce type de molécules peut avoir une action sur une souche de *K. pneumoniae* multirésistante (productrice de NDM-1).

Notre stratégie pour produire la protéine Bt103 après sécrétion semble efficace et donner de bons rendements. Une purification ultérieure sur colonne de tamisage moléculaire (séparation selon la taille) et si nécessaire, sur colonne d'affinité (colonne de Nickel), devrait permettre de l'obtenir pure. Son analyse en spectrométrie de masse devrait nous confirmer sa séquence N-terminale et le site de clivage du signal de sécrétion, ainsi que la présence d'éventuelle maturations post-traductionnelles.

Cette procédure permet aussi la sécrétion de la thioredoxine. Une analyse de la sécrétion de différentes protéines (taille, solubilité, toxicité...) permettrait de vérifier si ce signal pourrait être efficace pour la sécrétion de protéines recombinantes chez la bactérie *E. coli*, très utilisée en biotechnologie.

Conclusion

Depuis des décennies, *B. thuringiensis* est une bactérie très utilisée dans le domaine agricole, en tant que bio-insecticide et appliquée, sans toxicité et sans entraîner d'effets néfastes, sur différentes cultures destinées à la consommation humaine. Dans cette étude, nous montrons pour la 1^{ère} fois que la souche Bt BUMP103 est active contre une souche multirésistante de *K. pneumoniae* et que le surnageant de la bactéricine recombinante Bt103 produite chez *E. coli* BL21 semble conserver cette activité. Elle pourrait également être testée en synergie avec d'autres molécules (antibiotiques ou autres bactériocines) afin de potentialiser son effet et constituer une alternative thérapeutique intéressante pour le traitement des BMR.

Par ailleurs, dans la littérature, peu de bactériocines de *B. thuringiensis* sont produites en tant que protéines recombinantes chez *E. coli*^{184,314}. Notre stratégie, si elle se confirme, pourrait permettre la production de ce type de molécules et faciliter leur application biotechnologique.

Conclusion générale

En 2015, l'OMS a souligné la nécessité de la surveillance de la résistance aux antimicrobiens. Elle a pour but de regrouper les données épidémiologiques et cliniques sur les BMR, représentant les menaces les plus importantes pour la santé dans le monde. Le réservoir essentiel de ces BMR est le milieu hospitalier, où se trouvent réunies les conditions favorables à leur dissémination. Ces dernières années, certaines BMR ont également été trouvées dans le milieu communautaire.

En plus de la résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération chez les entérobactéries surtout chez *E. coli* et *K. pneumoniae* responsables parfois d'infections graves comme des bactériémies, des résistances enzymatiques aux carbapénèmes ont aussi émergé depuis la fin des années 2010, chez les bacilles à Gram négatif, tels que *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae*. La colistine est redevenue un antibiotique prescrit pour le traitement d'infections humaines sévères liées à des bactéries résistantes à toutes les autres options thérapeutiques. Ceci a eu pour conséquence l'émergence de souches résistantes à cet antibiotique.

En Tunisie, la surveillance des BMR dans les milieux communautaire et hospitalier nécessite davantage de contrôle. Une surveillance continue de la résistance aux antibiotiques est à encourager dans chaque établissement de santé. L'analyse des données de la surveillance est à la base de toute démarche permettant d'évaluer l'ampleur du problème et d'y apporter des correctifs et les solutions nécessaires.

La détermination des mécanismes de résistance des antibiotiques et leur régulation permet de mieux comprendre et détecter les bactéries résistantes en clinique. Elle permet une meilleure prise en compte pour le développement de futurs antimicrobiens. Le pouvoir anti-infectieux des bactériocines associé à leur faible toxicité a suscité un vif intérêt pour leur utilisation. La découverte des bactériocines et bactériocines-like actives sur des BMR peut être une alternative thérapeutique intéressante pour leur traitement.

Bibliographie

1. OMS | Premier rapport de l'OMS sur la résistance aux antibiotiques: une menace grave d'ampleur mondiale. WHO. <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/fr/>.
2. Price R. O'Neill report on antimicrobial resistance: funding for antimicrobial specialists should be improved. *Eur J Hosp Pharm.* 2016;23(4):245-247. doi:10.1136/ejpharm-2016-001013
3. Résistance aux antibiotiques. <http://lesantibiotiques-lapenicilline.e-monsite.com/pages/iile-fonctionnement>.
4. Tanwar J, Das S, Fatima Z, Hameed S. Multidrug resistance: an emerging crisis. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2014;2014:541340. doi:10.1155/2014/541340
5. Perron GG, Whyte L, Turnbaugh PJ, et al. Functional characterization of bacteria isolated from ancient arctic soil exposes diverse resistance mechanisms to modern antibiotics. *PLoS ONE.* 2015;10(3):e0069533. doi:10.1371/journal.pone.0069533
6. Olaitan AO, Rolain J-M. Ancient Resistome. *Microbiol Spectr.* 2016;4(4). doi:10.1128/microbiolspec.PoH-0008-2015
7. D'Costa VM, King CE, Kalan L, et al. Antibiotic resistance is ancient. *Nature.* 2011;477(7365):457-461. doi:10.1038/nature10388
8. Forsberg KJ, Reyes A, Wang B, Selleck EM, Sommer MOA, Dantas G. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science.* 2012;337(6098):1107-1111. doi:10.1126/science.1220761
9. Burmeister AR. Horizontal Gene Transfer. *Evol Med Public Health.* 2015;2015(1):193-194. doi:10.1093/emph/eov018
10. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep.* 2013;5(1):58-65. doi:10.1111/1758-2229.12019
11. Bengoechea JA, Sa Pessoa J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS Microbiology Reviews.* 2019;43(2):123-144. doi:10.1093/femsre/fuy043
12. Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread | Nature Microbiology. <https://www.nature.com/articles/s41564-019-0492-8>. Published August 1, 2019. Accessed August 1, 2019.
13. Hoffmann H, Roggenkamp A. Population genetics of the nomen species *Enterobacter cloacae*. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(9):5306-5318. doi:10.1128/aem.69.9.5306-5318.2003

14. Davin-Regli A, Lavigne J-P, Pagès J-M. *Enterobacter spp.*: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2019;32(4). doi:10.1128/CMR.00002-19
15. Nazir F, Ibrahim M, Zaman G, Hussain A, Yar AM, Bo Z. Genetic Diversity and Functional Analysis of Sigma Factors in *Enterobacter cloacae* Complex Resourced From Various Niche. *Evol Bioinform Online.* 2018;14:1176934318754878. doi:10.1177/1176934318754878
16. Guérin F, Isnard C, Sinel C, et al. Cluster-dependent colistin hetero-resistance in *Enterobacter cloacae* Complex. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(11):3058-3061. doi:10.1093/jac/dkw260
17. Cox G, Wright GD. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int J Med Microbiol.* 2013;303(6-7):287-292. doi:10.1016/j.ijmm.2013.02.009
18. Arzanlou M, Chai WC, Venter H. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Essays Biochem.* 2017;61(1):49-59. doi:10.1042/EBC20160063
19. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13(1):42-51. doi:10.1038/nrmicro3380
20. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31(4). doi:10.1128/CMR.00088-17
21. Guynet C, de la Cruz F. Plasmid segregation without partition. *Mob Genet Elements.* 2011;1(3):236-241. doi:10.4161/mge.1.3.18229
22. Guynet C, Cuevas A, Moncalián G, de la Cruz F. The stb operon balances the requirements for vegetative stability and conjugative transfer of plasmid R388. *PLoS Genet.* 2011;7(5):e1002073. doi:10.1371/journal.pgen.1002073
23. Vila J, Sáez-López E, Johnson JR, et al. *Escherichia coli* : an old friend with new tidings. *FEMS Microbiol Rev.* 2016;40(4):437-463. doi:10.1093/femsre/fuw005
24. Jaffe A, Chabbert YA, Semonin O. Role of porin proteins OmpF and OmpC in the permeation of beta-lactams. *Antimicrob Agents Chemother.* 1982;22(6):942-948.
25. Ferenci T, Phan K. How Porin Heterogeneity and Trade-Offs Affect the Antibiotic Susceptibility of Gram-Negative Bacteria. *Genes (Basel).* 2015;6(4):1113-1124. doi:10.3390/genes6041113
26. Liu Y-F, Yan J-J, Lei H-Y, et al. Loss of outer membrane protein C in *Escherichia coli* contributes to both antibiotic resistance and escaping antibody-dependent bactericidal activity. *Infect Immun.* 2012;80(5):1815-1822. doi:10.1128/IAI.06395-11
27. Shi X, Chen M, Yu Z, et al. In situ structure and assembly of the multidrug efflux pump AcrAB-TolC. *Nat Commun.* 2019;10(1):2635. doi:10.1038/s41467-019-10512-6

28. Atac N, Kurt-Azap O, Dolapci I, et al. The Role of AcrAB-TolC Efflux Pumps on Quinolone Resistance of *E. coli* ST131. *Curr Microbiol.* 2018;75(12):1661-1666. doi:10.1007/s00284-018-1577-y
29. Lange F, Pfennigwerth N, Höfken L-M, Gatermann SG, Kaase M. Characterization of mutations in *Escherichia coli* PBP2 leading to increased carbapenem MICs. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(3):571-576. doi:10.1093/jac/dky476
30. Zango UU. A review on β -lactam antibiotic drug resistance. :7.
31. Themes UFO. Penicillins, Cephalosporins, and Other β -Lactam Antibiotics. *Basicmedical Key.* June 2016. <https://basicmedicalkey.com/penicillins-cephalosporins-and-other-%ce%b2-lactam-antibiotics/>. Accessed October 5, 2019.
32. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci.* 1980;289(1036):321-331. doi:10.1098/rstb.1980.0049
33. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):969-976. doi:10.1128/AAC.01009-09
34. Bush K. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(10). doi:10.1128/AAC.01076-18
35. Chuong LV, Prachayasittikul V, Isarankura Na Ayudhya C, Lawung R. Multiplex PCR scheme for variant plasmid mediated class C β -lactamase typing. *J Clin Lab Anal.* 2018;32(3). doi:10.1002/jcla.22298
36. Coolen JPM, den Drijver EPM, Kluytmans JAJW, et al. Development of an algorithm to discriminate between plasmid- and chromosomal-mediated AmpC β -lactamase production in *Escherichia coli* by elaborate phenotypic and genotypic characterization. *J Antimicrob Chemother.* August 2019. doi:10.1093/jac/dkz362
37. Bonomo RA, Burd EM, Conly J, et al. Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. *Clin Infect Dis.* 2018;66(8):1290-1297. doi:10.1093/cid/cix893
38. Wu W, Feng Y, Tang G, Qiao F, McNally A, Zong Z. NDM Metallo- β -Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings. *Clin Microbiol Rev.* 2019;32(2). doi:10.1128/CMR.00115-18
39. Rodriguezvillalobos H, Struelens M. Résistance bactérienne par β -lactamases à spectre étendu: implications pour le réanimateur. *Réanimation.* 2006;15(3):205-213. doi:10.1016/j.reaurg.2006.03.006
40. Grigorenko V, Uporov I, Rubtsova M, et al. Mutual influence of secondary and key drug-resistance mutations on catalytic properties and thermal stability of TEM-type β -lactamases. *FEBS Open Bio.* 2018;8(1):117-129. doi:10.1002/2211-5463.12352
41. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(4):657-686. doi:10.1128/CMR.18.4.657-686.2005

42. Robin F, Beyrouthy R, Bonacorsi S, et al. Inventory of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in France as Assessed by a Multicenter Study. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(3). doi:10.1128/AAC.01911-16
43. Liakopoulos A, Mevius D, Ceccarelli D. A Review of SHV Extended-Spectrum β -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. *Front Microbiol.* 2016;7:1374. doi:10.3389/fmicb.2016.01374
44. Arpin C, Coze C, Rogues AM, Gachie JP, Bebear C, Quentin C. Epidemiological study of an outbreak due to multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes* in a medical intensive care unit. *J Clin Microbiol.* 1996;34(9):2163-2169.
45. Bonnet R. Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(1):1-14. doi:10.1128/AAC.48.1.1-14.2004
46. Cantón R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9(5):466-475. doi:10.1016/j.mib.2006.08.011
47. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59(2):165-174. doi:10.1093/jac/dkl483
48. Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. *J Antimicrob Chemother.* 2002;50(6):1031-1034. doi:10.1093/jac/dkf240
49. Bonnet R, Dutour C, Sampaio JL, et al. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240-->Gly. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(8):2269-2275. doi:10.1128/AAC.45.8.2269-2275.2001
50. Kimura S, Ishiguro M, Ishii Y, Alba J, Yamaguchi K. Role of a Mutation at Position 167 of CTX-M-19 in Ceftazidime Hydrolysis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(5):1454-1460. doi:10.1128/AAC.48.5.1454-1460.2004
51. Bonnet R, Recule C, Baraduc R, et al. Effect of D240G substitution in a novel ESBL CTX-M-27. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52(1):29-35. doi:10.1093/jac/dkg256
52. Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14 Suppl 1:33-41. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01867.x
53. Matsumoto Y, Ikeda F, Kamimura T, Yokota Y, Mine Y. Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988;32(8):1243-1246. doi:10.1128/aac.32.8.1243
54. Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection.* 1990;18(5):294-298.
55. Bauernfeind A, Casellas JM, Goldberg M, et al. A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. *Infection.* 1992;20(3):158-163.

56. Power P, Radice M, Barberis C, et al. Cefotaxime-hydrolysing beta lactamases in *Morganella morganii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1999;18(10):743-747.
57. Bernard H, Tancrede C, Livrelli V, Morand A, Barthelemy M, Labia R. A novel plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase not derived from TEM- or SHV-type enzymes. *J Antimicrob Chemother*. 1992;29(5):590-592. doi:10.1093/jac/29.5.590
58. Ishii Y, Ohno A, Taguchi H, Imajo S, Ishiguro M, Matsuzawa H. Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(10):2269-2275. doi:10.1128/aac.39.10.2269
59. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Ernst S, Casellas JM. Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40(2):509-513.
60. Gniadkowski M, Schneider I, Pałucha A, Jungwirth R, Mikiewicz B, Bauernfeind A. Cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from a hospital in Warsaw, Poland: identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(4):827-832.
61. Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2009;64 Suppl 1:i3-10. doi:10.1093/jac/dkp256
62. Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(8):2145-2155. doi:10.1093/jac/dkx146
63. Stoesser N, Sheppard AE, Pankhurst L, et al. Evolutionary History of the Global Emergence of the *Escherichia coli* Epidemic Clone ST131. *MBio*. 2016;7(2):e02162. doi:10.1128/mBio.02162-15
64. Brisse S, Diancourt L, Laouénan C, et al. Phylogenetic distribution of CTX-M- and non-extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates: group B2 isolates, except clone ST131, rarely produce CTX-M enzymes. *J Clin Microbiol*. 2012;50(9):2974-2981. doi:10.1128/JCM.00919-12
65. Birgy A, Levy C, Nicolas-Chanoine M-H, et al. Independent Host Factors and Bacterial Genetic Determinants of the Emergence and Dominance of *Escherichia coli* Sequence Type 131 CTX-M-27 in a Community Pediatric Cohort Study. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63(7). doi:10.1128/AAC.00382-19
66. Matsumura Y, Pitout JDD, Peirano G, et al. Rapid Identification of Different *Escherichia coli* Sequence Type 131 Clades. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(8). doi:10.1128/AAC.00179-17
67. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JDD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(3):565-591. doi:10.1128/CMR.00116-14

68. Naseer U, Sundsfjord A. The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones. *Microb Drug Resist.* 2011;17(1):83-97. doi:10.1089/mdr.2010.0132
69. Guermazi-Toumi S, Boujlel S, Assoudi M, Issaoui R, Tlili S, Hlaiem ME. Susceptibility profiles of bacteria causing urinary tract infections in Southern Tunisia. *J Glob Antimicrob Resist.* 2018;12:48-52. doi:10.1016/j.jgar.2017.09.004
70. Kim JY, Jung HI, An YJ, et al. Structural basis for the extended substrate spectrum of CMY-10, a plasmid-encoded class C beta-lactamase. *Mol Microbiol.* 2006;60(4):907-916. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05146.x
71. Dortet L, Bréchard L, Cuzon G, Poirel L, Nordmann P. Strategy for rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(4):2441-2445. doi:10.1128/AAC.01239-13
72. Glasner C, Albiger B, Buist G, et al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013. *Eurosurveillance.* 2013;18(28). doi:10.2807/1560-7917.ES2013.18.28.20525
73. Martin J, Phan HTT, Findlay J, et al. Covert dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (KPC) in a successfully controlled outbreak: long- and short-read whole-genome sequencing demonstrate multiple genetic modes of transmission. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(11):3025-3034. doi:10.1093/jac/dkx264
74. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(7):1584-1590.
75. Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(12):5046-5054. doi:10.1128/AAC.00774-09
76. Martínez-Martínez L, González-López JJ. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: types and molecular epidemiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32 Suppl 4:4-9. doi:10.1016/S0213-005X(14)70168-5
77. Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol.* 2013;303(6-7):298-304. doi:10.1016/j.ijmm.2013.02.001
78. Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SG, Miles RS, Amyes SG. ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents.* 1993;2(2):81-87. doi:10.1016/0924-8579(93)90045-7
79. Mathers A. Mobilization of Carbapenemase-Mediated Resistance in *Enterobacteriaceae*. *Microbiol Spectr.* 2016;4(3). doi:10.1128/microbiolspec.EI10-0010-2015
80. Potron A, Kalpoe J, Poirel L, Nordmann P. European dissemination of a single OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clone. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(12):E24-26. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03669.x

81. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(7):1597-1606. doi:10.1093/jac/dks121
82. Messaoudi A, Haenni M, Mansour W, et al. ST147 NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* spread in two Tunisian hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(1):315-316. doi:10.1093/jac/dkw401
83. Maamar E, Ferjani S, Jendoubi A, et al. High Prevalence of Gut Microbiota Colonization with Broad-Spectrum Cephalosporin Resistant *Enterobacteriaceae* in a Tunisian Intensive Care Unit. *Front Microbiol.* 2016;7:1859. doi:10.3389/fmicb.2016.01859
84. Mansour W, Grami R, Jaidane N, et al. Epidemiology and Whole-Genome Analysis of NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* KP3771 from Tunisia. *Microb Drug Resist.* 2019;25(5):644-651. doi:10.1089/mdr.2018.0204
85. Dalenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(3):490-495. doi:10.1093/jac/dkp498
86. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2002;40(6):2153-2162. doi:10.1128/jcm.40.6.2153-2162.2002
87. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JDD. Laboratory detection of *Enterobacteriaceae* that produce carbapenemases. *J Clin Microbiol.* 2012;50(12):3877-3880. doi:10.1128/JCM.02117-12
88. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods.* 2005;63(3):219-228. doi:10.1016/j.mimet.2005.03.018
89. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(10):4555-4558. doi:10.1128/aem.66.10.4555-4558.2000
90. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PAD, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol.* 2005;43(8):4178-4182. doi:10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005
91. Miyoshi-Akiyama T, Hayakawa K, Ohmagari N, Shimojima M, Kirikae T. Multilocus sequence typing (MLST) for characterization of *Enterobacter cloacae*. *PLoS ONE.* 2013;8(6):e66358. doi:10.1371/journal.pone.0066358
92. Morand PC, Billoet A, Rottman M, et al. Specific distribution within the *Enterobacter cloacae* Complex of strains isolated from infected orthopedic implants. *J Clin Microbiol.* 2009;47(8):2489-2495. doi:10.1128/JCM.00290-09
93. García-Fernández A, Carattoli A. Plasmid double locus sequence typing for IncHI2 plasmids, a subtyping scheme for the characterization of IncHI2 plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamase and quinolone resistance genes. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(6):1155-1161. doi:10.1093/jac/dkq101

94. Zhou K, Yu W, Cao X, et al. Characterization of the population structure, drug resistance mechanisms and plasmids of the community-associated *Enterobacter cloacae* Complex in China. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(1):66-76. doi:10.1093/jac/dkx361
95. Gibson JS, Cobbold RN, Heisig P, Sidjabat HE, Kyaw-Tanner MT, Trott DJ. Identification of Qnr and AAC(6')-1b-cr plasmid-mediated fluoroquinolone resistance determinants in multidrug-resistant *Enterobacter* spp. isolated from extraintestinal infections in companion animals. *Vet Microbiol.* 2010;143(2-4):329-336. doi:10.1016/j.vetmic.2009.11.031
96. Haenni M, Saras E, Ponsin C, et al. High prevalence of international ESBL CTX-M-15-producing *Enterobacter cloacae* ST114 clone in animals. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(6):1497-1500. doi:10.1093/jac/dkw006
97. Schmiedel J, Falgenhauer L, Domann E, et al. Multiresistant extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from humans, companion animals and horses in central Hesse, Germany. *BMC Microbiol.* 2014;14:187. doi:10.1186/1471-2180-14-187
98. Yang B, Feng Y, McNally A, Zong Z. Occurrence of *Enterobacter hormaechei* carrying blaNDM-1 and blaKPC-2 in China. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2018;90(2):139-142. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2017.10.007
99. Kieffer N, Royer G, Decousser J-W, et al. mcr-9, an Inducible Gene Encoding an Acquired Phosphoethanolamine Transferase in *Escherichia coli* , and Its Origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(9). doi:10.1128/AAC.00965-19
100. Nilsen E, Haldorsen BC, Sundsfjord A, et al. Large IncHI2-plasmids encode extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in *Enterobacter* spp. bloodstream isolates, and support ESBL-transfer to *Escherichia coli* . *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(11):E516-518. doi:10.1111/1469-0691.12274
101. Roy Chowdhury P, Fourment M, DeMaere MZ, et al. Identification of a novel lineage of plasmids within phylogenetically diverse subclades of IncHI2-ST1 plasmids. *Plasmid.* 2019;102:56-61. doi:10.1016/j.plasmid.2019.03.002
102. Petrosillo N, Vranić-Ladavac M, Feudi C, et al. Spread of *Enterobacter cloacae* carrying blaNDM-1, blaCTX-M-15, blaSHV-12 and plasmid-mediated quinolone resistance genes in a surgical intensive care unit in Croatia. *J Glob Antimicrob Resist.* 2016;4:44-48. doi:10.1016/j.jgar.2015.09.008
103. Sidjabat HE, Heney C, George NM, Nimmo GR, Paterson DL. Interspecies transfer of blaIMP-4 in a patient with prolonged colonization by IMP-4-producing *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol.* 2014;52(10):3816-3818. doi:10.1128/JCM.01491-14
104. Wang S, Zhou K, Xiao S, et al. A Multidrug Resistance Plasmid pIMP26, Carrying blaIMP-26, fosA5, blaDHA-1, and qnrB4 in *Enterobacter cloacae*. *Sci Rep.* 2019;9. doi:10.1038/s41598-019-46777-6
105. Zhu Y, Zhang W, Schwarz S, et al. Characterization of a blaIMP-4-carrying plasmid from *Enterobacter cloacae* of swine origin. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(7):1799-1806. doi:10.1093/jac/dkz107

106. Hennequin C, Ravet V, Robin F. Plasmids carrying DHA-1 β -lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018;37(7):1197-1209. doi:10.1007/s10096-018-3231-9
107. Mansour W, Grami R, Ben Haj Khalifa A, et al. Dissemination of multidrug-resistant blaCTX-M-15/IncFIIk plasmids in *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospital- and community-acquired human infections in Tunisia. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015;83(3):298-304. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2015.07.023
108. Maamar E, Hammami S, Alonso CA, et al. High prevalence of extended-spectrum and plasmidic AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from poultry in Tunisia. *Int J Food Microbiol*. 2016;231:69-75. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.001
109. Charfi K, Grami R, Ben Jeddou A, et al. Extended-spectrum β -lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance in enterobacterial clinical isolates from neonates in Tunisia. *Microb Pathog*. 2017;110:184-188. doi:10.1016/j.micpath.2017.06.030
110. Price LB, Johnson JR, Aziz M, et al. The epidemic of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone, H30-Rx. *MBio*. 2013;4(6):e00377-00313. doi:10.1128/mBio.00377-13
111. Petty NK, Ben Zakour NL, Stanton-Cook M, et al. Global dissemination of a multidrug resistant *Escherichia coli* clone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(15):5694-5699. doi:10.1073/pnas.1322678111
112. Sghaier S, Abbassi MS, Pascual A, et al. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from animal origin and wastewater in Tunisia: first detection of O25b-B23-CTX-M-27-ST131 *Escherichia coli* and CTX-M-15/OXA-204-producing *Citrobacter freundii* from wastewater. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019;17:189-194. doi:10.1016/j.jgar.2019.01.002
113. Zurfluh K, Stevens MJA, Stephan R, Nüesch-Inderbinen M. Complete and assembled genome sequence of an NDM-5- and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* sequence type 617 isolated from wastewater in Switzerland. *J Glob Antimicrob Resist*. 2018;15:105-106. doi:10.1016/j.jgar.2018.08.015
114. Rafaï C, Frank T, Manirakiza A, et al. Dissemination of IncF-type plasmids in multiresistant CTX-M-15-producing *Enterobacteriaceae* isolates from surgical-site infections in Bangui, Central African Republic. *BMC Microbiol*. 2015;15:15. doi:10.1186/s12866-015-0348-1
115. Izdebski R, Bojarska K, Baraniak A, et al. NDM-1- or OXA-48-producing *Enterobacteriaceae* colonising Polish tourists following a terrorist attack in Tunis, March 2015. *Euro Surveill*. 2015;20(23). doi:10.2807/1560-7917.es2015.20.23.21150
116. Maamar E, Ferjani S, Jendoubi A, et al. High Prevalence of Gut Microbiota Colonization with Broad-Spectrum Cephalosporin Resistant *Enterobacteriaceae* in a Tunisian Intensive Care Unit. *Front Microbiol*. 2016;7:1859. doi:10.3389/fmicb.2016.01859
117. Ben Nasr A, Decré D, Compain F, Genel N, Barguellil F, Arlet G. Emergence of NDM-1 in association with OXA-48 in *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(8):4089-4090. doi:10.1128/AAC.00536-13

118. Mansour W, Grami R, Jaidane N, et al. Epidemiology and Whole-Genome Analysis of NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* KP3771 from Tunisia. *Microb Drug Resist.* 2019;25(5):644-651. doi:10.1089/mdr.2018.0204
119. Messaoudi A, Haenni M, Mansour W, et al. ST147 NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* spread in two Tunisian hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(1):315-316. doi:10.1093/jac/dkw401
120. Morrill HJ, Pogue JM, Kaye KS, LaPlante KL. Treatment Options for Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Infections. *Open Forum Infect Dis.* 2015;2(2):ofv050. doi:10.1093/ofid/ofv050
121. Kempf I, Jouy E, Chauvin C. Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. *Int J Antimicrob Agents.* 2016;48(6):598-606. doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.09.016
122. Fernandes MR, Moura Q, Sartori L, et al. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the mcr-1 gene. *Euro Surveill.* 2016;21(17). doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.17.30214
123. Biswas S, Brunel J-M, Dubus J-C, Reynaud-Gaubert M, Rolain J-M. Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012;10(8):917-934. doi:10.1586/eri.12.78
124. BENEDICT RG, LANGLYKKE AF. Antibiotic activity of *Bacillus polymyxa*. *J Bacteriol.* 1947 Jul;54(1):24.
125. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev.* 2017;30(2):557-596. doi:10.1128/CMR.00064-16
126. Deris ZZ, Swarbrick JD, Roberts KD, et al. Probing the penetration of antimicrobial polymyxin lipopeptides into gram-negative bacteria. *Bioconjug Chem.* 2014;25(4):750-760. doi:10.1021/bc500094d
127. Lippa AM, Goulian M. Feedback Inhibition in the PhoQ/PhoP Signaling System by a Membrane Peptide. *PLoS Genet.* 2009;5(12). doi:10.1371/journal.pgen.1000788
128. Cannatelli A, Giani T, D'Andrea MM, et al. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(10):5696-5703. doi:10.1128/AAC.03110-14
129. Poirel L, Jayol A, Bontron S, et al. The mgrB gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(1):75-80. doi:10.1093/jac/dku323
130. Minagawa S, Ogasawara H, Kato A, et al. Identification and Molecular Characterization of the Mg²⁺ Stimulon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2003;185(13):3696-3702. doi:10.1128/JB.185.13.3696-3702.2003

131. Gunn JS. The Salmonella PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. *Trends Microbiol.* 2008;16(6):284-290. doi:10.1016/j.tim.2008.03.007
132. Tamayo R, Choudhury B, Septer A, Merighi M, Carlson R, Gunn JS. Identification of *cptA*, a PmrA-regulated locus required for phosphoethanolamine modification of the Salmonella enterica serovar typhimurium lipopolysaccharide core. *J Bacteriol.* 2005;187(10):3391-3399. doi:10.1128/JB.187.10.3391-3399.2005
133. Cannatelli A, Di Pilato V, Giani T, et al. In Vivo Evolution to Colistin Resistance by PmrB Sensor Kinase Mutation in KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Is Associated with Low-Dosage Colistin Treatment. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(8):4399-4403. doi:10.1128/AAC.02555-14
134. Rodrigues ACS, Santos IC de O, Campos CC, et al. Non-clonal occurrence of *pmrB* mutations associated with polymyxin resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2019;114:e180555. doi:10.1590/0074-02760180555
135. Cheng Y-H, Lin T-L, Lin Y-T, Wang J-T. Amino Acid Substitutions of CrrB Responsible for Resistance to Colistin through CrrC in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(6):3709-3716. doi:10.1128/AAC.00009-16
136. Jeannot K, Bolard A, Plésiat P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *Int J Antimicrob Agents.* 2017;49(5):526-535. doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.11.029
137. Rubin EJ, Herrera CM, Crofts AA, Trent MS. PmrD Is Required for Modifications to *Escherichia coli* Endotoxin That Promote Antimicrobial Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(4):2051-2061. doi:10.1128/AAC.05052-14
138. Mitrophanov AY, Jewett MW, Hadley TJ, Groisman EA. Evolution and dynamics of regulatory architectures controlling polymyxin B resistance in enteric bacteria. *PLoS Genet.* 2008;4(10):e1000233. doi:10.1371/journal.pgen.1000233
139. Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol.* 2014;5. doi:10.3389/fmicb.2014.00643
140. 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
141. Srinivasan VB, Rajamohan G. KpnEF, a new member of the *Klebsiella pneumoniae* cell envelope stress response regulon, is an SMR-type efflux pump involved in broad-spectrum antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(9):4449-4462. doi:10.1128/AAC.02284-12
142. Ni W, Li Y, Guan J, et al. Effects of Efflux Pump Inhibitors on Colistin Resistance in Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(5):3215-3218. doi:10.1128/AAC.00248-16

143. Llobet E, Tomás JM, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. *Microbiology (Reading, Engl)*. 2008;154(Pt 12):3877-3886. doi:10.1099/mic.0.2008/022301-0
144. Formosa C, Herold M, Vidailiac C, Duval RE, Dague E. Unravelling of a mechanism of resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* using atomic force microscopy. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(8):2261-2270. doi:10.1093/jac/dkv118
145. Weiss J, Victor M, Cross AS, Elsbach P. Sensitivity of K1-encapsulated *Escherichia coli* to killing by the bactericidal/permeability-increasing protein of rabbit and human neutrophils. *Infect Immun*. 1982;38(3):1149-1153.
146. Clements A, Tull D, Jenney AW, et al. Secondary acylation of *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide contributes to sensitivity to antibacterial peptides. *J Biol Chem*. 2007;282(21):15569-15577. doi:10.1074/jbc.M701454200
147. Lacour S, Bechet E, Cozzone AJ, Mijakovic I, Grangeasse C. Tyrosine phosphorylation of the UDP-glucose dehydrogenase of *Escherichia coli* is at the crossroads of colanic acid synthesis and polymyxin resistance. *PLoS ONE*. 2008;3(8):e3053. doi:10.1371/journal.pone.0003053
148. Pilonieta MC, Erickson KD, Ernst RK, Detweiler CS. A protein important for antimicrobial peptide resistance, YdeI/OmdA, is in the periplasm and interacts with OmpD/NmpC. *J Bacteriol*. 2009;191(23):7243-7252. doi:10.1128/JB.00688-09
149. Halaby T, Kucukkose E, Janssen AB, et al. Genomic Characterization of Colistin Heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* during a Nosocomial Outbreak. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(11):6837-6843. doi:10.1128/AAC.01344-16
150. Lee J-Y, Choi M-J, Choi HJ, Ko KS. Preservation of Acquired Colistin Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(1):609-612. doi:10.1128/AAC.01574-15
151. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(2):161-168. doi:10.1016/S1473-3099(15)00424-7
152. Wang R, van Dorp L, Shaw LP, et al. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene mcr-1. *Nat Commun*. 2018;9. doi:10.1038/s41467-018-03205-z
153. Snesrud E, He S, Chandler M, et al. A Model for Transposition of the Colistin Resistance Gene mcr-1 by ISAp11. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(11):6973-6976. doi:10.1128/AAC.01457-16
154. Zhou H-W, Zhang T, Ma J-H, et al. Occurrence of Plasmid- and Chromosome-Carried mcr-1 in Waterborne *Enterobacteriaceae* in China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(8). doi:10.1128/AAC.00017-17

155. Matamoros S, van Hattem JM, Arcilla MS, et al. Global phylogenetic analysis of *Escherichia coli* and plasmids carrying the mcr-1 gene indicates bacterial diversity but plasmid restriction. *Sci Rep.* 2017;7(1):15364. doi:10.1038/s41598-017-15539-7
156. Poirel L, Kieffer N, Liassine N, Thanh D, Nordmann P. Plasmid-mediated carbapenem and colistin resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(3):281. doi:10.1016/S1473-3099(16)00006-2
157. Yao X, Doi Y, Zeng L, Lv L, Liu J-H. Carbapenem-resistant and colistin-resistant *Escherichia coli* co-producing NDM-9 and MCR-1. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(3):288-289. doi:10.1016/S1473-3099(16)00057-8
158. Zhang X-F, Doi Y, Huang X, et al. Possible Transmission of mcr-1-Harboring *Escherichia coli* between Companion Animals and Human. *Emerging Infect Dis.* 2016;22(9):1679-1681. doi:10.3201/eid2209.160464
159. Haenni M, Poirel L, Kieffer N, et al. Co-occurrence of extended spectrum β lactamase and MCR-1 encoding genes on plasmids. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(3):281-282. doi:10.1016/S1473-3099(16)00007-4
160. Kieffer N, Nordmann P, Poirel L. Moraxella Species as Potential Sources of MCR-Like Polymyxin Resistance Determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(6). doi:10.1128/AAC.00129-17
161. Poirel L, Kieffer N, Fernandez-Garayzabal JF, Vela AI, Larpin Y, Nordmann P. MCR-2-mediated plasmid-borne polymyxin resistance most likely originates from *Moraxella pluranimalium*. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(10):2947-2949. doi:10.1093/jac/dkx225
162. Ling Z, Yin W, Li H, et al. Chromosome-Mediated mcr-3 Variants in *Aeromonas veronii* from Chicken Meat. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(11). doi:10.1128/AAC.01272-17
163. Eichhorn I, Feudi C, Wang Y, et al. Identification of novel variants of the colistin resistance gene mcr-3 in *Aeromonas spp.* from the national resistance monitoring programme GERM-Vet and from diagnostic submissions. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(5):1217-1221. doi:10.1093/jac/dkx538
164. Carattoli A, Villa L, Feudi C, et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance mcr-4 gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Euro Surveill.* 2017;22(31). doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30589
165. Carroll LM, Gaballa A, Guldimann C, Sullivan G, Henderson LO, Wiedmann M. Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene mcr-9 in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolate. *MBio.* 2019;10(3). doi:10.1128/mBio.00853-19
166. Schwarz S, Johnson AP. Transferable resistance to colistin: a new but old threat. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(8):2066-2070. doi:10.1093/jac/dkw274

167. Zurfluh K, Stephan R, Widmer A, et al. Screening for fecal carriage of MCR-producing *Enterobacteriaceae* in healthy humans and primary care patients. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017;6:28. doi:10.1186/s13756-017-0186-z
168. El-Halfawy OM, Valvano MA. Chemical communication of antibiotic resistance by a highly resistant subpopulation of bacterial cells. *PLoS ONE*. 2013;8(7):e68874. doi:10.1371/journal.pone.0068874
169. Falagas ME, Makris GC, Dimopoulos G, Matthaiou DK. Heteroresistance: a concern of increasing clinical significance? *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(2):101-104. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01912.x
170. Guérin F, Isnard C, Sinel C, et al. Cluster-dependent colistin hetero-resistance in *Enterobacter cloacae* Complex. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(11):3058-3061. doi:10.1093/jac/dkw260
171. El-Halfawy OM, Valvano MA. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(1):191-207. doi:10.1128/CMR.00058-14
172. Band VI, Crispell EK, Napier BA, et al. Antibiotic failure mediated by a resistant subpopulation in *Enterobacter cloacae*. *Nat Microbiol*. 2016;1(6):16053. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.53
173. Telke AA, Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M. soxRS induces colistin heteroresistance in *Enterobacter asburiae* and *Enterobacter cloacae* by regulating the acrAB-tolC efflux pump. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(10):2715-2721. doi:10.1093/jac/dkx215
174. Huang L, Feng Y, Zong Z. Heterogeneous resistance to colistin in *Enterobacter cloacae* Complex due to a new small transmembrane protein. *J Antimicrob Chemother*. June 2019. doi:10.1093/jac/dkz236
175. Ryffel C, Strässle A, Kayser FH, Berger-Bächli B. Mechanisms of heteroresistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38(4):724-728. doi:10.1128/aac.38.4.724
176. Markova N, Haydoushka I, Michailova L, et al. Cell wall deficiency and its effect on methicillin heteroresistance in *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;31(3):255-260. doi:10.1016/j.ijantimicag.2007.09.015
177. Li J, Rayner CR, Nation RL, et al. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(9):2946-2950. doi:10.1128/AAC.00103-06
178. Arpin C, Noury P, Boraud D, et al. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* resistant to colistin in a French community patient without history of foreign travel. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(6):3432-3434. doi:10.1128/AAC.00230-12
179. Jang CW1, Magnuson T. A novel selection marker for efficient DNA cloning and recombineering in *E. coli*. *PLoS One*. 2013;8(2):e57075. doi:10.1371/journal.pone.0057075

180. Kang KN, Klein DR, Kazi MI, et al. Colistin heteroresistance in *Enterobacter cloacae* is regulated by PhoPQ-dependent 4-amino-4-deoxy-l-arabinose addition to lipid A. *Mol Microbiol.* 2019;111(6):1604-1616. doi:10.1111/mmi.14240
181. Yang S-C, Lin C-H, Sung CT, Fang J-Y. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol.* 2014;5:241. doi:10.3389/fmicb.2014.00241
182. Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(10):777-788. doi:10.1038/nrmicro1273
183. Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(2):95-105. doi:10.1038/nrmicro2937
184. Salazar-Marroquín EL, Galán-Wong LJ, Moreno-Medina VR, Reyes-López MÁ, Pereyra-Alfárez B. Bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis*: generalities and potential applications. *Rev Med Microbiol.* 2016;27(3):95-101. doi:10.1097/MRM.0000000000000076
185. Majeed H, Gillor O, Kerr B, Riley MA. Competitive interactions in *Escherichia coli* populations: the role of bacteriocins. *ISME J.* 2011;5(1):71-81. doi:10.1038/ismej.2010.90
186. Riley MA, Gordon DM. The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends Microbiol.* 1999;7(3):129-133. doi:10.1016/s0966-842x(99)01459-6
187. Riley MA, Wertz JE. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie.* 2002;84(5-6):357-364. doi:10.1016/s0300-9084(02)01421-9
188. Bernbom N, Licht TR, Brogren C-H, et al. Effects of *Lactococcus lactis* on composition of intestinal microbiota: role of nisin. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(1):239-244. doi:10.1128/AEM.72.1.239-244.2006
189. Corr SC, Li Y, Riedel CU, O'Toole PW, Hill C, Gahan CGM. Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(18):7617-7621. doi:10.1073/pnas.0700440104
190. Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 1993;12(1-3):39-85. doi:10.1111/j.1574-6976.1993.tb00012.x
191. Kemperman R, Kuipers A, Karsens H, Nauta A, Kuipers O, Kok J. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(3):1589-1597. doi:10.1128/aem.69.3.1589-1597.2003
192. Xie L, van der Donk WA. Post-translational modifications during lantibiotic biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol.* 2004;8(5):498-507. doi:10.1016/j.cbpa.2004.08.005
193. Pag U, Sahl H-G. Multiple activities in lantibiotics--models for the design of novel antibiotics? *Curr Pharm Des.* 2002;8(9):815-833. doi:10.2174/1381612023395439
194. Chatterjee C, Miller LM, Leung YL, et al. Lacticin 481 synthetase phosphorylates its substrate during lantibiotic production. *J Am Chem Soc.* 2005;127(44):15332-15333. doi:10.1021/ja0543043

195. Alvarez-Sieiro P1, Montalbán-López M, Mu D, Kuipers OP. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016 Apr;100(7):2939-51. doi: 10.1007/s00253-016-7343-9
196. Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bacterial lantibiotics: strategies to improve therapeutic potential. *Curr Protein Pept Sci.* 2005;6(1):61-75.
197. Breukink E, Wiedemann I, van Kraaij C, Kuipers OP, Sahl HG, de Kruijff B. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science.* 1999;286(5448):2361-2364. doi:10.1126/science.286.5448.2361
198. Johnsen L, Fimland G, Nissen-Meyer J. The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. *J Biol Chem.* 2005;280(10):9243-9250. doi:10.1074/jbc.M412712200
199. Brötz H, Josten M, Wiedemann I, et al. Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Mol Microbiol.* 1998;30(2):317-327. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.01065.x
200. Wiedemann I, Breukink E, van Kraaij C, et al. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J Biol Chem.* 2001;276(3):1772-1779. doi:10.1074/jbc.M006770200
201. van Heusden HE, de Kruijff B, Breukink E. Lipid II induces a transmembrane orientation of the pore-forming peptide lantibiotic nisin. *Biochemistry.* 2002;41(40):12171-12178. doi:10.1021/bi026090x
202. Breukink E, de Kruijff B. Lipid II as a target for antibiotics. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(4):321-332. doi:10.1038/nrd2004
203. Martin NI, Sprules T, Carpenter MR, et al. Structural characterization of lactacin 3147, a two-peptide lantibiotic with synergistic activity. *Biochemistry.* 2004;43(11):3049-3056. doi:10.1021/bi0362065
204. Kleerebezem M. Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides.* 2004;25(9):1405-1414. doi:10.1016/j.peptides.2003.10.021
205. Gebhard S. ABC transporters of antimicrobial peptides in Firmicutes bacteria - phylogeny, function and regulation. *Mol Microbiol.* 2012;86(6):1295-1317. doi:10.1111/mmi.12078
206. Jimenez JC, Federle MJ. Quorum sensing in group A *Streptococcus*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4. doi:10.3389/fcimb.2014.00127
207. Diep DB, Nes IF. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr Drug Targets.* 2002;3(2):107-122. doi:10.2174/1389450024605409
208. van Belkum MJ, Stiles ME. Nonlantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. *Nat Prod Rep.* 2000;17(4):323-335.

209. Héchard Y, Sahl HG. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie*. 2002;84(5-6):545-557. doi:10.1016/s0300-9084(02)01417-7
210. Montville TJ, Chen Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1998;50(5):511-519. doi:10.1007/s002530051328
211. Nieto Lozano JC, Meyer JN, Sletten K, Peláz C, Nes IF. Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J Gen Microbiol*. 1992;138(9):1985-1990. doi:10.1099/00221287-138-9-1985
212. Eijsink VG, Skeie M, Middelhoven PH, Brurberg MB, Nes IF. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64(9):3275-3281.
213. Chen Y, Ludescher RD, Montville TJ. Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. *Appl Environ Microbiol*. 1997;63(12):4770-4777.
214. Kazacic M, Nissen-Meyer J, Fimland G. Mutational analysis of the role of charged residues in target-cell binding, potency and specificity of the pediocin-like bacteriocin sakacin P. *Microbiology (Reading, Engl)*. 2002;148(Pt 7):2019-2027. doi:10.1099/00221287-148-7-2019
215. Ennahar S, Sashihara T, Sonomoto K, Ishizaki A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol Rev*. 2000;24(1):85-106. doi:10.1111/j.1574-6976.2000.tb00534.x
216. Quadri LE, Sailer M, Roy KL, Vederas JC, Stiles ME. Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *J Biol Chem*. 1994;269(16):12204-12211.
217. Métivier A, Pilet MF, Dousset X, et al. Divercin V41, a new bacteriocin with two disulphide bonds produced by *Carnobacterium divergens* V41: primary structure and genomic organization. *Microbiology (Reading, Engl)*. 1998;144 (Pt 10):2837-2844. doi:10.1099/00221287-144-10-2837
218. Hühne K, Axelsson L, Holck A, Kröckel L. Analysis of the sakacin P gene cluster from *Lactobacillus sake* Lb674 and its expression in sakacin-negative Lb. sake strains. *Microbiology (Reading, Engl)*. 1996;142 (Pt 6):1437-1448. doi:10.1099/13500872-142-6-1437
219. Quadri LE, Sailer M, Terebiznik MR, Roy KL, Vederas JC, Stiles ME. Characterization of the protein conferring immunity to the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 and expression of carnobacteriocins B2 and BM1. *J Bacteriol*. 1995;177(5):1144-1151. doi:10.1128/jb.177.5.1144-1151.1995
220. Aymerich T, Holo H, Håvarstein LS, Hugas M, Garriga M, Nes IF. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl Environ Microbiol*. 1996;62(5):1676-1682.

221. Venema K, Haverkort RE, Abee T, et al. Mode of action of LciA, the lactococcin A immunity protein. *Mol Microbiol.* 1994;14(3):521-532. doi:10.1111/j.1365-2958.1994.tb02186.x
222. Kok J, Holo H, Van belkum MJ, Haandrikman AJ, Nes IF. CHAPTER 6 - Nonnisin Bacteriocins in Lactococci: Biochemistry, Genetics, and Mode of Action. In: Hoover DG, Steenson LR, eds. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Academic Press; 1993:121-150. doi:10.1016/B978-0-12-355510-6.50014-2
223. Bukhtiyarova M, Yang R, Ray B. Analysis of the pediocin AcH gene cluster from plasmid pSMB74 and its expression in a pediocin-negative *Pediococcus acidilactici* strain. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60(9):3405-3408.
224. Dayem MA, Fleury Y, Devilliers G, et al. The putative immunity protein of the gram-positive bacteria *Leuconostoc mesenteroides* is preferentially located in the cytoplasm compartment. *FEMS Microbiol Lett.* 1996;138(2-3):251-259. doi:10.1111/j.1574-6968.1996.tb08166.x
225. Rost B, Sander C. Improved prediction of protein secondary structure by use of sequence profiles and neural networks. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90(16):7558-7562. doi:10.1073/pnas.90.16.7558
226. Rost B, Casadio R, Fariselli P, Sander C. Transmembrane helices predicted at 95% accuracy. *Protein Sci.* 1995;4(3):521-533. doi:10.1002/pro.5560040318
227. Garneau S, Martin NI, Vederas JC. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie.* 2002;84(5-6):577-592. doi:10.1016/s0300-9084(02)01414-1
228. Marciset O, Jeronimus-Stratingh MC, Mollet B, Poolman B. Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin, that functions without a receptor. *J Biol Chem.* 1997;272(22):14277-14284. doi:10.1074/jbc.272.22.14277
229. Nissen-Meyer J, Oppegård C, Rogne P, Haugen HS, Kristiansen PE. Structure and Mode-of-Action of the Two-Peptide (Class-IIb) Bacteriocins. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2010;2(1):52-60. doi:10.1007/s12602-009-9021-z
230. Kawai Y, Kemperman R, Kok J, Saito T. The circular bacteriocins gassericin A and circularin A. *Curr Protein Pept Sci.* 2004;5(5):393-398.
231. Maqueda M, Gálvez A, Bueno MM, et al. Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. *Curr Protein Pept Sci.* 2004;5(5):399-416.
232. Heng NCK, Wescombe PA, Burton JP, Jack RW, Tagg JR. The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. *Bacteriocins.* 2007:45-92. doi:10.1007/978-3-540-36604-1_4
233. Bastos M do C de F, Coutinho BG, Coelho MLV. Lysostaphin: A Staphylococcal Bacteriolysin with Potential Clinical Applications. *Pharmaceuticals (Basel).* 2010;3(4):1139-1161. doi:10.3390/ph3041139

234. Lai AC-Y, Tran S, Simmonds RS. Functional characterization of domains found within a lytic enzyme produced by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *FEMS Microbiol Lett.* 2002;215(1):133-138. doi:10.1111/j.1574-6968.2002.tb11382.x
235. Melo AL de A, Socol VT, Socol CR. *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. *Crit Rev Biotechnol.* 2016;36(2):317-326. doi:10.3109/07388551.2014.960793
236. Smith RA, Couche GA. The Phylloplane as a Source of *Bacillus thuringiensis* Variants. *Appl Environ Microbiol.* 1991;57(1):311-315.
237. Argôlo-Filho RC, Loguercio LL. *Bacillus thuringiensis* Is an Environmental Pathogen and Host-Specificity Has Developed as an Adaptation to Human-Generated Ecological Niches. *Insects.* 2013;5(1):62-91. doi:10.3390/insects5010062
238. Raymond B, Johnston PR, Nielsen-LeRoux C, Lereclus D, Crickmore N. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends Microbiol.* 2010;18(5):189-194. doi:10.1016/j.tim.2010.02.006
239. Malovichko YV, Nizhnikov AA, Antonets KS. Repertoire of the *Bacillus thuringiensis* Virulence Factors Unrelated to Major Classes of Protein Toxins and Its Role in Specificity of Host-Pathogen Interactions. *Toxins (Basel).* 2019;11(6). doi:10.3390/toxins11060347
240. Sauka DH, Basurto-Ríos RE, Ibarra JE, Benintende GB. Characterization of an Argentine isolate of *Bacillus thuringiensis* similar to the HD-1 strain. *Neotrop Entomol.* 2010;39(5):767-773.
241. Nickerson KW, Bulla LA. Physiology of sporeforming bacteria associated with insects: minimal nutritional requirements for growth, sporulation, and parasporal crystal formation of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Microbiol.* 1974;28(1):124-128.
242. Liu BL, Tzeng YM. Characterization study of the sporulation kinetics of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol Bioeng.* 2000;68(1):11-17. doi:10.1002/(sici)1097-0290(20000405)68:1<11::aid-bit2>3.0.co;2-t
243. Andrews RE, Faust RM, Wabiko H, Raymond KC, Bulla LA. The biotechnology of *Bacillus thuringiensis*. *Crit Rev Biotechnol.* 1987;6(2):163-232. doi:10.3109/07388558709113596
244. Daffonchio D, Raddadi N, Merabishvili M, et al. Strategy for Identification of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains Closely Related to *Bacillus anthracis*. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(2):1295-1301. doi:10.1128/AEM.72.2.1295-1301.2006
245. Porcar M, Juárez-Pérez V. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. *FEMS Microbiol Rev.* 2003;26(5):419-432. doi:10.1111/j.1574-6976.2003.tb00624.x
246. Gomaa EZ. Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: their potential in antifungal biocontrol. *J Microbiol.* 2012;50(1):103-111. doi:10.1007/s12275-012-1343-y

247. de la Fuente-Salcido NM, Casados-Vázquez LE, García-Pérez AP, et al. The endochitinase ChiA Btt of *Bacillus thuringiensis* subsp. tenebrionis DSM-2803 and its potential use to control the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Microbiologyopen*. 2016;5(5):819-829. doi:10.1002/mbo3.372
248. Hollensteiner J, Wemheuer F, Harting R, et al. *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus weihenstephanensis* Inhibit the Growth of Phytopathogenic *Verticillium* Species. *Front Microbiol*. 2016;7:2171. doi:10.3389/fmicb.2016.02171
249. Juárez-Hernández EO, Casados-Vázquez LE, del Rincón-Castro MC, Salcedo-Hernández R, Bideshi DK, Barboza-Corona JE. *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis producing endochitinase ChiA74 Δ sp inclusions and its improved activity against *Aedes aegypti*. *J Appl Microbiol*. 2015;119(6):1692-1699. doi:10.1111/jam.12962
250. Regev A, Keller M, Strizhov N, et al. Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. *Appl Environ Microbiol*. 1996;62(10):3581-3586.
251. Arora N, Ahmad T, Rajagopal R, Bhatnagar RK. A constitutively expressed 36 kDa exochitinase from *Bacillus thuringiensis* HD-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;307(3):620-625. doi:10.1016/s0006-291x(03)01228-2
252. Miyoshi S, Shinoda S. Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes Infect*. 2000;2(1):91-98.
253. Cerdà-Costa N, Gomis-Rüth FX. Architecture and function of metallopeptidase catalytic domains. *Protein Sci*. 2014;23(2):123-144. doi:10.1002/pro.2400
254. Hooper NM. Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett*. 1994;354(1):1-6. doi:10.1016/0014-5793(94)01079-x
255. Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. Using the MEROPS Database for Proteolytic Enzymes and Their Inhibitors and Substrates. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2014;48:1.25.1-33. doi:10.1002/0471250953.bi0125s48
256. Lepore LS, Roelvink PR, Granados RR. Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease. *J Invertebr Pathol*. 1996;68(2):131-140. doi:10.1006/jipa.1996.0070
257. Wang P, Granados RR. An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94(13):6977-6982. doi:10.1073/pnas.94.13.6977
258. Gohar M, Faegri K, Perchat S, et al. The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS ONE*. 2008;3(7):e2793. doi:10.1371/journal.pone.0002793
259. Hajajj-Ellouze M, Fedhila S, Lereclus D, Nielsen-LeRoux C. The enhancin-like metalloprotease from the *Bacillus cereus* group is regulated by the pleiotropic transcriptional activator PlcR but is not essential for larvicidal activity. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;260(1):9-16. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00289.x
260. Slamti L, Lemy C, Henry C, Guillot A, Huillet E, Lereclus D. CodY Regulates the Activity of the Virulence Quorum Sensor PlcR by Controlling the Import of the Signaling

- Peptide PapR in *Bacillus thuringiensis*. *Front Microbiol.* 2015;6:1501. doi:10.3389/fmicb.2015.01501
261. Zhao D, Guo W, Sun W, Xu D, Liu D. Identification of a novel enhancin-like gene from *Bacillus thuringiensis*. *Front Agric China.* 2011;5(4):423-429. doi:10.1007/s11703-011-1117-z
262. Chung M-C, Popova TG, Millis BA, et al. Secreted neutral metalloproteases of *Bacillus anthracis* as candidate pathogenic factors. *J Biol Chem.* 2006;281(42):31408-31418. doi:10.1074/jbc.M605526200
263. Guillemet E, Cadot C, Tran S-L, Guinebretière M-H, Lereclus D, Ramarao N. The InhA metalloproteases of *Bacillus cereus* contribute concomitantly to virulence. *J Bacteriol.* 2010;192(1):286-294. doi:10.1128/JB.00264-09
264. Dalhammar G, Steiner H. Characterization of inhibitor A, a protease from *Bacillus thuringiensis* which degrades attacins and cecropins, two classes of antibacterial proteins in insects. *Eur J Biochem.* 1984;139(2):247-252. doi:10.1111/j.1432-1033.1984.tb08000.x
265. Fedhila S, Gohar M, Slamti L, Nel P, Lereclus D. The *Bacillus thuringiensis* PlcR-regulated gene inhA2 is necessary, but not sufficient, for virulence. *J Bacteriol.* 2003;185(9):2820-2825. doi:10.1128/jb.185.9.2820-2825.2003
266. Peng D, Lin J, Huang Q, et al. A novel metalloproteinase virulence factor is involved in *Bacillus thuringiensis* pathogenesis in nematodes and insects. *Environ Microbiol.* 2016;18(3):846-862. doi:10.1111/1462-2920.13069
267. Duarte AS, Correia A, Esteves AC. Bacterial collagenases - A review. *Crit Rev Microbiol.* 2016;42(1):106-126. doi:10.3109/1040841X.2014.904270
268. Wan L, Lin J, Du H, et al. *Bacillus thuringiensis* targets the host intestinal epithelial junctions for successful infection of *Caenorhabditis elegans*. *Environ Microbiol.* 2019;21(3):1086-1098. doi:10.1111/1462-2920.14528
269. Luo X, Chen L, Huang Q, et al. *Bacillus thuringiensis* metalloproteinase Bmp1 functions as a nematicidal virulence factor. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(2):460-468. doi:10.1128/AEM.02551-12
270. Grass G, Schierhorn A, Sorkau E, et al. Camelysin is a novel surface metalloproteinase from *Bacillus cereus*. *Infect Immun.* 2004;72(1):219-228. doi:10.1128/iai.72.1.219-228.2004
271. Fricke B, Drössler K, Willhardt I, Schierhorn A, Menge S, Rücknagel P. The cell envelope-bound metalloprotease (camelysin) from *Bacillus cereus* is a possible pathogenic factor. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1537(2):132-146. doi:10.1016/s0925-4439(01)00066-7
272. Candela T, Fagerlund A, Buisson C, et al. CalY is a major virulence factor and a biofilm matrix protein. *Mol Microbiol.* 2019;111(6):1416-1429. doi:10.1111/mmi.14184

273. Houry A, Gohar M, Deschamps J, et al. Bacterial swimmers that infiltrate and take over the biofilm matrix. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(32):13088-13093. doi:10.1073/pnas.1200791109
274. Nizhnikov AA, Antonets KS, Inge-Vechtomov SG. Amyloids: from Pathogenesis to Function. *Biochemistry Mosc*. 2015;80(9):1127-1144. doi:10.1134/S0006297915090047
275. Caro-Astorga J, Pérez-García A, de Vicente A, Romero D. A genomic region involved in the formation of adhesin fibers in *Bacillus cereus* biofilms. *Front Microbiol*. 2014;5:745. doi:10.3389/fmicb.2014.00745
276. Chapman MR, Robinson LS, Pinkner JS, et al. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science*. 2002;295(5556):851-855. doi:10.1126/science.1067484
277. Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*. 2018;9(1):522-554. doi:10.1080/21505594.2017.1313372
278. Nisnevitch M, Sigawi S, Cahan R, Nitzan Y. Isolation, characterization and biological role of camelysin from *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis. *Curr Microbiol*. 2010;61(3):176-183. doi:10.1007/s00284-010-9593-6
279. Geoffroy C, Mengaud J, Alouf JE, Cossart P. Alveolysin, the thiol-activated toxin of *Bacillus alvei*, is homologous to listeriolysin O, perfringolysin O, pneumolysin, and streptolysin O and contains a single cysteine. *J Bacteriol*. 1990;172(12):7301-7305. doi:10.1128/jb.172.12.7301-7305.1990
280. Billington SJ, Jost BH, Songer JG. Thiol-activated cytolysins: structure, function and role in pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett*. 2000;182(2):197-205. doi:10.1016/s0378-1097(99)00536-4
281. Hotze EM, Le HM, Sieber JR, Bruxvoort C, McInerney MJ, Tweten RK. Identification and characterization of the first cholesterol-dependent cytolysins from Gram-negative bacteria. *Infect Immun*. 2013;81(1):216-225. doi:10.1128/IAI.00927-12
282. Nishiwaki H, Nakashima K, Ishida C, Kawamura T, Matsuda K. Cloning, functional characterization, and mode of action of a novel insecticidal pore-forming toxin, sphaericolysin, produced by *Bacillus sphaericus*. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(10):3404-3411. doi:10.1128/AEM.00021-07
283. He H, Silo-Suh LA, Handelsman J, Clardy J. Zwittermicin A, an antifungal and plant protection agent from *Bacillus cereus*. *Tetrahedron Letters*. 1994;35(16):2499-2502. doi:10.1016/S0040-4039(00)77154-1
284. Kevany BM, Rasko DA, Thomas MG. Characterization of the complete zwittermicin A biosynthesis gene cluster from *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(4):1144-1155. doi:10.1128/AEM.02518-08
285. Zhou Y, Choi Y-L, Sun M, Yu Z. Novel roles of *Bacillus thuringiensis* to control plant diseases. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008;80(4):563-572. doi:10.1007/s00253-008-1610-3

286. Stabb EV, Handelsman J. Genetic analysis of zwittermicin A resistance in *Escherichia coli* : effects on membrane potential and RNA polymerase. *Mol Microbiol.* 1998;27(2):311-322. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00678.x
287. Zhang X, Liang Z, Siddiqui ZA, Gong Y, Yu Z, Chen S. Efficient screening and breeding of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* for high toxicity against *Spodoptera exigua* and *Heliothis armigera*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2009;36(6):815-820. doi:10.1007/s10295-009-0556-5
288. Liu X-Y, Ruan L-F, Hu Z-F, et al. Genome-wide screening reveals the genetic determinants of an antibiotic insecticide in *Bacillus thuringiensis*. *J Biol Chem.* 2010;285(50):39191-39200. doi:10.1074/jbc.M110.148387
289. Liu X, Ruan L, Peng D, Li L, Sun M, Yu Z. Thuringiensin: a thermostable secondary metabolite from *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against a wide range of insects. *Toxins (Basel).* 2014;6(8):2229-2238. doi:10.3390/toxins6082229
290. Levinson BL, Kasyan KJ, Chiu SS, Currier TC, González JM. Identification of beta-exotoxin production, plasmids encoding beta-exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. *J Bacteriol.* 1990;172(6):3172-3179. doi:10.1128/jb.172.6.3172-3179.1990
291. He J, Wang J, Yin W, et al. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *chinensis* strain CT-43. *J Bacteriol.* 2011;193(13):3407-3408. doi:10.1128/JB.05085-11
292. Beebee T, Korner A, Bond RP. Differential inhibition of mammalian ribonucleic acid polymerases by an exotoxin from *Bacillus thuringiensis*. The direct observation of nucleoplasmic ribonucleic acid polymerase activity in intact nuclei. *Biochem J.* 1972;127(4):619-634. doi:10.1042/bj1270619
293. Gohar M, Perchat S. Sample preparation for beta-exotoxin determination in *Bacillus thuringiensis* cultures by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* 2001;298(1):112-117. doi:10.1006/abio.2001.5373
294. Favret ME, Yousten AA. Thuricin: the bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol.* 1989;53(2):206-216. doi:10.1016/0022-2011(89)90009-8
295. Barboza-Corona JE, Vázquez-Acosta H, Bideshi DK, Salcedo-Hernández R. Bacteriocin-like inhibitor substances produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Arch Microbiol.* 2007;187(2):117-126. doi:10.1007/s00203-006-0178-5
296. Salazar-Marroquín EL, Galán-Wong LJ, Moreno-Medina VR, Reyes-López MÁ, Pereyra-Alfárez B. Bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis*: generalities and potential applications. *Rev Med Microbiol.* 2016;27(3):95-101. doi:10.1097/MRM.0000000000000076
297. Guillet C, Join-Lambert O, Le Monnier A, et al. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerging Infect Dis.* 2010;16(1):136-138. doi:10.3201/eid1601.091155

298. Svetoch EA, Levchuk VP, Pokhilenko VD, et al. Inactivating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other pathogens by use of bacteriocins OR-7 and E 50-52. *J Clin Microbiol.* 2008;46(11):3863-3865. doi:10.1128/JCM.01081-08
299. Cherif A, Chehimi S, Limem F, et al. Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* ssp. entomocidus HD9. *J Appl Microbiol.* 2003;95(5):990-1000. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02089.x
300. Chehimi S, Delalande F, Sablé S, et al. Purification and partial amino acid sequence of thuricin S, a new anti-*Listeria* bacteriocin from *Bacillus thuringiensis*. *Can J Microbiol.* 2007;53(2):284-290. doi:10.1139/w06-116
301. Cherif A, Rezgui W, Raddadi N, Daffonchio D, Boudabous A. Characterization and partial purification of entomocin 110, a newly identified bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* subsp. Entomocidus HD110. *Microbiol Res.* 2008;163(6):684-692.
302. Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol.* 2001;71(1):1-20. doi:10.1016/s0168-1605(01)00560-8
303. Dobson A, Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(1):1-6. doi:10.1128/AEM.05576-11
304. Lee H, Churey JJ, Worobo RW. Biosynthesis and transcriptional analysis of thurincin H, a tandem repeated bacteriocin genetic locus, produced by *Bacillus thuringiensis* SF361. *FEMS Microbiol Lett.* 2009;299(2):205-213. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01749.x
305. Perrin M, Bemer M, Delamare C. Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. *J Clin Microbiol.* 2003;41(11):5308-5309. doi:10.1128/jcm.41.11.5308-5309.2003
306. Kamoun F, Mejdoub H, Aouissaoui H, Reinbolt J, Hammami A, Jaoua S. Purification, amino acid sequence and characterization of Bacthuricin F4, a new bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. *J Appl Microbiol.* 2005;98(4):881-888. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02513.x
307. Gray EJ, Lee KD, Souleimanov AM, et al. A novel bacteriocin, thuricin 17, produced by plant growth promoting rhizobacteria strain *Bacillus thuringiensis* NEB17: isolation and classification. *J Appl Microbiol.* 2006;100(3):545-554. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02822.x
308. Kamoun F, Fguira IB, Hassen NBB, Mejdoub H, Lereclus D, Jaoua S. Purification and characterization of a new *Bacillus thuringiensis* bacteriocin active against *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Agrobacterium tumefaciens*. *Appl Biochem Biotechnol.* 2011;165(1):300-314. doi:10.1007/s12010-011-9252-9
309. Rea MC, Sit CS, Clayton E, et al. Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107(20):9352-9357. doi:10.1073/pnas.0913554107

310. Parente E, Brienza C, Moles M, Ricciardi A. A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity. *Journal of Microbiological Methods*. 1995;22(1):95-108. doi:10.1016/0167-7012(94)00068-I
311. Sambrook J, Gething MJ. Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature*. 1989;342(6247):224-225. doi:10.1038/342224a0
312. Carlet J, Jarlier V, Harbarth S, et al. Ready for a world without antibiotics? The Pensières Antibiotic Resistance Call to Action. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2012;1(1):11. doi:10.1186/2047-2994-1-11
313. OMS <http://www.euro.who.int/fr/publications/abstracts/tackling-antibiotic-resistance-from-a-food-safety-perspective-in-europe>. Published March 18, 2017.
314. Wang G, Manns DC, Guron GKP, Churey JJ, Worobo RW. Short communication: Homologous expression of recombinant and native thurincin H in an engineered natural producer. *J Dairy Sci*. 2014;97(7):4120-4126. doi:10.3168/jds.2014-8196

