



**HAL**  
open science

# Résistance à la colistine chez *Klebsiella pneumoniae*

Marine Herold Manuelli

► **To cite this version:**

Marine Herold Manuelli. Résistance à la colistine chez *Klebsiella pneumoniae*. Sciences pharmaceutiques. Université de Lorraine, 2018. Français. NNT : 2018LORR0048 . tel-01920494

**HAL Id: tel-01920494**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01920494>**

Submitted on 3 Apr 2023

**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.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**Résistance à la colistine chez *Klebsiella pneumoniae*****THÈSE**

présentée et soutenue publiquement le 30 mars 2018

pour l'obtention du

**Doctorat de l'Université de Lorraine****Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »****par****Marine HEROLD épouse MANUELLI****Composition du jury**

<b>Rapporteurs</b>	Corinne Arpin, PU	UMR 5234, MFP, CNRS- Université de Bordeaux
	Xavier Bertrand, PU-PH	UMR 6249, CE, CNRS- Université de Besançon
<b>Co-directeur de thèse</b>	Béatrice Demoré, MCU-PH (HDR)	EA 4360, APEMAC, Université de Lorraine
<b>Directeur de thèse</b>	Raphaël E Duval, PU	UMR 7053, L2CM, CNRS- Université de Lorraine
<b>Membre invité</b>	Hélène Dubois-Pot-Schneider, MCF	UMR 7039, CRAN, CNRS- Université de Lorraine



## REMERCIEMENTS

---

### *A mes Directeurs de thèse*

**Madame le Docteur Béatrice Demoré,**

Pour avoir accepté de co-diriger ce travail.

Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée et pour votre aide dans la réalisation de ce travail. Je tiens également à vous remercier pour votre soutien et vos conseils précieux qui m'ont permis de faire mes premiers pas en tant qu'Assistant Hospitalo-Universitaire.

**Monsieur le Professeur Raphaël Duval,**

Pour avoir accepté de co-diriger ce travail.

Je vous remercie pour m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire, mais surtout pour votre disponibilité, et vos qualités scientifiques et pédagogiques.

### *A mes rapporteurs*

**Madame le Professeur Corinne Arpin,**

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur de ce travail.

Soyez assurée de ma sincère reconnaissance ainsi que de mon profond respect.

**Monsieur le Professeur Xavier Bertrand,**

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur de ce travail.

Recevez toute ma gratitude

### *Au membre du jury*

**Madame le Docteur Hélène Dubois-Pot Schneider**

Pour m'avoir fait l'honneur de juger cette thèse.

Je te remercie également pour tous nos échanges, professionnels et personnels, très constructifs, et tes précieux conseils notamment en biologie moléculaire.

Trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

*A toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ces travaux*

*Aux personnels et étudiants du laboratoire*

*Pour votre travail, votre disponibilité et votre sympathie*

**A toute ma famille,**

**Mes parents et mes deux frères,**

Merci pour votre soutien et vos encouragements

**A ma belle-famille,**

Un grand merci pour votre soutien.

**A mes deux petits hommes,**

**Mon mari,**

Merci pour ta confiance, ton soutien et la force que tu m'apportes au quotidien

**Notre fils, Louis,**

Notre petit trésor et rayon de soleil

**A mes amis,**

Merci de votre présence, et pour tous ces moments partagés.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>ix</b>
<b>TABLE DES FIGURES</b> .....	<b>xi</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>xiii</b>
<b>LISTE DES ANNEXES</b> .....	<b>xv</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>ÉTAT DE L'ART</b> .....	<b>3</b>
<b>Chapitre 1 : Généralités sur <i>Klebsiella pneumoniae</i></b> .....	<b>4</b>
I. Taxonomie et phylogénie .....	4
II. Caractères bactériologiques.....	5
III. Facteurs de virulence.....	7
III.1 La capsule.....	7
III.1.1 Sérotypes capsulaires et virulence.....	7
III.1.2 Protection contre la phagocytose, l'action du complément et le pouvoir bactéricide du sérum.....	8
III.2 Le lipopolysaccharide .....	9
III.3 Les adhésines.....	11
III.4 Les sidérophores.....	11
IV. Habitat et pouvoir pathogène .....	12
V. Résistance aux antibiotiques .....	12
V.1 Résistance naturelle.....	12
V.2 Résistance acquise.....	13
VI. Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques .....	14
VI.1 Le point sur la résistance aux C3G.....	14
VI.2 Le point sur la résistance aux carbapénèmes .....	15
<b>Chapitre 2 : La colistine et ses mécanismes de résistance chez <i>K. pneumoniae</i></b> .....	<b>18</b>
I. La colistine .....	18
I.1 Généralités.....	18
I.2 Structure .....	18
I.3 Mécanisme d'action de la colistine .....	18
I.4 Spectre d'activité.....	19
I.5 Indications .....	20
I.6 Mode d'administration .....	20
I.7 Posologies.....	20
I.7.1 Unités .....	21
I.8 Pharmacocinétique .....	21
I.8.1 Métabolisme .....	22
I.8.2 Distribution.....	22
I.8.3 Élimination .....	22
I.9 Effets indésirables .....	23
I.9.1 Néphrotoxicité.....	23
I.9.2 Neurotoxicité.....	24
I.9.3 Réactions allergiques.....	24
II. Mécanismes de résistance acquise à la colistine chez <i>K. pneumoniae</i> .....	24

II.1	Modification du lipopolysaccharide par addition d'un groupement phosphoéthanolamine (pEtN) et/ ou 4-amino-4-déoxy-L-arabinose (L-Ara4N)	24
II.1.1	Gènes codant pour les enzymes modifiant le LPS	25
II.1.1.1	Gène <i>pmrC</i>	25
II.1.1.2	Opéron <i>arnBCADTEF</i>	25
II.1.2	Deux systèmes à deux composants : PmrA/PmrB et PhoP/PhoQ	27
II.1.2.1	PmrA/PmrB	27
II.1.2.2	PhoP/PhoQ	28
II.1.3	Gènes régulateurs des 2 systèmes à 2 composants	29
II.1.3.1	Gène <i>pmrD</i>	29
II.1.3.2	Gène <i>mgrB</i>	30
II.1.4	Autres mécanismes modifiant le lipopolysaccharide	30
II.1.4.1	RamA	30
II.1.4.2	CrrAB	31
II.1.4.3	Sous acylation du lipide A et son effet sur la résistance à la colistine	31
II.1.5	Modifications de la capsule	31
II.1.6	Système d'efflux	32
<b>Chapitre 3 : Traitement des infections à <i>K. pneumoniae</i> MDR résistante à la colistine.. 33</b>		
I.	Épidémiologie de la résistance à la colistine	33
II.	Associations antibiotiques	34
II.1	Associations antibiotiques utilisées en fonction du profil de résistance des souches de <i>K. pneumoniae</i> vis à vis des β-lactamines	37
II.1.1	Souches de <i>K. pneumoniae</i> productrices de carbapénémase	37
II.1.2	Souches de <i>K. pneumoniae</i> productrices de BLSE	38
II.1.3	Souches de <i>K. pneumoniae</i> productrices de céphalosporinase	38
II.2	Associations antibiotiques utilisées en fonction du profil de résistance des souches de <i>K. pneumoniae</i> vis à vis des polymyxines	39
II.2.1	Souches de <i>K. pneumoniae</i> résistantes aux polymyxines	39
II.2.1.1	Les associations antibiotiques	40
II.2.2	Souches de <i>K. pneumoniae</i> sensibles aux polymyxines	40
<b>OBJECTIFS</b>		<b>41</b>
<b>PARTIE EXPERIMENTALE</b>		<b>43</b>
<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES</b>		<b>44</b>
I.	Souches bactériennes utilisées	45
I.1	Souches résistantes à la colistine sélectionnées <i>in vitro</i>	45
I.2	Isolats cliniques résistants à la colistine	45
I.3	Isolats cliniques sensibles à la colistine	46
II.	Milieux de culture utilisés	46
III.	Antibiotiques testés au cours de l'étude	48
IV.	Réactifs et équipements	50
V.	Antibiogrammes et détermination des concentrations minimales inhibitrices	50
V.1	Antibiogrammes réalisés à l'aide du Vitek® 2	50
V.2	Préparation d'une culture bactérienne de 24 h et d'un inoculum bactérien	50
V.2.1	Préparation d'une culture bactérienne de 24 h	50
V.2.2	Préparation d'un inoculum bactérien	51
V.3	Détermination des concentrations minimales inhibitrices par microdilution	51



V.4	Méthode Etest®	53
VI.	Mesure de la production du biofilm à 24 h	54
VII.	Évaluation de la sensibilité au sérum humain	54
VIII.	Évaluation <i>in vitro</i> des associations antibiotiques	55
VIII.1	Technique de l'échiquier (Checkerboard method)	55
VIII.2	Technique du time kill-assay – Cinétique de bactéricidie	57
VIII.3	Technique par bandelette Etest®	59
VIII.4	Développement d'une technique de combinaisons antibiotiques permettant d'associer trois antibiotiques : Multiple Combination Bactericidal Testing	59
IX.	Extraction des ARN des souches bactériennes	62
X.	Reverse transcription ou RT	62
XI.	PCR quantitative en temps réel	63
XI.1	Choix du gène de référence	63
XI.2	Choix des amorces	63
XI.3	Vérification de la taille des amplicons et de la spécificité des couples d'amorces	64
XI.4	Migration sur gel d'agarose	64
XI.5	Réactions de qPCR	64
XII.	Tests statistiques utilisés	65
<b>RESULTATS</b>		<b>66</b>
<b>Chapitre 1 : Exploration du mécanisme de résistance à la colistine et de son expression chez <i>K. pneumoniae</i></b>		
I.	Contexte	68
II.	Résultats	68
II.1	Étude de l'expression des gènes impliqués dans la résistance à la colistine	68
II.1.1	Étude de <i>mgrB</i>	69
II.1.2	Étude de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse constitutive du LPS et du groupement L-Ara4N	70
II.2	Étude de deux facteurs de virulence	72
II.2.1	Étude de la sensibilité au sérum	72
II.2.2	Production de biofilm à 24 h	74
III.	Discussion	75
<b>Chapitre 2 : Impact du milieu de culture sur l'expression de 3 facteurs de virulence chez <i>K. pneumoniae</i></b>		
I.	Contexte	78
II.	Résultats	78
II.1	Détermination des CMI des souches étudiées dans les 3 milieux de culture	78
II.2	Détermination des concentrations de fer dans les trois milieux de culture utilisés	79
II.3	Étude de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse constitutive du LPS et du groupement L-Ara4N	80
II.4	Caractérisation phénotypique	83
II.4.1	Étude de la sensibilité au sérum	83
II.4.2	Évaluation de la production de biofilm à 24 h	87

III. Discussion .....	90
<b>Chapitre 3 : Résistance adaptative chez <i>K. pneumoniae</i>.....</b>	<b>93</b>
I. Contexte .....	94
II. Résultats .....	94
II.1 Partie I : Impact de la colistine sur l'expression du LPS et de 2 facteurs de virulence .....	95
II.1.1 Étude de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse du LPS en présence de deux concentrations de colistine.....	95
II.1.2 Observations morphologiques des souches de <i>K. pneumoniae</i> précédemment étudiées par microscopie à contraste négatif.....	96
II.1.3 Étude de la sensibilité au sérum .....	97
II.1.4 Production de biofilm à 24 h .....	99
II.2 Partie II : Impact de la colistine sur la capsule et son rôle dans le mécanisme de résistance chez <i>K. pneumoniae</i> .....	100
II.2.1 Étude de mgrB.....	100
II.2.2 Étude de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse constitutive du LPS et du groupement L-Ara4N en présence de deux concentrations de colistine .....	101
II.2.3 Observations morphologiques des souches de <i>K. pneumoniae</i> précédemment étudiées par microscopie à force atomique .....	103
II.2.4 Étude de la sensibilité au sérum .....	104
II.2.5 Production de biofilm à 24 h .....	105
III. Discussion .....	106
<b>Chapitre 4 : A la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques.....</b>	<b>108</b>
<b>Partie I.....</b>	<b>109</b>
I. Contexte .....	110
II. Résultats .....	111
II.1 Détermination des CMI à l'aide des 3 techniques.....	111
II.2 Évaluation du potentiel de synergie .....	114
II.2.1 Analyse des résultats pour les isolats CST-R.....	114
II.2.2 Analyse des résultats pour les isolats CST-S .....	119
II.3 Corrélation entre les différentes méthodes.....	121
III. Discussion .....	121
<b>Partie II .....</b>	<b>123</b>
I. Contexte .....	124
II. Résultats .....	124
II.1 Associations de deux antibiotiques .....	124
II.2 Associations de trois antibiotiques .....	124
III. Discussion .....	126
<b>DISCUSSION GENERALE.....</b>	<b>128</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>132</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>xvi</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AEE	Aire économique européenne
ANT	Antagonisme
ARN	Acide ribonucléique
ATB	Antibiotique
BET	Bromure d'éthidium
BGN	Bacille à Gram négatif
BHRe	Bactérie hautement résistantes aux antibiotiques et émergentes
BLSE	$\beta$ -lactamase à spectre étendu
BMR	Bactérie multirésistante
BMR-GN	Bactérie multirésistante à Gram négatif
C3G	Céphalosporine 3 <sup>ème</sup> génération
CA-SFM	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CAR	Carbapénèmes
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
CLSI	« Clinical and Laboratory Standards Institute »
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CMS	Colistiméthate sodique
CNRS	Centre national de la recherche scientifique
CST	Colistine
DORI	Doripénème
EARS-Net	« European Antimicrobial Resistance Surveillance Network »
ECDC	« European Centre for Disease Prevention and Control »
EMA	« European Medicines Agency »
EPC	Entérobactéries productrices de carbapénémase
ETP	Ertapénème
EUCAST	« European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing »
FIC	« Fractional Inhibitory Concentration »
IND	Indifférence
InVS	Institut de Veille Sanitaire
IPM	Imipénème
KPC	Klebsiella pneumoniae carbapénémase
L-Ara4N	4-amino-4-déoxy-L-arabinose
LBB	Luria Bertani bouillon
LCPME	Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement
LPS	Lipopolysaccharide
MCBT	« Multiple Combination Bactericidal Testing »
MDR	« Multidrug resistance »
MEM	Meropénème
MHA 2	Mueller Hinton agar 2
MHB	« Mueller Hinton broth »
MHB-CA	« Mueller Hinton broth – cations adjusted »
MM	Masse Moléculaire
MUI	Millions d'unités internationales
NDM	New Delhi Métallo- $\beta$ -lactamase
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OXA-48	Oxacillinase

Pb	Paire de bases
PBS	« Phosphate buffered saline »
PCR	« Polymerase chain reaction »
pEtN	Phosphéthanolamine
PMB	Polymyxine B
QSP	Quantité suffisante pour
R	Résistant
RT	Reverse transcription
RT-qPCR	PCR quantitative en temps réel
S	Sensible
SLD	Soins longue durée
SSR	Soins de suite et réadaptation
SRSMC	Structure et réactivité des systèmes moléculaires complexes
SYN	Synergie
TBE	Tris Borate EDTA
TMP	Triméthoprim
TMP/SMX	Triméthoprim/Sulfaméthoxazole
TKA	« Time-Kill Assay »
UFC	Unité formant colonie
UE	Union Européenne
UI	Unité internationale
UMR	Unité mixte de recherche
VAN	Vancomycine
VIM	Verona integron-encoded metallo-β-lactamase

## TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Dendrogramme dérivé de la comparaison des séquences d'ARNr 16S de membres de la famille des <i>Enterobacteriaceae</i> ( <i>Klebsiella</i> et <i>Raoultella</i> ).....	5
Figure 2 : Aspect microscopique de <i>K. pneumoniae</i> après coloration de Gram .....	5
Figure 3 : Composition des parois bactériennes des bactéries à Gram positif et à Gram négatif .....	6
Figure 4 : Représentation schématique des facteurs de virulence de <i>K. pneumoniae</i> .....	7
Figure 5 : Schéma représentatif du LPS chez <i>E. coli</i> .....	9
Figure 6 : Biosynthèse de Kdo2-lipidA chez <i>E. coli</i> .....	10
Figure 7 : Transfert du LPS à travers la membrane externe des BGN.....	10
Figure 8 : Pourcentages de <i>K. pneumoniae</i> résistantes aux C3G dans les pays de l'UE/AEE en 2010 et 2013 .....	14
Figure 9 : Pourcentages de <i>K. pneumoniae</i> résistantes aux carbapénèmes dans les pays de l'UE/AEE en 2010 et 2013.....	16
Figure 10 : Pourcentages de <i>K. pneumoniae</i> résistantes aux carbapénèmes dans les pays de l'UE/AEE en 2013 et 2016.....	16
Figure 11 : Mode d'action de la colistine.....	19
Figure 12 : Représentation schématique de la clairance du colistiméthate sodique après son administration.....	23
Figure 13 : Représentation des mécanismes impliqués dans la résistance à la colistine.....	25
Figure 14 : Synthèse et transfert du groupement L-Ara4N sur le lipide A chez <i>Salmonella spp.</i> .....	26
Figure 15 : Activation et interaction des 2 systèmes à 2 composants chez <i>Salmonella spp.</i> ...	27
Figure 16 : Représentation du LPS modifié par l'ajout de groupements L-Ara4N et pEtN chez <i>S. typhimurium</i> .....	28
Figure 17 : Activation de l'opéron <i>arnBCADTEF</i> chez <i>K. pneumoniae</i> .....	29
Figure 18 : Structures chimiques des ATB utilisés dans l'étude .....	48
Figure 19 : Schéma représentatif des cibles d'action des antibiotiques utilisés.....	49
Figure 20 : Schéma d'une microplaque utilisée dans la détermination de la CMI en milieu liquide.....	52
Figure 21 : Schéma de détermination de la CMI par méthode Etest® .....	53
Figure 22 : Schéma d'une microplaque utilisée dans la technique de l'échiquier .....	57
Figure 23 : Schéma de 2 géloses MHA 2 utilisées dans la technique du TKA.....	58
Figure 24 : Schéma d'un test de synergie par la méthode Etest®.....	59
Figure 25 : Schéma récapitulatif du design des amorces de <i>mgrB</i> et de la taille de l'amplicon attendue .....	69
Figure 26 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1,4% des amplicons de <i>mgrB</i> pour Kp1, Kp1m, Kp6 et Kp6m .....	70
Figure 27 : Étude de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse du LPS et du groupement L-Ara4N (a) Kp1m vs. Kp1, (b) Kp6m vs. Kp6.....	71
Figure 28 : Étude de la sensibilité au sérum (a) Kp1m vs. Kp1, (b) Kp6m vs. Kp6 .....	73
Figure 29 : Étude de la production de biofilm à 24 h chez Kp1, Kp6, Kp1m et Kp6m.....	75
Figure 30 : Suivi de l'expression des gènes chez (a) Kp1m (vs. Kp1), et (b) Kp6m (vs. Kp6), après culture dans le MHB-CA, MHB et le LBB .....	80
Figure 31 : Étude de la sensibilité au sérum pour Kp1 et Kp1m (a) et pour Kp6 et Kp6m (b) après culture dans chacun des trois milieux (MHB-CA, MHB, et LBB).....	83
Figure 32 : Évaluation de la production de biofilm à 24 h pour Kp1 et Kp1m (a) et Kp6 et Kp6m (b) après culture dans chacun des trois milieux (MHB-CA, MHB et LBB).....	89

Figure 33 : Observations morphologiques de quatre souches de <i>K. pneumoniae</i> en présence de différentes concentrations en colistine par microscopie à contraste négatif .....	97
Figure 34 : Étude de la sensibilité au sérum pour Kp1, Kp1m et Kp1mc <sub>1/4</sub> (a) et pour Kp6, Kp6m et Kp6mc <sub>1/2</sub> (b) .....	98
Figure 35 : Évaluation de la production de biofilm à 24 h pour Kp1, Kp1m et Kp1mc <sub>1/4</sub> et Kp6, Kp6m et Kp6mc <sub>1/2</sub> .....	99
Figure 36 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1,4% des amplicons de mgrB pour KpATCC et KpATCCm .....	100
Figure 37 : Représentations schématiques de l'organisation de la capsule de, (a) KpATCC et, (b) KpATCCm.....	103
Figure 38 : Étude de la sensibilité au sérum pour KpATCC, KpATCCm et KpATCCmc <sub>1/4</sub>	104
Figure 39 : Évaluation de la production de biofilm à 24 h pour KpATCC, KpATCCm et KpATCCmc <sub>1/4</sub> , ns : non significatif ( $p > 0,05$ ) .....	105
Figure 40 : Évaluation du potentiel de synergie des combinaisons antibiotiques à l'aide de la méthode du TKA à 0,5X CMI (n = 3). 408 (A), 409 (B), 411 (C), 419 (D), et 422 (E)	117
Figure 41 : Évaluation du potentiel de synergie des combinaisons antibiotiques à l'aide de la méthode du TKA à 0,25X CMI (n = 3). 408 (A'), 409 (B'), 411 (C'), 419 (D'), et 422 (E') .....	118

## LISTE DES TABLEAUX

---

Tableau I : Tableau récapitulatif des articles évaluant les combinaisons antibiotiques chez <i>K. pneumoniae</i> .....	36
Tableau II : Souches bactériennes utilisées.....	45
Tableau III : Composition et comparaison des milieux de culture utilisés (pour 1 L).....	47
Tableau IV : Conditions de réalisation des RT.....	62
Tableau V : Critères de design des amorces.....	63
Tableau VI : Conditions de réalisation des qPCR.....	65
Tableau VII : Comparaison de l'expression de l'ensemble des gènes entre Kp1m vs. Kp1 et Kp6m vs. Kp6.....	72
Tableau VIII : Interprétation des résultats obtenus lors de la cinétique de l'étude de la sensibilité au sérum chez Kp1, Kp1m, Kp6 et Kp6m.....	73
Tableau IX : Comparaison du nombre de survivants aux différents temps étudiés entre les souches sensibles (Kp1 et Kp6) et résistantes (Kp1m et Kp6m).....	74
Tableau X : Tableau récapitulatif des valeurs de CMI (mg/L) des quatre souches étudiées dans chaque milieu de culture utilisé.....	79
Tableau XI : Concentrations en fer (Fe <sup>3+</sup> ) (mg/L) des trois milieux de culture utilisés.....	79
Tableau XIV : Interprétation des résultats obtenus lors de l'étude de l'expression des gènes chez (a) Kp1m (vs. Kp1) et (b) Kp6m (vs. Kp6).....	81
Tableau XII : Expression de l'ensemble des gènes étudiés pour Kp1m (vs. Kp1) dans chacun des trois milieux de culture utilisés.....	82
Tableau XIII : Expression de l'ensemble des gènes étudiés pour Kp6m (vs. Kp6) dans chacun des trois milieux de culture utilisés.....	82
Tableau XV: Interprétation des résultats obtenus lors de la cinétique de l'étude de la sensibilité au sérum Kp1, Kp1m, Kp6 et Kp6m.....	84
Tableau XVI : Interprétation des résultats obtenus lors de la comparaison du nombre de survivants pour les différentes souches entre les milieux de culture utilisés aux différents temps étudiés.....	85
Tableau XVII : Comparaison du nombre de survivants entre les souches sensibles (Kp1 et Kp6) et les mutants (Kp1m et Kp6m) aux différents temps étudiés dans chacun des trois milieux.....	87
Tableau XVIII : Tableau récapitulatif de la significativité des résultats obtenus lors de l'évaluation de la production de biofilm à 24 h pour Kp1, Kp1m, Kp6 et Kp6m.....	90
Tableau XIX : Comparaison de l'expression de l'ensemble des gènes chez (a) Kp1mc <sub>x</sub> vs. Kp1m et (b) Kp6mc <sub>x</sub> vs. Kp6m.....	95
Tableau XX : Suivi de l'expression de l'ensemble des gènes chez (a) Kp1mc <sub>x</sub> (vs. Kp1m) et (b) Kp6mc <sub>x</sub> (vs. Kp6m).....	96
Tableau XXI : Interprétation des résultats obtenus lors de la cinétique de l'étude de la sensibilité au sérum chez Kp1, Kp1m, Kp1mc <sub>1/4</sub> et Kp6, Kp6m, Kp6mc <sub>1/2</sub> .....	99
Tableau XXII : Suivi de l'expression des gènes chez KpATCCm vs. KpATCC.....	101
Tableau XXIII : Suivi de l'expression des gènes chez KpATCCmc <sub>1/4</sub> et KpATCCmc <sub>1/2</sub> vs. KpATCCm.....	102
Tableau XXIV : Comparaison de l'expression des gènes entre KpATCCmc <sub>1/4</sub> (vs. KpATCCm) et KpATCCmc <sub>1/2</sub> (vs. KpATCCm).....	102
Tableau XXV : Interprétation des résultats obtenus lors de la cinétique de l'étude de la sensibilité au sérum chez KpATCC, KpATCCm et KpATCCmc <sub>x</sub> .....	104
Tableau XXVI : Moyennes des valeurs de CMI (µg/mL) obtenues à l'aide des 3 techniques (méthode Etest <sup>®</sup> , microdilution, Vitek2 <sup>®</sup> ) pour les isolats cliniques de <i>K. pneumoniae</i> résistants à la colistine.....	112

Tableau XXVII : Moyennes des valeurs de CMI ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtenues à l'aide des 3 techniques (méthode Etest <sup>®</sup> , microdilution, Vitek2 <sup>®</sup> ) pour les isolats cliniques de <i>K. pneumoniae</i> sensibles à la colistine .....	113
Tableau XXVIII : Évaluation du potentiel de synergie des combinaisons antibiotiques à l'aide des techniques de l'échiquier et Etest <sup>®</sup> chez 18 isolats CST-R .....	115
Tableau XXIX : Évaluation du potentiel de synergie des combinaisons antibiotiques à l'aide de la méthode de l'échiquier et du TKA à 0,25X et 0,5X CMI .....	116
Tableau XXX : Évaluation du potentiel de synergie des combinaisons antibiotiques à l'aide la technique de l'échiquier et Etest <sup>®</sup> chez 15 isolats CST-S .....	120
Tableau XXXI : Tableau récapitulatif de la significativité des associations antibiotiques chez 18 isolats CST-R .....	125
Tableau XXXII : Tableau récapitulatif de l'effet bactéricide des associations antibiotiques chez 18 isolats CST-R .....	126



## LISTE DES ANNEXES

---

Annexe 1 : Antibiogrammes des isolats cliniques utilisés à l'aide du Vitek®2 .....	xvii
Annexe 2 : Liste du matériel, équipements et réactifs .....	xlvi
Annexe 3 : Listing des amorces utilisées .....	xlix
Annexe 4 : Composition des tampons utilisés .....	l
Annexe 5 : Note d'informations BioMérieux .....	li
Annexe 6 : Résultats MCBT .....	liii
Annexe 7 : Publication n°1 .....	lxii
Annexe 8 : Publication n°2 .....	lxxiii
Annexe 9 : Publication n°3 .....	xcii

# INTRODUCTION

---

La dissémination des bactéries multirésistantes (BMR) aux antibiotiques représente un véritable enjeu de santé de publique. Depuis quelques années, les médias ne cessent de sensibiliser le grand public à travers des gros titres accrocheurs et alarmistes.

En 2014, nous pouvions lire dans la presse, « **La résistance aux antibiotiques devient une menace à l'échelle mondiale** » Le Monde, « **L'OMS s'alarme de la résistance aux antibiotiques. Des infections considérées aujourd'hui comme mineures risquent de nouveau de tuer si rien n'est fait globalement et de façon urgente pour lutter contre la résistance aux antibiotiques** » [...] « **Cette grave menace n'est plus une prévision, mais bien une réalité dans chaque région du monde** » [...] « **A moins que les nombreux acteurs concernés agissent d'urgence de manière coordonnée, le monde s'achemine vers une ère post antibiotique, où des infections courantes et des blessures mineures qui ont été soignées depuis des décennies pourraient à nouveau tuer** » Le Parisien, « **La résistance aux antibiotiques, première cause de mortalité dans le monde en 2050. Selon le rapport d'un groupe d'experts internationaux, la résistance aux antibiotiques devrait causer « 10 millions de morts par an » en 2050, soit plus que le cancer** » Les Echos, « **L'OMS alerte sur la résistance toujours plus grande aux antibiotiques** » [...] « **Vers une ère post antibiotiques** » [...] « **Inefficacité grandissante des antibactériens** » La Croix (1-4).

Sensibilisée par ces campagnes d'informations et de par ma profession de pharmacien hospitalier où le juste usage des antibiotiques dans les établissements de santé est devenu primordial afin de préserver l'efficacité des antibiotiques et de limiter le développement et la diffusion des résistances bactériennes, je me suis naturellement tournée vers la recherche dans ce domaine afin de contribuer à la lutte contre l'antibiorésistance. Cependant la problématique de l'antibiorésistance est vaste, de nombreux antibiotiques et davantage de bactéries...Alors dans quelle direction aller ?

Au sein du laboratoire, une thématique était déjà initiée, il s'agissait de la résistance à la colistine chez *Klebsiella pneumoniae*. Les premiers résultats obtenus étaient encourageants et prometteurs.

De plus *K. pneumoniae* est un agent opportuniste jouant un rôle majeur dans les infections nosocomiales. Cette bactérie requiert une attention particulière en raison de l'apparition constante de résistances aux antibiotiques chez cette espèce. L'usage massif et souvent inapproprié des antibiotiques associés au fort potentiel épidémique de cette espèce conditionnent l'évolution vers la résistance. Les infections à *K. pneumoniae* sont extrêmement redoutées à l'hôpital car les souches épidémiques sont souvent multirésistantes aux antibiotiques. En 2008, Rice qualifiait d'« ESKAPE pathogens » six espèces bactériennes (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter spp.*) , dont *K. pneumoniae*, capables d'échapper aux traitements antibiotiques et responsables de la majorité des infections dans les établissements de santé aux Etats-Unis (5). D'un point de vue épidémiologique, Boucher et coll. soulignaient l'importance de la diffusion de souches de *K. pneumoniae* productrices de  $\beta$ -lactamases et/ou de carbapénémases pour lesquelles les alternatives thérapeutiques sont très limitées (6). La colistine est l'antibiotique de choix utilisée en dernière intention dans les infections causées par ces bactéries (7). Cependant il a été constaté l'apparition de souches résistantes (8). D'après le rapport de l'European Center for Disease prevention and Control (ECDC), la résistance à la colistine est particulièrement préoccupante chez 3 bactéries à Gram négatif, *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter spp.* (9). Cette thématique m'a donc motivée pour participer à la lutte contre l'antibiorésistance.

Ce manuscrit est composé de trois parties.

La première est consacrée à l'état de l'art, et présente la bactérie *K. pneumoniae*, la colistine, la résistance à la colistine et le bilan des associations d'antibiotiques utilisées dans la littérature.

La deuxième partie présente le matériel et les méthodes utilisés afin de mener à bien nos expérimentations.

Et la troisième partie, organisée en chapitres, regroupe l'ensemble des résultats obtenus lors des différentes expérimentations.

# **ÉTAT DE L'ART**

# Chapitre 1 : Généralités sur *Klebsiella pneumoniae*

---

## I. Taxonomie et phylogénie

Actuellement, l'espèce *Klebsiella pneumoniae* appartient au règne des *Procaryotae*, au domaine des *Bacteria*, au phylum des *Proteobacteria*, à la classe des *Gammaproteobacteria*, à l'ordre des *Enterobacteriales*, à la famille des *Enterobacteriaceae* et au genre *Klebsiella*.

Le genre *Klebsiella* a été nommé par V. Trevisan en 1885 en l'honneur du bactériologiste allemand Theodor Albrecht Edwin Klebs (1834-1913) (10).

Depuis 1960, plusieurs classifications du genre *Klebsiella* ont été proposées (11–16). Parmi celles-ci, la plus communément utilisée jusqu'à la fin du vingtième siècle était celle proposée par Orskov en 1984 (13). Cette classification comportait cinq espèces ; *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola* (encore appelée *K. trevisanii*), *K. terrigena* et *K. ornithinolytica* (13). *K. pneumoniae* se différencie des autres espèces du genre car elle est composée de trois sous espèces : *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* et *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* (figure 1) (13).

En 1999, Carter et coll. ont montré, grâce à l'étude des gènes *16S* et *phoE* codant pour une porine, que *Calymmatobacterium granulomatis* (agent responsable de la donovanose), présentait une grande homologie avec le genre *Klebsiella*. Ainsi *Calymmatobacterium granulomatis* a été transférée dans le genre *Klebsiella* et renommée *K. granulomatis* (14).

En 2001, après l'étude des gènes *16S* et *rpoB*, un nouveau nom de genre, *Raoultella*, a été donné à trois espèces jusque-là dénommées *K. ornithinolytica*, *K. planticola* et *K. terrigena* (15).

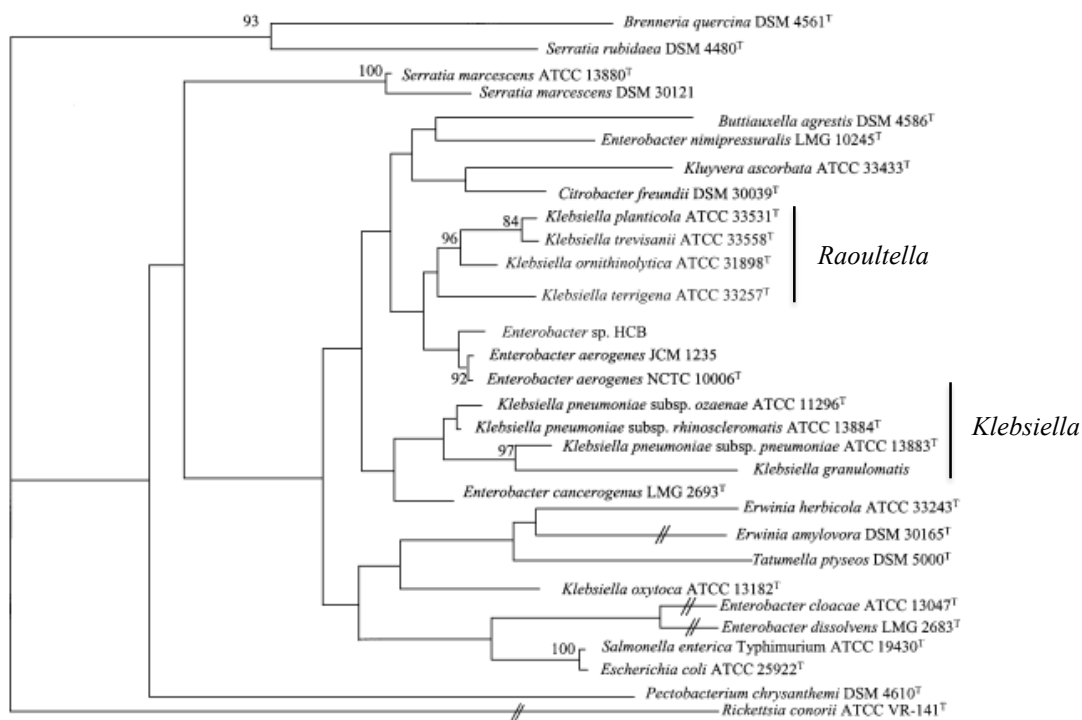


Figure 1 : Dendrogramme dérivé de la comparaison des séquences d'ARNr 16S de membres de la famille des *Enterobacteriaceae* (15)

En 2004, deux nouvelles espèces ont été identifiées : *K. variicola* (16) et *K. singaporensis* (17).

## II. Caractères bactériologiques

*K. pneumoniae* est un bacille à Gram négatif (BGN) (figure 2).

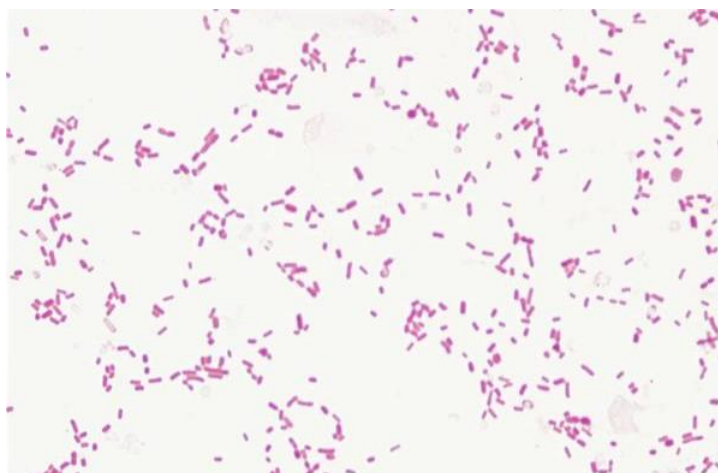


Figure 2 : Aspect microscopique de *K. pneumoniae* après coloration de Gram

La famille des entérobactéries se définit par les caractères suivants :

- BGN,
- mobiles ou immobiles,
- culture sur milieux de culture ordinaires,
- aéro-anaérobie facultatif,
- fermentant le glucose,
- réduisant les nitrates en nitrites et,
- oxydase négative.

*K. pneumoniae* se distingue dans cette famille en étant immobile et capsulée. D'un point de vue structural, les bactéries à Gram négatif se différencient des bactéries à Gram positif de par la composition de leur paroi bactérienne (figure 3).

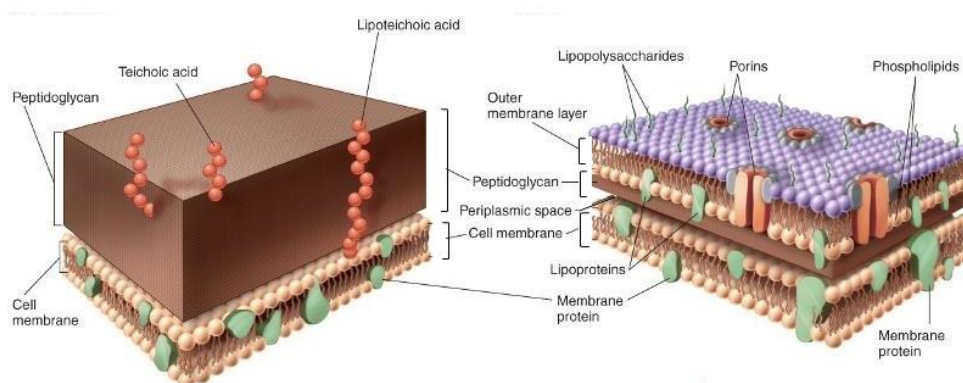


Figure 3 : Composition des parois bactériennes des bactéries à Gram positif (à gauche) et à Gram négatif (à droite) (18)

Outer membrane layer : membrane externe, periplasmic space : espace périplasmique, cell membrane : membrane plasmique

En effet, leur paroi est plus complexe. Elle est composée de trois parties, de l'extérieur vers l'intérieur :

- la membrane externe composée d'une double couche de phospholipides, de lipopolysaccharides (LPS) et de protéines variées telles que des porines,
- l'espace périplasmique principalement composé de peptidoglycane et de,
- la membrane plasmique.

### III. Facteurs de virulence

D'après Podschun et Ullmann, cinq facteurs ont été identifiés chez *K. pneumoniae* (figure 4) (19).

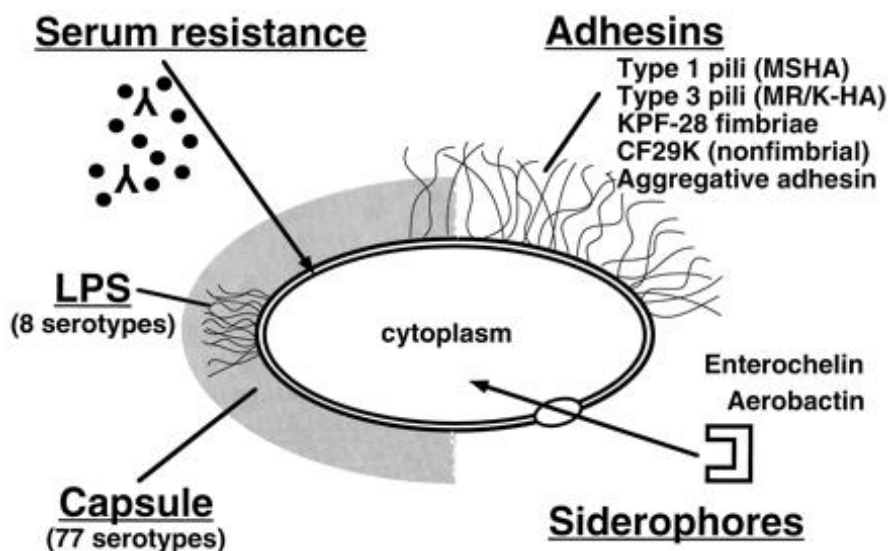


Figure 4 : Représentation schématique des facteurs de virulence de *K. pneumoniae* (19)

#### III.1 La capsule

*K. pneumoniae* possède une capsule de nature polysaccharidique et de structure fibrillaire recouvrant la surface bactérienne (20, 21). Les antigènes capsulaires K déterminent 77 sérotypes (19). La capsule est un facteur de virulence important. Elle protège les bactéries de la phagocytose (22, 23), de l'action du complément (24) et du pouvoir bactéricide du sérum (25).

##### III.1.1 Sérotypes capsulaires et virulence

En termes de virulence, il existe des différences importantes en fonction des sérotypes capsulaires. En effet, plusieurs modèles d'infection expérimentale ont permis de mettre en évidence ces différences. Les souches exprimant les antigènes capsulaires K1 et K2 sont particulièrement virulentes dans un modèle murin de péritonite comparées à d'autres sérotypes qui sont peu ou pas virulents (26, 27). Dans les lésions cutanées induites expérimentalement chez la souris, les souches de sérotypes K1, K2, K4 et K5 se sont révélées les plus virulentes (28).



En pathologie humaine, les souches de sérotype K1 et K2 sont actuellement considérées comme les plus virulentes. Bien qu'il n'existe pas de corrélation entre le sérotype et le site d'infection, plusieurs études suggèrent l'implication du sérotype K2 dans les infections pulmonaires, urinaires ou les bactériémies (29).

### **III.1.2 Protection contre la phagocytose, l'action du complément et le pouvoir bactéricide du sérum**

Au contact de bactéries, le système immunitaire de l'hôte réagit et mobilise ses défenses à la fois spécifiques et non spécifiques. La phagocytose et l'activité bactéricide du sérum constituent une première ligne de défense, non spécifique, de l'organisme contre les infections bactériennes. Cette ligne de défense est principalement médiée par la voie du complément (19).

La voie du complément peut être activée par deux mécanismes : la voie classique du complément, nécessitant la présence d'anticorps et la voie alterne, ne nécessitant pas la présence d'anticorps. La voie alterne est donc une ligne de défense très précoce du système immunitaire inné, capable de réagir avant la production d'anticorps spécifiques (30). Les deux voies du complément conduisent, *via* l'activation du fragment C3, à la formation de l'opsonine C3b, et à la formation du complexe terminal C5b-C9. Ces deux éléments vont jouer un rôle clé dans le système de défense inné. En effet, grâce à l'opsonisation par le fragment C3b, les cellules phagocytaires peuvent phagocyter les bactéries et le complexe C5b-C9 va être capable de former des pores au niveau de la membrane externe des BGN entraînant une lyse osmotique (19).

La capsule de *K. pneumoniae* va empêcher la fixation de l'opsonine C3b perturbant ainsi la phagocytose par les macrophages et les polynucléaires (24).

De plus, cette capsule confère à *K. pneumoniae* une protection contre l'action lytique du complexe C5b-C9, lui permettant d'échapper à cette première ligne de défense non spécifique (19).

Enfin, la capsule protégerait également du pouvoir bactéricide du sérum (25). Cependant le mécanisme de résistance n'est pas connu. Deux hypothèses ont été émises. Premièrement, il semblerait que la capsule masque le LPS, empêchant ainsi l'activation de la voie du complément. Deuxièmement, il semblerait que la quantité de C3b produite soit insuffisante quand elle est produite par une seule des deux voies du complément (19).

### III.2 Le lipopolysaccharide

Le LPS, représenté figure 5, est un composant majeur de la membrane externe des BGN. Il s'agit d'une endotoxine capable d'activer le système immunitaire entraînant des effets physiopathologiques caractéristiques chez l'hôte (choc septique, collapsus cardiovasculaire) (31).

Il est composé de trois entités synthétisées séparément : le lipide A, le « core » et l'antigène O.

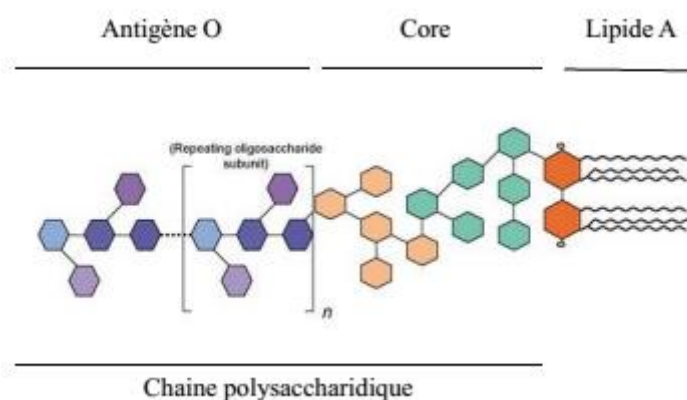


Figure 5 : Schéma représentatif du LPS chez *E. coli* (32)

⬡ ose

Le lipide A, enchâssé dans la membrane externe, représente la partie proximale du LPS, le « core », sa partie centrale, et l'antigène O, sa partie distale libre dans le milieu extérieur.

Le lipide A est un phospholipide, composé d'une glucosamine et de chaînes d'acides gras, qui sert de point d'ancrage au LPS dans la membrane externe des BGN. Les gènes structuraux codant les enzymes essentielles à la biosynthèse du lipide A d'*Escherichia coli* ont été identifiés et caractérisés (33). Il est important de souligner que l'identification et la caractérisation des gènes codant pour les enzymes de la biosynthèse du lipide A ont été élucidées principalement chez *Escherichia coli* et *Salmonella spp.*

La biosynthèse du lipide A, représentée figure 6, est un processus séquentiel dans lequel chaque enzyme catalyse la formation du substrat pour l'enzyme suivante.

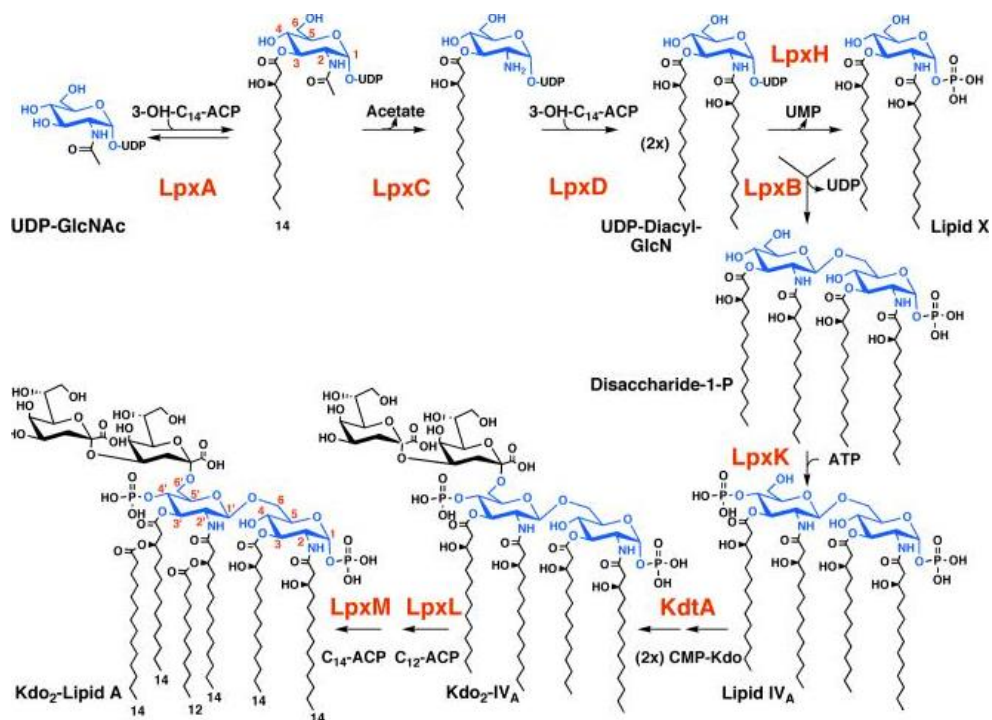


Figure 6 : Biosynthèse de Kdo2-lipidA chez *E. coli* à partir de l'UDP-GlcNAc (34)

Une fois synthétisé au niveau du cytoplasme, le lipide A sera associé à l'antigène O et le LPS naissant sera transféré au niveau de la membrane externe des BGN.

Les processus impliqués dans le transfert du LPS (lipide A + antigène O) sont brièvement décrits dans la figure 7.

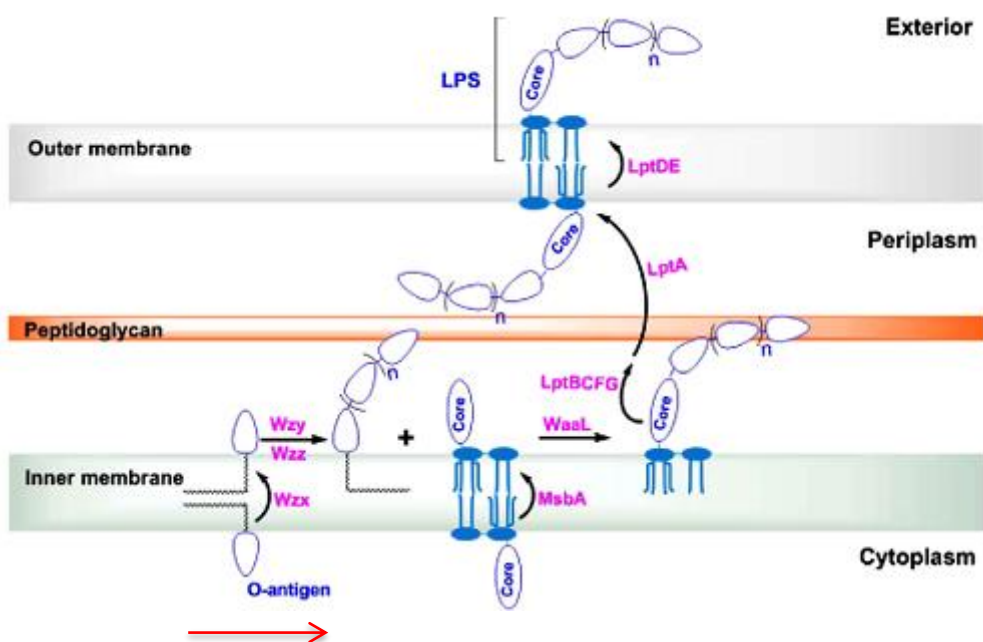


Figure 7 : Transfert du LPS à travers la membrane externe des BGN (35)

### III.3 Les adhésines

Différentes adhésines ont été mises en évidence chez *K. pneumoniae*. Le terme adhésine est utilisé pour la dénomination de différentes molécules impliquées dans l'adhésion des bactéries aux cellules de l'hôte. Ces molécules jouent un rôle essentiel dans le développement du processus infectieux. Les propriétés d'adhésion des *Enterobacteriaceae* sont principalement médiées par des *pili* encore appelés *fimbriae* (36). Parmi les différents types de *fimbriae* décrits chez les entérobactéries, il existe deux types prédominants chez *Klebsiella spp.*, les *fimbriae* de type 1 et de type 3 (37–39). Ces deux types de *fimbriae* se différencient en fonction de leur sensibilité au mannose.

Les *fimbriae* de type 1 sont les adhésines les plus fréquemment rencontrées chez les entérobactéries. Elles sont qualifiées de « mannose-sensible » car l'hémagglutination est inhibée en présence de mannose. Elles sont impliquées dans la colonisation des tractus urinaire et respiratoire (40–43). Leur rôle a clairement été identifié chez *E. coli* lors d'infections urinaires, et chez *K. pneumoniae* lors d'infections chez l'animal (44–46).

Les *fimbriae* de type 3 se différencient du type 1 par leur propriété d'hémagglutination. En effet, ce type de *fimbriae* n'agglutine que les érythrocytes préalablement traités par l'acide tannique et ne sont pas sensibles au mannose (4). Elles sont qualifiées de mannose-résistantes. Les *fimbriae* de type 3 sont également impliquées dans le processus d'adhésion de *K. pneumoniae* à différents types cellulaires tels que les cellules de l'épithélium respiratoire, urinaire et rénal (47–49). Cependant, leur rôle comme facteur de virulence, dans les infections respiratoires et urinaires, reste hypothétique. Néanmoins, une étude a montré que ces structures semblaient favoriser l'adhésion et la formation de biofilm sur des supports inertes, tels que des cathéters. Ces propriétés favoriseraient le développement d'infections sur sonde chez les patients immunodéprimés (50).

### III.4 Les sidérophores

La croissance bactérienne n'est pas seulement limitée par les défenses immunitaires de l'hôte, mais également par son approvisionnement en fer. En effet, le fer est un facteur essentiel à la croissance bactérienne, fonctionnant principalement comme un catalyseur redox dans les protéines, il participe au transport de l'oxygène et d'électrons (51). Dans l'organisme de l'hôte, le fer extracellulaire circule lié à des protéines telles que la lactoferrine et la transferrine. Une quantité très faible de fer circule librement, et cette quantité est insuffisante pour une croissance bactérienne normale (52). Dans ces conditions, les bactéries vont synthétiser et

sécréter des sidérophores (exemples chez *K. pneumoniae* : entérobactines, aérobactines). Ce sont des chélateurs capables de se lier au fer, sous la forme  $Fe^{3+}$ . Puis les complexes (sidérophore-fer) sont captés par des récepteurs membranaires à partir desquels le fer sera libéré dans la cellule par différents mécanismes (50).

#### **IV. Habitat et pouvoir pathogène**

*K. pneumoniae* est une espèce ubiquitaire. Elle peut être isolée de l'environnement (sols, eaux de surface, eaux usées, et végétaux etc.) ainsi que de la flore commensale de l'Homme et des animaux (53). Dans les sols, *Klebsiella* favorise la croissance des plantes en permettant la fixation de l'azote, la solubilisation des phosphates, la production de phytohormones et la limitation de la présence de microorganismes (54).

Chez l'Homme, *K. pneumoniae* peut être responsable d'infections communautaires et nosocomiales. Parmi les infections communautaires, *K. pneumoniae* est responsable d'infections respiratoires telles que les pneumonies lobaires nécrosantes, les abcès pulmonaires, les pleurésies purulentes (55). Depuis les années 90, elle est également responsable d'abcès hépatique primitif (56). Cette pathologie peut être associée à des complications métastatiques telles que des endophtalmies et des méningites (56). Le premier cas a été décrit à Taiwan puis d'autres cas ont été rapportés en Asie et aux Etats Unis (56). Actuellement, elle est surtout responsable d'infections nosocomiales. En effet, *K. pneumoniae* colonise principalement les patients hospitalisés où elle se retrouve au niveau du tractus gastro-intestinal, de la peau, de l'oropharynx, et des voies aériennes supérieures. Dans ce contexte, elle est responsable d'infections urinaires, intra-abdominales, respiratoires et de bactériémies (57).

#### **V. Résistance aux antibiotiques**

##### **V.1 Résistance naturelle**

*K. pneumoniae* appartient au groupe 2 des entérobactéries, ce qui implique qu'elle produit une pénicillinase constitutive de bas niveau. La production de cette pénicillinase lui confère une résistance aux aminopénicillines (amoxicilline), aux carboxypénicillines (ticarcilline) et aux uréidopénicillines (pipéracilline) (58).

Cependant, cette pénicillinase est sensible aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases tels que l'acide clavulanique et le tazobactam. Par conséquent, le phénotype sauvage de *K. pneumoniae* est sensible aux associations amoxicilline (ou ticarcilline) + acide clavulanique et pipéracilline + tazobactam, ainsi qu'à l'ensemble des céphalosporines (58).

## V.2 Résistance acquise

*K. pneumoniae* a toujours joué un rôle important dans l'apparition et/ou la dissémination des résistances, principalement vis à vis des  $\beta$ -lactamines. Ainsi, à partir des années 80, *K. pneumoniae* est entrée dans une nouvelle ère.

En 1983, la première enzyme capable d'hydrolyser les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G) a été identifiée chez *K. pneumoniae* (59). En raison de son large spectre d'action, elle a été qualifiée de  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE). La résistance acquise liée à la production de BLSE se caractérise par une perte d'activité des pénicillines, des céphalosporines et de l'aztréonam. Les carbapénèmes restent actifs. Par conséquent, après une utilisation massive de carbapénèmes pour traiter les infections causées par les souches productrices de BLSE, il apparaît en 1996 la première carbapénémase. La première *K. pneumoniae* productrice de carbapénémase a été signalée en Caroline du Nord (USA) et s'est propagée plus tard en Europe (60). Les carbapénémases conduisent à une inefficacité partielle ou totale des antibiotiques de la classe des carbapénèmes (traitement de dernière intention).

Actuellement, 3 classes de carbapénémases ont été décrites : classe A (KPC), classe B (VIM, NDM) et classe D (OXA-48). D'un point de vue épidémiologique, les carbapénémases de classe A sont les carbapénémases les plus répandues, elles ont été observées dans le monde entier (61). Quant aux carbapénémases des deux autres classes, on les retrouve dans des zones du globe plus caractéristiques telles que l'Inde pour les carbapénémases de classe B (NDM) et le bassin méditerranéen et l'Europe du Sud pour les carbapénémases de classe D (OXA-48) (62).

Par conséquent, *K. pneumoniae* est un acteur majeur de la résistance aux antibiotiques. Lorsqu'elle n'est pas le premier hôte, elle est fréquemment responsable de la diffusion épidémique de cette résistance, notamment au sein de secteurs hospitaliers (63).

## VI. Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques

### VI.1 Le point sur la résistance aux C3G

Depuis 2005, les données du réseau European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) montrent, en France, une importante augmentation de la résistance aux C3G pour les souches de *K. pneumoniae* isolées d'infections invasives (64). En 2014, 72,0% des souches de *K. pneumoniae* étaient productrices de BLSE (64).

De même, entre 2010 et 2015, les données du réseau BMR-Raisin montraient une importante augmentation de l'incidence des entérobactéries BLSE tous services confondus (+ 63,4%). L'analyse par secteur d'activité montrait la même évolution, dans les services de court séjour (+ 70,8%), en réanimation (+ 60,2%), en services de soins de suite et réadaptation (SSR) ou de soins de longue durée (SLD) (+ 45,8%). Les incidences d'entérobactéries BLSE les plus élevées étaient observées dans les services de réanimation où la pression antibiotique est plus forte (64).

En Europe, la résistance des entérobactéries aux C3G poursuit son augmentation, notamment chez *K. pneumoniae*. Cette résistance est principalement en lien avec la production de  $\beta$ -lactamases.

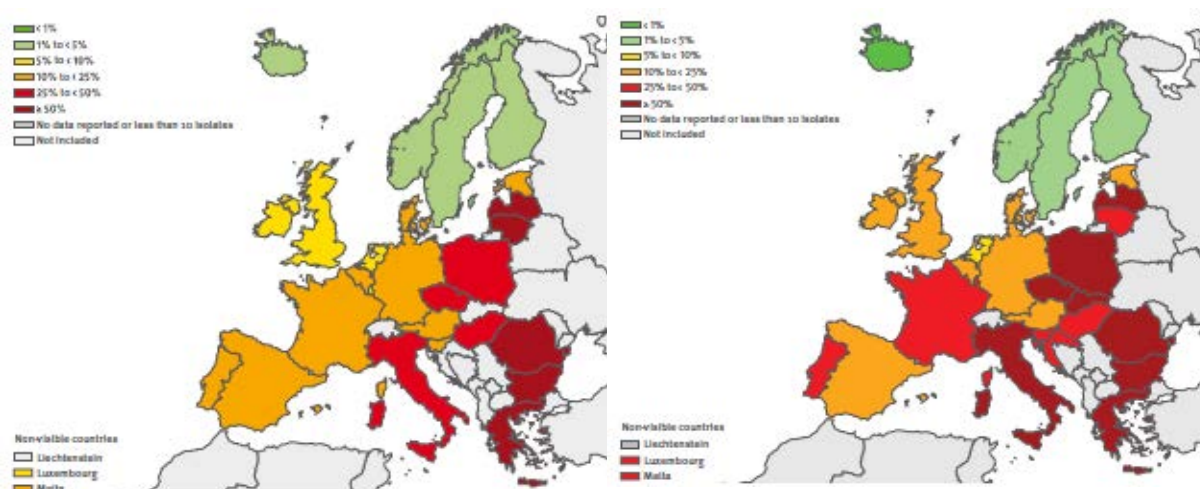


Figure 8 : Pourcentages de *K. pneumoniae* résistantes aux C3G dans les pays de l'UE/AEE en 2010 (à gauche) et 2013 (à droite) (9,65)

En 2013, la France présentait 9,5% de souches d'*E. coli* et 28,0% de souches de *K. pneumoniae* résistantes aux C3G. Pour les pays de l'Union Européenne/Aire Economique Européenne (UE/AEE), les proportions de résistance moyennes montraient une augmentation

significative entre 2010 et 2013 : la résistance aux C3G est passée de 9,5 % à 12,6 % chez *E. coli* et de 22,8 à 30 % chez *K. pneumoniae* (figure 8). Cependant, l'évolution de la résistance aux C3G apparaît plus importante en France que dans les autres pays. Concernant la résistance aux C3G chez *E. coli*, la France est passée de la 6<sup>ème</sup> position en 2008 à la 13<sup>ème</sup> position en 2013 (66).

En 2016, les résultats sont plus encourageants dans la mesure où les proportions de résistance aux C3G (associés aux fluoroquinolones et aminosides) chez *K. pneumoniae* semblent se stabiliser (57).

## VI.2 Le point sur la résistance aux carbapénèmes

Les entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC) sont qualifiées de bactéries hautement résistantes aux antibiotiques et émergentes (BHRe).

En France, une surveillance spécifique a été mise en place afin de suivre l'émergence de ces BHRe (67).

Depuis 2012, une importante augmentation des épisodes à EPC a été observée. Au 4 mars 2015, 1625 épisodes à EPC ont été signalés à l'InVS et concernaient 2836 patients (68). 79,0% des patients étaient uniquement colonisés et ne présentaient donc pas d'infection à EPC. La majorité des patients concernés étaient hospitalisés et/ou ont été hospitalisés à l'étranger.

L'espèce bactérienne la plus fréquemment isolée était *K. pneumoniae* (62,0% des épisodes) et le mécanisme de résistance associé était principalement de type OXA-48 (77,0% des épisodes). En vue de limiter l'émergence et la diffusion de ces BHRe en France, les recommandations associent le dépistage et la mise en place de mesures d'hygiène strictes pour tout patient hospitalisé ou ayant été hospitalisé dans un pays étranger (69).

La résistance aux carbapénèmes chez les entérobactéries reste faible en France (0,1 % pour *E. coli* et 0,7 % pour *K. pneumoniae*) alors qu'elle est déjà supérieure à 5% pour *K. pneumoniae* dans cinq pays du Sud de l'Europe (Malte, Chypre, Roumanie, Italie et Grèce) (69).



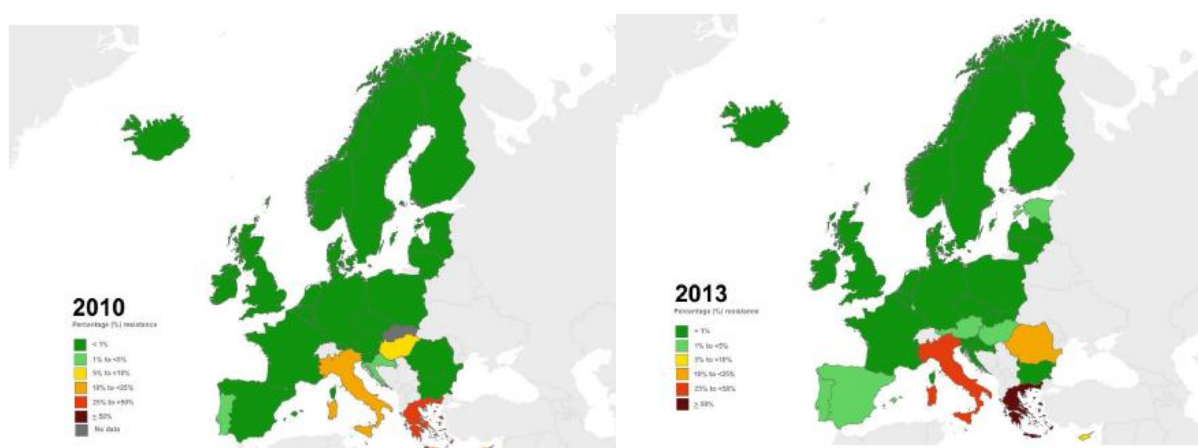


Figure 9 : Pourcentages de *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes dans les pays de l'UE/AEE en 2010 et 2013 (66)

Bien que les pourcentages de résistance aux carbapénèmes soient restés faibles pour la plupart des pays de l'UE/AEE en 2013, la résistance aux carbapénèmes a augmenté de façon significative au sein des pays de l'UE/AEE entre 2010 et 2013 (4,6% en 2010 et 8,3% en 2013). Cette résistance aux carbapénèmes a été plus fréquemment rapportée dans les bactériémies à *K. pneumoniae* dans les pays d'Europe du Sud et du Sud-Est (figure 9). En revanche, entre 2013 et 2016, l'ECDC n'observe pas de différence significative (figure 10).

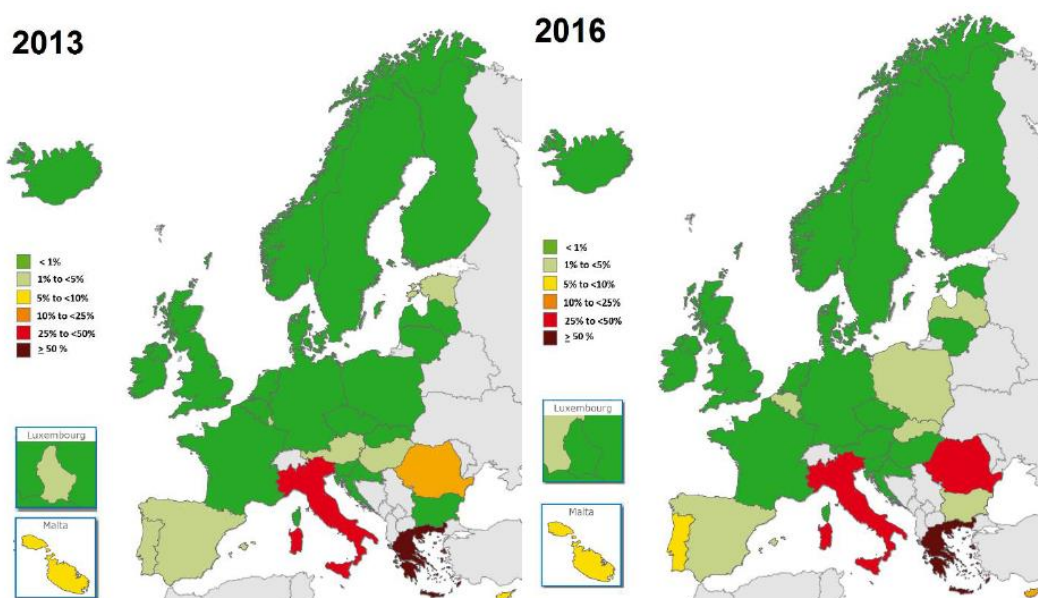


Figure 10 : Pourcentages de *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes dans les pays de l'UE/AEE en 2013 et 2016 (70)

L'absence de nouvelles molécules, jusqu'en 2016, engendraient de nombreuses impasses thérapeutiques, seules quelques molécules étaient susceptibles d'être actives pour le

traitement de ces infections à BMR à Gram négatif (BMR-GN) : la fosfomycine, la tigécycline ou la colistine mais la colistine demeurait l'antibiotique de choix (71).

## Chapitre 2 : La colistine et ses mécanismes de résistance chez *K. pneumoniae*

---

### I. La colistine

#### I.1 Généralités

La colistine appartient à la famille des polymyxines. Cette famille comprend actuellement 2 composés, la polymyxine B et la polymyxine E (aussi appelée colistine). Elles ont été isolées à partir de *Bacillus polymyxa* subsp. *colistinus* en 1947 (72).

La polymyxine B est utilisée en association sous forme de topique (exemple : Cébémixine® collyre et pommade ophtalmique).

La colistine quant à elle, bien que largement utilisée dans les années 1970, est vite tombée en désuétude à cause de ses graves effets indésirables (néphrotoxicité et neurotoxicité) et suite à l'apparition d'une nouvelle famille d'antibiotiques beaucoup moins toxique : les aminosides (72).

Aujourd'hui, en France, la colistine est commercialisée sous forme de colistiméthate sodique (CMS) utilisée par voie parentérale et en aérosol. Il est important de noter que le CMS est la prodrogue de la colistine, et que seule la colistine est la forme active contre les bactéries (72). Elle est utilisée comme antibiotique de dernier recours dans le traitement des infections à BMR-GN. En effet, la lutte contre les résistances bactériennes aux antibiotiques a relancé depuis quelques années l'intérêt pour cette molécule malgré ses effets indésirables.

#### I.2 Structure

La colistine (polymyxine E) est un polypeptide cationique. Il s'agit d'un mélange de plusieurs composés (~ 30) dont les 2 majeurs sont la colistine A (polymyxine E1) et la colistine B (polymyxine E2) (73). Ces 2 composés sont constitués d'un cycle de sept acides aminés, d'une chaîne tripeptidique et d'un acide gras terminal. Les colistines A et B se différencient par leur chaîne d'acide gras en position terminale et leur acide aminé.

#### I.3 Mécanisme d'action de la colistine

Concernant son mode d'action (figure 11), la colistine est un antibiotique bactéricide qui agit au niveau de la paroi des BGN. Cependant le(s) mécanisme(s) exact(s) n'est (ne sont) pas encore élucidé(s). Actuellement chez *K. pneumoniae*, 2 mécanismes d'action ont été mis en évidence.

Grâce à des interactions électrostatiques, la colistine (polypeptide cationique) interagirait avec le LPS (structure anionique) au niveau de la membrane externe des BGN. La colistine entrerait alors en compétition avec les cations divalents : magnésium ( $Mg^{2+}$ ) et calcium ( $Ca^{2+}$ ), entraînant une perturbation locale de la membrane externe de ces bactéries. Cette perturbation se traduirait par une augmentation de la perméabilité, une fuite du contenu cytoplasmique et enfin la mort de la bactérie (74).

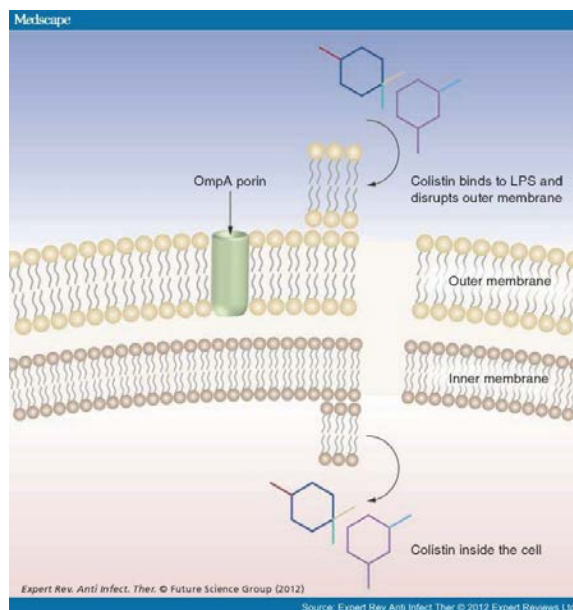


Figure 11 : Mode d'action de la colistine (72)

De plus, une fois au niveau de la membrane interne, la colistine inhiberait la NADH-quinone oxydoréductase (NDH-2), enzyme respiratoire, conduisant également à la mort cellulaire (75). Ce mécanisme constituerait le deuxième mécanisme d'action conduisant à la mort cellulaire.

#### I.4 Spectre d'activité

La colistine est active contre les BGN aérobies, tels que *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella spp.* et *Escherichia coli* (76).

Cependant, certaines espèces expriment une résistance naturelle, comme *Providencia spp.*, *Burkholderia cepacia*, *Proteus spp.*, *Serratia marcescens* et *Neisseria spp.* . En revanche, la colistine est inactive contre les bactéries à Gram positif et les bactéries anaérobies (76).

### **I.5 Indications**

La COLIMYCINE<sup>®</sup> 1 MUI pdre/solv pour solution injectable (colistiméthate sodique) est indiquée chez l'adulte et l'enfant, dont les nouveau-nés, dans le traitement des infections sévères dues à des bactéries aérobies à Gram négatif sensibles. Elle doit être utilisée en dernière intention lorsqu'aucun autre traitement n'est efficace et toujours en association avec un autre antibiotique (77).

D'autre part, la COLIMYCINE<sup>®</sup> poudre pour inhalation, le COLOBREATHE 1 662 500 UI poudre pour inhalation en gélule et le TADIM<sup>®</sup> 1 MUI poudre pour solution pour inhalation pour nébulisation (colistiméthate sodique) sont indiqués chez l'adulte et l'enfant dans la prise en charge des infections pulmonaires chroniques dues à *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose (77).

### **I.6 Mode d'administration**

Le CMS peut être administré soit par voie injectable soit par inhalation. Pour la voie injectable, seule la COLIMYCINE<sup>®</sup> 1 MUI pdre/solv pour solution injectable est commercialisée. Elle est administrée par voie intraveineuse, en perfusion lente pendant 30 à 60 minutes (77).

Les autres spécialités, telles que la COLIMYCINE<sup>®</sup> 1 MUI pdre/solv pour inhalation par nébuliseur, le COLOBREATHE<sup>®</sup> 1 662 500 UI poudre pour inhalation en gélule, et le TADIM<sup>®</sup> 1 MUI poudre pour solution pour inhalation pour nébulisation, sont utilisées par voie inhalée (77).

L'administration du CMS par voie intrathécale ou intraventriculaire peut être envisagée en cas de méningite, mais il existe très peu de données relatives à l'utilisation de la colistine par ces 2 voies (73).

### **I.7 Posologies**

Pour la forme injectable, chez l'adulte et l'adolescent, la dose d'entretien est de 9 MUI par jour répartis en 2 à 3 doses. Chez les patients présentant un état sévère, une dose de charge de 9 MUI peut être administrée. Cependant l'administration d'une dose de charge est une pratique récente. En effet, depuis quelques années, le nombre d'études relatives aux paramètres pharmacocinétiques de la colistine a considérablement augmenté. Plusieurs

auteurs ont montré que l'administration intraveineuse de colistine pouvait conduire à des concentrations plasmatiques suboptimales, pouvant entraîner à la fois le développement de mécanismes de résistance et une mortalité accrue. Par conséquent, ces auteurs recommandent l'administration d'une dose de charge afin d'atteindre plus rapidement l'état d'équilibre. Plachouras et coll. ont démontré chez 18 patients hospitalisés, recevant 3 MUI de CMS toutes les 8 heures, que la concentration plasmatique de colistine était suboptimale pendant 2 à 3 jours avant d'atteindre l'état d'équilibre (2,3 mg/L). A l'issue de leur étude, les auteurs recommandent donc l'administration d'une dose de charge de 9 MUI et des interdosages de 4,5 MUI toutes les 12h, dans la mesure où la demi-vie observée de la colistine est considérablement augmentée chez les patients de réanimation comparée aux patients mucoviscidosiques (78). De même, Mohamed et coll. recommandent également une dose de charge de 6 à 9 MUI pour les patients de réanimation (79). En 2014, l'Agence Européenne des Médicaments statue et recommande l'administration d'une dose de charge de 9 MUI de CMS, avec une dose journalière de 9 MUI de CMS répartie en 2 ou 3 administrations, pour les patients hospitalisés en réanimation avec une fonction rénale normale (80).

Les posologies pour les voies intrathécale et inhalée ne seront pas détaillées dans cette thèse.

### I.7.1 Unités

En Europe, la dose de colistine est exprimée en unités internationales (UI) de CMS, alors qu'aux Etats-Unis, les doses sont exprimées en mg d'activité de colistine base. Selon l'European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA), une UI correspond à la concentration minimale qui inhibe la croissance d'*Escherichia coli* 95 I.S.M dans 1 mL de bouillon à pH 7,2 (71). Un million d'UI de colistiméthate sodique correspond à 80 mg de colistiméthate sodique et à 30 mg de colistine base (81).

## I.8 Pharmacocinétique

Les profils pharmacocinétiques du CMS et de la colistine sont incomplètement élucidés. Les premières études ont été réalisées à l'aide de dosage microbiologique. Cependant, ces méthodes permettent de mesurer le pouvoir antibactérien d'un échantillon biologique sans distinguer l'activité de la molécule mère de celle de ses métabolites. Par conséquent, ces

méthodes ne constituent pas une méthode fiable et reproductible de mesure. Récemment, de nouveaux dosages réalisés par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) ont permis d'obtenir des valeurs fiables et reproductibles améliorant ainsi les connaissances pharmacocinétiques de ces 2 molécules (77).

### **I.8.1 Métabolisme**

Le CMS est la prodrogue inactive de la colistine. Après injection du CMS, la prodrogue est transformée en colistine active (77).

### **I.8.2 Distribution**

Le volume de distribution de la colistine chez les sujets sains est faible et correspond approximativement au liquide extracellulaire. D'autre part, la liaison aux protéines est modérée et diminue en présence de concentrations plus élevées. Le CMS et la colistine suivent une pharmacocinétique linéaire dans l'intervalle de doses cliniquement pertinentes (77).

### **I.8.3 Élimination**

Environ 30 % du CMS sont transformés en colistine chez les sujets sains. Sa clairance dépend de la clairance de la créatinine et quand la fonction rénale diminue, une plus grande partie du CMS est transformée en colistine. Chez les patients présentant une insuffisance rénale sévère (clairance de la créatinine < 30 mL/min), la transformation pourrait atteindre 60 à 70%. Le CMS est éliminé principalement par les reins par filtration glomérulaire. Chez les sujets sains, 60 à 70% du CMS est excrété sous forme inchangée dans les urines en 24 heures (figure 12).

L'élimination de la colistine active n'est pas entièrement caractérisée. La colistine subit une réabsorption tubulaire rénale importante et peut soit être éliminée par voie non rénale soit subir un métabolisme rénal avec une potentielle accumulation rénale. La clairance de la colistine diminue en cas d'insuffisance rénale, possiblement due à une augmentation de la transformation du CMS.

La demi-vie de la colistine chez des sujets sains et chez ceux atteints de mucoviscidose est évaluée, respectivement, à 3 h et 4 h, alors que chez les patients présentant un état inflammatoire sévère, la demi-vie est prolongée et est évaluée à 9-18 h (77).

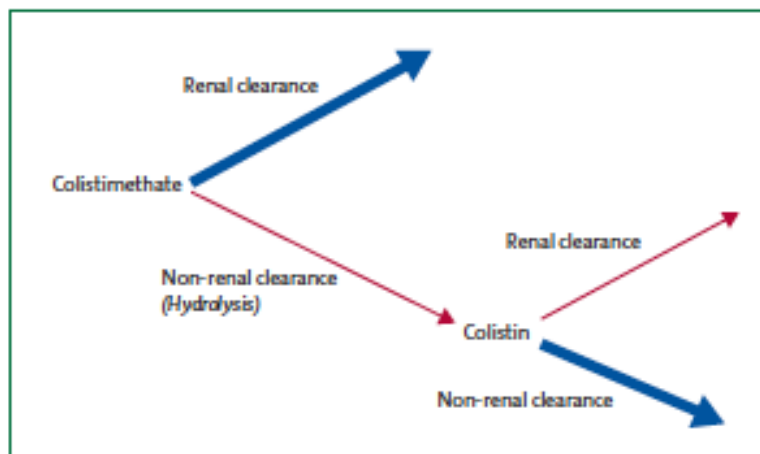


Figure 12 : Représentation schématique de la clairance du colistiméthate sodique après son administration (74)

## I.9 Effets indésirables

### I.9.1 Néphrotoxicité

Lors de la mise sur le marché de la colistine, les études rapportaient une incidence élevée de néphrotoxicité (82). Cependant, de récentes études indiquent que l'incidence de la néphrotoxicité serait moins élevée que prévue. Cette baisse d'incidence serait due, à une plus grande pureté du CMS commercialisé, à un meilleur monitoring dans les unités de soins intensifs, et à l'absence le plus possible d'administrations concomitantes de molécules néphrotoxiques (71).

De plus, une étude récente réalisée chez les patients mucoviscidosiques suggère que le CMS est moins néphrotoxique que les aminosides (83).

Des études plus récentes soulignent le caractère précoce et réversible de cet effet indésirable. En effet, la néphrotoxicité survient en général dans les premières semaines de traitement et est réversible dans 88% des cas (71). Les facteurs de risque de néphrotoxicité sont la dose journalière, la durée de traitement (dose cumulative), l'âge, une insuffisance rénale préexistante et l'administration concomitante de médicaments néphrotoxiques (71).



### I.9.2 Neurotoxicité

La neurotoxicité est moins fréquente que la néphrotoxicité (71). Les manifestations cliniques se caractérisent par une surdité partielle, des vertiges, des troubles visuels, une confusion, des paresthésies et une faiblesse musculaire pouvant conduire à une détresse respiratoire (83). Les paresthésies sont l'effet indésirable le plus fréquent. Elles représentent 27% des effets indésirables lors de l'administration intraveineuse de CMS. Cependant cet effet est résolutif après l'arrêt du traitement (84).

### I.9.3 Réactions allergiques

Les réactions d'hypersensibilité sont très rares et se caractérisent principalement par des manifestations cutanées (rashes cutanés, démangeaisons, et urticaire). Des bronchospasmes et des pneumonies d'hypersensibilité ont également été décrits (71).

## II. Mécanismes de résistance acquise à la colistine chez *Klebsiella pneumoniae*

### II.1 Modification du lipopolysaccharide par addition d'un groupement phosphoéthanolamine (pEtN) et/ ou 4-amino-4-déoxy-L-arabinose (L-Ara4N)

Chez *K. pneumoniae*, comme chez *E. coli*, l'ajout de groupements cationiques tels que le groupement 4-amino-4-déoxy-L-arabinose (L-Ara4N) et/ou le groupement phosphoéthanolamine (pEtN), au niveau du lipide A est à l'origine de l'acquisition de la résistance à la colistine. Plusieurs gènes et opérons sont impliqués dans cette modification (85).

Le gène *pmrC*, et l'opéron *arnBCADTEF* (également appelé *pmrHFIJKLM*) codent des enzymes directement impliquées dans la modification du LPS entraînant la synthèse et/ou l'ajout de groupements cationiques. Ces derniers sont sous le contrôle de 2 systèmes à 2 composants **PmrA/PmrB** et **PhoP/PhoQ**, qui sont à leur tour sous le contrôle de 2 gènes *mgrB* et *pmrD* (figure 13).

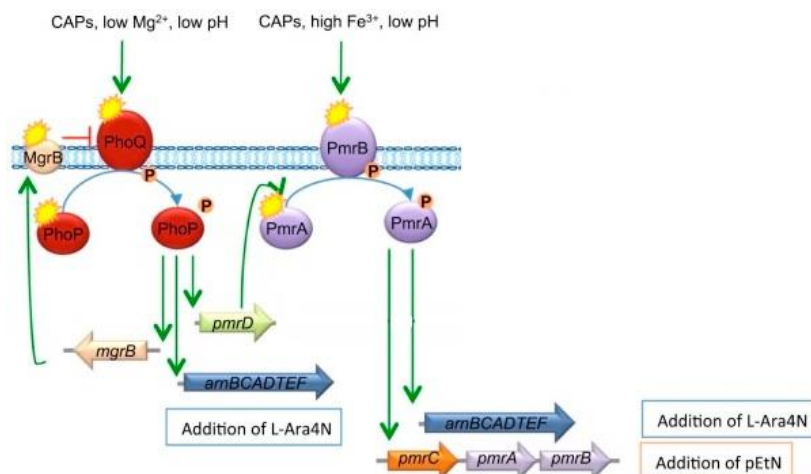


Figure 13 : Représentation des mécanismes impliqués dans la résistance à la colistine d'après Jeannot et coll. (85)

Le trait rouge représente une répression et les flèches vertes une activation.

Les astérisques jaunes indiquent que si un ou plusieurs éléments sont altérés cela peut induire une activation constitutive des 2 systèmes à 2 composants (PmrAB et PhoPQ).

## II.1.1 Gènes codant pour les enzymes modifiant le LPS

### II.1.1.1 Gène *pmrC*

Le gène *pmrC* est situé sur l'opéron *pmrCAB*. Cet opéron code 3 protéines, une phosphoéthanolamine phosphotransférase PmrC, une protéine régulatrice PmrA et une protéine kinase sensor PmrB (86). L'aminotransférase PmrC transcrite de *pmrC*, premier gène de l'opéron *pmrCAB*, entraîne l'addition d'un groupement phosphoéthanolamine (pEtN) sur le lipide A et sur le core du LPS.

### II.1.1.2 Opéron *arnBCADTEF*

L'opéron *arnBCADTEF* code 7 protéines (87) dont le rôle majeur est de synthétiser le groupement L-Ara4N et de le transférer sur le LPS.

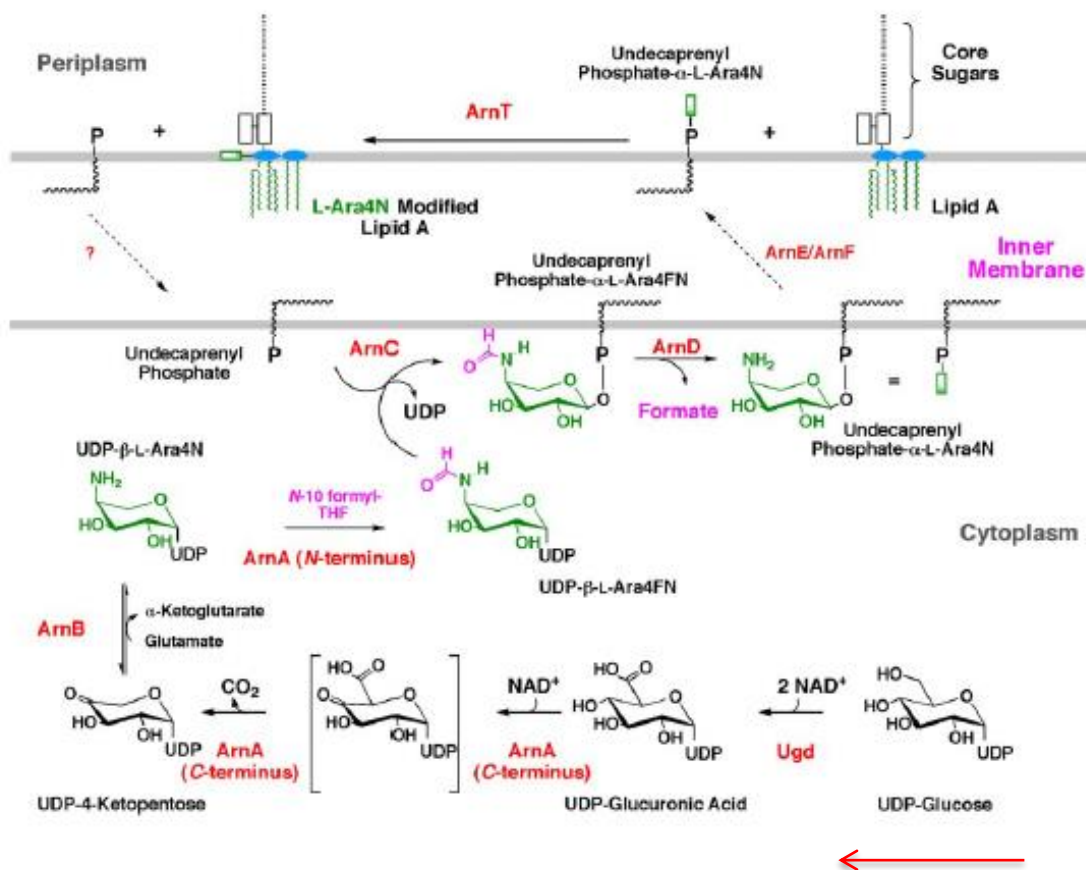


Figure 14 : Synthèse et transfert du groupement L-Ara4N sur le lipide A chez *Salmonella spp.* (87)

Chez *Salmonella spp.* (figure 14), l'UDP-glucose est transformé en UDP-acide glucuronique (UDP-GlcA) par la déshydrogénase PmrE codée par le gène *pmrE*. L'UDP-GlcA est ensuite transformé en UDP-4-ketopentose par la décarboxylase ArnA puis en UDP-β-L-Ara4N par la transaminase ArnB. L'UDP-β-L-Ara4N est ensuite formylé en UDP-β-L-Ara4FN par ArnA permettant ainsi son transfert au niveau de la membrane interne de la bactérie par ArnC puis après déformylation par ArnD, le L-Ara4N est transféré au niveau de la membrane externe par ArnE et ArnF. Enfin, ArnT transfère le groupement L-Ara4N sur le lipide A (87).

L'ajout de ce(s) groupement(s) sur le LPS entraîne une diminution de la charge négative en masquant les groupements phosphates du LPS. Cette diminution de charge affecte les interactions électrostatiques de la colistine avec la surface bactérienne empêchant ainsi sa fixation.

### II.1.2 Deux systèmes à deux composants : PmrA/PmrB et PhoP/PhoQ

La synthèse des groupements L-Ara4N et pEtN est médiée par des systèmes à 2 composants PmrA/PmrB et PhoP/PhoQ (figure 15).

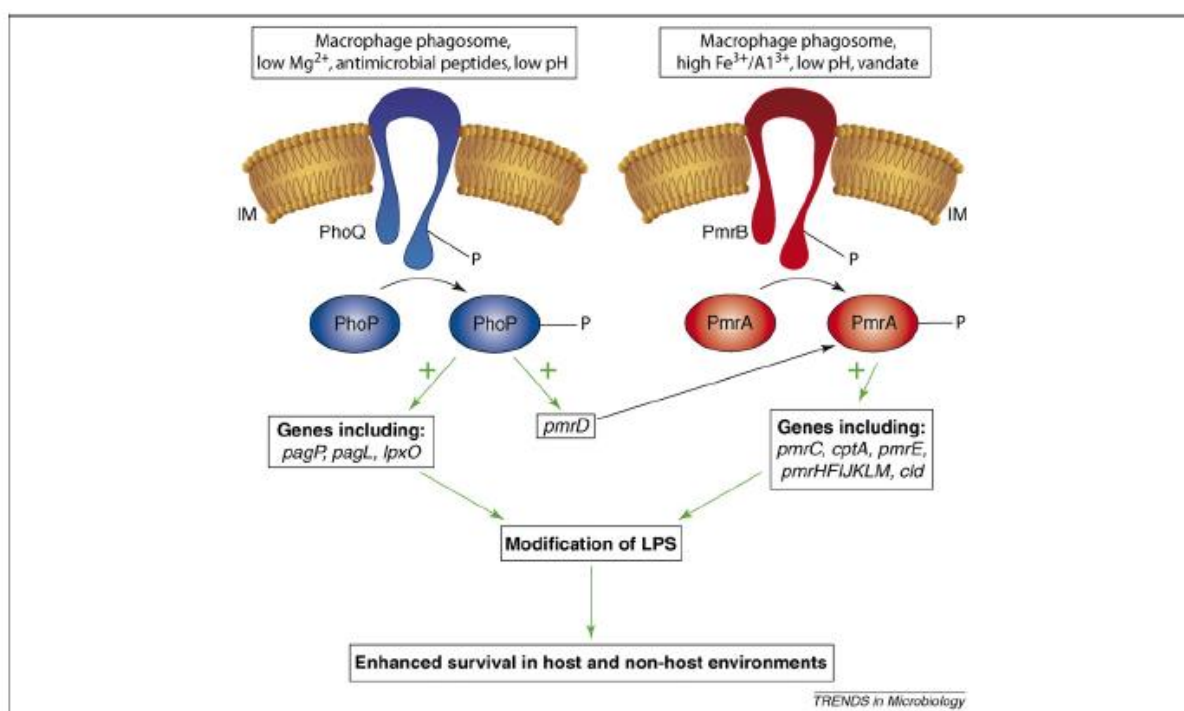


Figure 15 : Activation et interaction des 2 systèmes à 2 composants chez *Salmonella* spp. (86)

#### II.1.2.1 PmrA/PmrB

PmrB est une protéine à activité histidine kinase. Une concentration périplasmique élevée en  $Fe^{3+}$  (i.e., 100  $\mu M$ ) (88) ou  $Al^{3+}$  (i.e., 100  $\mu M$ ) (88) ainsi qu'un pH acide (i.e., pH 5,8) (88) peuvent entraîner l'activation de la protéine sensor PmrB. Chez *S. typhimurium*, en réponse à ces signaux, PmrB s'autophosphoryle puis transfère ce groupement phosphorylé sur le résidu aspartate de la protéine régulatrice PmrA. PmrA une fois activée, active à son tour la transcription du gène *pmrC*, du gène *cptA*, du gène *pmrE* et de l'opéron *arnBCADTEF* (également appelé *pmrHFIJKLM*) ayant pour conséquence une modification du LPS (86).

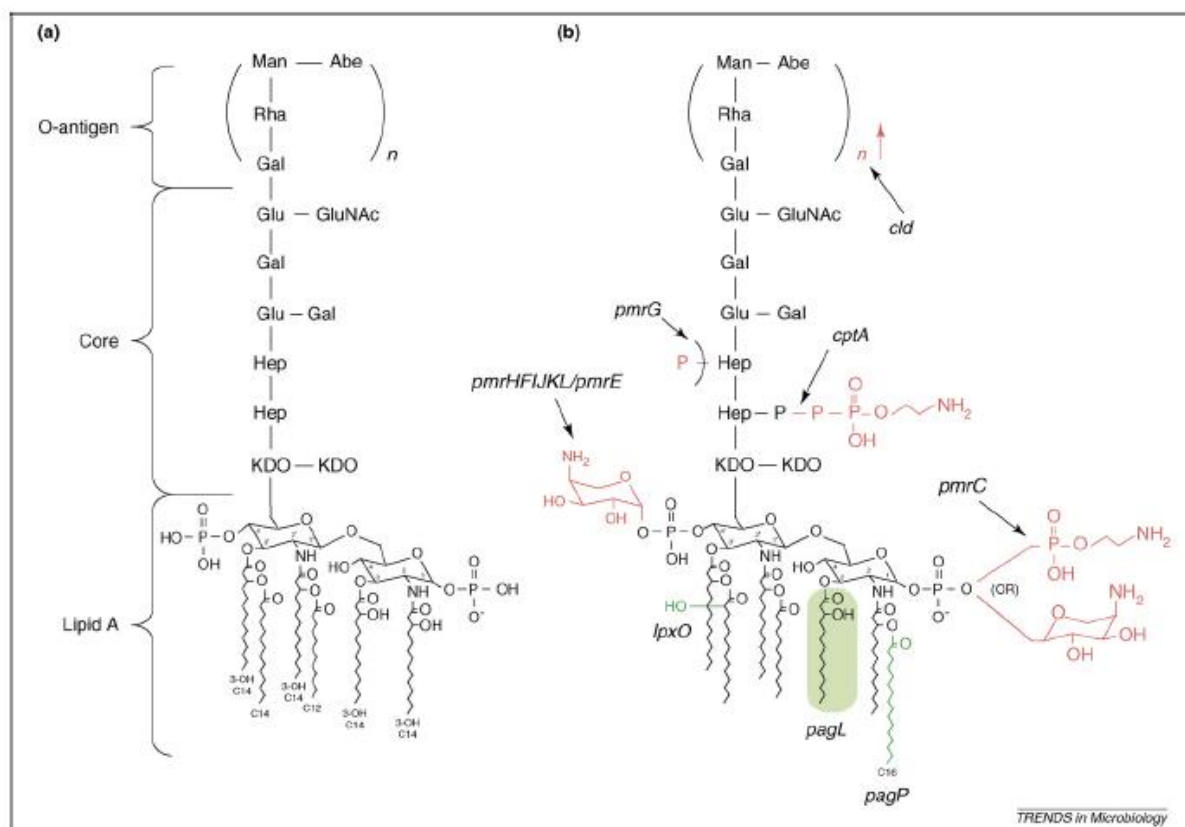


Figure 16 : Représentation du LPS modifié par l'ajout de groupements L-Ara4N et pEtN chez *S. typhimurium* (86)

Les gènes *pmrC* et *cptA* participent à l'addition du groupement pEtN sur le LPS. Cependant, le gène *pmrC* entraîne l'ajout du groupement sur le lipide A, alors que le gène *cptA* entraîne l'ajout de ce groupement sur le core du LPS (figure 16) (86).

Quant au gène *pmrE* et à l'opéron *arnBCADTEF*, ils entraînent l'addition du groupement L-Ara4N sur le lipide A (figure 16) (86).

### II.1.2.2 PhoP/PhoQ

PhoQ est une protéine à activité tyrosine kinase qui possède un résidu histidine au niveau de son domaine cytoplasmique. Une faible concentration en  $Mg^{2+}$  (i.e., 10  $\mu M$ ) (88) ou un pH acide entraîne l'activation de la protéine PhoQ. En réponse à ces signaux, PhoQ s'autophosphoryle et va phosphoryler la protéine PhoP. Une fois activée, PhoP activera à son tour PmrA, qui entraînera la transcription de l'opéron *arnBCADTEF* (*pbgP*) (figure 17) (89).

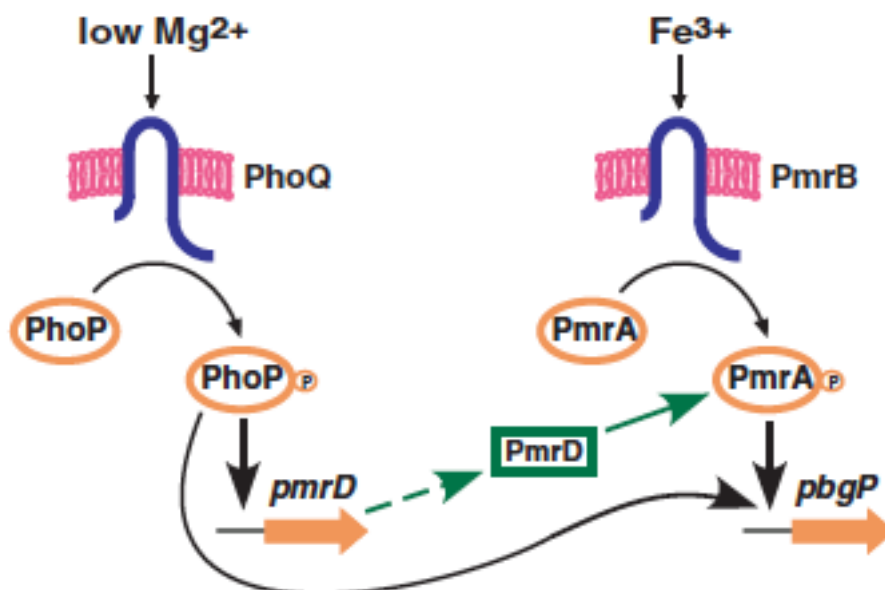


Figure 17 : Activation de l'opéron *arnBCADTEF* chez *Klebsiella pneumoniae* (89)

Chez *K. pneumoniae*, la transcription de l'opéron *arnBCADTEF* peut être déclenchée de 2 manières ;

- **directement** par liaison de la protéine PhoP au promoteur de l'opéron *arnBCADTEF* (*pbgP*) ou,
- **indirectement** par l'intermédiaire de la protéine PmrD.

En présence d'une concentration périplasmique élevée en  $Fe^{3+}$  (i.e., 100  $\mu M$ ) (88), la transcription de l'opéron *arnBCADTEF* est directement activée par le système PmrA/PmrB.

## II.1.3 Gènes régulateurs des 2 systèmes à 2 composants

### II.1.3.1 Gène *pmrD*

Le gène *pmrD* joue un rôle important dans le mécanisme de résistance à la colistine chez *K. pneumoniae*.

En effet, la protéine PmrD va se lier à la forme phosphorylée de PmrA, la protégeant de la déphosphorylation. Cette liaison va engendrer le maintien de son activation et favoriser la transcription de l'opéron *arnBCADTEF* (*pbgP*) ayant pour conséquence une modification du LPS (89).

### II.1.3.2 Gène *mgrB*

Le gène *mgrB* est un gène récemment mis en évidence dans le mécanisme de résistance acquis à la colistine. Chez *K. pneumoniae*, *mgrB* est un gène codant une protéine transmembranaire de 47 acides aminés, exerçant un rétrocontrôle négatif sur le système à 2 composants PhoP/PhoQ.

Lippa et Goulian ont suggéré que *mgrB* exerçait ce rétrocontrôle en inhibant l'activité kinase de PhoQ et/ou en stimulant son activité phosphatase, ce qui supprimerait par la suite la phosphorylation de PhoP, entraînant la répression des gènes régulés par PhoP (90). Ces mêmes auteurs ont montré que la délétion de *mgrB* chez *E. coli* entraînait une régulation positive des gènes régulés par PhoP, corroborant ainsi l'hypothèse émise concernant le rôle de *mgrB* dans l'acquisition du mécanisme de résistance à la colistine (90).

Chez *K. pneumoniae*, de nombreuses mutations du gène *mgrB* ont été mises en évidence, telles que des insertions inactivatrices (IS5-like element etc.), des mutations non-sens conduisant à la synthèse d'une protéine transmembranaire non mature et des mutations non-sens entraînant des substitutions d'acides aminés (91,92). L'inactivation de *mgrB* entraîne une régulation positive de l'opéron *arnBCADTEF*, ayant pour conséquence l'addition du groupement L-Ara4N sur le LPS. La régulation positive de l'opéron *arnBCADTEF* est attribuée à la forme phosphorylée de PmrA, qui est activée et protégée de la déphosphorylation par PmrD, qui est à son tour activée par la forme phosphorylée de PhoP résultant de l'inactivation de *mgrB* (85).

## II.1.4 Autres mécanismes modifiant le lipopolysaccharide

### II.1.4.1 RamA

Récemment, un régulateur transcriptionnel global, RamA, ainsi que son rôle dans la résistance à la colistine ont été mis en évidence. En effet, RamA peut modifier l'expression de plus de 68 gènes, dont *lpxC*, *lpxL* et *lpxO* (gènes impliqués dans la synthèse du lipide A) entraînant une diminution de la sensibilité à la colistine. Ce régulateur est présent chez certaines *Enterobacteriaceae* telles que *K. pneumoniae*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.* et *Salmonella spp.* (93).

#### II.1.4.2 CrrAB

De même, un nouveau système à deux composants également impliqué dans la résistance à la colistine a été identifié chez *K. pneumoniae* : *crrAB*, où *crrB* est l'histidine kinase et *crrA* le régulateur réponse. Il a été montré qu'une mutation de ce système entraînerait la surexpression de *pmrCAB* via l'intermédiaire de la protéine CrrC (94).

#### II.1.4.3 Sous acylation du lipide A et son effet sur la résistance à la colistine

Chez *K. pneumoniae*, le gène *lpxM* code une enzyme impliquée dans l'addition d'un groupement myristoylé sur le lipide A, entraînant la formation d'un lipide A hexa-acylé.

Chez des mutants *lpxM* produisant de façon prédominante un lipide A penta-acylé, il a été observé des souches 8 à 16 fois plus sensibles aux polymyxines comparées aux souches sauvages (95). De plus, Velkov et coll. ont montré qu'un mutant *lpxM* présentait une plus forte affinité vis à vis des polymyxines comparé à une souche sauvage (96).

De manière générale, il a été signalé que la sous-acylation jouait un rôle important dans la résistance aux polymyxines chez *K. pneumoniae*. Ceci étant probablement dû à l'incapacité de *K. pneumoniae* (mutant *lpxM*) à additionner le groupement L-Ara4N sur le lipide A, comme cela a été observé chez d'autres bactéries entériques (97).

Des hypothèses ont été proposées alternativement concernant la sensibilité accrue des souches de *K. pneumoniae* sous-acylées. Il semblerait que les souches mutantes permettraient une insertion accrue des têtes polaires ou des queues d'acides gras des polymyxines dans la membrane externe des bactéries, favorisant ainsi la liaison du lipide A à ces antibiotiques (95,96).

#### II.1.5 Modifications de la capsule

Dans le(s) mécanisme(s) de résistance à la colistine chez *K. pneumoniae*, les polysaccharides capsulaires jouent un rôle de barrière protectrice en limitant les interactions polymyxines – LPS. Actuellement, deux mécanismes principaux ont été mis en évidence, la libération et l'hyperproduction des polysaccharides capsulaires.

En effet, Llobet et coll. ont montré que *K. pneumoniae* était en mesure de libérer des polysaccharides capsulaires de sa surface. Une fois libérés, ces polysaccharides capsulaires



pouvaient se lier aux polymyxines, réduisant ainsi la quantité de médicament atteignant les LPS (98).

Campos et coll. ont mis en évidence que les polysaccharides capsulaires jouaient un rôle direct dans le mécanisme de résistance, en réduisant leurs interactions avec la paroi bactérienne. Cependant, la quantité de polysaccharides capsulaires doit atteindre une valeur seuil afin de conférer une résistance aux polymyxines (99).

### **II.1.6 Système d'efflux**

Récemment, un système d'efflux, dénommé KpnEF, impliqué dans la résistance à la colistine a été mis en évidence. En effet, lors d'expérimentations, il a été montré qu'une mutation de ce système d'efflux entraînait une restauration de la sensibilité des souches bactériennes à la colistine (100).

## Chapitre 3 : Traitement des infections à *K. pneumoniae* MDR résistante à la colistine

---

Aujourd'hui, dans les pays industrialisés, l'usage massif et inapproprié des antibiotiques a contribué au développement de mécanismes de résistance bactérienne (101). Dans la pratique hospitalière, l'augmentation de la résistance aux antibiotiques se traduit par une augmentation de la morbi-mortalité, l'apparition de BMR et par une augmentation des coûts (102). De plus, le nombre de nouvelles molécules mises sur le marché est très faible, conduisant à un appauvrissement progressif de l'arsenal thérapeutique et à de potentielles impasses thérapeutiques (101,103). Il existe en particulier un manque de nouveaux antibiotiques dirigés contre les BMR-GN (104). Ce manque de nouvelles molécules commercialisées a poussé les scientifiques à se pencher sur les combinaisons d'antibiotiques.

### I. Épidémiologie de la résistance à la colistine

En France, la colistine est classée parmi les antibiotiques dits de « dernier recours » (105).

Au niveau Européen, les données relatives à la résistance aux polymyxines ont été recueillies pour la première fois en 2013. Les résultats doivent être interprétés avec prudence en raison du faible nombre d'isolats testés et des différences de méthodes utilisées dans les différents laboratoires. La résistance aux polymyxines est un réel signal d'alerte. Les options thérapeutiques sont de plus en plus limitées, en particulier dans les pays où le pourcentage d'isolats résistants aux carbapénèmes est déjà élevé.

D'après le rapport de l'ECDC, la résistance aux polymyxines est particulièrement préoccupante chez 3 bactéries à Gram négatif (*K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter spp.*) (9).

Pour *K. pneumoniae*, seulement 26,4% des isolats avaient des résultats concernant la sensibilité aux polymyxines. Globalement, 8,8% des isolats de *K. pneumoniae* étaient résistants aux polymyxines. La majorité de ces isolats provenaient d'Europe du Sud et du Sud-Est (Grèce, Italie, Roumanie et Hongrie). Parmi les isolats résistants aux carbapénèmes, 32,0% étaient résistants aux polymyxines, alors que seulement 3,0% des isolats sensibles aux carbapénèmes étaient résistants aux polymyxines.

Concernant la résistance aux polymyxines chez *Pseudomonas aeruginosa*, 19 pays ont communiqué des données relatives à la sensibilité aux polymyxines, un total de 4742 isolats soit 39,0% des isolats de *Pseudomonas aeruginosa* en 2013. Au total, 1,0% des isolats de *Pseudomonas aeruginosa* étaient résistants aux polymyxines.

Concernant la résistance aux polymyxines chez *Acinetobacter spp.*, 17 pays ont communiqué des données relatives à la sensibilité aux polymyxines, représentant un total de 2217 isolats soit 52% des isolats d'*Acinetobacter spp.* en 2013. Au total, 5,0% des isolats étaient résistants aux polymyxines. Plus de 80,0% des isolats résistants aux polymyxines provenaient de l'Europe du Sud (Grèce et Italie) (9).

## II. Associations antibiotiques

Une étude rétrospective des publications relatives aux combinaisons antibiotiques a été réalisée, sur une période de 5 ans, entre le 1<sup>er</sup> janvier 2009 et le 31 décembre 2013.

Le recueil de données a été réalisé à l'aide de la base de données PubMed, incluant pour chaque étude, le nombre de souches testées, le profil de résistance des souches vis à vis des  $\beta$ -lactamines (carbapénémase, BLSE, céphalosporinase) et des polymyxines, les antibiotiques testés et la (ou les) méthode(s) utilisées *in vitro*. Toutes les publications relatives aux associations antibiotiques testées, *in vitro*, chez *K. pneumoniae* ont été incluses. Cependant, les études réalisées dans un autre milieu que le Mueller Hinton Bouillon – Cations Ajustés (MHB-CA) ont été exclues.

Les mots clés utilisés sont : (((in vitro OR in vitro activity OR in vitro combination antibiotic OR in vitro association antibiotic OR in vitro antibiotic combinations OR synergy OR antimicrobial combinations OR multi-agent combinations OR combination)) AND (polymyxin resistant enterobacteriaceae OR polymyxin-resistant enterobacteriaceae OR multidrug resistant enterobacteriaceae OR multidrug-resistant enterobacteriaceae OR beta lactamase-producing enterobacteriaceae OR carbapenemase-producing enterobacteriaceae OR KPC-producing enterobacteriaceae OR KPC-2-producing enterobacteriaceae OR metallo beta lactamase-producing enterobacteriaceae OR polymyxin resistant klebsiella OR polymyxin-resistant klebsiella OR multidrug resistant klebsiella OR multidrug-resistant klebsiella OR beta lactamase-producing klebsiella OR carbapenemase-producing klebsiella OR KPC-producing klebsiella OR KPC-2-producing klebsiella OR metallo beta lactamase-producing

klebsiella)) AND (time kill OR time-kill OR checkerboard OR chequerboard OR Etest OR E-test OR microdilution OR micro-dilution OR agar dilution OR bactericidal activities) Filters: 5 years, English

Concernant l'interprétation des résultats, nous nous sommes basés sur les instructions aux auteurs de l'Antimicrobial Agents and Chemotherapy (AAC) 2014. Pour la technique de l'échiquier, la synergie (SYN) est définie par un index de FIC inférieur ou égal à 0,5, alors que pour la technique du Time-kill Assay (TKA), la synergie est définie par une diminution supérieure ou égale à 2 log<sub>10</sub> en termes d'UFC/mL comparée à l'antibiotique le plus actif. L'antagonisme (ANT) est défini par un index de FIC supérieur ou égal à 4 pour la technique de l'échiquier et pour la technique du TKA, il se définit par une croissance supérieure ou égale à 2 log<sub>10</sub> en termes d'UFC/mL comparée à l'antibiotique le plus actif.

Tableau I : Tableau récapitulatif des articles évaluant les combinaisons antibiotiques chez  
*K. pneumoniae*

Références	Polymyxines	Carbapénèmes (CAR)	Nb d'isolats	Profil de Résistance		Technique utilisée	Evaluation
				CAR	Polymyxines		
Souli et al., 2009 (106)	CST	IPM	42	R	R, S	TKA	B
Vidaillac et al., 2009 (107)	Ø	MEM	10	S	Ø	TKA	B
Elemam et al., 2010 (108)	PMB	IPM	12	R	R	Echiquier	FICI
Urban et al., 2010 (109)	PMB	DORI	5	R, S	S	TKA	B
Pournaras et al., 2011 (110)	CST	MEM	4	R	S	TKA	B
Souli et al., 2011 (111)	CST	MEM	17	R	R, S	TKA	B
Yim et al., 2011 (112)	Ø	IPM	28	S	Ø	TKA	B
Pankey et al., 2011 (113)	PMB	MEM	14	R	R, S	TKA, Etest	B, FICI
Le et al., 2011 (114)	Ø	ETP, IPM, MEM	4	R	Ø	TKA	B
Jernigan et al., 2012 (115)	CST	DORI	12	R	R, S	TKA	B
Vidaillac et al., 2012 (116)	CST	Ø	4	S	R, S	TKA + Echiquier	B, FICI
Samonis et al., 2012 (117)	CST	IPM, MEM, DORI	65	R, S	R, S	Etest	FICI
Hong et al., 2013 (118)	CST	DORI, ETP	12	R	R, S	TKA	B
Lee et al., 2013 (119)	CST, PMB	DORI	4	R	S	TKA	B
Lingscheid et al., 2013 (120)	Ø	DORI	5	S	Ø	TKA + Echiquier	B, FICI
Clancy et al., 2013 (121)	CST	DORI	23	R	R, S	TKA	B
Pankey et al., 2013 (122)	PMB	MEM	26	R	R, S	TKA + Etest	B
Nastro et al., 2013 (123)	CST	Ø	27	R	R	TKA + Etest	B, FICI
Hickman et al., 2013 (124)	Ø	Ø	1	S	Ø	TKA + Echiquier + autre	B, FICI
Tascini et al., 2013 (125)	CST	MEM, IPM	13	R	R	Echiquier	FICI
Evren et al., 2013 (126)	CST	MEM, IPM	12	R	R, S	Echiquier	FICI
Clock et al., 2013 (127)	PMB	DORI	48	R	R, S	Echiquier	FICI
Berçot et al., 2013 (128)	CST	Ø	3	R	S	Echiquier	FICI

CST, colistine ; PMB, polymyxine B, DORI, doripénème, ETP, ertapénème, MEM, méropénème ; IPM, imipénème ; R, résistant ; S, sensible ; TKA, time-kill assay ; FICI, index de FIC ; B, bactéricidie.

A l'issue de notre recherche, 23 articles ont été inclus, correspondant à 391 souches de *Klebsiella pneumoniae* (tableau I). Parmi ces souches, 83,4% (326/391) possèdent une carbapénémase, 15,3% (60/391) une BLSE et 1,3% (5/391) une céphalosporinase (129). Le

profil de résistance vis à vis des polymyxines a été déterminé (colistine (CST) ou polymyxine B (PMB)) dans 73,9% (17/23) des articles, correspondant à 230 souches de *K. pneumoniae* (2 articles ont été exclus). Parmi ces articles, 68,75% (11/16) traite de la colistine, 25,0% (4/16) de la polymyxine B et 6,25% (1/16) des 2. Parmi ces 230 souches de *K. pneumoniae*, 53,5% (123/230) sont résistantes aux polymyxines et 46,5% (107/230) sont sensibles.

D'autre part, parmi cette sélection d'articles, trois méthodes ont été utilisées pour évaluer le potentiel de synergie des combinaisons antibiotiques : le TKA, la méthode de l'échiquier et la méthode Etest<sup>®</sup> représentant respectivement 47,9% (11/23), 21,7% (5/23) et 4,3% (1/23). Dans 26,1% (6/23) des études, 2 méthodes ou plus (TKA+ méthode Etest<sup>®</sup>, TKA + méthode de l'échiquier etc.) ont été associées afin d'évaluer le potentiel de synergie des combinaisons.

## **II.1 Associations antibiotiques utilisées en fonction du profil de résistance des souches de *K. pneumoniae* vis à vis des $\beta$ -lactamines**

### **II.1.1 Souches de *K. pneumoniae* productrices de carbapénémase**

Concernant les associations antibiotiques, 326 ont été testées sur 391 souches de *K. pneumoniae* productrices de carbapénémase. Les associations à base de polymyxines ou de carbapénèmes représentent respectivement 58,2% (39/67) et 58,2% (39/67) des associations antibiotiques et l'association carbapénèmes-polymyxines représente 25,4% (17/67) des associations.

Parmi les associations avec les polymyxines, 3 associations se sont révélées les plus synergiques,

- polymyxine + rifampicine (83,3% SYN, 16,7% IND, 0% ANT),
- colistine + doripénème + ertapénème (75,0% SYN, 25,0% IND) et,
- polymyxine + tigécycline (65,6% SYN, 34,4% IND, 0% ANT).

Pour les associations avec les carbapénèmes, les 3 plus synergiques sont,

- méropénème + amikacine (100,0% SYN),
- imipénème + amikacine (100,0% SYN) et,
- colistine + doripénème + ertapénème (75,0% SYN, 25,0% IND).

### II.1.2 Souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE

Concernant les 60 souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE, 23 associations antibiotiques ont été testées. Les différentes associations antibiotiques testées étaient composées de fosfomycine (43,5%, 10/23), ceftaroline (30,4%, 7/23), tigécycline (21,7%, 5/23), colistine (17,4%, 4/23). Les associations les plus efficaces sont les associations à base de fosfomycine ou de ceftaroline.

Parmi les associations avec la fosfomycine, 3 se sont révélées efficaces,

- fosfomycine + aztréonam (100,0% SYN)
- fosfomycine + mécillinam (100,0% SYN) et,
- fosfomycine + mécillinam + aztréonam (100,0% SYN).

Parmi les associations avec la ceftaroline, 2 se sont révélées les plus synergiques,

- ceftaroline + tazobactam (100,0% SYN) et,
- ceftaroline + amikacine (100,00% SYN).

### II.1.3 Souches de *K. pneumoniae* productrices de céphalosporinase

Parmi les 5 souches de *K. pneumoniae* productrices de céphalosporinase, cinq associations antibiotiques ont été testées, associant dans 80% des cas le doripénème et 60% la polymyxine B.

Parmi ces souches, l'association antibiotique doripénème-fosfomycine s'est révélée 100% synergique, cependant, cette association n'était pas bactéricide (résultat à prendre avec précaution car cette association a été testée sur une seule souche) (120).

D'autre part, Urban et coll. ont montré que d'autres associations antibiotiques étaient bactéricides, telles que polymyxine B + doripénème + rifampicine (66,7%), doripénème + rifampicine (66,7%), polymyxine B + doripénème (33,3%), et polymyxine B + rifampicine (33,3%) (109).

## II.2 Associations antibiotiques utilisées en fonction du profil de résistance des souches de *K. pneumoniae* vis à vis des polymyxines

Dans cette partie, 54 associations antibiotiques ont été testées sur 230 souches de *K. pneumoniae* ayant une valeur de concentration minimale inhibitrice (CMI) aux polymyxines.

Les associations antibiotiques composées d'un carbapénème (DORI, ETP, IPM, MEM) ou d'une polymyxine (colistine, polymyxine B) représentent respectivement 48,1% (26/54) et 70,4% (38/54). Les associations à base de colistine ou de polymyxine B représentent respectivement 60,5% (23/38) et 39,5% (15/38).

Si on réalise un classement des associations antibiotiques les plus utilisées avec la colistine, on retrouve la colistine-carbapénème (39,1%, 9/23), colistine-fosfomycine (13,1%, 3/23) et colistine-tigécycline (13,1%, 3/23).

De même, si l'on réalise ce classement avec la polymyxine B, on trouve polymyxine B-carbapénèmes (40,0%, 6/15), polymyxine B-rifampicine (20,0%, 3/15), et polymyxine B-céphalosporines (20,0%, 3/15).

Enfin, un classement des associations antibiotiques, à base d'une polymyxine, en fonction du profil de résistance aux polymyxines des souches de *K. pneumoniae* a été effectué. Pour cette partie, les articles de Samonis et coll. et de Clock et coll. ont été exclus (117,127).

En effet, Samonis et coll. ont une valeur de CMI pour chaque souche mais ne présentent pas de résultats sur l'évaluation du potentiel de synergie des antibiotiques en fonction du profil de résistance des souches (117). Clock et coll. ne donnent que des intervalles de valeurs de CMI pour la polymyxine B (127).

### II.2.1 Souches de *K. pneumoniae* résistantes aux polymyxines

Trente-quatre associations antibiotiques ont été testées sur des souches de *K. pneumoniae* résistantes aux polymyxines.



### II.2.1.1 Les associations antibiotiques

Si l'on considère uniquement les souches résistantes aux polymyxines, 3 associations se sont révélées synergiques,

- colistine + rifampicine (100,0% SYN),
- polymyxine B + rifampicine (100,0% SYN) et,
- colistine + vancomycine (100,0% SYN).

### II.2.2 Souches de *K. pneumoniae* sensibles aux polymyxines

Parmi les souches polymyxines sensibles, 3 combinaisons antibiotiques (ATB) se sont révélées les plus efficaces,

- polymyxine B + doripénème (100% SYN),
- colistine + doripénème + ertapénème (100% SYN) et,
- polymyxine B + méropénème (64,7% SYN, 35,3% IND, 0% ANT).

Grâce à cette revue de la littérature, nous pouvons constater que de nombreuses associations antibiotiques sont testées sur un faible nombre de souches à l'aide de techniques différentes. Par conséquent, il est difficile de généraliser un résultat. De plus il n'existe pas de méthode de référence et malgré les règles de standardisation des résultats il reste difficile de comparer les résultats obtenus à l'aide de techniques différentes. Cependant les résultats semblent encourageants.

# **OBJECTIFS**

Comme nous avons pu le constater à travers la première partie de ce manuscrit, la résistance à la colistine est un mécanisme complexe et incomplètement élucidé. Ces lacunes, en matière de caractérisation du mécanisme, nous mènent aux objectifs de ce travail de thèse.

La première partie de ce travail est consacrée à la caractérisation du (des) mécanisme(s) de résistance à la colistine chez *K. pneumoniae*. Afin de mener à bien notre étude, nous allons associer une étude génotypique et phénotypique du (des) mécanisme(s) chez 3 souches de *K. pneumoniae* (2 isolats cliniques (Kp1 et Kp6) et 1 souche de référence (KpATCC)) et leurs mutants résistants à la colistine (Kp1m, Kp6m et KpATCCm). Concernant l'étude génotypique, nous allons étudier l'expression de 2 groupes de gènes, ceux impliqués dans la synthèse constitutive du LPS (cible d'action de la colistine) et ceux impliqués dans la synthèse du groupement L-Ara4N (principal mécanisme de résistance à la colistine). En ce qui concerne les facteurs de virulence (se référer au Chapitre 1, paragraphe III), nous étudierons la sensibilité au sérum, la production de biofilm et la capsule. Toutes ces études seront réalisées dans différentes conditions afin d'étudier deux paramètres, l'impact du milieu de culture et l'impact des concentrations subinhibitrices de colistine sur l'expression de l'ensemble des gènes et des facteurs de virulence. En effet, nous avons choisi d'étudier ces deux paramètres afin de simuler une infection par une même souche chez différents patients, ou encore une prise en charge thérapeutique avec des concentrations suboptimales de colistine.

La seconde partie est, quant à elle, dédiée à la recherche de nouvelles alternatives thérapeutiques. Pour cela, nous allons étudier 5 associations (3 associations de 2 antibiotiques (colistine + vancomycine ou triméthoprimé ou triméthoprimé/sulfaméthoxazole) et 2 associations de plus de 2 antibiotiques (colistine + vancomycine + triméthoprimé et colistine + vancomycine + triméthoprimé/sulfaméthoxazole)) à l'aide de 4 techniques différentes (la technique de l'échiquier, Etest<sup>®</sup>, Time-kill Assay et la technique du Multiple Combination Bactericidal Testing - MCBT).

# **PARTIE EXPERIMENTALE**

# **MATÉRIELS ET MÉTHODES**

## I. Souches bactériennes utilisées

Toutes les souches bactériennes utilisées au cours de nos travaux proviennent du souchier de la plateforme ABC<sup>®</sup> : ABC Platform<sup>®</sup> Bugs Bank, L2CM, UMR 7053, CNRS-Université de Lorraine, Nancy.

### I.1 Souches résistantes à la colistine sélectionnées *in vitro*

Deux isolats cliniques de *K. pneumoniae* sensibles à la colistine : Kp1 (bas niveau de pénicillinase) et Kp6 (haut niveau de pénicillinase), et leurs deux mutants résistants à la colistine, Kp1m et Kp6m sélectionnés sous pression de sélection (culture sur gélose présentant différentes concentrations de colistine) ont été étudiées (tableau II).

De plus, *K. pneumoniae* ATCC 700603 a été incluse. Suivant la même méthode que pour Kp1 et Kp6, un mutant résistant à la colistine a été généré, KpATCCm (tableau II).

D'après les recommandations du CA-SFM (130), une souche est dite sensible à la colistine, si sa CMI est inférieure ou égale à 2 µg/mL, et résistante pour une valeur supérieure à 2 µg/mL.

Tableau II : Souches bactériennes utilisées

Souches/Isolats	CMI (mg/L)	Origine du prélèvement
Kp1	≤ 2	Bronchique
Kp6	≤ 2	Hémoculture
KpATCC	≤ 2	Urinaire
Kp1m	64	/
Kp6m	128	/
KpATCCm	64	/

### I.2 Isolats cliniques résistants à la colistine

En collaboration avec la Faculté de Médecine de Cardiff (Royaume-Uni), nous avons inclus dix-huit isolats cliniques de *K. pneumoniae* résistants à la colistine (CMI CST > 256 µg/mL). Ces isolats nous ont été transmis avec leurs antibiogrammes et afin d'uniformiser les techniques utilisées, les antibiogrammes de ces isolats ont été de nouveau déterminés par Vitek<sup>®</sup> 2. Les résultats sont présentés en annexe 1. Les CMI des antibiotiques d'intérêt (colistine, vancomycine, triméthoprime et triméthoprime/sulfaméthoxazole) ont été déterminées à l'aide de la méthode par microdilution et de la méthode Etest<sup>®</sup>. Les valeurs obtenues sont présentées tableau XXVI. Ces isolats sont numérotés de 408 à 425.

Les informations relatives au type de prélèvement, à l'origine des souches et au type d'infection ne nous ont pas été communiquées.

### **I.3 Isolats cliniques sensibles à la colistine**

Quinze isolats cliniques sensibles à la colistine ont également été inclus. Les antibiogrammes réalisés à l'aide du Vitek® 2 sont présentés en annexe 1. De même que pour les isolats cliniques résistants à la colistine, les CMI des antibiotiques d'intérêt ont été déterminées à l'aide de deux mêmes techniques (méthode par microdilution, et méthode Etest®). Les résultats sont présentés tableau XXVII. Ces isolats sont numérotés 42, 158, 309, 338, 365, 452, 467, 471, 472, 562, 626, 665, 713, 718, 720.

Les informations relatives au type de prélèvement, à l'origine des souches et au type d'infection ne nous ont pas été communiquées.

## **II. Milieux de culture utilisés**

Au cours de nos expérimentations, trois milieux de culture liquide ont été utilisés (tableau III), le bouillon Mueller Hinton cations ajustés (MHB-CA) encore appelé bouillon Mueller Hinton 2 (MHB 2) (Difco, Fischer Scientific, SAS, Illkirch, France), le bouillon Mueller Hinton (MHB) (Difco, Fischer Scientific, SAS, Illkirch, France) et le bouillon Luria Bertani (LBB) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Ces 3 milieux ont permis de réaliser des CMI, l'étude de l'expression des gènes, l'évaluation de la production de biofilm et la sensibilité au sérum.

Concernant le milieu de culture solide utilisé, le Mueller Hinton 2 agar (MHA 2) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) a été utilisé pour réaliser l'ensemble des expérimentations (tableau III).

Tableau III : Composition et comparaison des milieux de culture utilisés (pour 1 L)

	<b>MHB</b>		<b>MHB-CA</b>		<b>LBB</b>		<b>MHA 2</b>	
<b>Formule pour 1 L d'eau purifiée</b>	Peptone de caséine	17,5 g	Peptone de caséine	17,5 g	Tryptone	10 g	Peptone de caséine	17,5 g
	Extrait de boeuf	2,0 g	Extrait de boeuf	3,0 g	Extrait de levure	5 g	Extrait de bœuf	2,0 g
	Amidon	1,5 g	Amidon	1,5 g	NaCl	5 g	Amidon	1,5 g
							Agar	17,0 g
<b>Composition/ pH</b>	<b>Concentration massique (mg/L)</b>							
	Calcium	2,9-5,9	Calcium	20-25	Calcium	82,4	Calcium	20-25
	Magnésium	3,2-5,2	Magnésium	10-12,5	Magnésium	130	Magnésium	10-12,5
	<b>Concentration molaire (µmol/L)</b>							
	Calcium	72-147	Calcium	498-623	Calcium	82,4	Calcium	498-623
	Magnésium	130 -210	Magnésium	420-510	Magnésium	130	Magnésium	420-510
<b>pH</b>								
	7,3 ± 0,1		7,3 ± 0,1		6,8 – 7,2 (2% solution)		7,3 ± 0,1	

MHB : bouillon Mueller Hinton, MHB-CA : bouillon Mueller Hinton cations ajustés, LBB : bouillon Luria Bertani, MHA 2 : Mueller Hinton agar



### III. Antibiotiques testés au cours de l'étude

Les ATB utilisés au cours de nos études, représentés figure 18, sont la colistine, la vancomycine, le triméthoprime, et le sulfaméthoxazole.

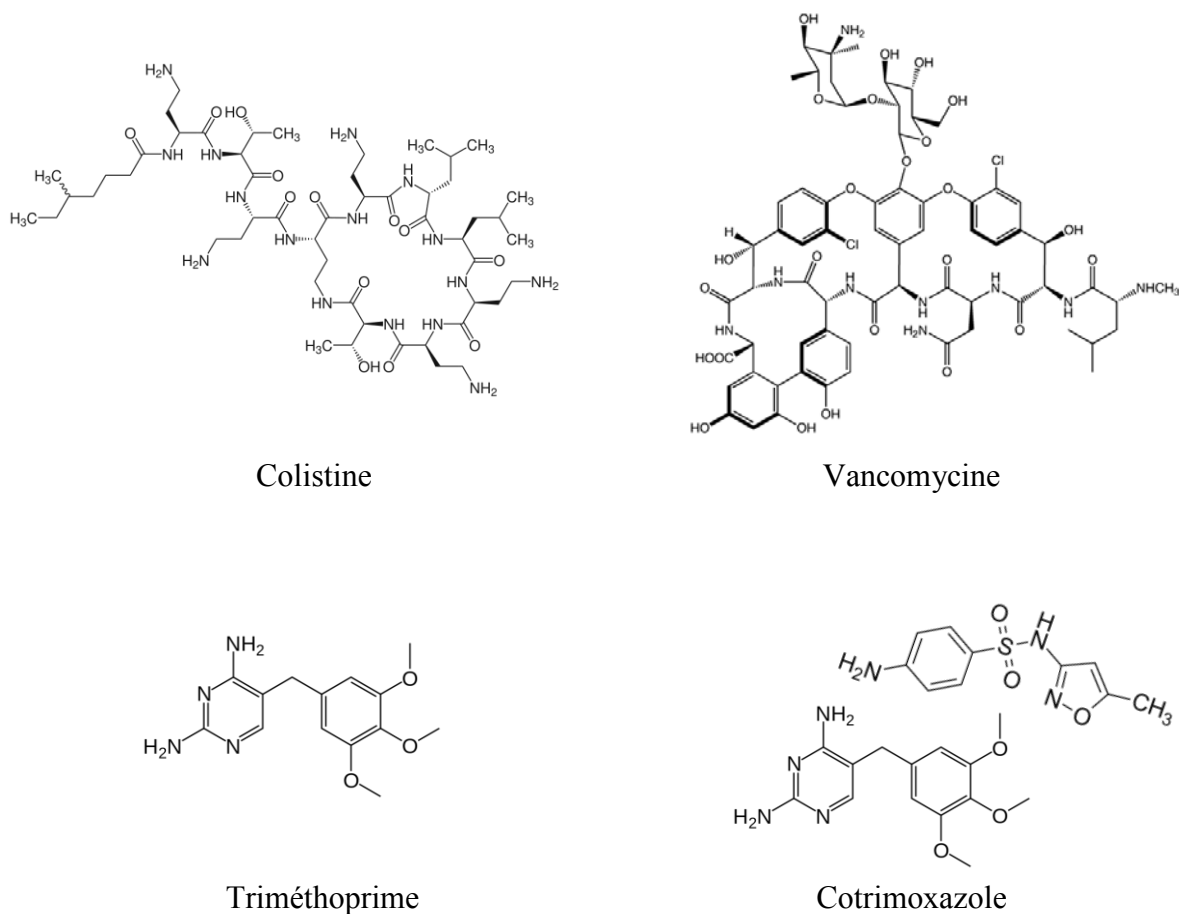


Figure 18 : Structures chimiques des ATB utilisés dans l'étude

Nous avons choisi d'associer ces différents antibiotiques car ils possèdent un mécanisme d'action différent, à l'exception du triméthoprime et du cotrimoxazole (figure 19). Ces deux antibiotiques ont été utilisés pour deux raisons. Premièrement, seul le cotrimoxazole est commercialisé en France et deuxièmement, nous voulions voir s'il y avait une différence d'activité entre le triméthoprime seul et le cotrimoxazole.

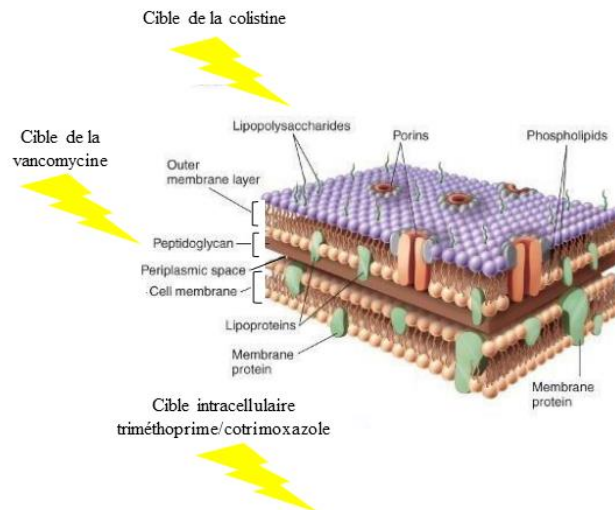


Figure 19 : Schéma représentatif des cibles d'action des antibiotiques utilisés (18)

La vancomycine est un antibiotique bactéricide, temps dépendant appartenant à la famille des glycopeptides. Elle a été isolée en 1956 à partir d'une bactérie *Amycolatopsis orientalis*. Concernant son spectre d'activité, la vancomycine est active uniquement sur les bactéries à Gram positif. En effet, à cause de sa structure volumineuse (MM = 1450 daltons), la vancomycine ne peut pas emprunter les porines de la membrane externe des BGN, et ne peut donc pas atteindre le peptidoglycane, sa cible d'action (131).

Le triméthoprim, quant à lui est un agent bactériostatique qui inhibe le fonctionnement de la dihydrofolate reductase, enzyme qui catalyse la réduction du dihydrofolate en tétrahydrofolate encore appelé vitamine B9. Cette vitamine est essentielle à la synthèse des bases puriques, pyrimidiques et des acides aminés. Le triméthoprim freine ainsi la synthèse des acides nucléiques et des protéines. Cet antibiotique n'est pas commercialisé seul en France, mais associé au sulfaméthoxazole (132).

Le sulfaméthoxazole est un sulfamide ayant une activité bactériostatique par inhibition de la synthèse de l'acide folique en bloquant la dihydrofolate synthétase. Cette association, couramment appelée cotrimoxazole (triméthoprim/sulfaméthoxazole), présente un effet fortement synergique (132).

#### **IV. Réactifs et équipements**

Les équipements et les réactifs utilisés dans cette étude sont décrits dans l'annexe 2.

Pour la suite des protocoles, le terme « souche bactérienne » désigne aussi bien les isolats cliniques que les mutants sélectionnés *in vitro*.

#### **V. Antibiogrammes et détermination des concentrations minimales inhibitrices**

##### **V.1 Antibiogrammes réalisés à l'aide du Vitek® 2**

Le Vitek® 2 est un automate permettant l'identification de plus de 300 micro-organismes (bactéries et levures) et la réalisation de l'antibiogramme de façon standardisée. Les résultats sont obtenus en 3 à 7 heures grâce à la combinaison d'un logiciel d'interprétation et d'un consommable miniaturisé : la carte Vitek® 2. Les CMI sont déterminées grâce à des modèles mathématiques de croissance établis pour chaque groupe bactérien et chaque antibiotique. Ces modélisations permettent ainsi de choisir les concentrations d'antibiotiques les plus discriminantes, permettant d'obtenir des CMI corrélées aux techniques de références. Les cartes sont mises à jour selon les recommandations du CA-SFM.

**J0 : Ensemencement de la bactérie sur une gélose Columbia additionnée de 5% de sang de mouton pendant 18 à 24 h, en accord avec les recommandations du fabricant**

**J1 : Identification et antibiogramme**

**J2 : Lecture des résultats**

Les antibiogrammes des isolats résistants et sensibles à la colistine sont présentés en annexe 1.

##### **V.2 Préparation d'une culture bactérienne de 24 h et d'un inoculum bactérien**

###### **V.2.1 Préparation d'une culture bactérienne de 24 h**

###### **Mise en culture sur gélose MHA 2**

- Décongeler les souches bactériennes étudiées, stockées à -80°C dans le souchier de la plateforme ABC®
- Prélever 10 µL à l'aide d'une öse
- Ensemencer une gélose MHA 2 et remettre la souche à -80°C
- Incuber 24 h à 35°C

### **Ensemencement d'un bouillon MHB-CA**

- Prélever une colonie isolée sur la gélose MHA 2
- Ensemencer cette colonie dans un tube contenant 5 mL de MHB-CA
- Incuber 24 h à 35°C

→ On obtient ainsi une culture bactérienne de 24 h correspondant à environ  $10^9$  UFC/mL.

### **V.2.2 Préparation d'un inoculum bactérien**

- Centrifuger la suspension bactérienne de 5 mL pendant 10 min à 3000 g
- Eliminer le surnageant
- Remettre le culot en suspension dans 1 mL d'eau distillée stérile
- Effectuer une dilution adéquate afin d'obtenir un inoculum compris entre  $5 \cdot 10^5$  et  $5 \cdot 10^6$  UFC/mL.

### **V.3 Détermination des concentrations minimales inhibitrices par microdilution**

La détermination des CMI a été réalisée par microdilution, adaptée du protocole décrit dans les recommandations du Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (133).

#### **J0 : Préparation d'un inoculum bactérien par ensemencement d'un bouillon MHB-CA**

#### **J1 : Préparation des microplaques 96 puits**

Ce protocole s'articule en 3 étapes (figure 20) :

#### **→ Étape 1 : Dépôt du milieu (MHB-CA) dans chaque puits**

Dans la colonne 1 (Témoin stérile) : Déposer 100  $\mu$ L de MHB-CA

Dans la colonne 2 (Témoin drogue) : Déposer 150  $\mu$ L de MHB-CA

Dans la colonne 3 (Témoin milieu + bactérie) : Déposer 50  $\mu$ L de MHB-CA

Dans les colonnes 4 à 12 : Déposer 50  $\mu$ L de MHB-CA

#### **→ Étape 2 : Dépôt de l'antibiotique à tester**

Préparer une solution mère de l'antibiotique à tester à une concentration de 1024  $\mu$ g/mL, puis filtrer la solution à l'aide d'un filtre 0,22  $\mu$ m. La solution mère est prête à l'emploi.

Dans la colonne 1 (Témoin stérile) : Ne pas déposer d'antibiotique

Dans la colonne 2 (Témoin drogue) : Ajouter 50  $\mu$ L de solution mère d'antibiotique, homogénéiser et jeter 100  $\mu$ L

Dans la colonne 3 (Témoin milieu + bactérie) : Ne pas déposer d'antibiotique

Dans la colonne 4 : Déposer 50 µL de solution mère d'antibiotique, homogénéiser et prélever 50 µL, les déposer dans les puits de la colonne 5

Dans la colonne 5 : Déposer 50 µL de la colonne 4, homogénéiser et prélever 50 µL, les déposer dans les puits de la colonne 6.

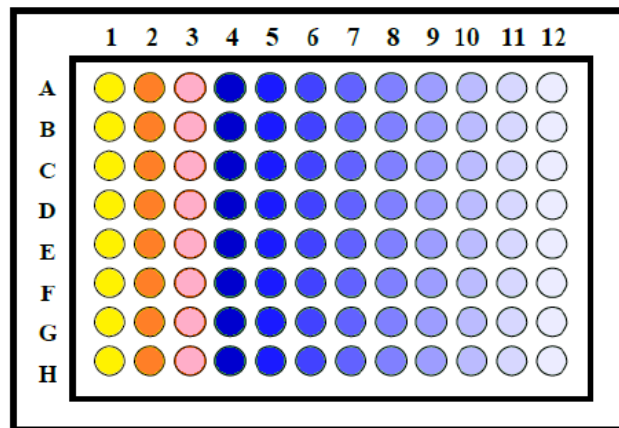
Réaliser cette manipulation jusqu'à la colonne 12. À la colonne 12, jeter 50 µL

**→ Étape 3 : Dépôt de l'inoculum bactérien**

Centrifuger la culture bactérienne de 24 h à 3000 g pendant 5 minutes, puis éliminer le surnageant et reprendre le culot bactérien avec 1 mL d'eau distillée stérile.

Dans les colonnes 3 à 12, déposer 50 µL de la suspension bactérienne diluée et incuber 18 à 24 h à 35°C.

**J2 : Après incubation, réaliser une lecture des densités optiques (DO) à 540 nm.**



Colonne 1 : Témoin stérile du milieu

Colonne 2 : Témoin antibiotique

Colonne 3 : Témoin bactérie

Colonne 4 à 12 : Dilution sériée de la drogue (256 → 1 µg/mL)

Figure 20 : Schéma d'une microplaque utilisée dans la détermination de la CMI en milieu liquide

#### V.4 Méthode Etest®

Il s'agit d'une technique de détermination de CMI utilisant le principe de diffusion en milieu gélosé (figure 21). Des bandelettes imprégnées d'un gradient de concentrations d'antibiotique sont disposées sur la gélose préalablement recouverte d'un tapis bactérien homogène. La drogue diffuse dans la gélose et inhibe la croissance bactérienne. La CMI est déterminée grâce à l'échelle imprimée sur les bandelettes autour de laquelle une ellipse d'inhibition se forme, les points d'intersection avec la bandelette correspondent à la CMI (figure 21).

#### J0 : Préparation d'une culture bactérienne de 24 h

#### J1 : Ensemencement de la gélose

- Préparation de l'inoculum bactérien (se référer au paragraphe correspondant)
- Recouvrir la gélose de la suspension bactérienne
- Retirer le surplus et laisser sécher 5 minutes
- Déposer les bandelettes Etest® sur la gélose
- Incuber pendant 16 à 18 h à 35°C.

#### J2 : Lecture des résultats

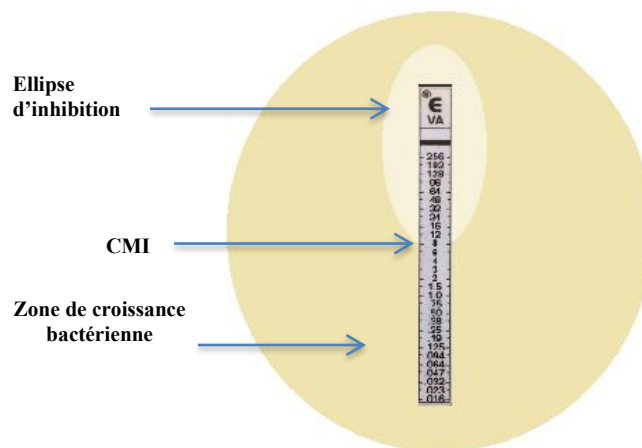


Figure 21 : Schéma de détermination de la CMI par méthode Etest®

## **VI. Mesure de la production du biofilm à 24 h**

Le protocole utilisé est adapté de l'article publié par Hancock et coll. (134). Le principe de cette méthode est d'évaluer la capacité d'une bactérie à former un biofilm par réaction colorimétrique.

### **J0 : Préparation d'une culture bactérienne de 24 h**

### **J1 : Préparation des microplaques 96 puits**

Par microplaque,

- Distribuer 100 µL de MHB-CA dans chaque puits et déposer 1 µL de suspension bactérienne dans chaque puits de la microplaque. Incuber les microplaques 16 h à 35°C.

### **J2 : Lecture des microplaques 96 puits**

- Ajouter 100 µL de Cristal Violet 0,1% dans tous les puits
- Incuber les microplaques pendant 3 minutes à température ambiante
- Eliminer le surnageant par retournement des microplaques
- Laver les microplaques 3 fois avec 100 µL de PBS (annexe 4)
- Ajouter 200 µL d'alcool éthylique
- Incuber 10-15 minutes à température ambiante
- Lecture des résultats

## **VII. Évaluation de la sensibilité au sérum humain**

Le protocole d'évaluation de la sensibilité au sérum humain a été adapté de la publication de Podschun et coll. L'objectif de cette méthode est d'évaluer l'activité antibactérienne du sérum humain non décomplémenté (135).

### **J0 : Préparation d'une culture bactérienne de 24 h**

### **J1 : Ensemencement de la gélose**

Après incubation,

Centrifuger la culture bactérienne de 24 h à 3000 g pendant 5 minutes, éliminer le surnageant et reprendre le culot bactérien avec 1 mL d'eau distillée stérile. Puis réaliser une dilution au 1/10<sup>ème</sup> de la suspension bactérienne.

Dans un microtube de 1,5 mL, mélanger 25 µL de la suspension bactérienne au 1/10<sup>ème</sup> avec 75 µL de sérum humain non décomplémenté.

Incuber le mélange 0, 1, 2 et 3 heures à 35°C. Après chaque temps, réaliser une gamme de dilution au 1/10<sup>ème</sup>, allant de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-8</sup> dans de l'eau distillée stérile.

Ensemencer 3 spots de 10 µL pour chaque dilution sur gélose MHA 2, puis incuber 24 h à 35°C.

## **J2 : Déterminer la viabilité bactérienne par comptage des colonies sur gélose MHA 2**

### **VIII. Évaluation *in vitro* des associations antibiotiques**

#### **VIII.1 Technique de l'échiquier (Checkerboard method)**

La technique de l'échiquier consiste à rechercher à 24 h un abaissement de la CMI de chaque antibiotique dans l'association, par rapport à la CMI des antibiotiques seuls. Le protocole utilisé est celui décrit par Elipoulos et coll. (136).

#### **J0 : Préparation d'une culture bactérienne de 24 h**

#### **J1 : Préparation des microplaques**

- Préparation de l'inoculum bactérien (se référer au paragraphe V, b, ii p 46)
- Préparation des solutions mères d'antibiotique, correspondant à 32 fois la CMI

Réalisation de dilutions successives de raison 1/2 en tube afin d'obtenir une gamme de concentration allant de 8 à 0,06 fois la CMI pour chaque molécule

Ce protocole s'articule en 3 étapes (figure 22),

#### **→Étape 1 : Dépôt du milieu (MHB-CA) dans chaque puits**

Dans les colonnes 1 et 12 : Déposer 100 µL de MBH-CA

Dans les colonnes 2 et 11 : Déposer 50 µL de MHB-CA

Dans les colonnes 4 à 10 : Déposer 25 µL de MHB-CA

#### **→Étape 2 : Dépôt des antibiotiques à tester**

Dans la colonne 3 : Déposer 25 µL de la solution mère de l'antibiotique A



Dans la colonne 4 : Déposer 25  $\mu\text{L}$  de la solution mère de l'antibiotique A et réaliser une dilution sériée de raison 1/2 jusqu'à la colonne 10

Dans la ligne A : Déposer 25  $\mu\text{L}$  de la solution mère de l'antibiotique B, puis déposer dans les autres lignes les solutions correspondant aux dilutions successives

### →Étape 3 : Dépôt de l'inoculum bactérien

Centrifuger la culture bactérienne de 24 h à 3000 g pendant 5 minutes, puis éliminer le surnageant et reprendre le culot bactérien avec 1 mL d'eau distillée stérile.

Dans les colonnes 3 à 12, déposer 50  $\mu\text{L}$  de la suspension bactérienne diluée et incuber 18 à 24 h à 35°C.

Cela permet l'obtention d'une gamme de concentrations allant de 8 à 0,06 fois la CMI pour les 2 antibiotiques.

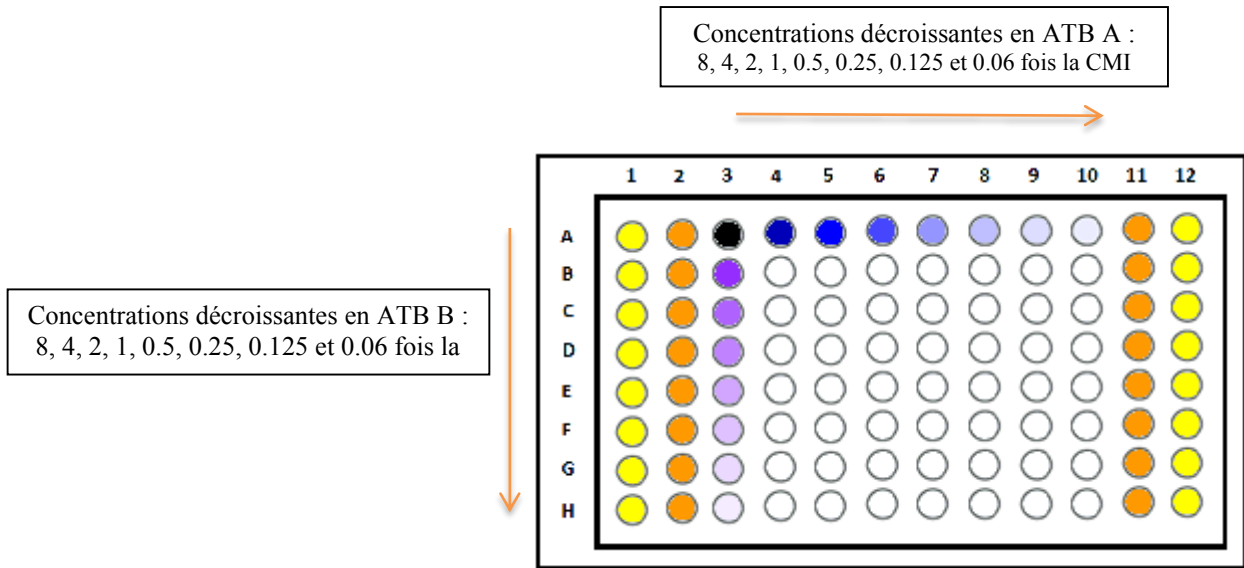
### J2 : Lecture des résultats à 540 nm

L'activité de chaque combinaison d'antibiotiques est estimée par la détermination de l'index de fraction de concentration inhibitrice (FIC) selon le calcul suivant :

$$\text{FIC} = \text{CMI}_A \text{ en assoc} / \text{CMI}_A \text{ seul} + \text{CMI}_B \text{ en assoc} / \text{CMI}_B \text{ seul}$$

Les résultats sont interprétés, d'après les recommandations de l'Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2012. On distingue quatre types d'interactions lors de la combinaison d'antibiotiques ; la synergie, l'additivité, l'indifférence et l'antagonisme.

- **La synergie** se définit par un effet supérieur à la somme des effets de chaque antibiotique,  $(A+B) > A + B$ , et se caractérise par un FIC inférieur ou égal à 0,5.
- **L'additivité** se définit par un effet égal à la somme des effets de chaque antibiotique,  $(A+B) = A + B$ , et se caractérise par un FIC compris dans l'intervalle ]0,5 ; 1].
- **L'indifférence** se définit par l'effet d'un des deux antibiotiques, l'activité d'un antibiotique n'est pas affectée par la présence de l'autre,  $(A+B) = A$  ou  $B$ , et se caractérise par un FIC compris dans l'intervalle ]1 ; 4].
- **L'antagonisme** se définit par un effet inférieur à la somme des effets de chaque antibiotique,  $(A+B) < A + B$ , et se caractérise par un FIC supérieur à 4.



Colonnes 1 et 12 : Témoins milieu  
 Colonnes 2 et 11 : Témoins bactéries  
 Colonnes 4 à 10 : Dilution sériée de l'antibiotique A  
 Lignes A à H : Dilution sériée de l'antibiotique B

Figure 22 : Schéma d'une microplaque utilisée dans la technique de l'échiquier

### VIII.2 Technique du time kill-assay (TKA) – Cinétique de bactéricidie

Cette technique permet d'étudier une association d'antibiotiques à une concentration donnée pour chacune des molécules. Il est ainsi possible d'évaluer la cinétique d'activité de la combinaison et de déterminer si elle est bactéricide ou bactériostatique. Les concentrations testées en association pour notre étude correspondent au 1/4 et au 1/2 de la CMI.

#### J0 : Préparation d'une culture bactérienne de 24 h

#### J1 : Réalisation de la cinétique de bactéricidie

- Préparation de l'inoculum bactérien (se référer au paragraphe V, b, ii p 46)
- Préparation des solutions mères d'antibiotique, correspondant à 2 fois la CMI pour la plaque au 1/2 et à 1 fois la CMI pour la plaque au 1/4.
- Préparation des microplaques

Colonne 1 : Témoin milieu

Colonne 2 : Témoin bactérie

Colonnes 3 à 10 : Dépôts des solutions antibiotiques au 1/4 ou au 1/2 de la CMI

- Réalisation des courbes de bactéricidie

Prélever les 8 puits de chaque colonne (volume total : 800  $\mu\text{L}$ )

Réaliser une dilution de chaque colonne au  $1/10^{\text{ème}}$  dans une microplaque de 96 puits : déposer au préalable 90  $\mu\text{L}$  d'eau distillée stérile dans chacun des puits puis 10  $\mu\text{L}$ , des 800  $\mu\text{L}$  collectés, dans le premier puits d'une ligne (obtention d'une suspension diluée à  $10^{-1}$ )

Effectuer une dilution sériée de  $10^{-2}$  à  $10^{-8}$

Déposer 3 spots de 10  $\mu\text{L}$  pour chaque dilution sur gélose MHA 2 (figure 23)

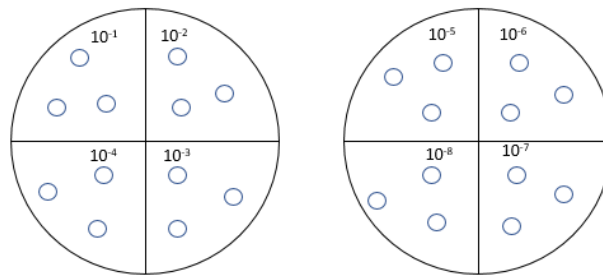


Figure 23 : Schéma de 2 géloses MHA 2 utilisées dans la technique du TKA

Laisser sécher les boîtes, couvercle fermé pendant quelques minutes

Incuber 24 h à  $35^{\circ}\text{C}$

Procéder de la même manière pour chaque temps ( $T = 2 \text{ h}, 4 \text{ h}, 8 \text{ h}, \text{ et } 24 \text{ h}$ )

### **J2: Dénombrement des colonies**

Les résultats sont présentés sous forme de courbes reliant le logarithme décimal de la quantité de survivants ( $\log_{10} (\text{UFC}/\text{mL})$ ) au temps.

D'après les recommandations de l'Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2014, la synergie est définie comme une réduction supérieure ou égale à deux logarithmes décimaux de la quantité de survivants ( $2 \log_{10} (\text{UFC}/\text{mL})$ ), entre l'association et l'antibiotique de référence. L'activité bactéricide des associations est quant à elle définie par une diminution supérieure ou égale à trois logarithme décimaux de la quantité de survivants ( $3 \log_{10} (\text{UFC}/\text{mL})$ ), soit 99,9% de réduction bactérienne par rapport au médicament le plus actif à 24 h.

### VIII.3 Technique par bandelette Etest®

Ce protocole est adapté de la publication de Kempf et coll. (137). Cette méthode consiste à croiser les bandelettes Etest® de chaque antibiotique au niveau de la valeur de CMI de la souche testée. On observe une synergie d'action s'il y a une diminution de la valeur de CMI (figure 24). Les bandelettes Etest® utilisées afin d'évaluer les potentiels de synergie sont, les bandelettes colistine (537300), vancomycine (412488), triméthoprim (523600) et triméthoprim/sulfaméthoxazole (1/19) (412481) (Biomérieux).

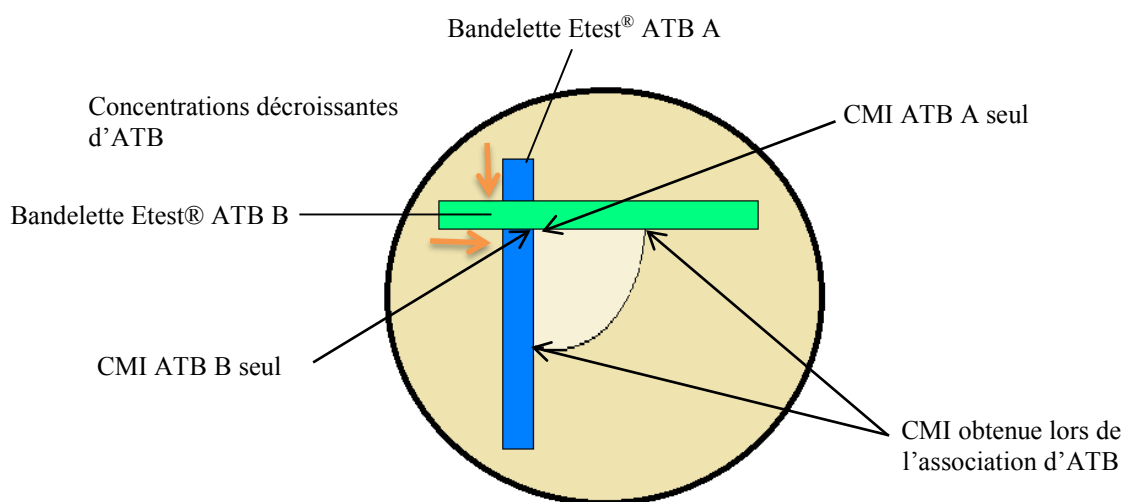


Figure 24 : Schéma d'un test de synergie par la méthode Etest®

### VIII.4 Développement d'une technique de combinaisons antibiotiques permettant d'associer trois antibiotiques : Multiple Combination Bactericidal Testing (MCBT)

Le protocole suivant a été établi à partir de différents travaux publiés par Aaron et coll., et Mezzatesta et coll. (138–140). Cette technique permet de comparer l'action de l'association de plusieurs antibiotiques.

Au cours de ces travaux, un ou deux antibiotiques ont été utilisés en combinaison avec la colistine ; la vancomycine, le triméthoprim et le cotrimoxazole (triméthoprim + sulfaméthoxazole). Toutes les expérimentations ont été réalisées au demi de la CMI des souches testées.

**J0 : Préparation d'une culture bactérienne de 24 h**

**J1 : Préparation des microplaques 96 puits**

Ce protocole s'articule en 3 étapes :

**→ Étape 1 : Dépôt des antibiotiques à tester**

Préparer une solution mère des antibiotiques à tester à 10 fois la concentration choisie, puis filtrer la solution à l'aide d'un filtre 0,22 µm. Les solutions mères sont prêtes à l'emploi.

**Si association de 2 antibiotiques,**

Dans la colonne 1 (Témoin stérile) : Ne pas déposer d'antibiotique

Dans la colonne 2 (Témoin association : drogue 1 (colistine) + drogue 2) : Déposer 10 µL de chaque solution mère d'antibiotique

Dans la colonne 3 (Témoin bactérie) : Ne pas déposer de solution mère d'antibiotique

Dans la colonne 4 (Témoin colistine + bactérie) : Déposer 10 µL de solution mère de colistine

Dans la colonne 5 (Témoin drogue 2 + bactérie) : Déposer 10 µL de solution mère de la drogue 2

Dans les colonnes 6 à 12 : Déposer 10 µL de chaque solution mère d'antibiotique

**Si association de 3 antibiotiques,**

Dans la colonne 1 (Témoin stérile) : Ne pas déposer d'antibiotique

Dans la colonne 2 (Témoin association : drogue 1 (colistine) + drogue 2 + drogue 3) : Déposer 10 µL de chaque solution mère d'antibiotique

Dans la colonne 3 (Témoin bactérie) : Ne pas déposer de solution mère d'antibiotique

Dans la colonne 4 (Témoin colistine + bactérie) : Déposer 10 µL de solution mère de colistine

Dans la colonne 5 (Témoin drogue 2 + bactérie) : Déposer 10 µL de solution mère de la drogue 2

Dans la colonne 6 (Témoin drogue 3 + bactérie) : Déposer 10 µL de solution mère de la drogue 3

Dans les colonnes 7 à 12 : Déposer 10 µL de chaque solution mère d'antibiotique

**→ Étape 2 : Dépôt du milieu (MHB-CA) dans chaque puits**

Dans la colonne 1 (Témoin stérile) : Déposer 100 µL de MHB-CA

**Si association de 2 antibiotiques,**

Dans la colonne 1 : Déposer 100 µL de MHB-CA

Dans la colonne 2 : Déposer 30 µL de MHB-CA

Dans la colonne 3 : Déposer 50  $\mu\text{L}$  de MHB-CA

Dans les colonnes 4 et 5 : Déposer 40  $\mu\text{L}$  de MHB-CA

Dans les colonnes 6 à 12 : Déposer 30  $\mu\text{L}$  de MHB-CA

**Si association de 3 antibiotiques,**

Dans la colonne 1 : Déposer 100  $\mu\text{L}$  de MHB-CA

Dans la colonne 2 : Déposer 20  $\mu\text{L}$  de MHB-CA

Dans la colonne 3 : Déposer 50  $\mu\text{L}$  de MHB-CA

Dans les colonnes 4 et 6 : Déposer 40  $\mu\text{L}$  de MHB-CA

Dans les colonnes 7 à 12 : Déposer 20  $\mu\text{L}$  de MHB-CA

**→ Étape 3 : Dépôt de l'inoculum bactérien**

Centrifuger la culture bactérienne de 24 h à 3000 g pendant 5 minutes, puis éliminer le surnageant et reprendre le culot bactérien avec 1 mL d'eau distillée stérile.

Dans les colonnes 6 à 12 (si 2 ATB) ou 7 à 12 (si 3 ATB), déposer 50  $\mu\text{L}$  de la suspension bactérienne diluée et incuber 18 à 24 h à 35°C.

**J2 : Après incubation, réaliser une lecture des DO à 540 nm et quantifier le nombre d'UFC présentes**

Prélever les 8 puits de chaque colonne (volume total : 800  $\mu\text{L}$ )

Réaliser une dilution de chaque colonne au 1/10<sup>ème</sup> dans une microplaque de 96 puits : déposer au préalable 90  $\mu\text{L}$  d'eau distillée stérile dans chacun des puits puis 10  $\mu\text{L}$  des 800  $\mu\text{L}$  collectés, dans le premier puits d'une ligne (obtention d'une suspension diluée à 10<sup>-1</sup>)

Effectuer une dilution sériée 10<sup>-2</sup> à 10<sup>-8</sup>

Déposer 3 spots de 10  $\mu\text{L}$  pour chaque dilution sur gélose MHA 2.

Laisser sécher les boîtes, couvercle fermé pendant quelques minutes

Incuber 24 h à 35°C

**J3 : Dénombrement des colonies**

La synergie est définie comme une réduction supérieure ou égale à deux logarithmes décimaux de la quantité de survivants (2 log<sub>10</sub> (UFC/mL)) entre l'association de deux antibiotiques et l'antibiotique de référence. Pour les combinaisons de trois antibiotiques, leur

effet a été comparé à celui des combinaisons de deux antibiotiques pour déterminer si l'ajout d'un troisième antibiotique a un effet significatif.

Le dénombrement a permis de calculer la différence entre la quantité de survivants en présence de colistine seule et en association ( $\Delta \log_{10}$  (UFC/mL)). Si la différence est supérieure ou égale à trois logarithmes décimaux ( $3 \log_{10}$  (UFC/mL)), cela signifie que la combinaison a un effet bactéricide. Le dénombrement permet aussi de confirmer l'absence de bactéries dans la microplaque.

### **IX. Extraction des ARN des souches bactériennes**

L'ARN a été extrait à l'aide du kit RNeasy® Plus Mini Kit (74136, Qiagen S.A., Saint Ulis, France) d'après les recommandations du fabricant. Une fois extrait, la concentration en ARN a été déterminée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 260 nm (NanoPhotometer® P-Class, Impln, Munich, Allemagne). Les absorbances à 230 et 280 nm sont aussi mesurées afin de valider la pureté des échantillons. Les ARN obtenus sont conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **X. Reverse transcription ou RT**

La reverse transcription (iScript™ cDNA Synthesis Kit #170-8891) (BioRad, Marnes-la-Coquette, France) a permis la synthèse d'ADN complémentaire à partir de l'ARN total sous l'action d'une enzyme, la reverse transcriptase. Les échantillons d'ADNc sont conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Les réactions ont été effectuées dans un volume final de 20  $\mu\text{L}$  comprenant 4  $\mu\text{L}$  de mix 5X (contenant des oligo(dT) et des primers), 1  $\mu\text{L}$  de reverse transcriptase, 500 ng d'ARN et d'eau RNase free qsp. 20  $\mu\text{L}$ . Les réactions de RT ont été réalisées à l'aide du thermocycleur CFX96 (BioRad, Marnes-la-Coquette, France) selon le programme suivant (tableau IV).

Tableau IV : Conditions de réalisation des RT

Étape	Température	Durée
Appariement des primers	25°C	5 min
Elongation	42°C	30 min
Inactivation de la reverse transcriptase	85°C	5 min

## XI. PCR quantitative en temps réel

### XI.1 Choix du gène de référence

Le gène de référence permet de normaliser les variations quantitatives (quantité d'ARNm variable entre les échantillons, efficacité de la RT) et qualitatives (conservation des ARN) entre les échantillons.

Après avoir testé cinq gènes de référence mentionnés dans la littérature ; *alda*, *mdh*, *16S*, *rpsL* et *rpoB*, nous avons choisi d'utiliser le gène *16S*, celui-ci présentant le moins de variation entre les échantillons.

### XI.2 Choix des amorces

Les amorces utilisées pour les gènes (*lpxA*, *lpxC*, *arnT* et *msba*) avaient déjà été déterminées dans une étude précédente au laboratoire. En revanche, les amorces des gènes (*pmrA*, *pmrB*, *pmrD*, *phoP*, *phoQ* et *mgrB*) ont été déterminées en utilisant les séquences de *K. pneumoniae* présentées en annexe 3. Les critères de choix des amorces sont définis tableau V.

Tableau V : Critères de design des amorces

Longueur des amorces	20-25 bases
Teneur en GC des amorces	40-60%
Tm des amorces	60-65°C
Taille de l'amplicon	50-200 paires de bases
Localisation des amorces	entre différents exons ou à la jonction exon-exon (évite la co-amplification d'ADN génomique contaminant)

Puis, chaque paire d'amorces a été dessinée à l'aide du logiciel Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)). La spécificité des amorces ainsi obtenues a été évaluée par le logiciel d'alignement de séquences BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Avant leur utilisation lors d'une RT-qPCR, nous avons déterminé la température optimale et l'efficacité de ces couples d'amorces. Le listing des amorces est présenté en annexe 3.



### **XI.3 Vérification de la taille des amplicons et de la spécificité des couples d'amorces**

Au terme de chaque RT-qPCR, une courbe de fusion a été établie permettant ainsi de contrôler la spécificité des amorces. En effet, la dérivée de cette courbe doit présenter un pic unique correspondant à la température de fusion des brins d'ADN, caractéristique d'un amplicon donné.

### **XI.4 Migration sur gel d'agarose**

Afin de vérifier la taille des amplicons, une électrophorèse sur gel d'agarose a été nécessaire. Pour cela, un gel d'agarose à 1,4% a été réalisé en mélangeant 100 mL de tampon TBE (annexe 4) et 1,4 g d'agarose. Après une étape de chauffe pour solubiliser l'agarose, 1  $\mu$ L de BET (0,1  $\mu$ g/mL final) a été ajouté. Pour la migration, 4  $\mu$ L de ADNc et 1  $\mu$ L de bleu de charge sont déposés dans les puits. La migration se fait à 100 V pendant 20 minutes. Le gel sera observé sous UV.

### **XI.5 Réactions de qPCR**

La RT-qPCR permet de quantifier la quantité d'ARN présent dans un extrait afin de déterminer le niveau d'expression des gènes. Elle a été réalisée à l'aide du kit SsoAdvanced SYBR Green Supermix (172-5264, BioRad, Marnes-la-coquette, France). Les réactions ont été effectuées dans un volume final de 20  $\mu$ L comprenant 500 ng d'ADNc, 10  $\mu$ L de mix de réaction, 10  $\mu$ M de chaque amorce et de l'eau RNase et DNase free QSP 20  $\mu$ L. L'étude de l'expression des gènes impliqués dans le ou les mécanisme(s) de résistance à la colistine chez *K. pneumoniae* a été réalisée à l'aide des amorces listées dans l'annexe 3. Les réactions de PCR ont été réalisées à l'aide du thermocycleur CFX96 (BioRad, Marnes-la-coquette, France) selon le programme suivant (tableau VI).

Tableau VI : Conditions de réalisation des qPCR

Étape	Température	Durée	
Dénaturation initiale + activation de l'enzyme Hot start	95°C	3 min	
Dénaturation	95°C	15 s	] X45
Hybridation des amorces	X°C*	30 s	
Élongation	72°C	1 min	
Courbe de fusion	55 à 95°C incrément tous les 0,5°C		

\* Les températures d'hybridation de chaque gène sont présentées en annexe 3.

Pour chaque qPCR, les étapes 2, 3 et 4 sont répétées 45 fois.

L'unité de quantification utilisée en PCR en temps réel est le Ct (threshold cycle), correspondant au cycle de PCR pour lequel la fluorescence dépasse de manière significative le bruit de fond. Le thermocycleur est réglé sur le mode régression pour le calcul du Ct. Pour chaque expérimentation, les données obtenues ont été normalisées par rapport à celles obtenues pour le gène *I6S*, puis la variation de la quantité d'ADN a été comparée aux souches parentes sensibles à la colistine à l'aide de l'équation  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Les expériences ont été répétées trois fois.

## XII. Tests statistiques utilisés

Les analyses statistiques des résultats obtenus au cours des différents chapitres ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism<sup>®</sup> version 6.0e. Lors de comparaisons multiples des résultats, nous avons réalisé un test ANOVA suivi d'un tukey en test post hoc. Lors de la comparaison deux à deux, un t-test a été réalisé.

# **RESULTATS**

**Chapitre 1**  
**Exploration du mécanisme de résistance**  
**à la colistine et de son expression chez**  
***K. pneumoniae***

## I. Contexte

Dans ce chapitre, nous avons voulu explorer le mécanisme de résistance à la colistine chez *K. pneumoniae* en étudiant les modifications génotypiques et phénotypiques des souches résistantes à la colistine sélectionnées *in vitro*.

Concernant les modifications génotypiques, nous avons choisi d'étudier des gènes impliqués dans la synthèse constitutive du LPS (*lpxA*, *lpxC* et *msbA*) et des gènes impliqués dans la synthèse du groupement L-Ara4N (*pmrA*, *pmrB*, *pmrD*, *phoP*, *phoQ* et *arnT*). Bien que l'absence de LPS soit un mécanisme de résistance à la colistine observé chez *Acinetobacter baumannii* (141) et non chez *K. pneumoniae*, nous avons fait le choix d'inclure ces gènes afin d'étudier ce possible mécanisme de résistance chez *K. pneumoniae*.

Concernant les modifications phénotypiques, nous avons étudié deux facteurs de virulence pour lesquels le LPS serait impliqué ; la sensibilité au sérum humain, et la production de biofilm (142-144). Cette étude a été réalisée chez Kp1 et Kp6 et leurs deux mutants résistants à la colistine (Kp1m et Kp6m).

## II. Résultats

### II.1 Étude de l'expression des gènes impliqués dans la résistance à la colistine

Comme nous l'avons vu dans la première partie de cette thèse, l'inactivation de *mgrB* peut entraîner une régulation positive de l'opéron *arnBCADTEF*, ayant pour conséquence l'addition du groupement L-Ara4N sur le LPS. Chez *K. pneumoniae*, de nombreuses mutations du gène *mgrB*, telles que des insertions inactivantes (IS5-like), ont été mises en évidence (91, 92). En plus d'être sous le contrôle indirect de *mgrB*, l'opéron *arnBCADTEF* est également sous le contrôle direct des deux systèmes à deux composants PmrA/PmrB et PhoP/PhoQ (figure 13). Par conséquent, dans un premier temps, nous avons choisi d'étudier *mgrB* puis dans un second temps les deux systèmes à deux composants PmrA/PmrB et PhoP/PhoQ.

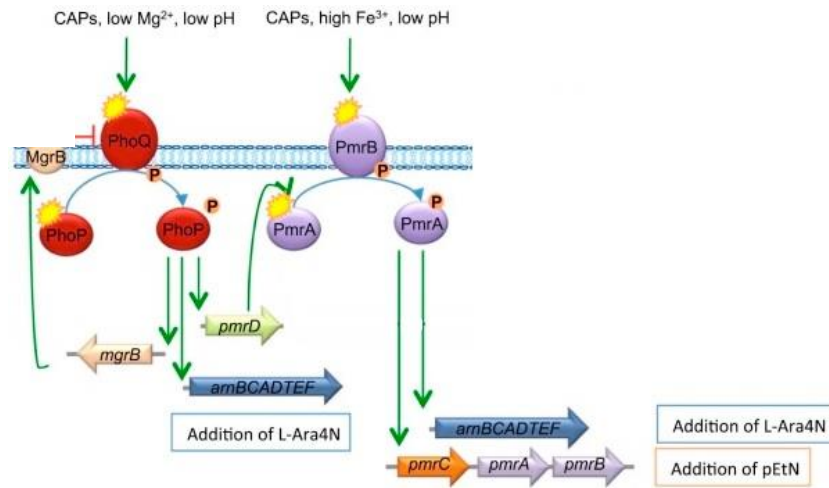


Figure 13 : Représentation des mécanismes impliqués dans la résistance à la colistine d’après Jeannot et coll. (85)

### II.1.1 Étude de *mgrB*

Chez *K. pneumoniae*, *mgrB* est un gène de petite taille composé de 144 paires de bases (pb) (145). Afin de mettre en évidence une éventuelle insertion, les primers ont été définis de part et d’autre de la région codante (figure 25). C’est la raison pour laquelle la taille des amplicons attendue est de 253 paires de bases.

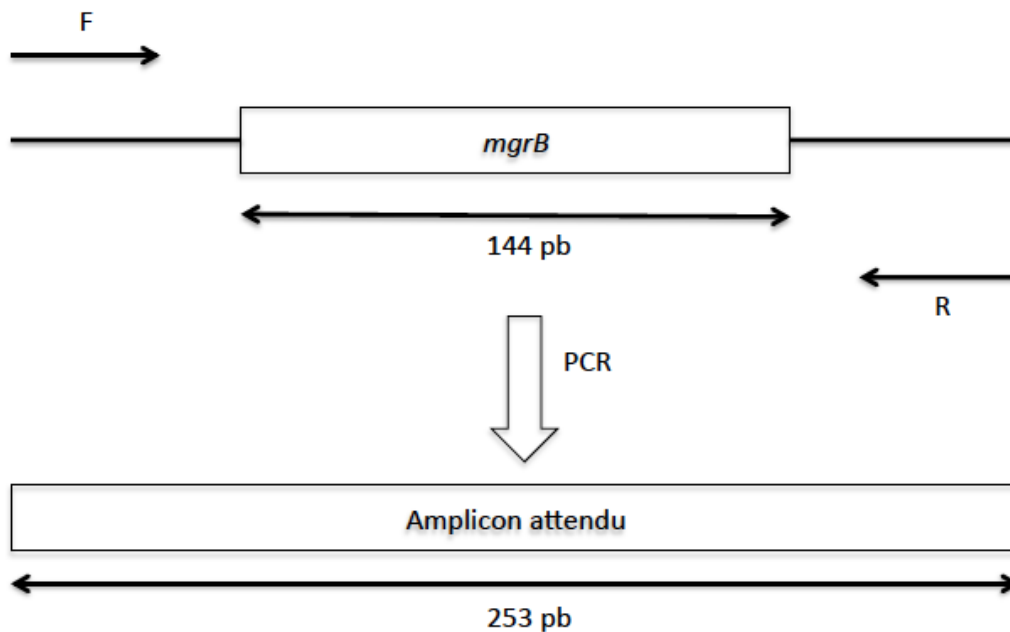


Figure 25 : Schéma récapitulatif du design des amorces de *mgrB* et de la taille de l’amplicon attendu

*mgrB* a été amplifié par qPCR à la fois pour Kp1 et Kp6 et leurs dérivés résistants à la colistine, Kp1m et Kp6m. Les amplicons ont ensuite été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,4% (figure 26).

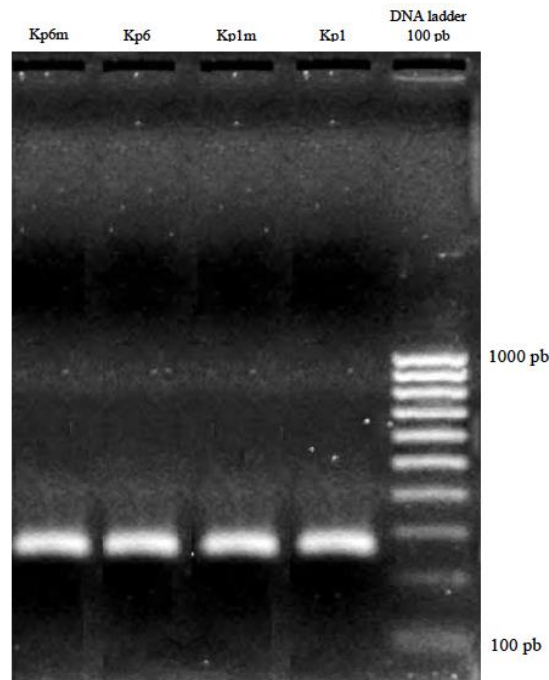


Figure 26 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1,4% des amplicons de *mgrB* pour Kp1, Kp1m, Kp6 et Kp6m

Après migration, nous avons observé que les amplicons de toutes les souches avaient migré au même endroit soit entre 200 et 300 pb correspondant à la taille attendue des amplicons. Par conséquent, nous pouvons conclure que, pour Kp1m et Kp6m, *mgrB* ne présente pas d'insertion IS5-like (~ 1000 pb) telle que définie par Olaitan et coll (145). Ces résultats nous ont permis de conclure que la résistance à la colistine, chez Kp1m et Kp6m, ne résultait pas d'une insertion inactivatrice.

### II.1.2 Étude de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse constitutive du LPS et du groupement L-Ara4N

Lors de l'étude de l'expression des gènes chez Kp1m vs. Kp1, (figure 27a) on constate que l'expression de l'ensemble des gènes impliqués dans la synthèse constitutive du LPS est augmentée. En revanche, l'expression de cinq gènes sur six impliqués dans la synthèse du groupement L-Ara4N sont réprimés, seule l'expression d'*arnT* est augmentée.

Lors de l'étude de l'expression des gènes chez Kp6m vs. Kp6, (figure 27b) on constate que l'expression des gènes impliqués dans la synthèse constitutive ne varie pas.

En revanche, l'expression de l'ensemble des gènes impliqués dans la synthèse du groupement L-Ara4N est augmentée à l'exception de l'expression d'*arnT* qui ne varie pas.

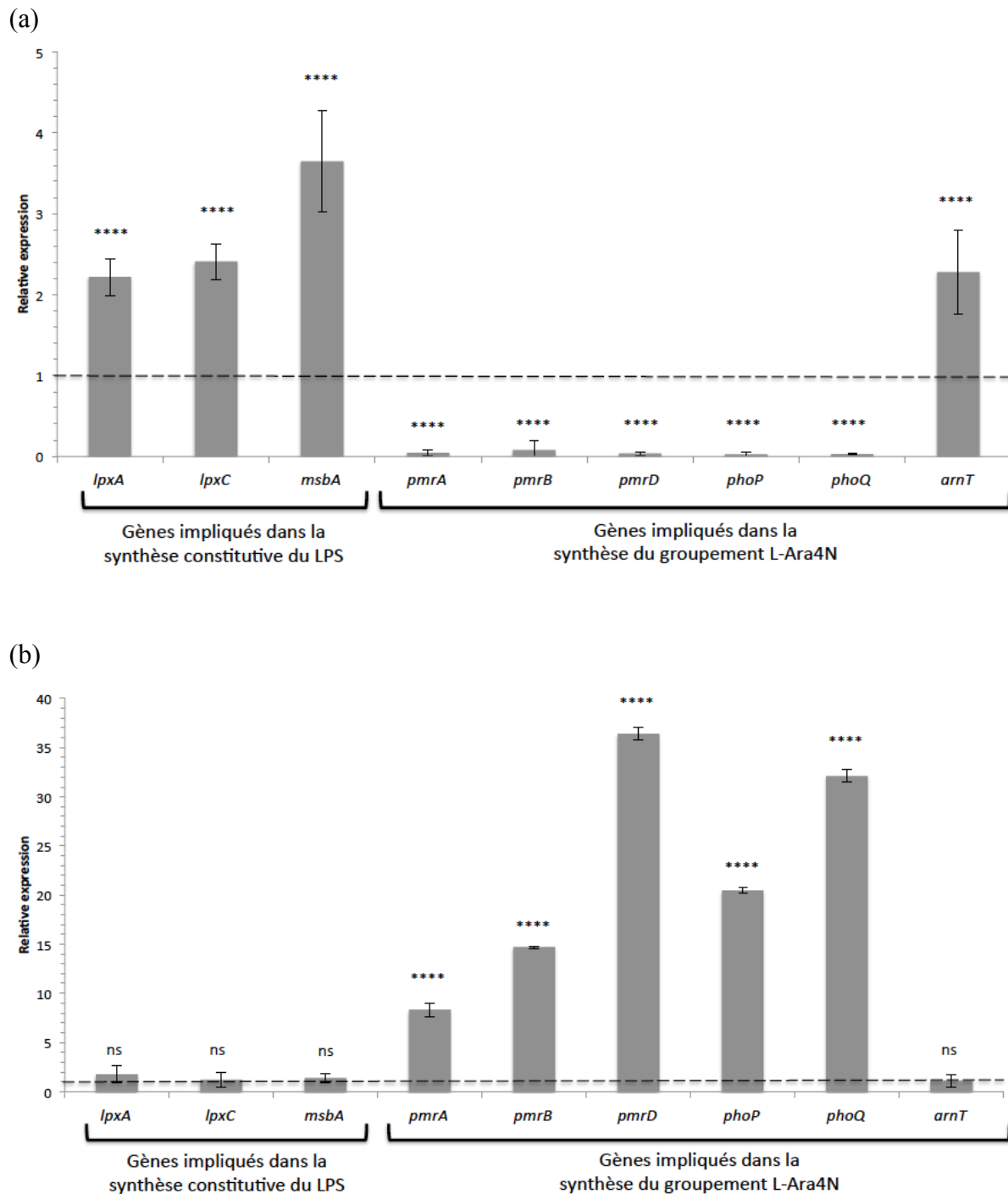


Figure 27 : Étude de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse du LPS et du groupement L-Ara4N (a) Kp1m vs. Kp1, (b) Kp6m vs. Kp6 t-test, \*\*\*\* =  $p < 0,001$ , ns : non significatif ( $p > 0,05$ ),  $n = 3$



Lors de la comparaison des deux mutants Kp1m et Kp6m (tableau VII), on constate que l'expression des gènes impliqués dans la synthèse du groupement L-Ara4N, à l'exception d'*arnT*, est significativement augmentée ( $p < 0,001$ ) chez Kp6m comparé à Kp1m.

Tableau VII : Comparaison de l'expression de l'ensemble des gènes entre Kp1m vs. Kp1 et Kp6m vs. Kp6

		<b>Kp1m vs. Kp1</b>	<b>Kp6m vs. Kp6</b>	<b>Significativité</b>
<b>Synthèse constitutive du LPS</b>	<i>lpxA</i>	2,22 ± 0,23	1,79 ± 0,89	ns
	<i>lpxC</i>	2,41 ± 0,22	1,25 ± 0,74	ns
	<i>msbA</i>	3,65 ± 0,62	1,39 ± 0,50	ns
<b>Synthèse du groupement L-Ara4N</b>	<i>pmrA</i>	0,05 ± 0,04	8,32 ± 0,65	****
	<i>pmrB</i>	0,08 ± 0,11	14,70 ± 0,14	****
	<i>pmrD</i>	0,04 ± 0,02	36,38 ± 0,63	****
	<i>phoP</i>	0,03 ± 0,03	20,47 ± 0,29	****
	<i>phoQ</i>	0,03 ± 0,01	32,11 ± 0,60	****
	<i>arnT</i>	2,28 ± 0,52	1,13 ± 0,65	ns

t-test, \*\*\*\* =  $p < 0,001$  ; ns : non significatif ( $p > 0,05$ ),  $n = 3$

Interprétations des résultats :  $> 1$  : expression augmentée,  $< 1$  : expression diminuée,  $= 1$  : pas de changement

## II.2 Étude de deux facteurs de virulence

Dans cette partie, nous avons voulu étudier si les différences observées au niveau du LPS se retrouvaient au niveau de deux facteurs de virulence, la sensibilité au sérum et la production de biofilm (facteurs pour lesquels le LPS serait impliqué).

### II.2.1 Étude de la sensibilité au sérum

Dans la figure 28a, on n'observe pas de modification significative ( $p > 0,05$ ) du nombre de bactéries entre Kp1-Kp1m et Kp6-Kp6m. Dans le tableau VIII on n'observe pas de modification significative ( $p > 0,05$ ) jusqu'à trois heures d'incubation pour Kp1m, en revanche il y a une modification significative ( $p < 0,05$ ) du nombre de bactéries entre le début de l'expérimentation et la troisième heure pour Kp1. Cependant, pour Kp1 et Kp1m, le pourcentage de survivants reste supérieur à 80% après trois heures d'incubation (figure 28a).

Concernant Kp6 et Kp6m, on observe, dans la figure 28b et le tableau VIII, une modification significative ( $p < 0,001$ ) du nombre de bactéries dès la première heure d'incubation et ce jusqu'à la troisième heure.

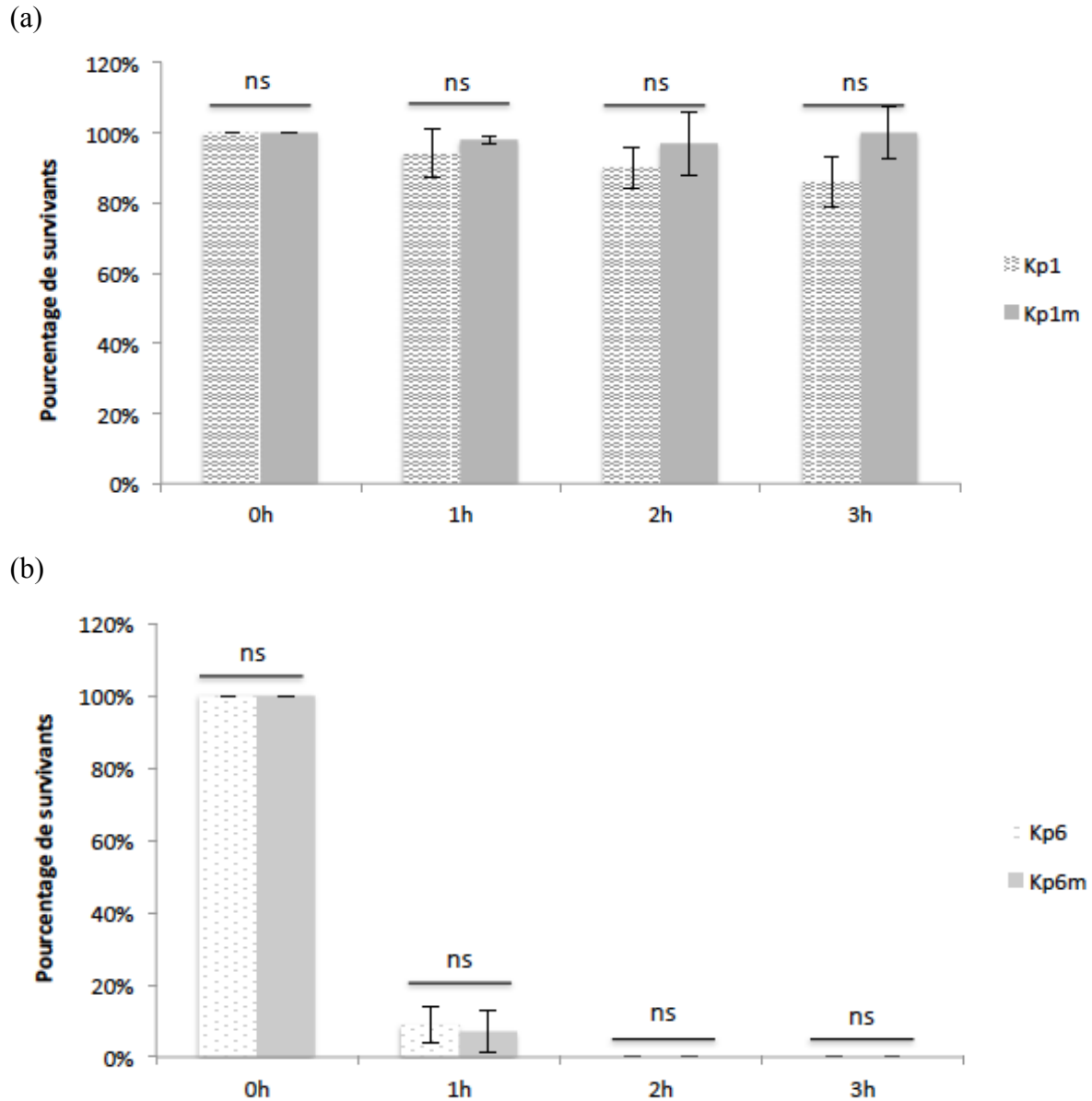


Figure 28 : Étude de la sensibilité au sérum (a) Kp1m vs. Kp1, (b) Kp6m vs. Kp6 ANOVA 2way, ns : non significatif ( $p > 0,05$ ),  $n = 3$

Tableau VIII : Interprétation des résultats obtenus lors de la cinétique de l'étude de la sensibilité au sérum chez Kp1, Kp1m, Kp6 et Kp6m

	Kp1	Kp1m	Kp6	Kp6m
1h vs. 0h	ns	ns	****	****
2h vs. 0h	ns	ns	****	****
3h vs. 0h	*	ns	****	****
1h vs. 2h	ns	ns	ns	ns
1h vs. 3h	ns	ns	ns	ns
2h vs. 3h	ns	ns	ns	ns

ANOVA 2way, \* =  $p < 0,05$  ; \*\*\*\* =  $p < 0,001$  ; ns : non significatif ( $p > 0,05$ ),  $n = 3$

De plus, nous avons constaté que les deux souches sensibles Kp1 et Kp6 se comportaient significativement ( $p < 0,001$ ) différemment à partir d'une heure d'incubation (tableau IX). Les mêmes observations ont été réalisées pour les souches mutantes (tableau IX).

Tableau IX : Comparaison du nombre de survivants aux différents temps étudiés entre les souches sensibles (Kp1 et Kp6) et résistantes (Kp1m et Kp6m)

	Kp1	Kp6	p	Kp1m	Kp6m	p
0h	1,00	1,00	ns	1,00	1,00	ns
1h	0,94 ± 0,07	0,09 ± 0,15	****	0,98 ± 0,01	0,07 ± 0,11	****
2h	0,90 ± 0,06	0,00 ± 0,00	****	0,97 ± 0,09	0,00 ± 0,00	****
3h	0,86 ± 0,07	0,00 ± 0,00	****	1,00 ± 0,04	0,00 ± 0,00	****

t-test, \*\*\*\* =  $p < 0,001$ , ns : non significatif ( $p > 0,05$ ), n = 3

A l'issue de nos expérimentations, nous constatons que Kp1 et Kp1m sont résistantes au sérum alors que Kp6 et Kp6m sont sensibles après culture dans le MHB-CA. De plus, nous pouvons ajouter que les souches mutantes se comportent de la même manière que les souches parentes sensibles.

## II.2.2 Production de biofilm à 24 h

La sensibilité au sérum était un des facteurs de virulence pour lequel le LPS serait impliqué. Après nos observations, un deuxième facteur de virulence a été étudié, la production de biofilm.

Dans la figure 29, nous n'observons pas de production de biofilm significativement différente ( $p > 0,05$ ) entre le mutant et la souche parente sensible (figure 29).

En revanche, la production de biofilm est significativement différente entre les deux couples de bactéries, Kp1 et Kp1m produisant significativement ( $p < 0,001$ ) plus de biofilm que Kp6 et Kp6m (figure 29).

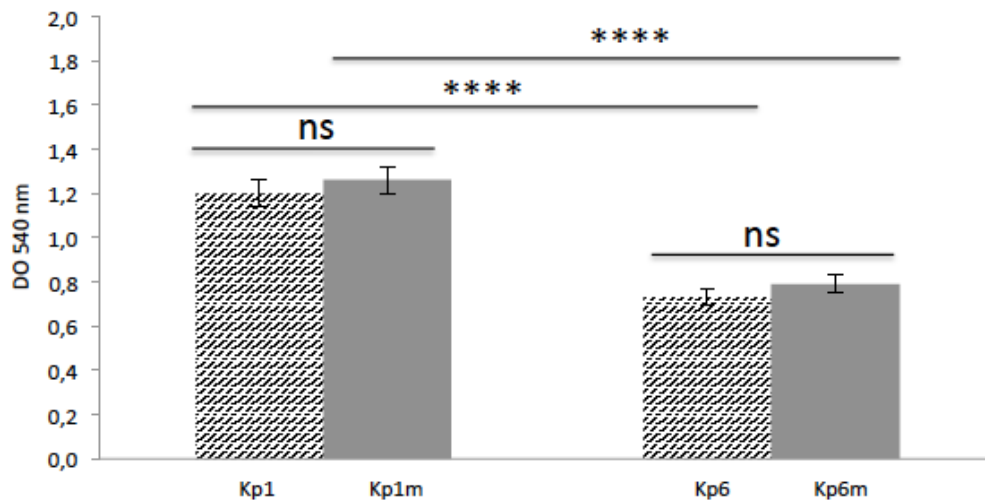


Figure 29 : Étude de la production de biofilm à 24 h chez Kp1, Kp6, Kp1m et Kp6m ANOVA 2way, \*\*\*\* =  $p < 0,001$  ; ns: non significatif ( $p > 0,05$ ),  $n = 3$

Par conséquent, au terme de nos expérimentations, nous constatons une fois de plus que les deux couples de bactéries ne se comportent pas de la même manière, mais que les mutants se comportent de la même manière que les souches parentes sensibles.

### III. Discussion

Ces premières investigations nous ont permis d'explorer le ou les mécanisme(s) de résistance à la colistine et son expression chez quatre souches de *K. pneumoniae*, deux isolats sensibles à la colistine (Kp1 et Kp6) et leurs deux mutants résistants à la colistine sélectionnés *in vitro* (Kp1m et Kp6m).

A l'issue de la première partie des résultats, nos résultats, figure 26, ne montrent pas d'insertion de type IS5-like (~ 1000 pb) telle que définie par Olaitan et coll. au niveau du gène *mgrB* chez Kp1m et Kp6m (145). Ce type de mécanisme ne semble pas être responsable du mécanisme de résistance à la colistine chez ces deux souches. Par conséquent, nous avons choisi d'étudier les gènes impliqués dans la synthèse du groupement L-Ara4N. Nous avons constaté que Kp1m réprimait l'expression de l'ensemble des gènes impliqués dans la synthèse du groupement L-Ara4N, tandis que Kp6m les surexprimait (figure 27 a et b). En revanche, concernant les gènes impliqués dans la synthèse constitutive du LPS, nous avons remarqué que Kp1m les surexprimait alors qu'il n'y avait pas de changement chez Kp6m (figure 27a et b).

Concernant l'étude des facteurs de virulence, on distingue également deux comportements différents. Kp1 et Kp1m sont résistants au sérum alors que Kp6 et Kp6m sont sensibles (figure 28 a et b). De plus, toutes les souches produisent du biofilm, mais Kp1 et Kp1m produisent significativement plus de biofilm que Kp6 et Kp6m (figure 29).

A l'issue de l'analyse génotypique des souches, il semblerait que Kp1m et Kp6m expriment deux mécanismes de résistance à la colistine différents. De plus, il semble que l'addition du groupement L-Ara4N sur le lipide A de Kp6m entraîne une diminution de l'expression des facteurs de virulence étudiés (sensibilité au sérum et production de biofilm). Ces observations corroborent les conclusions de Choi et Ko. En effet, ces auteurs ont constaté que la résistance à la colistine, *via* la surexpression des deux systèmes à deux composants PmrA/PmrB et PhoP/PhoQ, pouvait entraîner une diminution de l'expression du profil de virulence, incluant la résistance au sérum et la production de biofilm (146). En revanche, Choi et Ko. ont observé une différence de comportement au niveau de l'expression des facteurs de virulence entre leur souche sensible et leur souche résistante, ce qui n'est pas le cas dans notre étude. En revanche, nos observations pourraient corroborer les conclusions de Cannatelli et coll. dans la mesure où ces auteurs n'observent pas de différence de comportement entre la souche sensible et la souche résistante si le mécanisme de résistance à la colistine implique une mutation de *pmrB* (147). Nos expérimentations ne nous permettent pas, pour le moment, de conclure vis à vis de ce mécanisme de résistance.

**Chapitre 2**  
**Impact du milieu de culture sur**  
**l'expression de 3 facteurs de virulence**  
**chez *K. pneumoniae***

## I. Contexte

Dans le chapitre précédent, nous avons constaté que les isolats cliniques sensibles à la colistine, Kp1 et Kp6, ainsi que leurs mutants, Kp1m et Kp6m, se comportaient différemment tant au niveau génotypique que phénotypique après culture dans le MHB-CA.

Cependant, dans la littérature, différents milieux de culture tels que le LBB, le MHB et le MHB-CA, sont utilisés afin d'étudier l'expression de gènes impliqués dans la résistance à la colistine (148-150). Alors que le CLSI recommande l'utilisation du MHB-CA pour déterminer les CMI de la colistine, il n'existe aucune recommandation spécifique concernant le milieu à utiliser pour étudier l'expression des gènes impliqués dans le mécanisme de résistance (133).

Par conséquent, l'objectif de ce chapitre a été d'étudier l'impact du milieu de culture sur, l'expression des gènes impliqués dans la synthèse du LPS, la sensibilité au sérum et la production de biofilm. Dans ce chapitre, nous avons considéré le LPS comme un facteur de virulence et plus comme la cible d'action de la colistine. Cependant, il paraît indispensable d'explorer le LPS des souches résistantes à la colistine, car il a été observé que les modifications du lipide A pouvaient affecter directement le potentiel de virulence des souches (ex: changement de la perméabilité membranaire) (151). Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé deux isolats cliniques de *K. pneumoniae*, Kp1 et Kp6, et leurs mutants résistants à la colistine, Kp1m et Kp6m, et trois milieux de culture ont été utilisés (MHB-CA, MHB et LBB).

## II. Résultats

Dans ce chapitre, nous allons confronter les résultats précédemment obtenus dans le MHB-CA (cf. chapitre 1) avec ceux obtenus avec les deux autres milieux, le LBB et le MHB.

### II.1 Détermination des CMI des souches étudiées dans les 3 milieux de culture

Les CMI des quatre souches ont été déterminées dans trois milieux de culture différents (MHB-CA, MHB et LBB), à l'aide de la méthode par microdilution. Quel que soit le milieu de culture utilisé, Kp1 et Kp6 sont sensibles à la colistine (CMI < 1 mg/L) et Kp1m et Kp6m sont résistantes (CMI > 2 mg/L). Néanmoins, si nous observons attentivement ces CMI, nous

pouvons constater une très large gamme de valeurs (tableau X). En effet, des valeurs de CMI plus élevées ont été obtenues lorsque le MHB-CA était utilisé (Kp1m : 64 mg/L, Kp6m : 128 mg/L). Alors que nous avons obtenu des valeurs de CMI relativement «plus faibles», lorsque le MHB était utilisé (8 mg/L pour les deux bactéries). Lorsque le LBB a été utilisé, nous avons obtenu de nouvelles valeurs de CMI très différentes avec 8 mg/L pour Kp1m et 128 mg/L pour Kp6m.

Tableau X : Tableau récapitulatif des valeurs de CMI (mg/L) des quatre souches étudiées dans chaque milieu de culture utilisé

	Kp1	Kp1m	Kp6	Kp6m
<b>MHB-CA</b>	<b>&lt; 1</b>	<b>64</b>	<b>&lt; 1</b>	<b>128</b>
MHB	< 1	8	< 1	8
LBB	< 1	8	< 1	128

## II.2 Détermination des concentrations de fer dans les trois milieux de culture utilisés

Les concentrations en fer ( $\text{Fe}^{3+}$ ) des trois milieux de culture utilisés nous ont paru importantes à déterminer. En effet, comme nous pouvons le constater dans la figure 13, PmrA/PmrB et PhoP/PhoQ sont deux systèmes à deux composants sensibles à leur environnement et plus particulièrement aux concentrations en magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ), en fer ( $\text{Fe}^{3+}$ ) et au pH. La concentration en  $\text{Mg}^{2+}$  et le pH nous ont été donnés par les fournisseurs, cependant la détermination de la concentration en fer des différents milieux n'est pas un facteur limitant à la libération d'un lot. Par conséquent, les concentrations en fer ne sont pas déterminées systématiquement par les fournisseurs. En collaboration avec Pr Hébrant et Mme Genois du Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME), nous avons déterminé les concentrations en fer ( $\text{Fe}^{3+}$ ) des trois milieux liquides. Les analyses ont été réalisées par spectrométrie à plasma couplage inductif avec une détection par spectrométrie d'émission atomique (ICP-AES) sur un ICP Ultima (Jobin-Yvon Horiba). Les résultats sont présentés tableau XI.

Tableau XI : Concentrations en fer ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (mg/L) des trois milieux de culture utilisés

	MHB-CA	MHB	LBB
$\text{Fe}^{3+}$ (mg/L)	<b>0,22</b>	0,27	0,33



### II.3 Étude de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse constitutive du LPS et du groupement L-Ara4N

Les résultats relatifs à l'expression de ces gènes sont présentés figure 30.

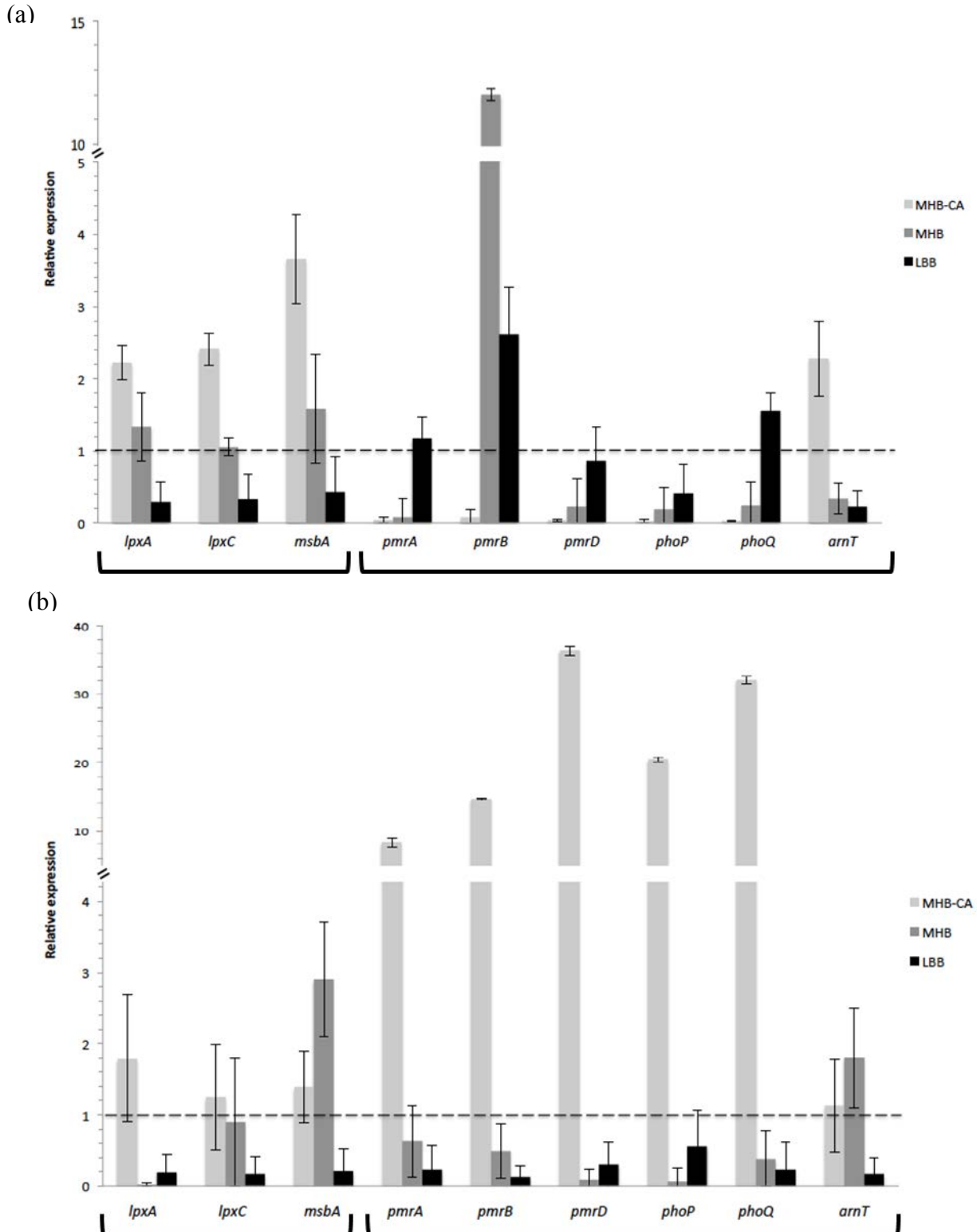


Figure 30 : Suivi de l'expression des gènes chez (a) Kp1m (vs. Kp1), et (b) Kp6m (vs. Kp6), après culture dans le MHB-CA, MHB et le LBB (n=3). Par souci de lisibilité, l'interprétation des résultats est présentée dans le tableau XII ci-dessous.

Tableau XII : Interprétation des résultats obtenus lors de l'étude de l'expression des gènes chez (a) Kp1m (vs. Kp1) et (b) Kp6m (vs. Kp6)

(a)

		MHB-CA vs. MHB	LBB vs. MHB	LBB vs. MHB-CA
<b>Synthèse constitutive du LPS</b>	<i>lpxA</i>	*	**	****
	<i>lpxC</i>	***	ns	****
	<i>msbA</i>	****	**	****
<b>Synthèse du groupement L-Ara4N</b>	<i>pmrA</i>	ns	**	**
	<i>pmrB</i>	****	****	****
	<i>pmrD</i>	ns	ns	*
	<i>phoP</i>	ns	ns	ns
	<i>phoQ</i>	ns	***	****
	<i>arnT</i>	****	ns	****

(b)

		MHB-CA vs. MHB	LBB vs. MHB	LBB vs. MHB-CA
<b>Synthèse constitutive du LPS</b>	<i>lpxA</i>	***	ns	**
	<i>lpxC</i>	ns	ns	*
	<i>msbA</i>	**	****	*
<b>Synthèse du groupement L-Ara4N</b>	<i>pmrA</i>	****	ns	****
	<i>pmrB</i>	****	ns	****
	<i>pmrD</i>	****	ns	****
	<i>phoP</i>	****	ns	****
	<i>phoQ</i>	****	ns	****
	<i>arnT</i>	ns	**	ns

ANOVA 2way, \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,005$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,001$ ; ns: non significatif ( $p > 0,05$ ),  $n = 3$

Lors de l'étude de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse constitutive du LPS chez Kp1m vs. Kp1, nous avons constaté que l'expression de ces gènes était augmentée après culture dans le MHB-CA, ne variait pas après culture dans le MHB et était réprimée après culture dans le LBB (figure 30 et tableau XII). D'autre part, l'expression de la majorité des gènes impliqués dans la synthèse du groupement L-Ara4N était réprimée après culture dans chacun des trois milieux, MHB-CA, MHB et LBB (à l'exception de l'expression de *pmrB* qui était augmentée après culture dans le MHB et le LBB, et pour l'expression d'*arnT* qui était augmentée après culture dans le MHB-CA) (figure 30 et tableau XII).

Tableau XIII : Expression de l'ensemble des gènes étudiés pour Kp1m (vs. Kp1) dans chacun des trois milieux de culture utilisés

		MHB-CA	MHB	LBB
<b>Synthèse constitutive du LPS</b>	<i>lpxA</i>	<b>2,22 ± 0,23</b>	1,33 ± 0,48	0,29 ± 0,28
	<i>lpxC</i>	<b>2,41 ± 0,22</b>	1,05 ± 0,12	0,33 ± 0,35
	<i>msbA</i>	<b>3,65 ± 0,62</b>	1,58 ± 0,75	0,43 ± 0,49
<b>Synthèse du groupement L-Ara4N</b>	<i>pmrA</i>	<b>0,05 ± 0,04</b>	0,08 ± 0,26	1,17 ± 0,29
	<i>pmrB</i>	<b>0,08 ± 0,11</b>	12,01 ± 0,25	2,61 ± 0,65
	<i>pmrD</i>	<b>0,04 ± 0,02</b>	0,23 ± 0,39	0,86 ± 0,47
	<i>phoP</i>	<b>0,03 ± 0,03</b>	0,19 ± 0,61	0,41 ± 0,41
	<i>phoQ</i>	<b>0,03 ± 0,01</b>	0,24 ± 0,63	1,55 ± 0,26
	<i>arnT</i>	<b>2,28 ± 0,52</b>	0,34 ± 0,21	0,23 ± 0,22

Interprétations des résultats : > 1 : expression augmentée, < 1 : expression diminuée, = 1 : pas de changement

Lors de l'étude de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse constitutive du LPS chez Kp6m vs. Kp6, nous avons constaté que l'expression de ces gènes ne variait pas après culture dans le MHB-CA et était réprimée après culture dans le MHB et le LBB, (à l'exception de l'expression de *msbA* après culture dans le MHB) (tableau XIII).

Puis nous nous sommes intéressés aux gènes impliqués dans la synthèse du groupement L-Ara4N. Nous avons constaté que l'expression de ces gènes était augmentée chez Kp6m après culture dans le MHB-CA (à l'exception d'*arnT*). En revanche, l'expression de l'ensemble de ces gènes était réprimée après culture dans le MHB et le LBB (à l'exception d'*arnT* après culture dans le MHB) (tableau XIII).

Tableau XIV : Expression de l'ensemble des gènes étudiés pour Kp6m (vs. Kp6) dans chacun des trois milieux de culture utilisés

		MHB-CA	MHB	LBB
<b>Synthèse constitutive du LPS</b>	<i>lpxA</i>	<b>1,79 ± 0,89</b>	0,02 ± 0,03	0,19 ± 0,25
	<i>lpxC</i>	<b>1,25 ± 0,74</b>	0,90 ± 0,90	0,17 ± 0,24
	<i>msbA</i>	<b>1,39 ± 0,50</b>	2,90 ± 0,80	0,21 ± 0,31
<b>Synthèse du groupement L-Ara4N</b>	<i>pmrA</i>	<b>8,32 ± 0,65</b>	0,63 ± 0,50	0,23 ± 0,35
	<i>pmrB</i>	<b>14,70 ± 0,14</b>	0,49 ± 0,39	0,13 ± 0,16
	<i>pmrD</i>	<b>36,38 ± 0,63</b>	0,09 ± 0,14	0,30 ± 0,32
	<i>phoP</i>	<b>20,47 ± 0,29</b>	0,06 ± 0,19	0,56 ± 0,50
	<i>phoQ</i>	<b>32,11 ± 0,60</b>	0,38 ± 0,39	0,23 ± 0,39
	<i>arnT</i>	<b>1,13 ± 0,65</b>	1,80 ± 0,70	0,17 ± 0,23

Par conséquent, à l'issue de nos expérimentations, nous constatons que l'expression de l'ensemble des gènes varie en fonction du milieu de culture utilisé.

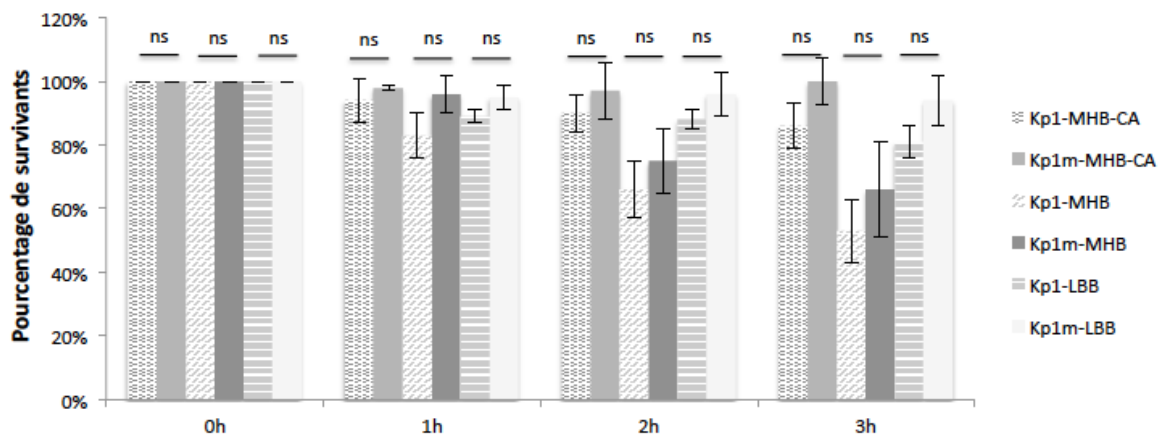
## II.4 Caractérisation phénotypique

### II.4.1 Étude de la sensibilité au sérum

Les résultats obtenus pour l'étude de la sensibilité au sérum pour les souches Kp1-Kp1m et Kp6-Kp6m sont présentés figure 31.

Dans la figure 31a et b, on n'observe pas de modification significative ( $p > 0,05$ ) du nombre de bactéries entre la souche sensible et le mutant (Kp1 vs. Kp1m et Kp6 vs. Kp6m) dans chacun des trois milieux aux quatre temps étudiés.

(a)



(b)

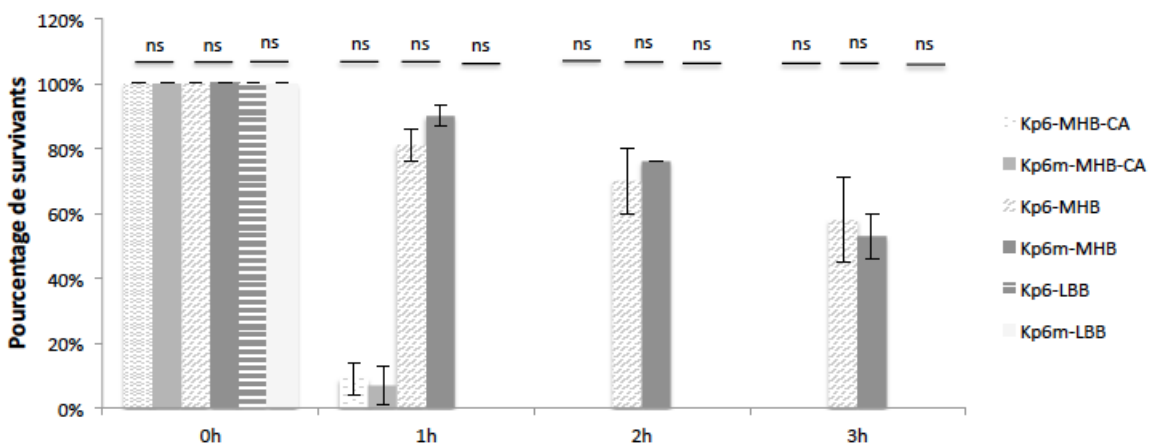


Figure 31 : Étude de la sensibilité au sérum pour Kp1 et Kp1m (a) et pour Kp6 et Kp6m (b) après culture dans chacun des trois milieux (MHB-CA, MHB, et LBB) ANOVA 2way, ns : non significatif ( $p > 0,05$ ),  $n = 3$ . Par souci de lisibilité, l'interprétation des résultats est présentée dans le tableau XV.

Dans la figure 31 et le tableau XV, après culture dans le MHB-CA, la décroissance bactérienne est significative ( $p < 0,05$ ) après trois heures d'incubation pour Kp1. Aucune décroissance significative ( $p > 0,05$ ) n'a été observée pour Kp1m.

Après culture dans le MHB, on constate une diminution significative du nombre de bactéries pour Kp1 ( $p < 0,001$ ) et Kp1m ( $p < 0,01$ ) à partir de deux heures d'incubation. Ce résultat est également observé à trois heures.

Après culture dans le LBB, on observe une diminution significative du nombre de survivants uniquement pour Kp1 à partir d'une heure ( $p < 0,01$ ) d'incubation jusqu'à trois heures ( $p < 0,001$ ).

Concernant Kp6 et Kp6m, on observe une décroissance bactérienne significative ( $p < 0,001$ ) à partir d'une heure d'incubation après culture dans le MHB-CA et le LBB.

Et après culture dans le MHB, la diminution du nombre de survivants est significative ( $p < 0,05$ ) dès la première heure pour Kp6. Ce résultat est maintenu à deux heures ( $p < 0,005$ ) et à trois heures ( $p < 0,001$ ). En revanche, la décroissance est significative ( $p < 0,01$ ) seulement à partir de deux heures pour Kp6m et ce résultat est également observé à trois heures.

Tableau XV: Interprétation des résultats obtenus lors de la cinétique de l'étude de la sensibilité au sérum Kp1, Kp1m, Kp6 et Kp6m

		Kp1	Kp1m	Kp6	Kp6m
MHB-CA	1h vs. 0h	ns	ns	****	****
	2h vs. 0h	ns	ns	****	****
	3h vs. 0h	*	ns	****	****
	1h vs. 2h	ns	ns	ns	ns
	1h vs. 3h	ns	ns	ns	ns
	2h vs. 3h	ns	ns	ns	ns
	MHB	1h vs. 0h	ns	ns	*
2h vs. 0h		****	**	***	**
3h vs. 0h		****	****	****	****
1h vs. 2h		ns	*	ns	ns
1h vs. 3h		***	***	**	****
2h vs. 3h		ns	ns	ns	**
LBB	1h vs. 0h	**	ns	****	****
	2h vs. 0h	***	ns	****	****
	3h vs. 0h	****	ns	****	****
	1h vs. 2h	ns	ns	ns	ns
	1h vs. 3h	*	ns	ns	ns
	2h vs. 3h	ns	ns	ns	ns

ANOVA 2way, \* =  $p < 0, 05$ ; \*\* =  $p < 0, 01$ ; \*\*\* =  $p < 0,005$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,001$ ; ns: non significatif ( $p > 0, 05$ ), n = 3

Dans la figure 31a et le tableau XVIa, on constate une modification significative du nombre de bactéries pour Kp1 et Kp1m, à partir de deux heures d'incubation après culture dans le MHB comparé aux nombres de bactéries après culture dans le MHB-CA et le LBB. Cependant, les pourcentages de survivants dans les trois milieux (MHB-CA, MHB et LBB) restent supérieurs à 50% et 80% respectivement (figure 31a).

De même, pour Kp6 et Kp6m, on constate une modification significative (tableau XVI b) du nombre de bactéries, dès la première heure et ce jusqu'à la troisième heure d'incubation après culture dans le MHB-CA et le LBB comparé aux nombres de bactéries après culture dans le MHB. En effet, pour Kp6 et Kp6m, les pourcentages de survivants sont inférieurs à 10% après une heure et atteignent 0% après deux heures d'incubation pour les deux milieux (MHB-CA et LBB). En revanche, après culture dans le MHB, le pourcentage de survivants reste supérieur à 50% (figure 31b).

Tableau XVI : Interprétation des résultats obtenus lors de la comparaison du nombre de survivants pour les différentes souches entre les milieux de culture utilisés aux différents temps étudiés

(a)

Temps	Comparaisons	Significativité
0h	Ø	Ø
1h	Ø	Ø
2h	Kp1 MHB-CA vs. Kp1 MHB	***
	Kp1m MHB-CA vs. Kp1 MHB	****
	Kp1m MHB-CA vs. Kp1m MHB	**
	Kp1 MHB vs. Kp1 LBB	**
	Kp1 MHB vs. Kp1m LBB	****
	Kp1m MHB vs. Kp1m LBB	**
3h	Kp1 MHB-CA vs. Kp1 MHB	****
	Kp1 MHB-CA vs. Kp1m	**
	Kp1m MHB-CA vs. Kp1 MHB	****
	Kp1m MHB-CA vs. Kp1m MHB	****
	Kp1m MHB-CA vs. Kp1 LBB	**
	Kp1 MHB vs. Kp1 LBB	****
	Kp1 MHB vs. Kp1m LBB	****
	Kp1m MHB vs. Kp1m LBB	****

Tableau XVI suite

(b)

Temps	Comparaisons	Significativité
0h	Ø	Ø
1h	Kp6 MHB-CA vs. Kp6 MHB	****
	Kp6 MHB-CA vs. Kp6m MHB	****
	Kp6m MHB-CA vs. Kp6 MHB	****
	Kp6m MHB-CA vs. Kp6m MHB	****
	Kp6 MHB vs. Kp6 LBB	****
	Kp6 MHB vs. Kp6m LBB	****
	Kp6m MHB vs. Kp6 LBB	****
	Kp6m MHB vs. Kp6m LBB	****
2h	Kp6 MHB-CA vs. Kp6 MHB	****
	Kp6 MHB-CA vs. Kp6m MHB	****
	Kp6m MHB-CA vs. Kp6 MHB	****
	Kp6m MHB-CA vs. Kp6m MHB	****
	Kp6 MHB vs. Kp6 LBB	****
	Kp6 MHB vs. Kp6m LBB	****
	Kp6m MHB vs. Kp6 LBB	****
	Kp6m MHB vs. Kp6m LBB	****
3h	Kp6 MHB-CA vs. Kp6 MHB	****
	Kp6 MHB-CA vs. Kp6m MHB	****
	Kp6m MHB-CA vs. Kp6 MHB	****
	Kp6m MHB-CA vs. Kp6m MHB	****
	Kp6 MHB vs. Kp6 LBB	****
	Kp6 MHB vs. Kp6m LBB	****
	Kp6m MHB vs. Kp6 LBB	****
	Kp6m MHB vs. Kp6m LBB	****

ANOVA 2way, \*\* =  $p < 0,01$  ; \*\*\* =  $p < 0,005$  ; \*\*\*\* =  $p < 0,001$  ; ns : non significatif ( $p > 0,05$ ), n = 3

De plus, dans le tableau XVII, nous avons constaté que les deux souches sensibles Kp1 et Kp6 se comportaient significativement ( $p < 0,001$ ) différemment à partir d'une heure d'incubation dans le MHB-CA et le LBB. En revanche aucune différence significative ( $p > 0,05$ ) n'a été observée dans le MHB. Les mêmes observations ont été réalisées pour Kp1m et Kp6m.

Tableau XVII : Comparaison du nombre de survivants entre les souches sensibles (Kp1 et Kp6) et les mutants (Kp1m et Kp6m) aux différents temps étudiés dans chacun des trois milieux

		Kp1	Kp6	p	Kp1m	Kp6m	p
MHB-CA	0h	<b>1,00 ± 0,05</b>	<b>1,00 ± 0,05</b>	ns	<b>1,00 ± 0,05</b>	<b>1,00 ± 0,05</b>	ns
	1h	<b>0,94 ± 0,07</b>	<b>0,09 ± 0,15</b>	****	<b>0,98 ± 0,01</b>	<b>0,07 ± 0,11</b>	****
	2h	<b>0,90 ± 0,06</b>	<b>0,00 ± 0,00</b>	****	<b>0,97 ± 0,09</b>	<b>0,00 ± 0,00</b>	****
	3h	<b>0,86 ± 0,07</b>	<b>0,00 ± 0,00</b>	****	<b>1,00 ± 0,04</b>	<b>0,00 ± 0,00</b>	****
MHB	0h	1,00 ± 0,05	1,00 ± 0,05	ns	1,00 ± 0,05	1,00 ± 0,05	ns
	1h	0,83 ± 0,07	0,81 ± 0,05	ns	0,95 ± 0,06	0,90 ± 0,03	ns
	2h	0,66 ± 0,09	0,69 ± 0,15	ns	0,75 ± 0,10	0,76 ± 0,02	ns
	3h	0,53 ± 0,10	0,58 ± 0,13	ns	0,66 ± 0,15	0,53 ± 0,07	ns
LBB	0h	1,00 ± 0,05	1,00 ± 0,05	ns	1,00 ± 0,05	1,00 ± 0,05	ns
	1h	0,89 ± 0,02	0,00 ± 0,00	****	0,95 ± 0,04	0,00 ± 0,00	****
	2h	0,88 ± 0,03	0,00 ± 0,00	****	0,96 ± 0,07	0,00 ± 0,00	****
	3h	0,81 ± 0,05	0,00 ± 0,00	****	0,94 ± 0,08	0,00 ± 0,00	****

t-test, \*\*\*\* =  $p < 0,001$ , ns: non significatif ( $p > 0,05$ ),  $n = 3$

Par conséquent, à l'issue de nos expérimentations, il apparaît que Kp1 et Kp1m sont résistantes au sérum quel que soit le milieu de culture utilisé. En revanche, il semble que le résultat soit moins évident pour Kp6 et Kp6m, car après culture dans le MHB, les deux souches semblent résistantes au sérum alors qu'elles apparaissent sensibles après culture dans le MHB-CA ou le LBB. De plus, nous observons également que le mutant se comporte de la même manière que la souche parente sensible quel que soit le milieu de culture utilisé.

#### II.4.2 Évaluation de la production de biofilm à 24 h

Les résultats relatifs à l'évaluation de la production de biofilm sont présents figure 32.

En effet, dans la figure 32a, on observe que Kp1m produit significativement ( $p < 0,005$ ) plus de biofilm comparé à Kp1 dans le MHB. Dans le MHB-CA, il n'y a pas de différence significative entre Kp1 et Kp1m ( $p > 0,05$ ) et dans le LBB, Kp1 produit significativement ( $p < 0,001$ ) plus de biofilm comparé à Kp1m.

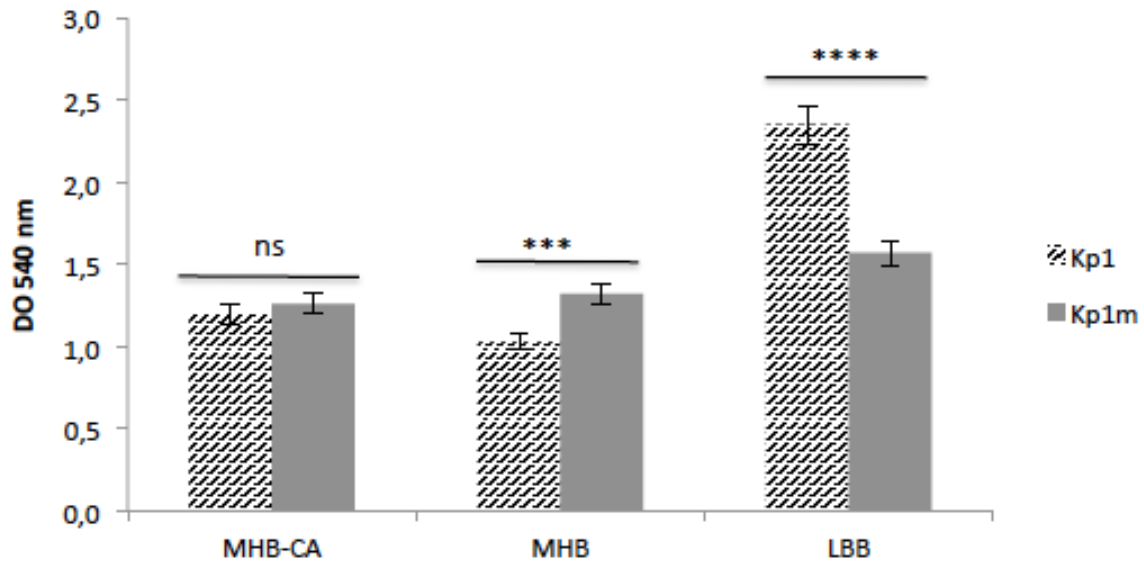
Dans la figure 32a et le tableau XVIII, on constate que Kp1 et Kp1m produisent significativement plus de biofilm dans LBB que dans le MHB et le MHB-CA.



Dans la figure 32b, on peut noter l'absence de différence significative ( $p > 0,05$ ) de production de biofilm entre Kp6 et Kp6m dans les trois milieux de cultures étudiés. De plus, on constate que Kp6 et Kp6m produisent significativement ( $p < 0,001$ ) plus de biofilm dans le MHB comparé à leur production dans le MHB-CA et le LBB.

Dans la figure 32b et dans le tableau XVIII, on observe que Kp6 et Kp6m produisent significativement plus de biofilm dans le MHB (vs. MHB-CA et LBB). De plus, contrairement à Kp1 et Kp1m, le LBB est le milieu pour lequel Kp6 et Kp6m produisent significativement ( $p < 0,001$ ) moins de biofilm.

(a)



(b)

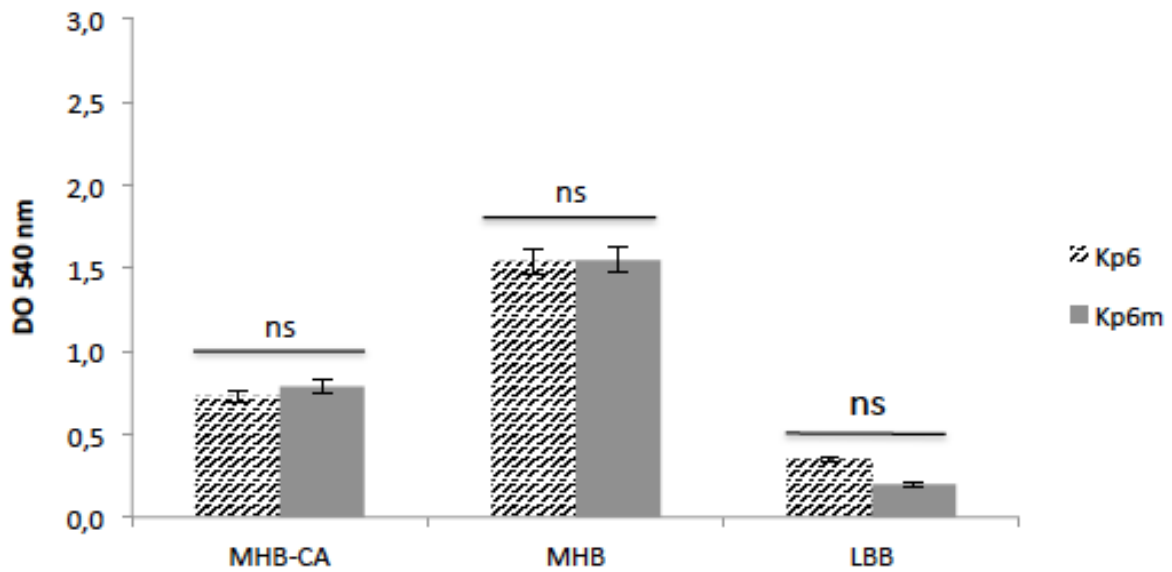


Figure 32 : Évaluation de la production de biofilm à 24 h pour Kp1 et Kp1m (a) et Kp6 et Kp6m (b) après culture dans chacun des trois milieux (MHB-CA, MHB et LBB) ANOVA 2way. \*\*\*,  $p < 0,005$ ; \*\*\*\*,  $p < 0, 01$ ; ns: non significatif ( $p > 0, 05$ ),  $n = 3$

Tableau XVIII : Tableau récapitulatif de la significativité des résultats obtenus lors de l'évaluation de la production de biofilm à 24 h pour Kp1, Kp1m, Kp6 et Kp6m

Souche	Comparaison milieux	Significativité
Kp1	MHB-CA vs. MHB	*
	MHB-CA vs. LBB	****
	MHB vs. LBB	****
Kp1m	MHB-CA vs. MHB	ns
	MHB-CA vs. LBB	****
	MHB vs. LBB	***
Kp6	MHB-CA vs. MHB	****
	MHB-CA vs. LBB	****
	MHB vs. LBB	****
Kp6m	MHB-CA vs. MHB	****
	MHB-CA vs. LBB	****
	MHB vs. LBB	****

ANOVA 2way, \*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,005$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,001$ ; ns: non significatif ( $p > 0,05$ ),  $n = 3$

A l'issue de nos expérimentations, nous constatons que les deux couples de bactéries se comportent différemment en fonction des milieux. De plus, nous observons que les mutants ne se comportent pas de la même manière que les souches sensibles (exemple : LBB) contrairement à ce que nous avons observé jusqu'à présent (Cf. Résultats Chapitre 1).

### III. Discussion

L'addition du groupement L-Ara4N sur le lipide A est le principal mécanisme de résistance à la colistine mis en évidence chez *K. pneumoniae* (145). De plus, grâce aux résultats précédemment obtenus dans le chapitre 1, il ne semble pas y avoir d'insertion de type IS5-like telle que définie par Olaitan et coll. au niveau de *mgrB* chez Kp1m et Kp6m (145). Ce type de mécanisme ne semble pas être responsable du mécanisme de résistance à la colistine chez ces deux souches, mais il serait intéressant d'étudier l'expression de ce gène et/ou de le séquencer. Par conséquent, nous avons choisi d'étudier les gènes impliqués dans la synthèse du groupement L-Ara4N, gènes sensibles à leur environnement (ex:  $Fe^{3+}$ ,  $Mg^{2+}$ ) (76,89,152).

Pour Kp1m, figure 30a, l'expression des gènes impliqués dans la synthèse du LPS (*lpxA*, *lpxC* et *msbA*) varie en fonction du milieu utilisé. En revanche, l'expression des gènes impliqués dans la synthèse du groupement L-Ara4N est diminuée dans les trois milieux, à l'exception de l'expression de *pmrB* qui est augmentée après culture dans le MHB ou le LBB, et *arnT* après culture dans le MHB-CA.

Concernant Kp6m, figure 30b, l'expression des gènes impliqués dans la synthèse du LPS (*lpxA*, *lpxC* et *msbA*) varie en fonction du milieu utilisé et l'expression des gènes impliqués dans la synthèse du groupement L-Ara4N est augmentée après culture dans le MHB-CA et, réprimée après culture dans le MHB ou le LBB.

Afin de s'affranchir de toutes variations d'expression dues aux concentrations de magnésium ( $Mg^{2+}$ ) ou de fer ( $Fe^{3+}$ ) présentes dans les trois milieux de culture, les concentrations de ces cations ont été déterminées en collaboration avec Pr. Hébrant et Mme Genois du LCPME. Les résultats sont présentés dans le tableau XI. Après détermination de ces concentrations, nous pouvons conclure que les variations d'expression ne sont pas dues aux concentrations de ces cations. En effet, d'après Mitrophanov et coll. les concentrations de  $Mg^{2+}$ , supérieures à 10  $\mu M$ , sont trop élevées pour activer directement PhoP/PhoQ et les concentrations de  $Fe^{3+}$ , inférieures à 100  $\mu M$ , sont trop faibles pour activer directement PmrA/PmrB (89). Il semble exister d'autres facteurs entraînant une modification de l'expression des gènes (ex : autres composants du milieu de culture, origine des souches). En effet, Llobet et coll. ont montré que les modifications du lipide A pouvaient être fonction du site de l'infection (153). En accord avec nos résultats, il semblerait que l'origine des souches (Kp1 : prélèvement bronchique, et Kp6 : hémoculture) influence l'expression du LPS. De plus, les souches peuvent également adapter l'expression du LPS en fonction de leur environnement. En conclusion, ces premiers résultats permettent de mettre en évidence l'impact du milieu de culture sur l'expression du LPS. Par la suite, il nous a semblé intéressant de combiner l'étude de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse du LPS avec l'expression de deux facteurs de virulence impliquant le LPS (sensibilité au sérum et production de biofilm).

Quel que soit le milieu de culture utilisé, Kp1 et Kp1m sont résistants au sérum, alors que Kp6 et Kp6m sont sensibles au sérum après culture dans le MHB-CA et le LBB, et résistants après culture dans le MHB (figure 31 a et b).

Concernant la production de biofilm, Kp6 et Kp6m produisent significativement plus de biofilm dans le MHB-CA que dans le MHB. Le LBB est le milieu dans lequel Kp6 et Kp6m produisent le moins de biofilm. En revanche, la différence est moins marquée pour Kp1 et Kp1m, mais Kp1m produit significativement plus de biofilm dans le LBB (vs. MHB-CA et MHB) (figure 32 a et b).

En conclusion, à travers l'étude de ces trois facteurs de virulence, nous pouvons conclure que le milieu de culture influence le potentiel de virulence de ces souches. De plus, ces résultats semblent indiquer qu'*in vitro*, le profil de résistance à la colistine influence le profil de

virulence des souches. Et ces différences, entre le profil de virulence et le profil de résistance à la colistine, pourraient dépendre du milieu de culture et/ou de l'origine des souches.

Pour la suite de nos expérimentations, et à cause des recommandations du CLSI pour la détermination des CMI à la colistine, nous avons choisi d'utiliser le MHB-CA.

**Chapitre 3**  
**Résistance adaptative chez**  
***K. pneumoniae***

## I. Contexte

Dans le chapitre précédent, nous avons constaté que le milieu de culture pouvait influencer le profil de virulence (synthèse du LPS, production de biofilm, sensibilité au sérum) des souches de *K. pneumoniae* étudiées.

Dans ce chapitre, nous avons choisi d'étudier l'impact de la colistine, à des concentrations subinhibitrices, sur les mutants résistants à la colistine. En effet, le mécanisme de résistance à la colistine est un mécanisme complexe et incomplètement élucidé. Cependant certains auteurs ont pensé que le ou un des mécanismes de résistance à la colistine est un mécanisme adaptatif. En effet, Antoniadou et coll. ont constaté l'apparition de souches résistantes après un traitement prolongé (8). De plus, d'autres auteurs, ont montré que l'administration intraveineuse de colistine à des concentrations plasmatiques suboptimales, pouvait entraîner à la fois le développement de mécanismes de résistance et une mortalité accrue (78, 79, 154). Par conséquent, l'objectif de ce chapitre a été d'étudier l'impact de la colistine, à des concentrations subinhibitrices/suboptimales, sur le LPS et l'expression de 3 facteurs de virulence (la sensibilité au sérum, la production de biofilm, et la capsule) afin d'explorer le caractère adaptatif de ce mécanisme. Pour atteindre nos objectifs, nous avons utilisé deux isolats cliniques de *K. pneumoniae*, Kp1 et Kp6 et leurs mutants résistants à la colistine, Kp1m et Kp6m, ainsi que ces mutants après culture en présence de colistine (1/4 ou 1/2 de la CMI) Kp1mc<sub>x</sub> et Kp6mc<sub>x</sub>. KpATCC 700603 a également été inclus, son mutant KpATCCm et le mutant après culture en présence de colistine KpATCCmc<sub>x</sub>. Le milieu utilisé est le MHB-CA.

## II. Résultats

Les comparaisons entre les souches sensibles et mutantes étant réalisées dans les chapitres précédents ne seront pas refaites dans ce chapitre.

**II.1 Partie I : Impact de la colistine sur l'expression du LPS et de 2 facteurs de virulence**

**II.1.1 Étude de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse du LPS en présence de deux concentrations de colistine**

Les résultats relatifs à l'expression de ces gènes sont présentés tableau XIX.

Lors de l'étude de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse constitutive du LPS chez Kp1mc<sub>x</sub> vs. Kp1m, nous avons constaté que l'expression de l'ensemble des gènes était réprimée en présence de colistine (1/4 ou 1/2 de la CMI) (tableau XIX a). Les mêmes observations ont été réalisées pour Kp6mc<sub>x</sub> vs. Kp6m en présence des deux concentrations de colistine (1/4 ou 1/2 de la CMI) (tableau XIX b). D'autre part, dans le tableau XX, on constate que quel que soit la concentration de colistine utilisée, l'expression de l'ensemble des gènes est diminuée.

Tableau XIX : Comparaison de l'expression de l'ensemble des gènes chez (a) Kp1mc<sub>x</sub> vs. Kp1m et (b) Kp6mc<sub>x</sub> vs. Kp6m

(a)

		Kp1mc <sub>1/4</sub> vs. Kp1m	Significativité	Kp1mc <sub>1/2</sub> vs. Kp1m	Significativité
<b>Synthèse constitutive du LPS</b>	<i>lpxA</i>	0,06 ± 0,33	****	0,21 ± 2,17	ns
	<i>lpxC</i>	0,04 ± 0,30	****	0,14 ± 1,73	ns
	<i>msbA</i>	0,02 ± 0,06	****	0,01 ± 0,12	***
<b>Synthèse du groupement L-Ara4N</b>	<i>pmrA</i>	0,06 ± 0,06	****	0,01 ± 0,01	****
	<i>pmrB</i>	0,01 ± 0,01	****	0,01 ± 0,01	****
	<i>pmrD</i>	0,06 ± 0,06	****	0,01 ± 0,01	****
	<i>phoP</i>	0,06 ± 0,06	****	0,01 ± 0,01	****
	<i>phoQ</i>	0,05 ± 0,07	****	0,01 ± 0,01	****
	<i>arnT</i>	0,08 ± 0,45	****	0,22 ± 0,08	***

(b)

		Kp6mc <sub>1/4</sub> vs. Kp6m	Significativité	Kp6mc <sub>1/2</sub> vs. Kp6m	Significativité
<b>Synthèse constitutive du LPS</b>	<i>lpxA</i>	0,01 ± 0,01	****	0,01 ± 0,01	****
	<i>lpxC</i>	0,01 ± 0,01	****	0,01 ± 0,01	****
	<i>msbA</i>	0,00 ± 0,01	****	0,01 ± 0,01	****
<b>Synthèse du groupement L-Ara4N</b>	<i>pmrA</i>	0,00 ± 0,00	****	0,01 ± 10 <sup>-5</sup>	****
	<i>pmrB</i>	0,00 ± 0,00	****	0,00 ± 0,00	****
	<i>pmrD</i>	0,01 ± 10 <sup>-5</sup>	****	0,01 ± 10 <sup>-6</sup>	****
	<i>phoP</i>	0,01 ± 10 <sup>-4</sup>	****	0,01 ± 10 <sup>-5</sup>	****
	<i>phoQ</i>	0,00 ± 10 <sup>-5</sup>	****	0,01 ± 10 <sup>-3</sup>	****
	<i>arnT</i>	0,01 ± 0,02	****	0,01 ± 0,01	****

t-test, \*\*\* = p < 0,005 ; \*\*\*\* = p < 0,001 ; ns : non significatif (p > 0,05), n = 3



Tableau XX : Suivi de l'expression de l'ensemble des gènes chez (a) Kp1mc<sub>x</sub> (vs. Kp1m) et (b) Kp6mc<sub>x</sub> (vs. Kp6m)

(a)

		Kp1mc <sub>1/4</sub> (vs. Kp1m)	Kp1mc <sub>1/2</sub> (vs. Kp1m)	Significativité
<b>Synthèse constitutive du LPS</b>	<i>lpxA</i>	0,06 ± 0,33	0,21 ± 2,17	ns
	<i>lpxC</i>	0,04 ± 0,30	0,14 ± 1,73	ns
	<i>msbA</i>	0,02 ± 0,06	0,01 ± 0,12	ns
<b>Synthèse du groupement L-Ara4N</b>	<i>pmrA</i>	0,06 ± 0,06	0,01 ± 0,01	ns
	<i>pmrB</i>	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	ns
	<i>pmrD</i>	0,06 ± 0,06	0,01 ± 0,01	ns
	<i>phoP</i>	0,06 ± 0,06	0,01 ± 0,01	ns
	<i>phoQ</i>	0,05 ± 0,07	0,01 ± 0,01	ns
	<i>arnT</i>	0,08 ± 0,45	0,22 ± 0,08	ns

t-test, ns : non significatif (p &gt; 0,05), n = 3

(b)

		Kp6mc <sub>1/4</sub> (vs. Kp6m)	Kp6mc <sub>1/2</sub> (vs. Kp6m)	Significativité
<b>Synthèse constitutive du LPS</b>	<i>lpxA</i>	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	ns
	<i>lpxC</i>	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	ns
	<i>msbA</i>	0,00 ± 0,01	0,01 ± 0,01	ns
<b>Synthèse du groupement L-Ara4N</b>	<i>pmrA</i>	0,00 ± 0,00	0,01 ± 10 <sup>-5</sup>	ns
	<i>pmrB</i>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	ns
	<i>pmrD</i>	0,01 ± 0,01	0,01 ± 10 <sup>-4</sup>	ns
	<i>phoP</i>	0,01 ± 10 <sup>-5</sup>	0,01 ± 0,01	ns
	<i>phoQ</i>	0,00 ± 10 <sup>-3</sup>	0,01 ± 10 <sup>-5</sup>	ns
	<i>arnT</i>	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,01	ns

t-test, ns : non significatif (p &gt; 0,05), n = 3

Interprétations des résultats : &gt; 1 : expression augmentée, &lt; 1 : expression diminuée, = 1 : pas de changement

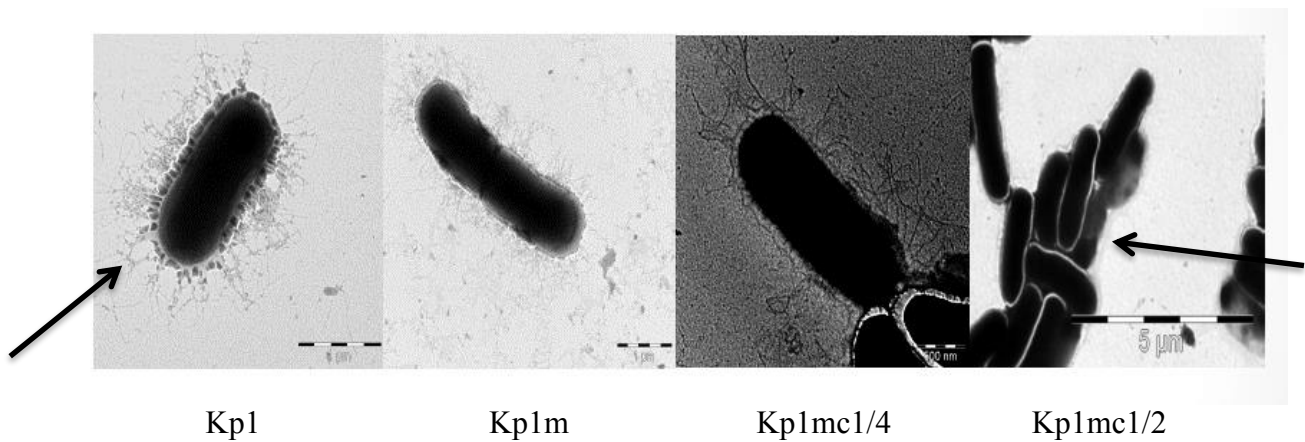
### II.1.2 Observations morphologiques des souches de *K. pneumoniae* précédemment étudiées par microscopie à contraste négatif

A l'issue de cette première partie, nous avons constaté que quel que soit la concentration de colistine utilisée, l'expression de l'ensemble des gènes était réprimée pour les deux mutants. Dans cette partie, nous avons voulu observer les conséquences morphologiques par microscopie à contraste négatif.

La paroi des BGN est une structure complexe composée de nombreux composants dont le LPS. Sur ces images, il est difficile d'observer distinctement le LPS à la surface de ces bacilles. Cependant, nous pouvons supposer que le LPS appartient à ce halo qui entoure aussi bien les souches sensibles (Kp1 et Kp6) que les souches résistantes (Kp1m et Kp6m) (figure 33 a et b). Par conséquent, même s'il est difficile de distinguer le LPS, nous pouvons affirmer, grâce à ces images, que la présence de colistine dans le milieu de culture entraîne

une diminution de ce halo (figure 33 a et b) et, donc certainement une diminution voire une absence de LPS, sous sa forme originelle, à la surface de la bactérie. Par conséquent, ces observations microscopiques semblent confirmer les conclusions obtenues lors de l'étude de l'expression des gènes.

(a)



(b)

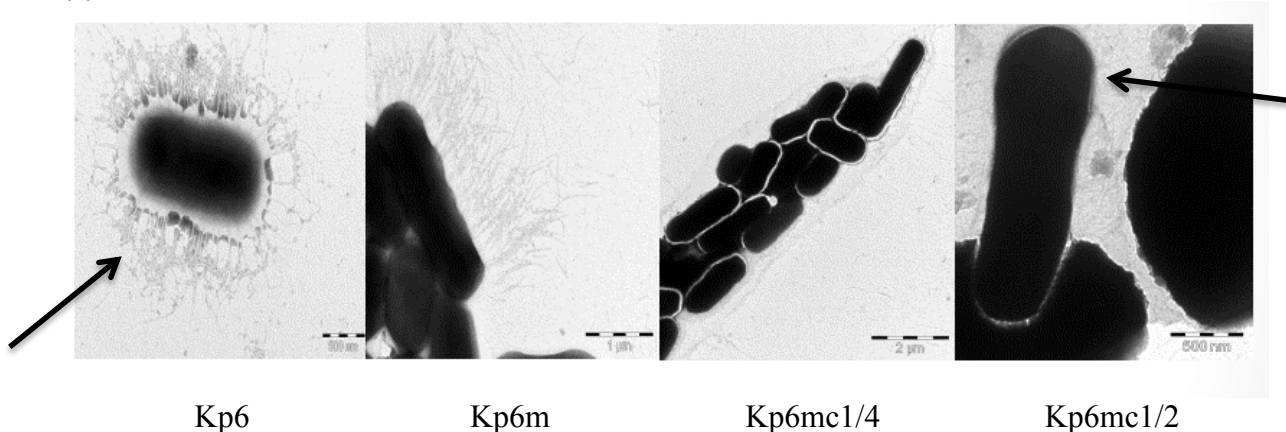


Figure 33 : Observations morphologiques de quatre souches de *K. pneumoniae* en présence de différentes concentrations en colistine par microscopie à contraste négatif

### II.1.3 Étude de la sensibilité au sérum

Dans la figure 34a, on n'observe pas de modification significative ( $p > 0,05$ ) du nombre de bactéries entre Kp1m et Kp1mc<sub>1/4</sub> après une et deux heures d'incubation. En revanche, après trois heures d'incubation, on note une diminution significative ( $p < 0,005$ ) du nombre de survivants entre Kp1mc<sub>1/4</sub> et Kp1m.

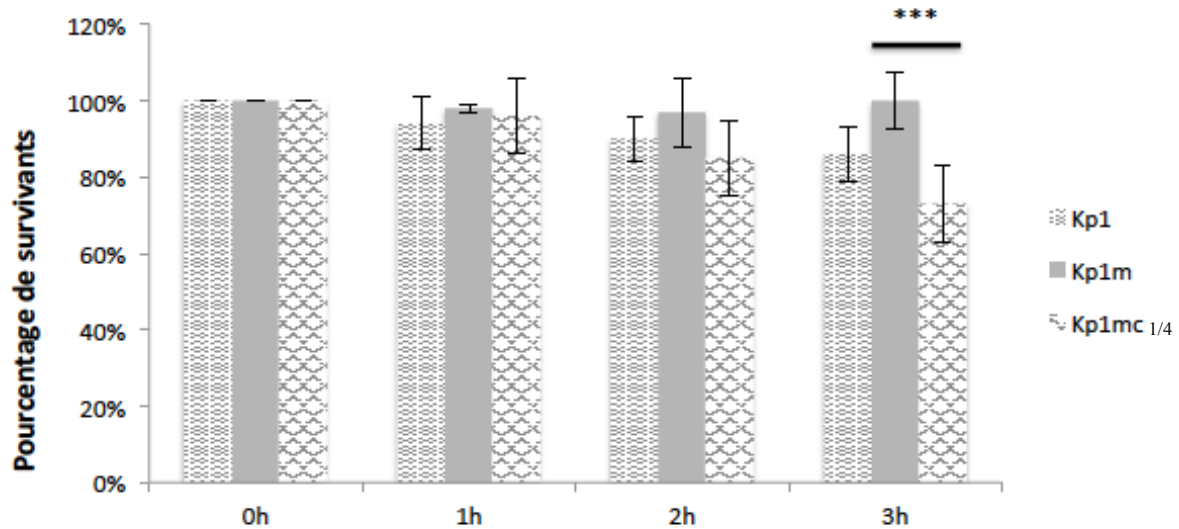
De plus, au cours de l'expérimentation, on constate que la décroissance bactérienne de Kp1mc<sub>1/4</sub> devient significative ( $p < 0,05$ ) à partir de deux heures et le reste à trois heures ( $p < 0,001$ ). Ces résultats diffèrent de ceux observés pour Kp1m pour laquelle aucune décroissance significative ( $p > 0,05$ ) n'est observée (tableau XXI).

Dans la figure 34b, on n’observe pas de décroissance bactérienne significative ( $p > 0,05$ ) entre Kp6m et Kp6mc<sub>1/2</sub>.

Pour Kp6mc<sub>1/2</sub>, on constate une diminution significative ( $p < 0,001$ ) du nombre de bactéries dès la première heure et ce jusqu’à la troisième heure d’incubation (tableau XXI).

De même que pour Kp6m, le pourcentage de survivants pour Kp6mc<sub>1/2</sub> est inférieur à 10% après une heure et atteint 0% après deux heures d’incubation (figure 34b).

(a)



(b)

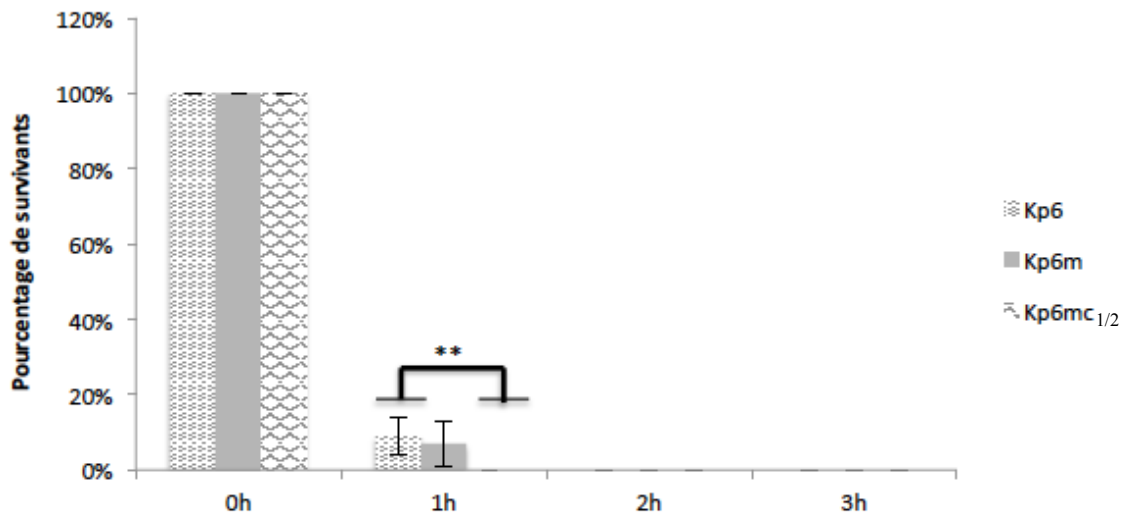


Figure 34 : Étude de la sensibilité au sérum pour Kp1, Kp1m et Kp1mc<sub>1/4</sub> (a) et pour Kp6, Kp6m et Kp6mc<sub>1/2</sub> (b). Seuls les résultats significatifs sont représentés sur ces graphes. ANOVA 2way, \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,005$ , ns : non significatif ( $p > 0,05$ ), n = 3

Tableau XXI : Interprétation des résultats obtenus lors de la cinétique de l'étude de la sensibilité au sérum chez Kp1, Kp1m, Kp1mc<sub>1/4</sub> et Kp6, Kp6m, Kp6mc<sub>1/2</sub>

	Kp1	Kp1m	Kp1mc <sub>1/4</sub>	Kp6	Kp6m	Kp6mc <sub>1/2</sub>
1h vs. 0h	ns	ns	ns	****	****	****
2h vs. 0h	ns	ns	*	****	****	****
3h vs. 0h	*	ns	****	****	****	****
2h vs. 1h	ns	ns	ns	ns	ns	ns
3h vs. 1h	ns	ns	***	ns	ns	ns
3h vs. 2h	ns	ns	ns	ns	ns	ns

ANOVA 2way, \* = p < 0, 05; \*\*\* = p < 0,005; \*\*\*\* = p < 0,001, ns: non significatif (p > 0, 05), n = 3

A l'issue de nos expérimentations, on constate que Kp1mc<sub>1/4</sub> et Kp6mc<sub>1/2</sub> se comportent différemment. Cependant, elles se comportent de la même manière que les souches mutantes. Par conséquent, Kp1mc<sub>1/4</sub> apparaît résistante au sérum et Kp6mc<sub>1/2</sub> sensible.

#### II.1.4 Production de biofilm à 24 h

Dans la figure 35, on observe que Kp1mc<sub>1/4</sub> et Kp6mc<sub>1/2</sub> produisent significativement plus de biofilm comparé aux souches mutantes, Kp1m et Kp6m.

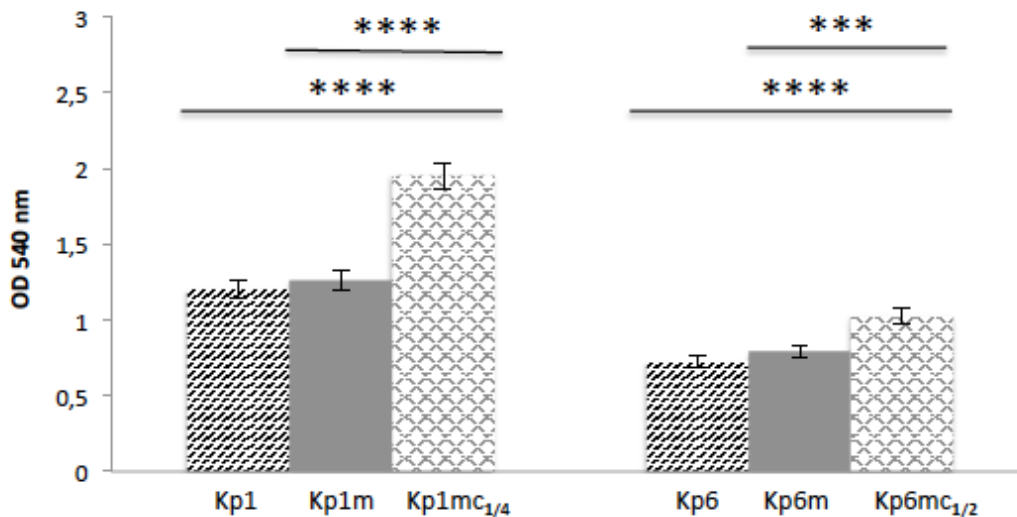


Figure 35 : Évaluation de la production de biofilm à 24 h pour Kp1, Kp1m et Kp1mc<sub>1/4</sub> et Kp6, Kp6m et Kp6mc<sub>1/2</sub>

ANOVA 2way, \*\*\* = p < 0,005; \*\*\*\* = p < 0,001, n = 3

En conclusion, Kp1mc<sub>1/4</sub> et Kp6mc<sub>1/2</sub> se comportent de la même manière. En effet, elles produisent significativement plus de biofilm que les souches mutantes, Kp1 et Kp6m respectivement.

## II.2 Partie II : Impact de la colistine sur la capsule et son rôle dans le mécanisme de résistance chez *K. pneumoniae*

De même que dans le chapitre 2, nous avons étudié *mgrB* puis l'expression des gènes impliqués dans la synthèse constitutive du LPS et ceux impliqués dans la synthèse groupement L-Ara4N.

### II.2.1 Étude de *mgrB*

*mgrB* a été amplifié par qPCR à la fois chez KpATCC et son mutant résistant à la colistine, KpATCCm. Les amplicons ont ensuite été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,4% (figure 36). Après migration, nous avons observé que les amplicons de KpATCCm avaient migré moins loin que ceux de KpATCC, impliquant une différence de taille entre les amplicons. Dans la figure 36, on observe que les amplicons de KpATCCm ont une taille approximative de 1000 pb correspondant au type d'insertion IS5-like définie par Olaitan et coll. (145).

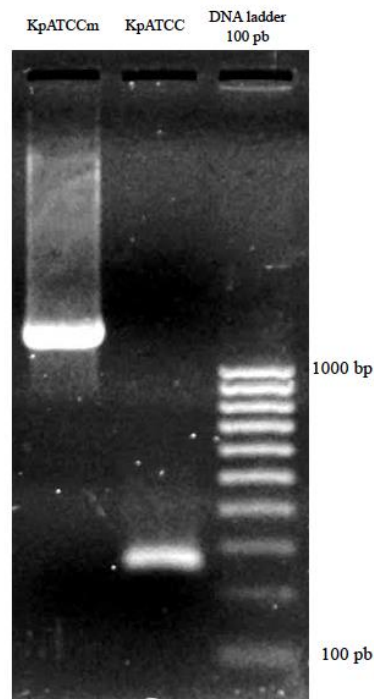


Figure 36 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1,4% des amplicons de *mgrB* pour KpATCC et KpATCCm

Par conséquent, ces résultats nous ont permis de conclure que la résistance à la colistine, chez KpATCCm, était peut être médiée par cette insertion identifiée chez *mgrB*. Suite à la mise en évidence de cette insertion, nous avons voulu savoir si cette insertion était inactivatrice.

Pour cela nous avons souhaité étudier l'expression des gènes impliqués dans la synthèse constitutive du LPS et ceux impliqués dans la synthèse du groupement L-Ara4N.

### II.2.2 Étude de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse constitutive du LPS et du groupement L-Ara4N en présence de deux concentrations de colistine

Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression des gènes chez KpATCCm comparée à KpATCC. Les résultats sont présentés dans le tableau XXII. On constate que l'expression de l'ensemble des gènes est réprimée chez KpATCCm vs. KpATCC.

Puis, nous avons comparé l'expression de ces mêmes gènes chez KpATCCm<sub>c1/4</sub> et KpATCCm<sub>c1/2</sub> au mutant (KpATCCm). Les résultats sont présentés tableau XXIII. On observe que l'expression de l'ensemble des gènes est également réprimée chez les deux mutants après culture en présence de deux concentrations de colistine.

Tableau XXII : Suivi de l'expression des gènes chez KpATCCm vs. KpATCC

		KpATCCm vs. KpATCC	Significativité
<b>Synthèse constitutive du LPS</b>	<i>lpxA</i>	0,10 ± 0,57	****
	<i>lpxC</i>	0,08 ± 0,43	****
	<i>msbA</i>	0,06 ± 0,32	****
<b>Synthèse du groupement L-Ara4N</b>	<i>pmrA</i>	0,17 ± 0,64	****
	<i>pmrB</i>	0,12 ± 0,43	****
	<i>pmrD</i>	0,09 ± 0,34	****
	<i>phoP</i>	0,12 ± 0,45	****
	<i>phoQ</i>	0,11 ± 0,41	****
	<i>arnT</i>	0,12 ± 0,51	****

t-test, \*\*\*\* =  $p < 0,001$  ;  $n = 3$

Interprétations des résultats : > 1 : expression augmentée, < 1 : expression diminuée, = 1 : pas de changement

Tableau XXIII : Suivi de l'expression des gènes chez KpATCCmc<sub>1/4</sub> et KpATCCmc<sub>1/2</sub> vs. KpATCCm

		KpATCCmc <sub>1/4</sub> vs. KpATCCm	Significativité	KpATCCmc <sub>1/2</sub> vs. KpATCCm	Significativité
<b>Synthèse constitutive du LPS</b>	<i>lpxA</i>	0,09 ± 0,49	****	0,43 ± 2,30	ns
	<i>lpxC</i>	0,35 ± 1,87	ns	0,54 ± 3,10	ns
	<i>msbA</i>	0,11 ± 0,60	****	0,70 ± 3,85	ns
<b>Synthèse du groupement L-Ara4N</b>	<i>pmrA</i>	0,01 ± 0,01	****	0,00 ± 0,01	****
	<i>pmrB</i>	0,01 ± 0,01	****	0,07 ± 0,34	****
	<i>pmrD</i>	0,03 ± 0,17	****	0,10 ± 0,49	****
	<i>phoP</i>	0,01 ± 0,01	****	0,01 ± 0,01	****
	<i>phoQ</i>	0,01 ± 0,01	****	0,01 ± 0,01	****
	<i>arnT</i>	0,01 ± 0,46	****	0,54 ± 2,80	ns

t-test, \*\*\*\* = p < 0,001 ; n = 3

Interprétations des résultats : > 1 : expression augmentée, < 1 : expression diminuée, = 1 : pas de changement

Enfin, nous avons souhaité comparer l'expression de ces mutants après culture en présence de colistine, KpATCCmc<sub>1/4</sub> et KpATCCmc<sub>1/2</sub>. Dans le tableau XXIV, il n'apparaît pas de différence significative (p > 0,05) concernant l'expression de l'ensemble des gènes.

Tableau XXIV : Comparaison de l'expression des gènes entre KpATCCmc<sub>1/4</sub> (vs. KpATCCm) et KpATCCmc<sub>1/2</sub> (vs. KpATCCm)

		KpATCCmc <sub>1/4</sub> (vs. KpATCCm)	KpATCCmc <sub>1/2</sub> (vs. KpATCCm)	Significativité
<b>Synthèse constitutive du LPS</b>	<i>lpxA</i>	0,09 ± 0,49	0,43 ± 2,30	ns
	<i>lpxC</i>	0,35 ± 1,87	0,54 ± 3,10	ns
	<i>msbA</i>	0,11 ± 0,60	0,70 ± 3,85	ns
<b>Synthèse du groupement L-Ara4N</b>	<i>pmrA</i>	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,01	ns
	<i>pmrB</i>	0,01 ± 0,01	0,07 ± 0,34	ns
	<i>pmrD</i>	0,03 ± 0,17	0,10 ± 0,49	ns
	<i>phoP</i>	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	ns
	<i>phoQ</i>	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	ns
	<i>arnT</i>	0,01 ± 0,46	0,54 ± 2,80	ns

t-test, ns = non significatif (p > 0,05), n = 3

Interprétations des résultats : > 1 : expression augmentée, < 1 : expression diminuée, = 1 : pas de changement

A l'issue de cette première partie, il apparaît que *mgrB* présente une insertion inactivante dans la mesure où KpATCCm ne semble pas exprimer le groupement L-Ara4N au niveau de son LPS. Pour faire suite à ces observations, nous avons couplé cette étude à une étude morphologique des souches de *K. pneumoniae* réalisée par microscopie à force atomique (AFM).

### II.2.3 Observations morphologiques des souches de *K. pneumoniae* précédemment étudiées par microscopie à force atomique

Concernant les résultats obtenus par AFM, il a été constaté, qu'en l'absence de colistine, KpATCC possédait une capsule composée d'une seule couche, tandis que KpATCCm possédait une capsule organisée en plusieurs couches (figure 37).

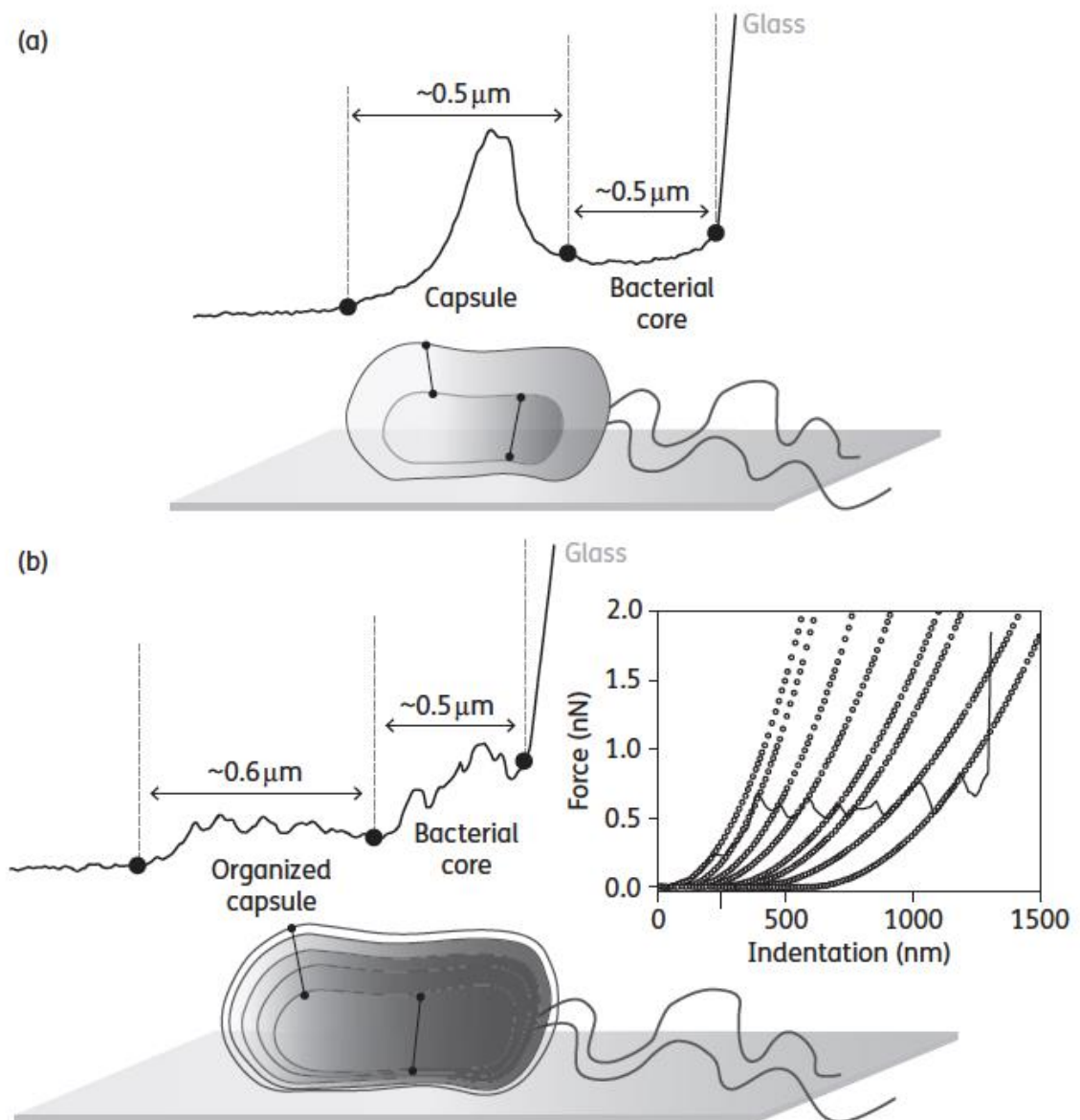


Figure 37 : Représentations schématiques de l'organisation de la capsule de, (a) KpATCC (sensible à la colistine) et, (b) KpATCCm (résistante à la colistine)

De plus, les données nano mécaniques ont permis de montrer, qu'en présence de colistine, KpATCC était capable de ne pas exprimer sa capsule alors que KpATCCm la



conservait. Cependant, cette capsule n'était plus composée de plusieurs couches mais d'une seule, de plus en plus rigide en présence de concentrations croissantes de colistine (155). Par conséquent, ces observations nous ont poussés à conclure que la colistine agissait sur les propriétés nano mécaniques de la capsule. En effet, ces modifications entraîneraient la formation d'une barrière imperméable à la colistine l'empêchant ainsi d'atteindre le LPS.

### II.2.4 Étude de la sensibilité au sérum

Dans la figure 38 et le tableau XXV, on constate une diminution significative ( $p < 0,001$ ) du nombre de survivants pour chacune des souches étudiées (KpATCC, KpATCCm, KpATCCmc) dès la première heure d'incubation. Ce résultat est également observé aux deux autres temps. Cependant, également dans la figure 38, on n'observe pas de différence significative ( $p > 0,05$ ) entre chacune des souches aux trois temps étudiés.

Tableau XXV : Interprétation des résultats obtenus lors de la cinétique de l'étude de la sensibilité au sérum chez KpATCC, KpATCCm et KpATCCmc<sub>x</sub>

	KpATCC	KpATCCm	KpATCCmc <sub>1/4</sub>
1h vs. 0h	****	****	****
2h vs. 0h	****	****	****
3h vs. 0h	****	****	****
2h vs. 1h	ns	ns	ns
3h vs. 1h	*	ns	ns
3h vs. 2h	ns	ns	ns

ANOVA 2way, \* =  $p < 0,05$  ; \*\*\*\* =  $p < 0,001$  ; ns : non significatif ( $p > 0,05$ ), n = 3

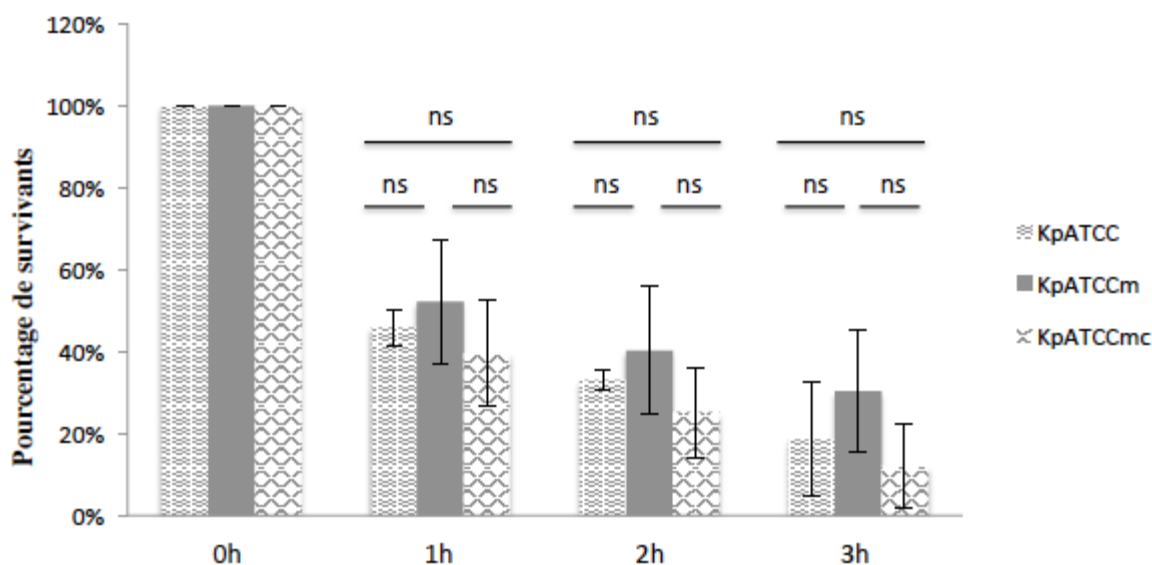


Figure 38 : Étude de la sensibilité au sérum pour KpATCC, KpATCCm et KpATCCmc<sub>1/4</sub>  
ANOVA 2way, ns : non significatif ( $p > 0,05$ ), n = 3

Par conséquent, à l'issue de nos expérimentations, KpATCC, KpATCCm, et KpATCCmc<sub>1/4</sub> apparaissent toutes sensibles au sérum. En effet, après trois heures d'incubation, les pourcentages de survivants sont inférieurs à 50% (figure 38).

### II.2.5 Production de biofilm à 24 h

Dans la figure 39, on constate qu'il n'y a pas de différence significative de production de biofilm entre KpATCC, KpATCCm et KpATCCmc<sub>1/4</sub>.

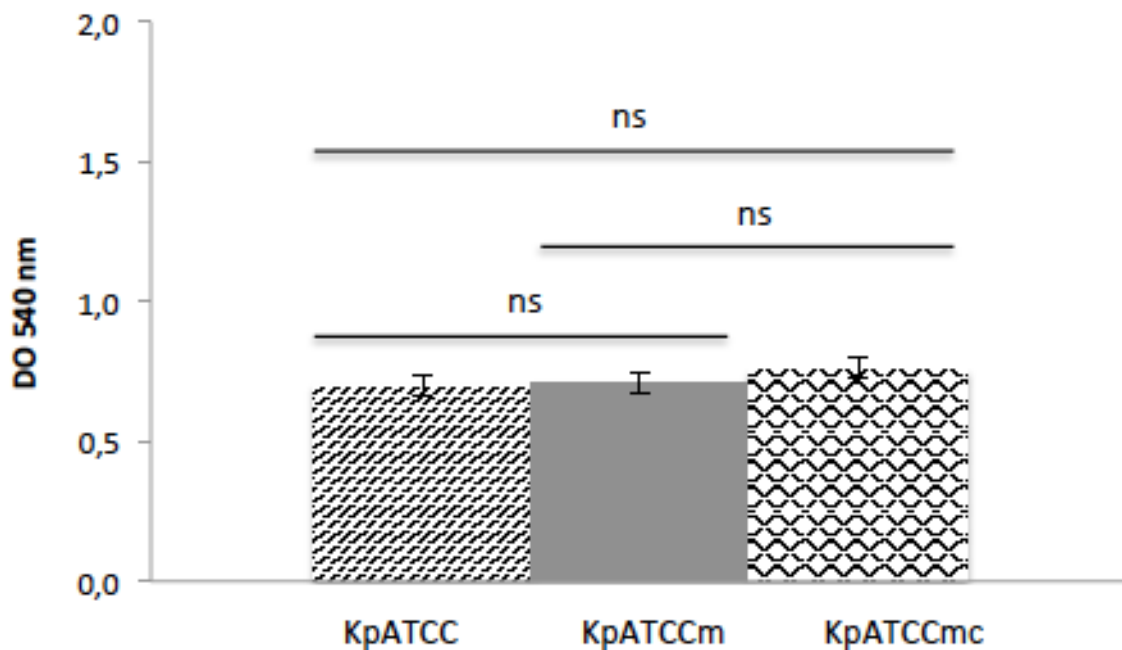


Figure 39 : Évaluation de la production de biofilm à 24 h pour KpATCC, KpATCCm et KpATCCmc<sub>1/4</sub>, ns : non significatif ( $p > 0,05$ ),  $n = 3$

En conclusion, concernant la production de biofilm, les trois souches se comportent de la même manière. Par conséquent, la souche mutante (KpATCCm) se comporte de la même manière que la souche sensible (KpATCC), et le mutant sous pression de sélection (KpATCCmc<sub>1/4</sub>) se comporte de la même manière que la souche mutante (KpATCCm). Ces résultats sont différents des résultats précédemment observés dans la mesure où le mutant exposé à la colistine ne produit pas plus de biofilm que la souche mutante (figure 35).

### III. Discussion

Le mécanisme de résistance à la colistine, chez *K. pneumoniae*, est un mécanisme complexe. De nombreux mécanismes ont été mis en évidence (addition du groupement L-Ara4N, addition du groupement pEtN, deacylation, hydroxylation etc.) (34,156). Néanmoins une hypothèse n'a pas été explorée. Il s'agit de l'aspect adaptatif du mécanisme de résistance. Ce type de mécanisme a été étudié chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* (157–159). Cependant, à ce jour, aucune étude n'a été menée chez *K. pneumoniae*, même si certains auteurs abordent succinctement le sujet (8, 98, 99). Par conséquent, nous avons choisi d'étudier le LPS, et 3 facteurs de virulence, tels que la production de biofilm, la sensibilité au sérum et la capsule, en présence de différentes concentrations de colistine.

La première étude est centrée sur l'impact de la colistine sur le LPS (étude de l'expression des gènes), et sur l'expression de deux facteurs de virulence pour lesquels le LPS serait impliqué (sensibilité au sérum et production de biofilm).

La deuxième étude, quant à elle, traite exclusivement du rôle de la capsule dans le mécanisme de résistance à la colistine, encore une fois en présence de colistine.

A l'issue de ces deux études, nous avons constaté que la majorité des facteurs de virulence était modifiée en présence de colistine. En effet, les résultats de la première étude montrent que, pour Kp1mc<sub>x</sub> (vs. Kp1m) et Kp6mc<sub>x</sub> (vs. Kp6m), l'expression de l'ensemble des gènes est réprimée quelle que soit les concentrations de colistine utilisées.

Concernant les facteurs de virulence, Kp1mc<sub>x</sub> et Kp6mc<sub>x</sub> produisent plus de biofilm que la souche mutante. En revanche, concernant la sensibilité au sérum, Kp6mc<sub>x</sub> se comporte de la même manière que la souche mutante et est sensible au sérum dès la première heure d'incubation. Quant à Kp1mc<sub>x</sub>, elle apparaît résistante au sérum de même que la souche mutante, mais le nombre de survivants est significativement diminué comparé au mutant après trois heures d'incubation.

Ainsi, grâce à cette étude, nous pouvons constater, encore une fois, que les deux mutants ne se comportent pas de la même manière (Cf. chapitre 1). Kp1m et Kp6m semblent s'adapter aux différentes concentrations de colistine.

De manière générale, la présence de colistine entraîne une diminution de l'expression de l'ensemble des gènes et une augmentation de production de biofilm, modifiant ainsi les

propriétés de surface de la bactérie. Ces conclusions corroborent ainsi les observations réalisées à l'aide du microscope à contraste négatif (figure 33). Dans cette optique, nous avons choisi, dans une deuxième étude, d'utiliser l'AFM afin d'étudier la capsule, autre structure de surface de la bactérie.

Dans la littérature, la capsule n'est pas un acteur majeur du mécanisme de résistance à la colistine.

Cependant, Campos et coll. et Llobet et coll., ont montré que les polysaccharides capsulaires participaient à ce mécanisme, soit en se liant directement à l'antibiotique, soit en formant une barrière imperméable empêchant les polymyxines d'atteindre leur cible (98,99).

Dans notre étude, nous avons choisi de comparer l'organisation de la capsule entre une souche sensible (KpATCC) et une souche résistante (KpATCCm). A l'issue de nos expérimentations, nous avons constaté que la capsule « s'adaptait » aux différentes concentrations de colistine. En effet, en présence de colistine, la capsule de KpATCC n'était pas exprimée et, le mutant résistant à la colistine, KpATCCm, était capable de remanier l'organisation de sa capsule en présence de colistine et, notamment de passer d'une organisation multicouches en une couche plus rigide en présence de concentrations croissantes de colistine (155).

En conclusion, nous ne pouvons pas affirmer qu'il existe un ou plusieurs mécanismes de résistance à la colistine. Cependant les résultats de nos deux études sont en faveur d'un mécanisme adaptatif, car quelle que soit la cible du mécanisme étudiée (LPS, capsule, biofilm etc.), on observe une adaptation des souches en fonction des concentrations de colistine.

# **Chapitre 4**

## **A la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques**

# Partie I

## I. Contexte

Dans les chapitres précédents, nous avons essayé de comprendre le ou les mécanisme(s) de résistance à la colistine. Cependant, comme nous avons pu le constater à travers la première partie de ce manuscrit, le mécanisme de résistance à la colistine est un mécanisme complexe. D'autre part, il a été constaté une augmentation des infections causées par des souches de *K. pneumoniae* multirésistantes, pour lesquelles la colistine constituait la seule alternative thérapeutique (160). Cet engouement récent pour ce « vieil » antibiotique a entraîné l'émergence de souches résistantes, pour lesquelles les options thérapeutiques sont limitées voire inexistantes (8). Le développement de la résistance et le manque de nouveaux agents antibactériens ont conduit les scientifiques à se concentrer sur les combinaisons d'antibiotiques. Comme son (ou ses) mécanisme(s) de résistance, le mode d'action de la colistine est incomplètement élucidé. Cependant, toutes les hypothèses convergeraient vers une perturbation de la membrane externe qui entrainerait une lyse de la cellule bactérienne. Par conséquent, nous avons souhaité, à travers l'utilisation d'associations non conventionnelles, mettre à profit cette propriété afin de créer une brèche, au niveau de la membrane externe, favorable au passage de molécule volumineuse (vancomycine) et/ou hydrophobe (triméthoprime). Dans la littérature, ces combinaisons ont déjà fait leur preuve sur les BGN (161–163). De plus, en 2012, Vidailiac et coll. ont montré une synergie d'action pour les associations CST+VAN, CST+TMP et CST+TMP/SMX (1/19), chez *A. baumannii* (3 isolats CST-R et 1 isolat S) et *K. pneumoniae* (1 isolat CST-R), cependant aucune synergie n'a été détectée pour les souches CST-S de *K. pneumoniae*, poussant les auteurs à conclure que la résistance à la colistine favoriserait l'action de ces combinaisons antibiotiques (116). Afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse, nous avons choisi d'inclure un plus grand nombre d'isolats CST-R et S de *K. pneumoniae*. En l'absence de méthode de référence pour évaluer le potentiel de synergie des combinaisons antibiotiques, nous avons choisi d'utiliser deux techniques classiquement utilisées en antibiothérapie et une troisième technique, plus rapide et plus facile à mettre en place notamment en laboratoire d'analyses médicales, la méthode Etest<sup>®</sup>.

L'objectif de notre étude a été d'évaluer le potentiel de synergie de trois combinaisons antibiotiques (CST+VAN, CST+TMP et CST+TMPS/SMX) à l'aide de trois techniques (méthode de l'échiquier, TKA, méthode Etest<sup>®</sup>).

## **II. Résultats**

### **II.1 Détermination des CMI à l'aide des 3 techniques**

Les valeurs de CMI obtenues à l'aide des 3 techniques (microdilution, Etest<sup>®</sup> et Vitek<sup>®</sup> 2) sont données dans le tableau XXVI pour les isolats résistants à la colistine et dans le tableau XXVII pour les isolats sensibles à la colistine. Les résultats obtenus mettent en évidence une différence de valeurs de CMI entre les différentes techniques uniquement pour les isolats résistants à la colistine. Concernant les valeurs de CMI obtenues pour les différents antibiotiques (colistine, vancomycine, triméthoprimé et triméthoprimé/sulfaméthoxazole), le taux de concordance entre les trois techniques est respectivement de 88,9%, 100,0%, 83,3% et 61,1%. Le taux global de concordance entre les trois techniques est de 83,3% pour les isolats résistants à la colistine, alors qu'il est de 100,0% pour les isolats sensibles à la colistine.



Tableau XXVI : Moyennes des valeurs de CMI ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtenues à l'aide des 3 techniques (méthode Etest<sup>®</sup> (1), microdilution (2), Vitek2<sup>®</sup> (3)) pour les isolats cliniques de *K. pneumoniae* résistants à la colistine (n=3)

	CST			VAN			TMP			TMP/SMX (1/19)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
408	16	128	$\geq 16$	256	256	$\emptyset$	32	> 256	$\geq 16$	32	> 256	$\geq 320$
409	32	16	$\geq 16$	256	256	$\emptyset$	32	> 256	$\geq 16$	32	> 256	$\geq 320$
410	32	16	$\geq 16$	256	256	$\emptyset$	32	> 256	$\geq 16$	32	> 256	40
411	24	256	0,5	256	256	$\emptyset$	32	< 1	$\leq 0,5$	32	4	$\leq 20$
412	16	16	$\geq 16$	256	256	$\emptyset$	32	> 256	$\geq 16$	32	> 256	$\geq 320$
413	256	256	$\geq 16$	256	256	$\emptyset$	32	< 1	$\geq 16$	32	4	$\geq 320$
414	64	64	$\geq 16$	256	256	$\emptyset$	32	> 256	$\geq 16$	32	> 256	$\geq 320$
415	32	16	$\geq 16$	256	256	$\emptyset$	32	> 256	$\geq 16$	32	> 256	$\geq 320$
416	16	8	$\geq 16$	256	256	$\emptyset$	32	> 256	$\geq 16$	32	> 256	$\geq 320$
417	32	32	$\geq 16$	256	256	$\emptyset$	32	> 256	$\geq 16$	0,25	> 256	$\leq 20$
418	16	16	$\geq 16$	256	256	$\emptyset$	0,38	< 1	$\leq 0,5$	0,19	16	$\leq 20$
419	32	16	$\geq 16$	256	256	$\emptyset$	32	16	8	32	16	40
420	32	16	$\geq 16$	256	256	$\emptyset$	32	> 256	$\geq 16$	32	> 256	$\geq 320$
421	32	64	$\geq 16$	256	256	$\emptyset$	32	> 256	$\geq 16$	32	> 256	$\geq 320$
422	256	256	$\geq 16$	256	256	$\emptyset$	32	< 1	8	32	> 256	$\geq 320$
423	256	256	$\leq 0,5$	256	256	$\emptyset$	0,38	< 1	$\leq 0,5$	0,125	4	$\leq 0,5$
424	12	16	$\geq 16$	256	256	$\emptyset$	32	> 256	$\geq 16$	32	> 256	$\geq 320$
425	16	16	$\geq 16$	256	256	$\emptyset$	0,5	2	$\leq 0,5$	0,25	64	$\leq 20$

\* CST : colistine, VAN : vancomycine, TMP : triméthoprimine, TMP/SMX (1/19) : triméthoprimine/sulfaméthoxazole

Recommandations du CA-SFM 2015: CST, S  $\leq 2 \mu\text{g/mL}$  R >  $2 \mu\text{g/mL}$ , TMP, S  $\leq 2 \mu\text{g/mL}$  R >  $4 \mu\text{g/mL}$ , TMP/SMX, S  $\leq 2 \mu\text{g/mL}$  R >  $4 \mu\text{g/mL}$

Tableau XXVII : Moyennes des valeurs de CMI ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtenues à l'aide des 3 techniques (méthode Etest<sup>®</sup> (1), microdilution (2), Vitek2<sup>®</sup> (3)) pour les isolats cliniques de *Klebsiella pneumoniae* sensibles à la colistine (n=3)

	CST			VAN			TMP			TMP/SMX (1/19)		
	Etest <sup>®</sup>	Broth	Vitek2 <sup>®</sup>	Etest <sup>®</sup>	Broth	Vitek2 <sup>®</sup>	Etest <sup>®</sup>	Broth	Vitek2 <sup>®</sup>	Etest <sup>®</sup>	Broth	Vitek2 <sup>®</sup>
42	0,125	< 1	$\leq 0,5$	256	256	$\emptyset$	0,50	2	$\leq 0,5$	0,25	2/38	$\leq 20$
158	0,125	< 1	$\leq 0,5$	256	256	$\emptyset$	0,38	4	$\leq 0,5$	0,094	2/38	$\leq 20$
309	0,125	< 1	$\leq 0,5$	256	256	$\emptyset$	0,25	< 1	$\leq 0,5$	0,094	2/38	$\leq 20$
338	0,125	< 1	$\leq 0,5$	256	256	$\emptyset$	0,38	< 1	$\leq 0,5$	0,125	2/38	$\leq 20$
365	0,125	< 1	$\leq 0,5$	256	256	$\emptyset$	0,19	< 1	$\leq 0,5$	0,032	2/38	$\leq 20$
452	0,125	< 1	$\leq 0,5$	256	256	$\emptyset$	0,50	< 1	$\leq 0,5$	0,25	2/38	$\leq 20$
467	0,125	< 1	$\leq 0,5$	256	256	$\emptyset$	0,38	< 1	$\leq 0,5$	0,19	2/38	$\leq 20$
471	0,125	< 1	$\leq 0,5$	256	256	$\emptyset$	0,50	4	$\leq 0,5$	0,125	2/38	$\leq 20$
472	0,125	< 1	$\leq 0,5$	256	256	$\emptyset$	0,50	< 1	$\leq 0,5$	0,19	2/38	$\leq 20$
562	0,38	< 1	$\leq 0,5$	256	256	$\emptyset$	0,38	< 1	$\leq 0,5$	0,125	2/38	$\leq 20$
626	0,125	< 1	$\leq 0,5$	256	256	$\emptyset$	0,50	4	$\leq 0,5$	0,38	2/38	$\leq 20$
665	0,125	< 1	$\leq 0,5$	256	256	$\emptyset$	0,19	< 1	$\leq 0,5$	0,125	2/38	$\leq 20$
713	0,125	< 1	$\leq 0,5$	256	256	$\emptyset$	0,50	< 1	$\leq 0,5$	0,125	2/38	$\leq 20$
718	0,125	< 1	$\leq 0,5$	256	256	$\emptyset$	0,38	4	$\leq 0,5$	0,125	2/38	$\leq 20$
720	0,125	< 1	$\leq 0,5$	256	256	$\emptyset$	0,38	2	$\leq 0,5$	0,094	2/38	$\leq 20$

\* CST : colistine, VAN : vancomycine, TMP : triméthoprime, TMP/SMX (1/19) : triméthoprime/sulfaméthoxazole (1/19)

Recommandations du CA-SFM 2015: CST, S  $\leq 2 \mu\text{g/mL}$  R  $> 2 \mu\text{g/mL}$ , TMP, S  $\leq 2 \mu\text{g/mL}$  R  $> 4 \mu\text{g/mL}$ , TMP/SMX, S  $\leq 2 \mu\text{g/mL}$  R  $> 4 \mu\text{g/mL}$

## II.2 Évaluation du potentiel de synergie

Les résultats obtenus à l'aide des méthodes de l'échiquier et Etest<sup>®</sup> sont présentés tableau XXVIII pour les isolats CST-R et tableau XXX pour les isolats CST-S.

### II.2.1 Analyse des résultats pour les isolats CST-R

À l'aide de la technique de l'échiquier, il a été constaté un pourcentage variable d'antagonisme en fonction des combinaisons testées, 16,7% (CST + VAN), 38,9% (CST + TMP) et 44,4% (CST + TMP / SMX (1/19)). Une synergie d'action des combinaisons a également été observée 5,6% (CST + VAN), 11,1% (CST + TMP) et 11,1% (CST + TMP / SMX 1/19).

En revanche, avec la méthode Etest<sup>®</sup>, aucun antagonisme n'a été observé. Une synergie d'action a été observée pour les associations suivantes, CST + TMP (16,7%), CST + TMP / SMX (1/19) (27,8%), mais aucune synergie n'a été détectée pour l'association CST + VAN.

Le potentiel de synergie et l'activité bactéricide de chaque combinaison ont également été évalués par TKA, sur 5 isolats (408, 409, 411, 419, 422) représentatifs de l'échantillon en fonction des différents comportements observés lors de l'évaluation des potentiels de synergie, à une concentration de 0,25X et 0,5X la CMI. Testée seule à 0,25X et 0,5X CMI, la colistine n'a aucun effet.

A l'aide de la technique du TKA, aucun antagonisme n'a été observé. L'association CST + VAN a montré une synergie d'action à 0,5X CMI et 0,25X CMI contre 4 souches (408, 409, 411 et 419) et une indifférence contre une souche (422). L'activité bactéricide ( $\geq 3 \log_{10}$  CFU/mL) a été obtenue en 2 h pour l'isolat 408 et en 4 à 24 h pour les autres souches.

Les associations CST + TMP et CST + TMP/SMX ont montré une synergie à 0,5X CMI contre 4 souches (408, 411, 419 et 422) et l'activité bactéricide a été obtenue en 2 à 24 h (figure 40 et tableau XXIX). Ces combinaisons d'antibiotiques ont montré une synergie à 0,25X CMI pour les souches 408, 419 (uniquement pour CST-TMP) et 422 (uniquement pour CST-TMP / SMX) et une activité bactéricide en 2 à 8 h (figure 41 et tableau XXIX).

Tableau XXVIII : Évaluation du potentiel de synergie des combinaisons antibiotiques à l'aide des techniques de l'échiquier et Etest® chez 18 isolats CST-R (n = 3)

Combinaisons antibiotiques	CST-VAN		CST-TMP		CST-TMP/SMX (1/19)		
	Méthode	Échiquier	Etest®	Échiquier	Etest®	Échiquier	Etest®
408		0,31/ Syn	1,00/ Ind	0,39/ Syn	2,00/ Ind	0,45/ Syn	1,50/ Ind
409		2,24/ Ind	1,00/ Ind	4,06/ Ant	2,00/ Ind	4,06/ Ant	2,00/ Ind
410		1,38/ Ind	0,87/ Ind	2,73/ Ind	2,00/ Ind	0,89/ Ind	2,00/ Ind
411		4,08/ Ant	0,83/ Ind	1,50/ Ind	0,18/ Syn	0,83/ Ind	0,09/ Syn
412		1,94/ Ind	1,50/ Ind	4,06/ Ant	2,00/ Ind	4,06/ Ant	2,00/ Ind
413		4,71/ Ant	2,00/ Ind	2,21/ Ind	0,50/ Syn	1,50/ Ind	0,07/ Syn
414		2,33/ Ind	0,87/ Ind	3,35/ Ind	2,00/ Ind	4,06/ Ant	1,25/ Ind
415		2,17/ Ind	1,25/ Ind	4,71/ Ant	2,00/ Ind	4,06/ Ant	2,00/ Ind
416		1,50/ Ind	1,25/ Ind	4,21/ Ant	1,25/ Ind	4,06/ Ant	1,00/ Ind
417		1,83/ Ind	1,50/ Ind	4,06/ Ant	2,00/ Ind	1,39/ Ind	1,25/ Ind
418		0,92/ Ind	2,00/ Ind	1,71/ Ind	2,00/ Ind	1,43/ Ind	1,25/ Ind
419		3,00/ Ind	1,25/ Ind	0,14/ Syn	1,25/ Ind	2,02/ Ind	0,39/ Syn
420		2,25/ Ind	2,00/ Ind	4,06/ Ant	2,00/ Ind	4,06/ Ant	2,00/ Ind
421		2,75/ Ind	1,00/ Ind	3,39/ Ind	2,00/ Ind	4,06/ Ant	2,00/ Ind
422		3,67/ Ind	2,00/ Ind	3,03/ Ind	0,21/ Syn	0,47/ Syn	0,07/ Syn
423		5,10/ Ant	0,75/ Ind	1,81/ Ind	0,53/ Ind	0,75/ Ind	0,39/ Syn
424		1,99/ Ind	2,00/ Ind	4,06/ Ant	2,00/ Ind	4,06/ Ant	2,00/ Ind
425		2,02/ Ind	1,50/ Ind	0,77/ Ind	2,00/ Ind	1,00/ Ind	1,03/ Ind
% concordance		77,8		33,4		27,8	

\* CST, colistine; VAN, vancomycine; TMP, triméthoprime; TMP/SMX (1/19), triméthoprime/sulfaméthoxazole (1/19)

% concordance globale = 46,3%

Syn : Synergie, Ind : Indifférence, Ant : Antagonisme

Tableau XXIX : Évaluation du potentiel de synergie des combinaisons antibiotiques à l'aide de la méthode de l'échiquier et du TKA à 0,25X et 0,5X CMI (n = 3)

	CST-VAN			CST-TMP			CST-TMP/SMX (1/19)		
	0.5*MIC	0.25*MIC	Σ FIC	0.5*MIC	0.25*MIC	Σ FIC	0.5*MIC	0.25*MIC	Σ FIC
408	-11,7 ± 0,3	-11,4 ± 0,2	0,3	-11,7 ± 0,3	-11,4 ± 0,2	0,4	-11,7 ± 0,3	-11,4 ± 0,2	0,4
409	-11,7 ± 0,1	-3,9 ± 0,3	2,2	+1,0 ± 0,2	+0,2 ± 0,3	4,1	+0,6 ± 0,1	-1,1 ± 0,1	4,1
411	-5,8 ± 0,7	-4,6 ± 0,4	4,1	-5,0 ± 0,7	+0,4 ± 0,6	1,5	-7,9 ± 0,3	-1,6 ± 0,3	0,8
419	-12,8 ± 0,3	-3,1 ± 0,3	3,0	-12,8 ± 0,3	-7,5 ± 0,6	0,1	-5,0 ± 0,9	0,0 ± 0,2	2,0
422	+0,7 ± 0,8	0,0 ± 0,1	3,7	-3,7 ± 0,4	-0,1 ± 0,8	3,1	-12,6 ± 0,6	-11,3 ± 0,1	0,5

\* CST, colistine; VAN, vancomycine; TMP, triméthoprimine; TMP/SMX (1/19), triméthoprimine/sulfaméthoxazole (1/19)

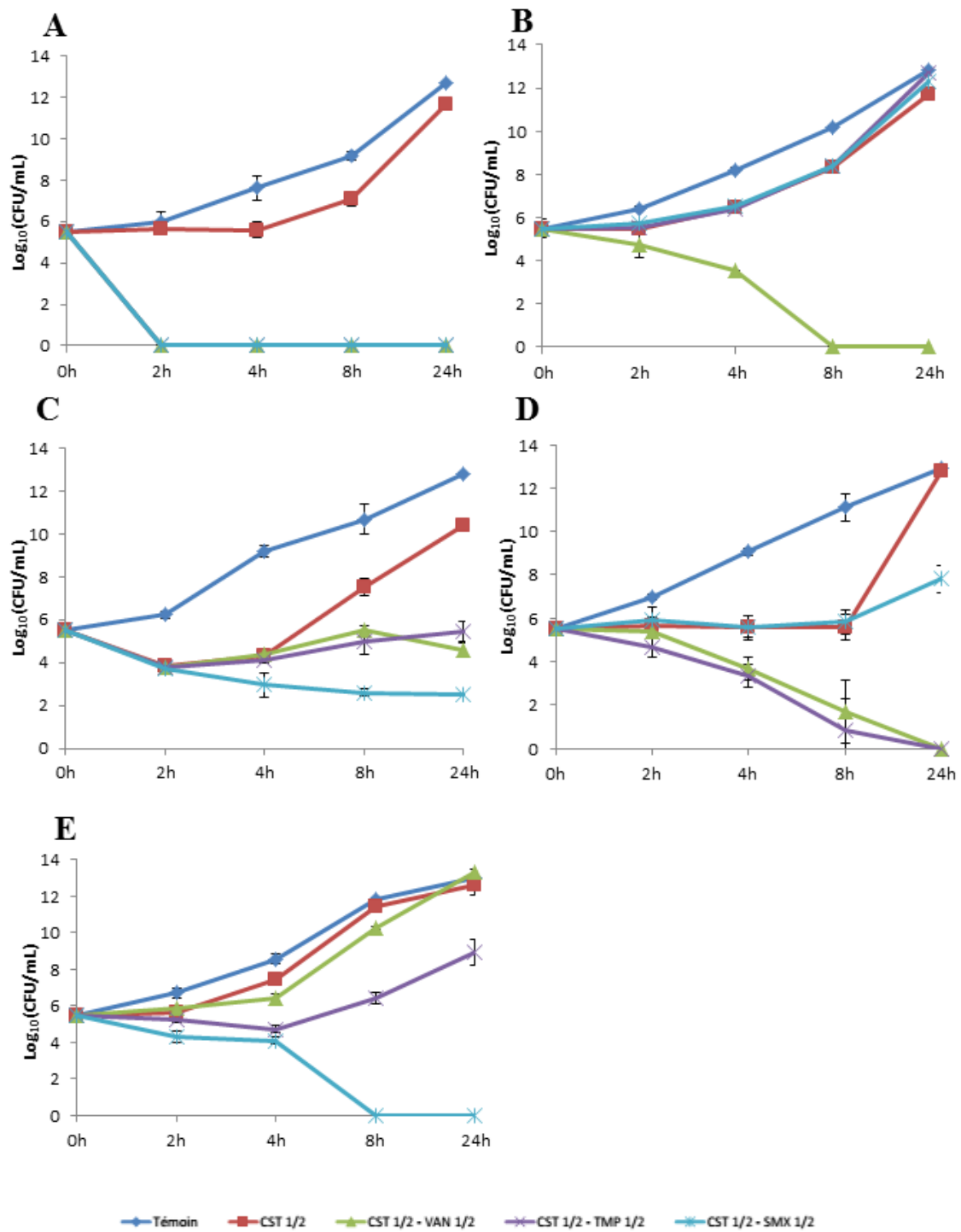


Figure 40 : Évaluation du potentiel de synergie des combinaisons antibiotiques à l'aide de la méthode du TKA à 0,5X CMI (n = 3). 408 (A), 409 (B), 411 (C), 419 (D), et 422 (E)

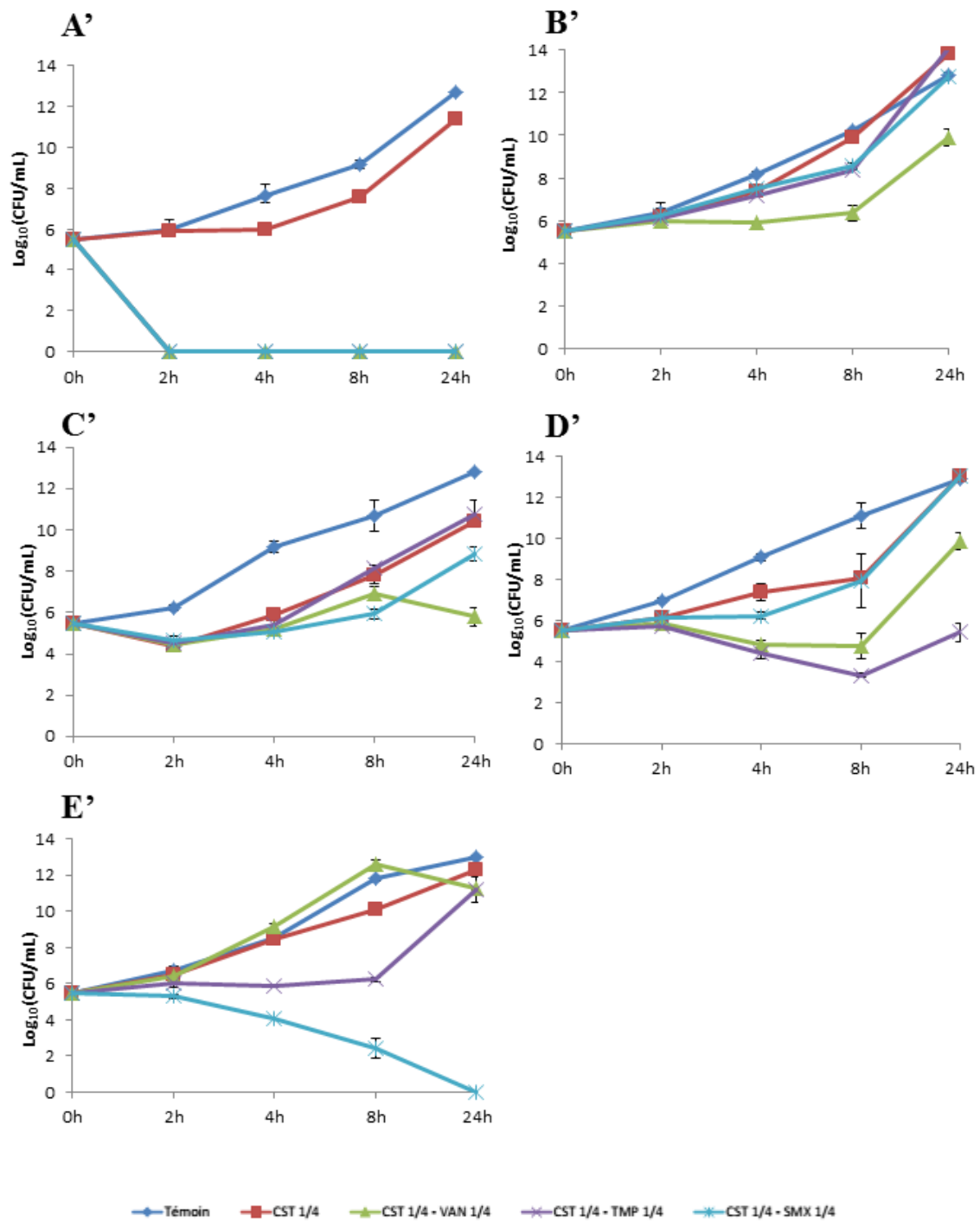


Figure 41 : Évaluation du potentiel de synergie des combinaisons antibiotiques à l'aide de la méthode du TKA à 0,25X CMI (n = 3). 408 (A'), 409 (B'), 411 (C'), 419 (D'), et 422 (E')

### **II.2.2 Analyse des résultats pour les isolats CST-S**

Avec la technique de l'échiquier, aucun antagonisme n'a été observé. Pour les associations CST + TMP, CST + TMP / SMX (1/19), nous avons observé une synergie de 40,0% et 20,0%. Aucun antagonisme n'a été observé pour la combinaison CST + VAN (tableau XXX).

De même avec la méthode Etest®, aucun antagonisme n'a été observé. Et une synergie d'action n'a été observée que pour la combinaison CST + SMX (1/19) (6,7%). Aucun effet n'a été observé pour les combinaisons CST + VAN et CST + TMP (tableau XXX).



Tableau XXX : Évaluation du potentiel de synergie des combinaisons antibiotiques à l'aide la technique de l'échiquier et Etest® chez 15 isolats CST-S (n =3)

Combinaisons antibiotiques	CST-VAN		CST-TMP		CST-TMP/SMX (1/19)		
	Méthode	Échiquier	Etest®	Échiquier	Etest®	Échiquier	Etest®
42		0,56/ Ind	2,00/ Ind	0,54/ Ind	2,00/ Ind	0,56/ Ind	1,51/ Ind
158		0,56/ Ind	2,00/ Ind	0,39/ Syn	1,76/ Ind	0,53/ Ind	1,75/ Ind
309		0,83/ Ind	2,00/ Ind	0,64/ Ind	2,00/ Ind	0,81/ Ind	0,68/ Ind
338		0,56/ Ind	2,00/ Ind	0,39/ Syn	1,41/ Ind	0,56/ Ind	2,00/ Ind
365		0,68/ Ind	2,00/ Ind	0,56/ Ind	2,00/ Ind	0,56/ Ind	2,00/ Ind
452		0,56/ Ind	2,00/ Ind	1,00/ Ind	1,25/ Ind	0,81/ Ind	1,51/ Ind
467		0,56/ Ind	2,00/ Ind	0,64/ Ind	2,00/ Ind	0,56/ Ind	0,50/ Syn
471		0,59/ Ind	2,00/ Ind	0,56/ Ind	2,00/ Ind	0,56/ Ind	2,00/ Ind
472		0,56/ Ind	2,00/ Ind	0,78/ Ind	1,00/ Ind	0,91/ Ind	2,00/ Ind
562		0,70/ Ind	2,00/ Ind	0,65/ Ind	1,31/ Ind	0,56/ Ind	0,68/ Ind
626		0,56/ Ind	2,00/ Ind	0,39/ Syn	2,00/ Ind	0,59/ Ind	1,17/ Ind
665		0,78/ Ind	2,00/ Ind	0,31/ Syn	2,00/ Ind	0,40/ Syn	1,50/ Ind
713		0,77/ Ind	2,00/ Ind	0,46/ Syn	1,00/ Ind	0,47/ Syn	0,64/ Ind
718		0,54/ Ind	2,00/ Ind	0,46/ Syn	2,00/ Ind	0,44/ Syn	1,50/ Ind
720		0,68/ Ind	2,00/ Ind	0,75/ Ind	2,00/ Ind	0,53/ Ind	1,25/ Ind
<b>% concordance</b>		<b>100,0</b>		<b>60,0</b>		<b>73,3</b>	

\* CST, colistine; VAN, vancomycine; TMP, triméthoprine; TMP/SXM (1/19), triméthoprine/sulfaméthoxazole (1/19)

% Concordance totale = 77,8%

Syn : Synergie, Ind : Indifférence, Ant : Antagonisme

### II.3 Corrélation entre les différentes méthodes

Pour les isolats CST-R, le pourcentage de concordance globale entre la méthode de l'échiquier et la méthode Etest<sup>®</sup> est de 46,3%. Le pourcentage de concordance entre les deux méthodes, pour chaque combinaison d'antibiotiques, est de 77,8% (CST + VAN), 33,4% (CST + TMP) et 27,8% (CST + TMP / SMX (1/19)).

Concernant les cinq isolats CST-R testés par TKA, le pourcentage de concordance globale entre la méthode de l'échiquier, la méthode Etest<sup>®</sup> et la méthode du TKA est de 13,3%. La meilleure corrélation est obtenue entre la méthode de l'échiquier et celle du TKA (40,0%), puis celle obtenue entre la méthode de l'échiquier et la méthode Etest<sup>®</sup> (26,7%), et enfin celle obtenue entre la méthode du TKA et la méthode Etest<sup>®</sup> (13,3%).

Pour les isolats CST-S, le pourcentage de concordance globale entre la méthode de l'échiquier et la méthode Etest<sup>®</sup> est de 77,8%. Le pourcentage de concordance entre ces 2 méthodes, pour chaque combinaison d'antibiotiques, est de 100,0% (CST + VAN), 60,0% (CST + TMP) et 73,3% (CST + TMP / SMX 1/19). Un taux de corrélation plus élevé est observé entre ces deux méthodes pour les isolats de CST-S.

### III. Discussion

A l'issue de nos expérimentations, différents points peuvent être soulignés.

Premièrement, contrairement aux isolats sensibles à la colistine, il a été constaté une différence de valeurs de CMI en fonction de la technique utilisée pour les isolats CST-R.

En effet, deux isolats (411 et 423) ont été déterminés sensibles à la colistine par Vitek<sup>®</sup> 2 et résistantes à l'aide des deux autres techniques (Etest<sup>®</sup> et microméthode en microplaque). Ces résultats sont en faveur de la note d'information de BioMérieux datant du 31 mai 2017 (annexe 5). En effet, des investigations approfondies ont permis de mettre en évidence un taux élevé d'erreurs (souches catégorisées sensibles au lieu de résistantes) avec la colistine Vitek<sup>®</sup> 2 AST-GN par rapport à la technique de dilution en gélose et comparée à la méthode par microdilution (méthode recommandée par l'EUCAST et le CLSI). Une autre hypothèse peut également être émise et serait en faveur des conclusions de Lo-Ten-Foe et coll. (164). En effet, à travers leurs travaux, les auteurs ont souligné le manque de sensibilité du Vitek<sup>®</sup> 2 en matière de détection d'hétérorésistance de populations (164). Ce phénomène ayant déjà été

mis en évidence chez *K. pneumoniae* pourrait également constituer une cause de résultats erronés (116).

Deuxièmement, concernant les associations antibiotiques, il est très difficile de comparer les résultats obtenus avec les différentes techniques, malgré l'existence de nombreuses règles afin de standardiser au maximum les résultats obtenus. Cette difficulté de comparaison est un phénomène ancien et récurrent dans la littérature et nos résultats viennent conforter ces observations (122,165–169).

D'autre part, concernant l'efficacité de ces associations, elles ne semblent pas plus efficaces pour les isolats CST-R comparés aux isolats CST-S. Au contraire, un pourcentage de synergie plus élevé a été observé pour les isolats CST-S pour les associations CST+TMP et CST+TMP/SMX (1/19).

Concernant les isolats CST-R et quelle que soit l'association antibiotique considérée, un fort taux d'antagonisme a été observé à l'aide de la méthode échiquier, alors qu'aucun antagonisme n'a été détecté à l'aide de la méthode Etest<sup>®</sup>. Enfin, un faible taux de synergie a été observé à l'aide des deux techniques (méthode de l'échiquier et Etest<sup>®</sup>). Cette sous-estimation de l'effet antagonisme par la méthode Etest<sup>®</sup> est due, dans notre étude, à l'utilisation d'isolats MDR, pour lesquels les CMI sont égales au maximum des bandelettes. Par conséquent, lorsqu'une association antibiotique est testée et sans effet, le FICImax sera égal à deux (Indifférence) alors qu'avec la technique de l'échiquier le FICImax sera égal à seize (Antagonisme).

Concernant les résultats obtenus lors des TKA, quatre isolats sur cinq se sont révélés synergiques et bactéricides pour l'association CST+VAN au 1/4 et au 1/2 de la CMI. De même, pour les deux autres associations, quatre isolats sur cinq se sont révélés synergiques et bactéricides au 1/2 des CMI et 2/5 isolats se sont révélés synergiques et bactéricides au 1/4 des CMI. Aucun antagonisme n'a été détecté quelle que soit l'association antibiotique considérée.

Une très nette différence de résultats est observée entre la technique du TKA et les deux autres techniques (méthode de l'échiquier et Etest<sup>®</sup>). Dans la littérature, la technique du TKA est, en général, considérée comme la méthode de référence pour évaluer le potentiel de synergie des combinaisons antibiotiques. A l'issue de nos expérimentations, nous ne pouvons pas conclure que la technique du TKA constitue la méthode de référence, en revanche, nous pouvons affirmer que la méthode de l'échiquier et la méthode Etest<sup>®</sup> ne constituent pas une alternative satisfaisante à la technique du TKA.

## **Partie II**

## I. Contexte

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons évalué le potentiel de synergie de combinaisons antibiotiques associant deux antibiotiques au maximum à l'aide des trois techniques les plus utilisées en recherche. Dans cette deuxième partie, nous avons cherché à développer une technique nous permettant de tester des combinaisons antibiotiques associant plus de deux molécules. Pour cela, nous avons adapté un protocole intitulé « Multiple Combination Bactericidal Testing : MCBT » publié par Aaron et coll. et Mezzatesta et coll. (138-140).

## II. Résultats

L'ensemble des résultats détaillés sont présentés en annexe 6.

### II.1 Associations de deux antibiotiques

A l'aide de cette technique, toutes les associations antibiotiques testées sont efficaces sur les souches de *K. pneumoniae* sélectionnées, cependant leur efficacité est variable. En effet, les associations les plus efficaces sont l'association colistine-vancomycine (9/18, 50,0%), et l'association colistine-cotrimoxazole (9/18, 50,0%) suivie de l'association colistine-triméthoprim (7/18, 38,9%) (tableau XXXI).

Concernant l'effet bactéricide, toutes les associations antibiotiques possèdent un effet bactéricide. Le pourcentage le plus élevé est observé pour l'association colistine-vancomycine (17/18, 94,4%) suivie de l'association colistine-triméthoprim (15/18, 83,3%) et de l'association colistine-cotrimoxazole (14/18, 77,7%) (tableau XXXII).

### II.2 Associations de trois antibiotiques

Après les résultats encourageants obtenus dans cette première partie, nous avons souhaité associer les trois antibiotiques afin d'améliorer les taux d'efficacité et de bactéricidie précédemment obtenus. Les associations testées sont : colistine-vancomycine-triméthoprim et colistine-vancomycine-cotrimoxazole à 0,5 x la CMI des souches. L'effet de ces trois antibiotiques a été comparé à celui des duos avec un test d'Anova suivi d'un test post hoc de Tukey. Les résultats sont présentés dans le tableau XXXI.

A l'issue de ces tests, il apparaît que, pour la majorité des souches, ces deux

associations (colistine-vancomycine-triméthoprime et colistine-vancomycine-cotrimoxazole) ne sont pas significativement plus efficaces que les associations de deux antibiotiques.

Concernant l'effet bactéricide de ces associations, cet effet a été observé chez 94,4% des souches pour l'association colistine-vancomycine-triméthoprime et 88,8% des souches pour la deuxième association (tableau XXXII).

Tableau XXXI : Tableau récapitulatif de la significativité des associations antibiotiques chez 18 isolats CST-R

L'effet des combinaisons doubles est comparé à l'effet de la colistine seule. L'effet des combinaisons triples est comparé aux combinaisons doubles. Les antibiotiques sont testés au demi des CMI de chaque souche.

Souche	CST vs. CST+VAN	CST vs. CST+TMP	CST vs. CST+ TMP- SMX	CST+VAN+TMP		CST+VAN+TMP- SMX	
				vs. CST +VAN	vs. CST +TMP	vs. CST +VAN	vs. CST +TMP- SMX
Kp 408	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Kp 409	****	****	****	ns	ns	ns	ns
Kp 410	****	*	****	ns	ns	ns	ns
Kp 411	**	**	**	ns	ns	ns	ns
Kp 412	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Kp 413	*	ns	*	ns	ns	ns	ns
Kp 414	**	*	**	ns	ns	ns	ns
Kp 415	***	***	***	ns	ns	ns	ns
Kp 416	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Kp 417	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Kp 418	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Kp 419	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Kp 420	*	*	*	ns	ns	ns	ns
Kp 421	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Kp 422	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns
Kp 423	*	*	*	ns	ns	ns	ns
Kp 424	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Kp 425	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Pourcentage de significativité (%)	50	39	50	0	0	0	0

ANOVA 2way, \* p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\* p < 0,005, \*\*\*\* p < 0,001. ns : non significatif, n = 3

Tableau XXXII : Tableau récapitulatif de l'effet bactéricide des associations antibiotiques chez 18 isolats CST-R

$$\Delta\log(\text{UFC/mL}) = \log(\text{UFC/mL}) \text{ de l'ATB seul} - \log(\text{UFC/mL}) \text{ de la combinaison. (n = 3)}$$

Souche	CST+VAN $\Delta\log\text{UFC/mL}$	CST+TMP $\Delta\log\text{UFC/mL}$	CST+TMP/SMX $\Delta\log\text{UFC/mL}$	CST-VAN TMP $\Delta\log\text{UFC/mL}$	CST-VAN TMP-SMX $\Delta\log\text{UFC/mL}$
Kp 408	-7	-5,4	-2,8	-8,1	- 8,5
Kp 409	-9,4	-10,4	-11,3	-11,3	-9,7
Kp 410	-9,2	+3	-10,3	-10,9	-8,9
Kp 411	-8	-8	-10,1	-9,8	-11
Kp 412	-7,7	-9,1	-2,7	-8,1	-9,5
Kp 413	-10,6	-9,9	-10,1	-8,2	-8,8
Kp 414	-8,6	-4,8	-10,5	-7,8	-5
Kp 415	-11,2	-9,3	-10	-9,8	-10,4
Kp 416	-9,2	-8,5	-6,1	-8,6	-9,9
Kp 417	-8,5	-0,4	0	-3	-6,1
Kp 418	-8,1	-8,2	-10,1	-8,4	-9,7
Kp 419	-11,1	-8,2	-8,2	-8,5	-9,5
Kp 420	-9,4	-7,7	-5,7	0	-2,8
Kp 421	-9,2	-8,3	-9,1	-5,7	0
Kp 422	-10,8	-8	-6,5	-9,1	-9,7
Kp 423	-9,6	-9,6	-8,7	-6	-8,6
Kp 424	-11,3	-0,6	-6,9	-10,9	-10,1
Kp 425	-2,7	-8,8	0	-6,3	-7,1
Pourcentage de bactéricidie (%)	94,4	83,3	77,7	94,4	88,8

### III. Discussion

A l'instar de la première partie de ce chapitre, il n'existe pas de méthode de référence pour évaluer le potentiel de synergie des combinaisons multiples d'antibiotiques (> 2). De plus, peu d'articles relatifs à l'évaluation de ce potentiel ont été publiés. Cependant, les deux techniques les plus utilisées sont la technique du TKA (170,171) et le MCBT (138–140). Ainsi, en l'absence de méthode de référence et au vu du peu de techniques publiées, nous avons choisi d'utiliser la technique du MCBT.

A l'issue de nos expérimentations, il apparaît que les associations colistine-vancomycine et colistine-cotrimoxazole sont les plus efficaces.

Concernant les associations de trois antibiotiques, les résultats obtenus ne sont pas significativement différents de ceux obtenus lors de l'association de deux antibiotiques. Par conséquent, *in vitro*, il ne semble pas avoir d'intérêt à associer les trois antibiotiques.

D'autre part, dans la première partie de ce chapitre, il a été constaté qu'il était très difficile de comparer les résultats obtenus avec différentes techniques. Les résultats précédemment obtenus (Cf. Chap 4, partie I) venaient conforter ces observations. Ce constat est également réalisé lorsque l'on compare, cette fois-ci, les résultats obtenus à l'aide de la technique de l'échiquier, Etest<sup>®</sup> et MCBT (deux antibiotiques). En revanche, lors de la comparaison des résultats obtenus pour les cinq souches sélectionnées (408, 409, 411, 419, 422) à l'aide de la technique du TKA (1/2 de la CMI) avec ceux obtenus à l'aide de la technique du MCBT (2 antibiotiques), on constate une bonne corrélation (tableau XXIX). Ainsi, à l'issue de nos expérimentations, nos résultats nous confortent dans les conclusions obtenues dans la première partie de ce chapitre. La méthode de l'échiquier et la méthode Etest<sup>®</sup> ne constituent pas une alternative satisfaisante à la technique du TKA. En revanche, la technique du MCBT peut constituer une alternative satisfaisante. Afin de confirmer nos observations, il serait intéressant d'évaluer ces combinaisons antibiotiques, à l'aide de la technique du TKA, sur les treize autres isolats cliniques de *K. pneumoniae*.



# **DISCUSSION GENERALE**

L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier le(s) mécanisme(s) de résistance à la colistine chez *K. pneumoniae*.

Afin de mener à bien notre étude, nous avons utilisé 3 souches sensibles à la colistine, 2 isolats cliniques (Kp1 et Kp6) et une souche de référence KpATCC 700603. Ce qui différencie, principalement, ces 2 isolats cliniques est l'origine du prélèvement. En effet, Kp1 provient d'un prélèvement bronchique, et Kp6 provient d'une hémoculture. Des mutants ont été générés, Kp1m, Kp6m et KpATCCm, et nous les avons inclus. Pour la suite de nos expérimentations, nous avons également utilisé ces mutants en présence de concentrations subinhibitrices de colistine, Kp1mc<sub>x</sub>, Kp6mc<sub>x</sub>, et KpATCCmc<sub>x</sub>.

Dans un premier temps, nous avons voulu **explorer le mécanisme de résistance à la colistine** chez Kp1 et Kp6 et leurs 2 mutants. A l'issue de ce premier chapitre, nous avons constaté que Kp1-Kp1m et Kp6-Kp6m semblaient exprimer 2 mécanismes de résistance différents ainsi que des profils de virulence différents. A ce stade de nos recherches, il semblerait que l'origine des souches soit le ou un des facteurs responsables du développement de ces 2 mécanismes. Par conséquent, si nous supposons que l'origine des souches peut influencer le développement de résistance, nous pouvons également nous interroger sur l'impact de leur environnement (milieu de culture) sur le développement du mécanisme de résistance. C'est la raison pour laquelle dans le chapitre 2, nous nous sommes intéressés à **l'impact du milieu de culture sur 3 facteurs de virulence chez *K. pneumoniae***. A la fin de ce chapitre, nous avons constaté que le milieu de culture influence le potentiel de virulence de ces souches. Par conséquent, si le milieu de culture influence l'expression des facteurs de virulence étudiés, nous pouvons également en déduire que les isolats sont capables de s'adapter à leur environnement. De ce fait, nous pouvons nous interroger sur l'éventuelle **adaptation de ces isolats en présence de concentrations subinhibitrices de colistine**. Dans cette optique, nous avons choisi d'étudier le LPS et 3 facteurs de virulence en présence de concentrations subinhibitrices de colistine. Afin d'apprécier le caractère adaptatif de ce mécanisme, 2 études ont été menées en parallèle. Dans un premier temps, nous avons étudié l'impact de la colistine sur l'expression du LPS et sur l'expression de 2 facteurs de virulence (sensibilité au sérum et production de biofilm). Et de manière générale, nous avons observé que Kp1m et Kp6m adaptaient l'expression du LPS et des facteurs de virulence en fonction des concentrations de colistine, modifiant, ainsi, leur propriété de surface. En parallèle, nous avons choisi d'étudier l'impact de la colistine sur l'expression du LPS et de la capsule chez KpATCC-KpATCCm. Les résultats obtenus viennent conforter les résultats précédents. En effet, grâce à l'AFM, nous avons constaté que KpATCCm était capable d'adapter

l'organisation de sa capsule en présence de différentes concentrations de colistine. Simultanément à l'étude du (des) mécanisme(s) de résistance à la colistine, nous nous sommes intéressés à **l'évaluation du potentiel de synergie de combinaisons d'antibiotiques**. En effet, il a été constaté une augmentation des infections causées par des souches de *K. pneumoniae* multirésistantes, pour lesquelles la colistine constituait la seule alternative thérapeutique (160). Cet engouement récent pour ce « vieil » antibiotique a entraîné l'émergence de souches résistantes, pour lesquelles les options thérapeutiques sont limitées voire inexistantes (8). Le développement de la résistance et le manque de nouveaux agents antibactériens ont conduit les scientifiques à se concentrer sur les combinaisons d'antibiotiques. Deux études ont été menées. Dans la première, nous avons évalué 3 associations antibiotiques à l'aide de 3 méthodes différentes. Cependant, lors de cette étude, nous avons rencontré un problème majeur. En effet, il n'existe pas de méthode de référence pour évaluer le potentiel de ces associations. Par conséquent, il est difficile de comparer les résultats obtenus, ainsi que d'établir un classement de ces associations. Néanmoins, notre étude nous a permis de constater que la méthode de l'échiquier et la méthode Etest<sup>®</sup> ne constituaient pas des alternatives satisfaisantes comparées au TKA. De plus, les méthodes utilisées dans cette première partie ne permettaient de comparer que les associations de 2 molécules. Par conséquent, nous avons choisi d'utiliser une quatrième méthode, le MCBT. Cette méthode nous a permis d'étudier l'association de plus de 2 molécules. A l'issue de nos expérimentations, nous avons constaté, *in vitro*, que les associations de plus de 2 molécules n'étaient pas plus efficaces que certaines associations de 2 molécules. Par conséquent, il apparaît, à l'aide de cette technique, que l'association colistine-vancomycine est l'association la plus efficace suivie de l'association colistine-cotrimoxazole. Par ailleurs, le MCBT semble constituer une alternative satisfaisante au TKA afin d'évaluer le potentiel de synergie de ces associations.

Il apparaît donc que le mécanisme de résistance à la colistine chez *K. pneumoniae* est un mécanisme complexe, faisant intervenir différents facteurs. Ces facteurs interagissant par l'intermédiaire de fines interactions. Il est nécessaire d'avoir une vision globale et non plus axée principalement sur ces 2 systèmes de régulation afin d'observer d'éventuelles interactions entre les différents systèmes. Une des perspectives que nous souhaitons développer au sein de cette thématique est une analyse transcriptomique à large échelle sur *K. pneumoniae*. A l'heure actuelle très peu d'études de transcriptomique ont été réalisées chez cette bactérie (172, 173). Parmi elles une seule traite de la résistance à la colistine (174). Cependant cette étude comporte plusieurs limites : elle n'a mis en évidence que peu de gènes,

elle est dépourvue d'analyse de voies de signalisation/signature moléculaire et n'a pas étudié l'effet du traitement de la colistine sur les souches sensibles ou résistantes. C'est pourquoi nous envisageons d'aller plus loin dans la description des mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la résistance à la colistine. Pour cela nous proposons de :

- Comparer le profil d'expression d'une souche de *K. pneumoniae* sensible (KpATCC, Kp1, Kp6) à une souche de *K. pneumoniae* résistante (KpATCCm, Kp1m, Kp6m) à la colistine et d'identifier les gènes différentiellement exprimés entre ces 2 conditions,
- Etudier les changements du profil d'expression de Kp1, Kp6 et Kp1m, Kp6m en réponse au traitement à la colistine. Cette comparaison permettra d'obtenir les signatures moléculaires induites par la colistine sur Kp1, Kp6 et Kp1m, Kp6m,
- Réaliser une analyse non supervisée des voies de signalisations impliquées dans ce processus,
- Valider par des tests fonctionnels appropriés les résultats générés par notre étude.

Par cette approche notre objectif est de mettre en lumière les voies de signalisation impliquées lors de la résistance de *K. pneumoniae* à la colistine et d'accroître nos connaissances sur ce phénomène. Une fois ces mécanismes élucidés nos données pourront contribuer au développement de nouveaux antibiotiques ciblant ces bactéries multirésistantes.

Enfin, comme nous l'avons vu dans la première partie de ce manuscrit *K. pneumoniae* a toujours joué un rôle important dans l'apparition et/ou la dissémination des résistances. Aujourd'hui l'apparition d'un nouveau mécanisme de résistance à la colistine, médié par le plasmide mcr-1, met de nouveau en évidence le rôle majeur de *K. pneumoniae* dans le développement et la diffusion d'un mécanisme de résistance (85). Ce nouveau mécanisme semble tenir une place prépondérante dans la résistance à la colistine chez les entérobactéries et principalement chez *K. pneumoniae*. Par conséquent l'étude de ce mécanisme peut être une nouvelle perspective.

# **BIBLIOGRAPHIE**

1. Benkimoun P. La résistance aux antibiotiques devient une menace à l'échelle mondiale. Le Monde.fr [Internet]. 3 mai 2014 [cité 28 nov 2017]; Disponible sur: [http://www.lemonde.fr/planete/article/2014/05/03/la-resistance-aux-antibiotiques-devient-une-menace-a-l-echelle-mondiale\\_4411118\\_3244.html](http://www.lemonde.fr/planete/article/2014/05/03/la-resistance-aux-antibiotiques-devient-une-menace-a-l-echelle-mondiale_4411118_3244.html)
2. L'OMS s'alarme de la résistance aux antibiotiques [Internet]. La Parisienne. 2014 [cité 28 nov 2017]. Disponible sur: <http://www.leparisien.fr/laparisienne/sante/l-oms-s-alarme-de-la-resistance-aux-antibiotiques-30-04-2014-3807171.php>
3. La résistance antibiotique, première cause de mortalité dans le monde en 2050 [Internet]. lesechos.fr. [cité 28 nov 2017]. Disponible sur: [https://www.lesechos.fr/15/12/2014/lesechos.fr/0204017510699\\_la-resistance-antibiotique--premiere-cause-de-mortalite-dans-le-monde-en-2050.htm](https://www.lesechos.fr/15/12/2014/lesechos.fr/0204017510699_la-resistance-antibiotique--premiere-cause-de-mortalite-dans-le-monde-en-2050.htm)
4. L'OMS alerte sur la résistance toujours plus grande aux antibiotiques - La Croix [Internet]. [cité 28 nov 2017]. Disponible sur: <https://www.la-croix.com/Ethique/Sciences-Ethique/Sciences/L-OMS-alerte-sur-la-resistance-toujours-plus-grande-aux-antibiotiques-2014-05-01-1144204>
5. Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis.* 15 avr 2008;197(8):1079-81.
6. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 janv 2009;48(1):1-12.
7. Lim LM, Ly N, Anderson D, Yang JC, Macander L, Jarkowski A, et al. Resurgence of colistin: a review of resistance, toxicity, pharmacodynamics, and dosing. *Pharmacotherapy.* déc 2010;30(12):1279-91.
8. Antoniadou A, Kontopidou F, Poulakou G, Koratzanis E, Galani I, Papadomichelakis E, et al. Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster. *J Antimicrob Chemother.* avr 2007;59(4):786-90.
9. European center for disease prevention and control (ECDC). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (Ears-net). Stockholm. 2014;211p.
10. Stürchler D. *Klebsiella* and *Klebs* the person behind the name. *Travel Med Infect Dis.* déc 2016;14(6):654.
11. Cowan ST, Steel KJ, Shaw C, Duguid JP. A classification of the *Klebsiella* group. *J Gen Microbiol.* déc 1960;23:601-12.
12. Bascomb S, Lapage SP, Willcox WR, Curtis MA. Numerical classification of the tribe *Klebsielleae*. *J Gen Microbiol.* juin 1971;66(3):279-95.
13. Orskov. Genus *V Klebsiella*. Baltimore, MD; 1984. (Bergey's manual of systematic bacteriology. The williams and wilkins Co.).
14. Carter JS, Bowden FJ, Bastian I, Myers GM, Sriprakash KS, Kemp DJ. Phylogenetic evidence for reclassification of *Calymmatobacterium granulomatis* as *Klebsiella granulomatis* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* oct 1999;49 Pt 4:1695-700.
15. Drancourt M, Bollet C, Carta A, Rousselier P. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* mai 2001;51(Pt 3):925-32.
16. Rosenblueth M, Martínez L, Silva J, Martínez-Romero E. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. *Syst Appl Microbiol.* févr 2004;27(1):27-35.
17. Li X, Zhang D, Chen F, Ma J, Dong Y, Zhang L. *Klebsiella singaporensis* sp. nov., a novel isomaltulose-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol.* nov 2004;54(Pt 6):2131-6.

18. The McGraw Hill companies, Inc. [Internet]. [cité 28 novembre 2017]. Disponible sur <https://www.mheducation.com/about.html>.
19. Podschun R, Ullmann U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev.* oct 1998;11(4):589-603.
20. Cryz SJ, Fürer F, Germanier R. Experimental Klebsiella pneumoniae burn wound sepsis: role of capsular polysaccharide. *Infect Immun.* janv 1984;43(1):440-1.
21. Amako K, Meno Y, Takade A. Fine structures of the capsules of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli K1. *J Bacteriol.* oct 1988;170(10):4960-2.
22. Podschun R, Penner I, Ullmann U. Interaction of Klebsiella capsule type 7 with human polymorphonuclear leucocytes. *Microb Pathog.* nov 1992;13(5):371-9.
23. Podschun R, Ullmann U. Klebsiella capsular type K7 in relation to toxicity, susceptibility to phagocytosis and resistance to serum. *J Med Microbiol.* avr 1992;36(4):250-4.
24. Williams P, Lambert PA, Brown MR, Jones RJ. The role of the O and K antigens in determining the resistance of Klebsiella aerogenes to serum killing and phagocytosis. *J Gen Microbiol.* juill 1983;129(7):2181-91.
25. Podschun R, Sievers D, Fischer A, Ullmann U. Serotypes, hemagglutinins, siderophore synthesis, and serum resistance of Klebsiella isolates causing human urinary tract infections. *J Infect Dis.* déc 1993;168(6):1415-21.
26. Baer H, Ehrenworth L. The pathogenicity of Klebsiella pneumoniae for mice: the relationship to the quantity and rate of production of type-specific capsular polysaccharide. *J Bacteriol.* nov 1956;72(5):713-7.
27. Mizuta K, Ohta M, Mori M, Hasegawa T, Nakashima I, Kato N. Virulence for mice of Klebsiella strains belonging to the O1 group: relationship to their capsular (K) types. *Infect Immun.* avr 1983;40(1):56-61.
28. Simoons-Smit AM, Verwey-van Vught AM, Kanis IY, MacLaren DM. Virulence of Klebsiella strains in experimentally induced skin lesions in the mouse. *J Med Microbiol.* févr 1984;17(1):67-77.
29. Yeh K-M, Chiu S-K, Lin C-L, Huang L-Y, Tsai Y-K, Chang J-C, et al. Surface antigens contribute differently to the pathophysiological features in serotype K1 and K2 Klebsiella pneumoniae strains isolated from liver abscesses. *Gut Pathog.* 2016;8:4.
30. Joiner KA. Complement evasion by bacteria and parasites. *Annu Rev Microbiol.* 1988;42:201-30.
31. Gaytán-Martínez J, Mateos-García E, Sánchez-Cortés E, González-Llaven J, Casanova-Cardiel LJ, Fuentes-Allen JL. Microbiological findings in febrile neutropenia. *Arch Med Res.* août 2000;31(4):388-92.
32. Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton IR. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect.* juill 2002;4(8):837-51.
33. Trent MS. Biosynthesis, transport, and modification of lipid A. *Biochem Cell Biol Biochim Biol Cell.* févr 2004;82(1):71-86.
34. Raetz CRH, Reynolds CM, Trent MS, Bishop RE. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:295-329.
35. Wang X, Quinn PJ. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Prog Lipid Res.* avr 2010;49(2):97-107.
36. Ottow JC. Ecology, physiology, and genetics of fimbriae and pili. *Annu Rev Microbiol.* 1975;29:79-108.
37. Old DC, Tavendale A, Senior BW. A comparative study of the type-3 fimbriae of Klebsiella species. *J Med Microbiol.* oct 1985;20(2):203-14.

38. Podschun R, Heineken P, Sonntag HG. Haemagglutinins and adherence properties to HeLa and intestine 407 cells of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* isolates. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]*. mars 1987;263(4):585-93.
39. Przondo Hessek A, Pulverer G. Hemagglutinins of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*. *Zentralblatt Bakteriol Mikrobiol Hyg 1 Abt Orig Med Mikrobiol Infekt Parasitol Int J Microbiol Hyg Med Microbiol Infect*. nov 1983;255(4):472-8.
40. Balish MJ, Jensen J, Uehling DT. Bladder mucin: a scanning electron microscopy study in experimental cystitis. *J Urol*. nov 1982;128(5):1060-3.
41. Ofek I, Beachey EH. Mannose binding and epithelial cell adherence of *Escherichia coli*. *Infect Immun*. oct 1978;22(1):247-54.
42. Venegas MF, Navas EL, Gaffney RA, Duncan JL, Anderson BE, Schaeffer AJ. Binding of type 1-piliated *Escherichia coli* to vaginal mucus. *Infect Immun*. févr 1995;63(2):416-22.
43. Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. *Infect Immun*. nov 2009;77(11):5016-24.
44. Fader RC, Davis CP. Effect of piliation on *Klebsiella pneumoniae* infection in rat bladders. *Infect Immun*. nov 1980;30(2):554-61.
45. Fader RC, Davis CP. *Klebsiella pneumoniae*-induced experimental pyelitis: the effect of piliation on infectivity. *J Urol*. juill 1982;128(1):197-201.
46. Maayan MC, Ofek I, Medalia O, Aronson M. Population shift in mannose-specific fimbriated phase of *Klebsiella pneumoniae* during experimental urinary tract infection in mice. *Infect Immun*. sept 1985;49(3):785-9.
47. Hornick DB, Allen BL, Horn MA, Clegg S. Adherence to respiratory epithelia by recombinant *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial gene products. *Infect Immun*. avr 1992;60(4):1577-88.
48. Tarkkanen AM, Virkola R, Clegg S, Korhonen TK. Binding of the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae* to human endothelial and urinary bladder cells. *Infect Immun*. avr 1997;65(4):1546-9.
49. Würker M, Beuth J, Ko HL, Przondo-Mordarska A, Pulverer G. Type of fimbriation determines adherence of *Klebsiella* bacteria to human epithelial cells. *Zentralblatt Bakteriol Int J Med Microbiol*. nov 1990;274(2):239-45.
50. Lawlor MS, O'connor C, Miller VL. Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection. *Infect Immun*. 2007;75(3):1463-72.
51. Griffiths E. The iron-uptake systems of pathogenic bacteria. In: Iron and infection. In J. J. Bullen and E. Griffiths. New York, N.Y: John Wiley et Sons, Inc.; 1987. p. p69-137.
52. Bullen JJ, Rogers HJ, Griffiths E. Role of iron in bacterial infection. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1978;80:1-35.
53. Bagley ST, Seidler RJ, Talbot HW, Morrow JE. Isolation of *Klebsiella* from within living wood. *Appl Environ Microbiol*. 7 janv 1978;36(1):178-85.
54. Kuan KB, Othman R, Rahim KA, Shamsuddin ZH. Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions. *PLoS One*. 2016; 11(3): e0152478.
55. Carpenter JL. *Klebsiella* pulmonary infections: occurrence at one medical center and review. *Rev Infect Dis*. août 1990;12(4):672-82.
56. Yeh K-M, Kurup A, Siu LK, Koh YL, Fung C-P, Lin J-C, et al. Capsular serotype K1 or K2, rather than magA and rmpA, is a major virulence determinant for *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Singapore and Taiwan. *J Clin Microbiol*. févr 2007;45(2):466-71.



57. Surveillance report. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2016 - AMR 2016\_Final-with-cover-for-web-2017.pdf [Internet]. [cité 28 nov 2017]. Disponible sur: [https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/AMR%202016\\_Final-with-cover-for-web-2017.pdf](https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/AMR%202016_Final-with-cover-for-web-2017.pdf)
58. Freney J, Renaud F, Leclercq R, Riegel P. Précis de bactériologie clinique 2<sup>ème</sup> édition. ESKA, Paris, France. 2007. 1783p.
59. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* oct 2005;18(4):657-86.
60. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* avr 2001;45(4):1151-61.
61. Nordmann P. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: overview of a major public health challenge. *Med Mal Infect.* févr 2014;44(2):51-6.
62. Nordmann P, Carrer A. Les carbapénèmases des entérobactéries. /data/revues/0929693X/v17sS4/S0929693X10709180/ [Internet]. 7 sept 2010 [cité 28 nov 2017]; Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/en/article/264877>
63. Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* mai 2012;18(5):413-31.
64. Institut de veille sanitaire (InVS). Consommation d'antibiotiques et résistance aux antibiotiques en France : nécessité d'une mobilisation déterminée et durable. Bilan des données de surveillance.
65. European center for disease prevention and control (ECDC). Antimicrobial resistance surveillance in Europe in 2010. Surveillance report. Stockholm. 2011;208p.
66. European center for disease prevention and control (ECDC). Summary of the latest data on antibiotic resistance in the European Union. Rapport. 2014;8p.
67. Réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (Raisin). Entérobactéries productrices de carbapénèmases, EPC, bilan de la situation nationale, mise à jour au 4 mars 2015.
68. Institut de veille sanitaire (InVS). Dossier thématique « infections associées aux soins ».
69. Haut conseil de la Santé publique (HCSP). Prévention de la transmission croisée des bactéries hautement résistantes aux antibiotiques émergentes (BHRe), juillet 2013.
70. 07-09-2017-RRA-636403829570926027 (Otilia Mardh) - EAAD EARS-Net summary.pdf [Internet]. [cité 28 nov 2017]. Disponible sur: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/EAAD%20EARS-Net%20summary.pdf>
71. Yahav D, Farbman L, Leibovici L, Paul M. Colistin: new lessons on an old antibiotic. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* janv 2012;18(1):18-29.
72. 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.* août 2012;10(8):917-34.
73. Evans ME, Feola DJ, Rapp RP. Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria. *Ann Pharmacother.* sept 1999;33(9):960-7.
74. Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, et al. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect Dis.* sept 2006;6(9):589-601.
75. Deris ZZ, Akter J, Sivanesan S, Roberts KD, Thompson PE, Nation RL, et al. A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. *J Antibiot (Tokyo).* févr 2014;67(2):147-51.

76. Falagas ME, Rafailidis PI, Matthaiou DK. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother.* oct 2010;13(4-5):132-8.
77. VIDAL Hoptimal [Internet]. [cité 5 juin 2017]. Disponible sur: <https://connect.chu-nancy.fr/DanaInfo=hoptimal.chu-nancy.fr+showProduct.html?productId=4200>
78. Plachouras D, Karvanen M, Friberg LE, Papadomichelakis E, Antoniadou A, Tsangaris I et al. Population pharmacokinetic analysis of colistin methanesulfonate and colistin after intravenous administration in critically ill patients with infections caused by gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(8):3430-6.
79. Mohamed AF, Karaikos I, Plachouras D, Karvanen M, Pontikis K, Jansson B et al. Application of a loadind dose of colistin methanesulfonate in critically ill patients : population pharmacokinetics, protein binding, and protection of bacterial kill. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(8):4241-9.
80. European Medicines Agency completes review of polymyxin-based medicines. Recommendations issued for safe use in patients with serious infections resistant to standard antibiotics. 2014
81. Nation RL, Li J, Cars O, Couet W, Dudley MN, Kaye KS, et al. Consistent global approach on reporting of colistin doses to promote safe and effective use. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* janv 2014;58(1):139-41.
82. Koch-Weser J, Sidel VW, Federman EB, Kanarek P, Finer DC, Eaton AE. Adverse effects of sodium colistimethate. Manifestations and specific reaction rates during 317 courses of therapy. *Ann Intern Med.* juin 1970;72(6):857-68.
83. Nation RL, Li J. Optimizing use of colistin and polymyxin B in the critically ill. *Semin Respir Crit Care Med.* déc 2007;28(6):604-14.
84. Falagas ME, Kasiakou SK. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Crit Care Lond Engl.* févr 2006;10(1):R27.
85. Jeannot K, Bolard A, Plésiat P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *Int J Antimicrob Agents.* mai 2017;49(5):526-35.
86. Gunn JS. The Salmonella PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. *Trends Microbiol.* juin 2008;16(6):284-90.
87. Yan A, Guan Z, Raetz CRH. An undecaprenyl phosphate-aminoarabinose flippase required for polymyxin resistance in Escherichia coli. *J Biol Chem.* 7 déc 2007;282(49):36077-89.
88. Chen HD, Groisman EA. The biology of the PmrA/PmrB two-component system: the major regulator of lipopolysaccharide modifications. *Annu Rev Microbiol.* 2013;67:83-112.
89. Mitrophanov AY, Jewett MW, Hadley TJ, Groisman EA. Evolution and dynamics of regulatory architectures controlling polymyxin B resistance in enteric bacteria. *PLoS Genet.* oct 2008;4(10):e1000233.
90. Lippa AM, Goulian M. Feedback inhibition in the PhoQ/PhoP signaling system by a membrane peptide. *PLoS Genet.* déc 2009;5(12):e1000788.
91. Olaitan AO, Diene SM, Kempf M, Berrazeg M, Bakour S, Gupta SK, et al. Worldwide emergence of colistin resistance in Klebsiella pneumoniae from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator mgrB: an epidemiological and molecular study. *Int J Antimicrob Agents.* déc 2014;44(6):500-7.
92. Poirel L, Jayol A, Bontron S, Villegas M-V, Ozdamar M, Türkoglu S, et al. The mgrB gene as a key target for acquired resistance to colistin in Klebsiella pneumoniae. *J Antimicrob Chemother.* janv 2015;70(1):75-80.

93. Majumdar SD, Yu J, Fookes M, McAteer SP, Llobet E, Finn S, et al. Elucidation of the RamA Regulon in *Klebsiella pneumoniae* Reveals a Role in LPS Regulation. *PLOS Pathog.* 29 janv 2015;11(1):e1004627.
94. 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.* 23 mai 2016;60(6):3709-16.
95. Clements A, Tull D, Jenney AW, Farn JL, Kim S-H, Bishop RE, et al. Secondary acylation of *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide contributes to sensitivity to antibacterial peptides. *J Biol Chem.* 25 mai 2007;282(21):15569-77.
96. Velkov T, Soon RL, Chong PL, Huang JX, Cooper MA, Azad MAK, et al. Molecular basis for the increased polymyxin susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* strains with under-acylated lipid A. *Innate Immun.* juin 2013;19(3):265-77.
97. Tran AX, Lester ME, Stead CM, Raetz CRH, Maskell DJ, McGrath SC, et al. Resistance to the antimicrobial peptide polymyxin requires myristoylation of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* lipid A. *J Biol Chem.* 5 août 2005;280(31):28186-94.
98. Llobet E, Tomás JM, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. *Microbiol Read Engl.* déc 2008;154(Pt 12):3877-86.
99. Campos MA, Vargas MA, Regueiro V, Llompard CM, Albertí S, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun.* déc 2004;72(12):7107-14.
100. 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.* sept 2013;57(9):4449-62.
101. Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AKM, Wertheim HFL, Sumpradit N, et al. Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis.* déc 2013;13(12):1057-98.
102. Bertrand X, Costa Y, Pina P. [Surveillance of antimicrobial resistance of bacteria isolated from bloodstream infections: data of the French National Observatory for Epidemiology of Bacterial Resistance to Antibiotics (ONERBA), 1998-2003]. *Med Mal Infect.* juin 2005;35(6):329-34.
103. Carlet J, Rambaud C, Pulcini C, l'Alliance contre développement des bactéries multirésistantes (ACdeBMR). [Alliance against MDRO: safeguarding antibiotics]. *Ann Fr Anesth Reanim.* sept 2012;31(9):704-8.
104. Carlet J, Mainardi J-L. Antibacterial agents: back to the future? Can we live with only colistin, co-trimoxazole and fosfomycin? *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* janv 2012;18(1):1-3.
105. Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM). Caractérisation des antibiotiques considérés comme « critiques ». Rapport d'expertise. France. nov 2013;16p.
106. Souli M, Rekatsina PD, Chryssouli Z, Galani I, Giamarellou H, Kanellakopoulou K. Does the activity of the combination of imipenem and colistin in vitro exceed the problem of resistance in metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates? *Antimicrob Agents Chemother.* mai 2009;53(5):2133-5.
107. Vidailac C, Leonard SN, Sader HS, Jones RN, Rybak MJ. In vitro activity of ceftaroline alone and in combination against clinical isolates of resistant gram-negative pathogens, including beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* juin 2009;53(6):2360-6.
108. Elemam A, Rahimian J, Doymaz M. In vitro evaluation of antibiotic synergy for polymyxin B-resistant carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* oct 2010;48(10):3558-62.

109. Urban C, Mariano N, Rahal JJ. In vitro double and triple bactericidal activities of doripenem, polymyxin B, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* juin 2010;54(6):2732-4.
110. Pournaras S, Vrioni G, Neou E, Dendrinou J, Dimitroulia E, Poulou A, et al. Activity of tigecycline alone and in combination with colistin and meropenem against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing Enterobacteriaceae strains by time-kill assay. *Int J Antimicrob Agents.* mars 2011;37(3):244-7.
111. Souli M, Galani I, Boukovalas S, Gourgoulis MG, Chryssouli Z, Kanellakopoulou K, et al. In vitro interactions of antimicrobial combinations with fosfomycin against KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* and protection of resistance development. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 2011;55(5):2395-7.
112. Yim H, Woo H, Song W, Park M-J, Kim HS, Lee KM, et al. Time-kill synergy tests of tigecycline combined with imipenem, amikacin, and ciprofloxacin against clinical isolates of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Ann Clin Lab Sci.* 2011;41(1):39-43.
113. Pankey GA, Ashcraft DS. Detection of synergy using the combination of polymyxin B with either meropenem or rifampin against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* août 2011;70(4):561-4.
114. Le J, McKee B, Srisupha-Olarn W, Burgess DS. In vitro activity of carbapenems alone and in combination with amikacin against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Med Res.* 19 mai 2011;3(3):106-10.
115. Jernigan MG, Press EG, Nguyen MH, Clancy CJ, Shields RK. The combination of doripenem and colistin is bactericidal and synergistic against colistin-resistant, carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* juin 2012;56(6):3395-8.
116. Vidailiac C, Benichou L, Duval RE. In vitro synergy of colistin combinations against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* sept 2012;56(9):4856-61.
117. Samonis G, Maraki S, Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Falagas ME. Synergy of fosfomycin with carbapenems, colistin, netilmicin, and tigecycline against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* mai 2012;31(5):695-701.
118. Hong JH, Clancy CJ, Cheng S, Shields RK, Chen L, Doi Y, et al. Characterization of porin expression in *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* identifies isolates most susceptible to the combination of colistin and carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 2013;57(5):2147-53.
119. Lee GC, Burgess DS. Polymyxins and Doripenem Combination Against KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Med Res.* avr 2013;5(2):97-100.
120. Lingscheid T, Tobudic S, Poepl W, Mitteregger D, Burgmann H. In vitro activity of doripenem plus fosfomycin against drug-resistant clinical blood isolates. *Pharmacology.* 2013;91(3-4):214-8.
121. Clancy CJ, Chen L, Hong JH, Cheng S, Hao B, Shields RK, et al. Mutations of the ompK36 porin gene and promoter impact responses of sequence type 258, KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains to doripenem and doripenem-colistin. *Antimicrob Agents Chemother.* nov 2013;57(11):5258-65.
122. Pankey GA, Ashcraft DS, Dornelles A. Comparison of 3 Etest(®) methods and time-kill assay for determination of antimicrobial synergy against carbapenemase-producing *Klebsiella* species. *Diagn Microbiol Infect Dis.* nov 2013;77(3):220-6.

123. Nastro M, Rodriguez CH, Monge R, Zintgraff J, Neira L, Rebollo M, et al. Activity of the colistin-rifampicin combination against colistin-resistant, carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *J Chemother Florence Italy*. août 2014;26(4):211-6.
124. Hickman RA, Hughes D, Cars T, Malmberg C, Cars O. Cell-wall-inhibiting antibiotic combinations with activity against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. avr 2014;20(4):O267-273.
125. Tascini C, Tagliaferri E, Giani T, Leonildi A, Flammini S, Casini B, et al. Synergistic activity of colistin plus rifampin against colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. août 2013;57(8):3990-3.
126. Evren E, Azap OK, Çolakoğlu Ş, Arslan H. In vitro activity of fosfomycin in combination with imipenem, meropenem, colistin and tigecycline against OXA 48-positive *Klebsiella pneumoniae* strains. *Diagn Microbiol Infect Dis*. juill 2013;76(3):335-8.
127. Clock SA, Tabibi S, Alba L, Kubin CJ, Whittier S, Saiman L. In vitro activity of doripenem alone and in multi-agent combinations against extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. juill 2013;76(3):343-6.
128. Berçot B, Poirel L, Dortet L, Nordmann P. In vitro evaluation of antibiotic synergy for NDM-1-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. oct 2011;66(10):2295-7.
129. Cohen Stuart J, Leverstein-Van Hall MA, Dutch Working Party on the Detection of Highly Resistant Microorganisms. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents*. sept 2010;36(3):205-10.
130. CA-SFM 2015. [Internet] [cité le 10 juin 2017]. Disponible sur : [http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFM\\_EUCAST\\_V1\\_2015.pdf](http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFM_EUCAST_V1_2015.pdf)
131. Vaubourdolle M. Chapitre Glycopeptides. In: *Infectiologie Tome 3*. 2009. (Collection Moniteur Internat).
132. Vaubourdolle M. Chapitre Sulfamides antibactériens et diaminopyrimidines. In: *Infectiologie Tome 3*. 2009. (Collection Moniteur Internat).
133. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard 9th ed. M07-A9*. 2012;
134. Hancock V, Ferrières L, Klemm P. Biofilm formation by asymptomatic and virulent urinary tract infectious *Escherichia coli* strains. *FEMS Microbiol Lett* 2007;267:30-37.
135. Podschun R, Pietsch S, Höller C, Ullmann U. Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. *Appl Environ Microbiol*. juill 2001;67(7):3325-7.
136. Eliopoulos GM, Moellering RC. Antimicrobial combinations. In: In Lorian V (ed), *Antibiotics in laboratory medicine*. Baltimore, MD: Williams & Wilkins Co.; 1991.
137. Kempf M, Djouhri-Bouktab L, Brunel J-M, Raoult D, Rolain J-M. Synergistic activity of sulbactam combined with colistin against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents*. févr 2012;39(2):180-1.
138. Aaron SD, Ferris W, Henry DA, Speert DP, Macdonald NE. Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with *Burkholderia cepacia*. *Am J Respir Crit Care Med*. avr 2000;161(4 Pt 1):1206-12.
139. Aaron SD, Vandemheen KL, Ferris W, Fergusson D, Tullis E, Haase D, et al. Combination antibiotic susceptibility testing to treat exacerbations of cystic fibrosis associated with multiresistant bacteria: a randomised, double-blind, controlled clinical trial. *Lancet Lond Engl*. 6 août 2005;366(9484):463-71.

140. Mezzatesta ML, Caio C, Gona F, Zingali T, Salerno I, Stefani S. Colistin Increases the Cidal Activity of Antibiotic Combinations Against Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: An In Vitro Model Comparing Multiple Combination Bactericidal Testing at One Peak Serum Concentration and Time-Kill Method. *Microb Drug Resist* Larchmt N. juill 2016;22(5):360-3.
141. Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JDF, Vinogradov E, Seemann T, et al. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother*. déc 2010;54(12):4971-7.
142. Bugla-Ploskonska G, Doroszkiewicz W. Bactericidal activity of normal bovine serum (NBS) directed against some *Enterobacteriaceae* with sialic acid-containing lipopolysaccharides (LPS) as a component of cell wall. *Pol J Microbiol* 2006;55:169-174.
143. Klak M, Jankowski S. The influence of lipopolysaccharides isolated from *Enterobacteriaceae* strains on the bactericidal activity of normal cord serum. *Adv Clin Exp Med* 2010;19:57-64.
144. Balestrino D, Ghigo JM, Charbonnel N, Haagensen JA, Forestier C. The characterization of functions involved in the establishment and maturation of *Klebsiella pneumoniae* in vitro biofilm reveals dual roles for surface exopolysaccharides. *Environ Microbiol* 2008;10:685-701.
145. Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol*. 2014;5:643.
146. Choi M-J, Ko KS. Loss of hypermucoviscosity and increased fitness cost in colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 23 strains. *Antimicrob Agents Chemother*. nov 2015;59(11):6763-73.
147. Cannatelli A, Pilato VD, Giani T, Arena F, Ambretti S, Gaibani P, 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*. 8 janv 2014;58(8):4399-403.
148. Henry R, Vithanage N, Harrison P, Seeman T, Coutts S, Moffatt JH, Nation RL, Li J, Harper M, Adler B, Boyce JD. Colistin-resistant, lipopolysaccharide-deficient *Acinetobacter baumannii* responds to lipopolysaccharide loss through increased expression of genes involved in the synthesis and transport of lipoproteins, phospholipids, and poly- $\beta$ -1,6-N-acetylglucosamine. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:59-69.
149. Kim SY, Choi HJ, Ko KS. Differential expression of two-component systems, pmrAB and phoPQ, with different growth phases of *Klebsiella pneumoniae* in the presence or absence of colistin. *Curr Microbiol*. 2014 Jul;69(1):37-41.
150. McPhee JB, Bains M, Winsor G, Lewenza S, Kwasnicka A, Brazas MD, Brinkman FS, Hancock RE. Contribution of the PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB two-component regulatory systems to Mg<sup>2+</sup>-induced gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2006 Jun;188(11):3995-4006.
151. Needham BD, Trent MS. Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*. juill 2013;11(7):467-81.
152. Cheng H-Y, Chen Y-F, Peng H-L. Molecular characterization of the PhoPQ-PmrD-PmrAB mediated pathway regulating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *J Biomed Sci*. 24 juill 2010;17:60.
153. Llobet E, Martínez-Moliner V, Moranta D, Dahlström KM, Regueiro V, Tomás A, et al. Deciphering tissue-induced *Klebsiella pneumoniae* lipid A structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 17 nov 2015;112(46):E6369-6378.

154. Karaiskos I, Friberg LE, Pontikis K, Ioannidis K, Tsagkari V, Galani L, et al. Colistin Population Pharmacokinetics after Application of a Loading Dose of 9 MU Colistin Methanesulfonate in Critically Ill Patients. *Antimicrob Agents Chemother.* déc 2015;59(12):7240-8.
155. 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.* août 2015;70(8):2261-70.
156. Ernst RK, Guina T, Miller SI. *Salmonella typhimurium* outer membrane remodeling: role in resistance to host innate immunity. *Microbes Infect.* déc 2001;3(14-15):1327-34.
157. Skiada A, Markogiannakis A, Plachouras D, Daikos GL. Adaptive resistance to cationic compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents.* mars 2011;37(3):187-93.
158. Breidenstein EBM, de la Fuente-Núñez C, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol.* août 2011;19(8):419-26.
159. Barin J, Martins AF, Heineck BL, Barth AL, Zavascki AP. Hetero- and adaptive resistance to polymyxin B in OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2 juill 2013;12:15.
160. Ah Y-M, Kim A-J, Lee J-Y. Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents.* juill 2014;44(1):8-15.
161. Simmons NA. Colistin, sulphamethoxazole, and trimethoprim in synergy against Gram-negative bacteria. *J Clin Pathol.* déc 1970;23(9):757-64.
162. Rosenblatt JE, Stewart PR. Combined activity of sulfamethoxazole, trimethoprim, and polymyxin B against gram-negative bacilli. *Antimicrob Agents Chemother.* juill 1974;6(1):84-92.
163. O'Hara JA, Ambe LA, Casella LG, Townsend BM, Pelletier MR, Ernst RK, et al. Activities of vancomycin-containing regimens against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 2013;57(5):2103-8.
164. Lo-Ten-Foe JR, de Smet AMGA, Diederer BMW, Kluytmans JAJW, van Keulen PHJ. Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, etest, broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* oct 2007;51(10):3726-30.
165. White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob Agents Chemother.* août 1996;40(8):1914-8.
166. Bonapace CR, White RL, Friedrich LV, Bosso JA. Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with Etest, time-kill, and checkerboard methods. *Diagn Microbiol Infect Dis.* sept 2000;38(1):43-50.
167. Orhan G, Bayram A, Zer Y, Balci I. Synergy tests by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*. *J Clin Microbiol.* janv 2005;43(1):140-3.
168. Kiratisin P, Apisarnthanarak A, Kaewdaeng S. Synergistic activities between carbapenems and other antimicrobial agents against *Acinetobacter baumannii* including multidrug-resistant and extensively drug-resistant isolates. *Int J Antimicrob Agents.* sept 2010;36(3):243-6.
169. Miyasaki Y, Morgan MA, Chan RC, Nichols WS, Hujer KM, Bonomo RA, et al. In vitro activity of antibiotic combinations against multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii* and the effects of their antibiotic resistance determinants. *FEMS Microbiol Lett.* mars 2012;328(1):26-31.

170. Tängdén T, Hickman RA, Forsberg P, Lagerbäck P, Giske CG, Cars O. Evaluation of double- and triple-antibiotic combinations for VIM- and NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* by in vitro time-kill experiments. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(3):1757-62.
171. Diep JK, Jacobs DM, Sharma R, Covelli J, Bowers DR, Russo TA, et al. Polymyxin B in Combination with Rifampin and Meropenem against Polymyxin B-Resistant KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* févr 2017;61(2).
172. Chiang MK, Lu MC, Liu LC, Lin CT, Lai YC. Impact of Hfq on global gene expression and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS One.* 2011;6(7):e22248.
173. Ramos PI, Picão RC, Almeida LG, et al. Comparative analysis of the complete genome of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Kp13 reveals remarkable genome plasticity and a wide repertoire of virulence and resistance mechanisms. *BMC Genomics.* 2014;15:54.
174. Wright MS, Suzuki Y, Jones MB, et al., Genomic and Transcriptomic Analyses of Colistin-Resistant Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* Reveal Multiple Pathways of Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(1):536-43.



# ANNEXES



Annexe 2 : Liste du matériel, équipements et réactifs

<b>Matériels et équipements</b>	<b>Références</b>	<b>Fournisseurs</b>
PSM II	12969	ESI FLUFRANCE
Balance de précision (d=0,01 mg de 0 à 10 g / d=0,05 de 10 à 100g)	BP211D	Sartorius
Balance de précision (d=0.01g de 0 à 1500g)	TE1502S	Sartorius
Centrifugeuse de paillasse réfrigérée	5804R	Eppendorf
Filtre 0.2 µm	83.1826.001	Sarstedt
Incubateur	Stabilitherme	Thermo Electron Corporation
Incubateur/Agitateur		INFORS AG
Microplaques 96 puits fonds en U	82.1582.001	Sarstedt
Pipetboy accu		Integra Biosciences
Pipettes 5 mL	86.1253.001	Sarstedt
Pipettes 10 mL	86.1254.001	Sarstedt
Pipettes 25 mL	86.1685.001	Sarstedt
Seringues 10 mL, 3 pièces, stériles	302188	BD Plastipak
Spectrophotomètre Multiskan FC	F01789	Thermo Scientific
Tubes 50 mL	62.547.254	Sarstedt
Tubes 15 mL	62.554.502	Sarstedt
Tubes Eppendorf 1.5 mL	72.706	Sarstedt

<b>Réactifs</b>	<b>Références</b>	<b>Fournisseurs</b>
Colistine sulfate	<b>C4461</b>	<b>Sigma</b>
Eau Distillée Stérile		
Etest® Colistine	<b>523600</b>	<b>Biomérieux</b>
Etest® Triméthoprim	<b>577300</b>	<b>Biomérieux</b>
Etest® Triméthoprim- Sulfaméthoxazole	<b>412481</b>	<b>Biomérieux</b>
Gélose au sang	<b>43049</b>	<b>Biomérieux</b>
Mueller Hinton Agar II	<b>97580</b>	<b>Sigma</b>
Mueller Hinton Bouillon II	<b>212322</b>	<b>BD</b>
Sulfaméthoxazole	<b>S7507</b>	<b>fluka</b>
Triméthoprim	<b>T7883</b>	<b>Sigma</b>
Vancomycine HCl	<b>66397</b>	<b>Inresa</b>

Annexe 3 : Listing des amorces utilisées

RT-qPCR					
Nom du gène	R/F *	Séquences (5' ->3')	Tm (°C)	Accession number/ Ref	Taille de l'amplicon
<i>16S</i>	R	TGC-GGT-ATT-AGC-TAC-CGT-TTC-C	62,9	NC_009648	
	F	TCA-TGG-CTC-AGA-TTG-AAC-GCT			
<i>lpxA</i>	R	CCA-ACC-ATA-ACG-TGT-GAG-CCA	62,9	NC_009648	
	F	CCA-CAC-CAA-AAT-CGG-CCG-TGA			
<i>lpxC</i>	R	CAT-CTT-CGA-CGC-GAA-CCG-TCT-C	62,9	NC_009648	
	F	TCA-CAC-TGA-CGT-TAC-GCC-CTG			
<i>msbA</i>	R	TAA-TCG-ATG-CCC-CTT-CGC-GGA-C	62,9	NC_009648	
	F	CGG-GCT-AAT-CGT-AGC-GGC-GGT-G			
<i>arnT</i>	R	CAC-CCC-AGA-AGC-TGC-ACA-TCG	62,9	NC_009648	
	F	CCG-TTT-GCT-TTG-GCA-ACC-CGA			
<i>alda</i>	R	GGA-TCT-TGC-CGC-CTT-CAG-GGA-C	59,9		
	F	ATG-ACA-GCA-CCC-GTT-CAA-CAC			
<i>mdh</i>	R	TTC-AGC-TCC-GCC-ACA-AAG-GTA	59,9		
	F	GC-TGG-CGG-TAG-ATC-TAA-GTC-ATA			
<i>pmrA</i>	R	ATG-CAC-TTC-CAG-GGT-ATT-GG	59,9	A79E_3435 CDS T02213	
	F	ATC-TGC-GCC-TTA-ACG-TCA-CT			
<i>pmrD</i>	R	CAA-CGC-TCG-CTG-CTA-TAA-TG	59,9	KPN_02444 CDS T00566	
	F	AAA-GTA-CAG-GAC-AAC-GCT-TCG			
<i>pmrB</i>	R	GAG-ACG-ACG-GTC-TCG-TTT-TC	67,8	KPN_00806 CDS T00566	
	F	AGA-TGA-CCA-CCA-GCA-TTT-CC			
<i>phoP</i>	R	CGA-ATT-GCG-CTG-ATG-AAG-GG	59,9	HF536482	
	F	TCA-GGT-TTT-CCG-GGA-TGT-CG			
<i>phoQ</i>	R	GCA-ATG-GCT-TCC-ATG-AGA-TT	59,9	HF536482	
	F	CAC-CAT-ATA-GCT-GCG-CTT-GA			
qPCR					
Nom du gène	R/F *	Séquences (5' ->3')	Tm (°C)	Accession number/ Ref	Taille de l'amplicon
<i>mgrB</i>	R	AAG-GCG-TTC-ATT-CTA-CCA-CC	62,9	Cannatelli	253 pb
	F	TTA-AGA-AGG-CCG-TGC-TAT-CC			

\*R : reverse, F : Forward

#### Annexe 4 : Composition des tampons utilisés

---

- Pour 1 L de tampon Tris, Borate, EDTA (TBE) (1X) pH = 8

10,78 g (89 mM) Tris  
5,50 g (89mM) acide borique  
0,58 g (2 mM) EDTA disodique  
H<sub>2</sub>O qsp 1 L

- Pour 1 L de tampon phosphate salin (PBS)

8 g de NaCl  
0,2 g de KCl  
2,9 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12H<sub>2</sub>O  
0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
H<sub>2</sub>O qsp 1 L



**IMPORTANT**

A l'attention du  
Responsable de Laboratoire  
Directeur des Établissements de Santé  
Responsable de réactovigilance

Craponne, le 31 Mai 2017  
Réf. : AH/im - FSCA 3490

**IMPORTANT : AVIS DE SECURITE**  
**Cartes VITEK® 2 Antibiogramme :**  
**AST-N240 (réf. 413205) et AST-XN05**  
**(réf. 413230)**  
**Colistine**

Chère cliente, Cher client,

Nous avons le plaisir de vous compter parmi les utilisateurs du système VITEK® 2 et nous vous remercions de votre fidélité.

Ce courrier est destiné à tous les utilisateurs des cartes VITEK 2 Gram-Négatif des références citées ci-dessous :

Référence	Description
413205	AST-N240
413230	AST-XN05

Un problème de performance a été identifié avec la Colistine (formule : cs01n).

**Description de l'anomalie :**

L'EUCAST et le CLSI ont récemment publié une recommandation conjointe selon laquelle la technique de référence Microdilution en bouillon (BMD) est la seule méthode validée pour la détermination de la sensibilité à la Colistine. Puisque le développement de la Colistine (formule cs01n) des cartes VITEK 2 AST-GN, a été corrélé à la technique de référence de Dilution en Gélose (DEG), bioMérieux a mené une enquête en interne afin d'identifier tout changement de performance pour la Colistine (cs01n) depuis le développement du test VITEK 2 Colistine (cs01n). Deux cent quatre-vingt-dix (290) isolats avec des degrés différents de sensibilité et de résistance à la Colistine ont été testés sur le système VITEK 2, avec la technique de référence Microdilution en bouillon et la Dilution en Gélose. Deux souches de contrôle qualité (*E.coli* ATCC® 25922™ et *P. aeruginosa* ATCC® 27853™) ont été également testées. Les résultats de CMI des trois méthodes ont été comparés et évalués.

Les investigations ont démontré un taux élevé d'erreurs très majeures, (souches catégorisées sensibles au lieu de résistantes) avec la Colistine VITEK 2 AST-GN (cs01n) par rapport à la Dilution en Gélose (méthode de référence utilisée lors du développement cs01n) et comparée à la Microdilution en bouillon (méthode recommandée par l'EUCAST et le CLSI).



Depuis le développement de la Colistine sur les cartes VITEK® 2 AST-GN, des taux de résistance plus élevés ont été signalés. En novembre 2015, une résistance à la Colistine transférable par un plasmide (gène *mcr-1*) a été décrite\* ainsi qu'une résistance hétérogène signalée plus fréquemment.

\* "Emergence of plasmid-mediated Colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study.". *The Lancet. Infectious diseases.* (Liu YY et al., *Lancet Infect Dis*, 2015).

#### **Impact client :**

Une évaluation de l'anomalie décrite montre qu'il existe un risque potentiel d'obtenir un résultat faussement sensible vis à vis de la Colistine. Un résultat faussement sensible pourrait avoir une influence négative sur la décision de traitement en choisissant cette molécule. Un traitement inapproprié pourrait être prescrit entraînant un échec thérapeutique.

#### **Actions requises :**

Nous vous demandons en conséquence de prendre les dispositions suivantes :

- Réaliser une méthode alternative avant de communiquer tout résultat sensible de Colistine (cs01n).
  - Veuillez noter qu'une règle bioART peut être créée pour supprimer du rapport de laboratoire le résultat sensible de Colistine (cs01n). (Voir Annexe A)
- De bien vouloir diffuser cette information aux personnels concernés de votre laboratoire, de conserver une copie dans vos fichiers et de communiquer l'information à tous les utilisateurs de ce produit, incluant aussi ceux à qui vous l'auriez transféré.
- Compléter l'accusé de réception de ce courrier, joint en Annexe et nous le retourner :

par email à [atrbact@biomerieux.com](mailto:atrbact@biomerieux.com) ou par fax au 04 78 87 20 91

L'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé a été informée de cette communication.

bioMérieux s'engage à fournir des produits de qualité à ses clients. Aussi, nous vous prions de bien vouloir nous excuser des inconvénients que cette situation pourrait engendrer dans l'organisation de votre laboratoire.

Notre Centre de Relation Client se tient à votre disposition pour tout complément d'information au :

☎ : 0 820 22 9090

Nous vous remercions pour votre confiance en nos produits et vous prions d'agréer, Chère Cliente, Cher Client, l'expression de nos salutations les meilleures.

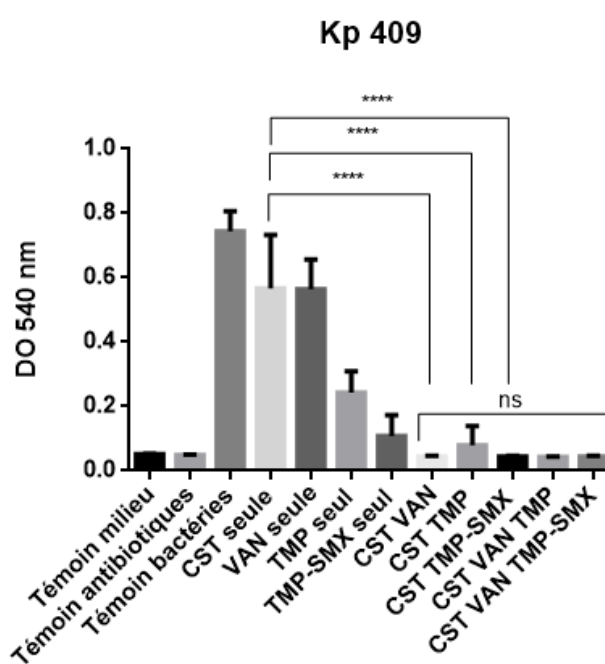
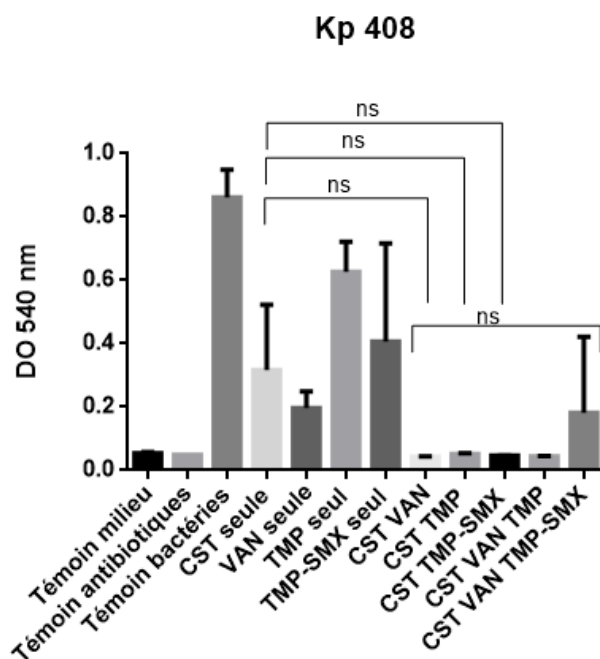
Armèle HEURTEAU  
Support Application Bactériologie  
Centre de Relation Client

PJ : Accusé réception / Annexe A

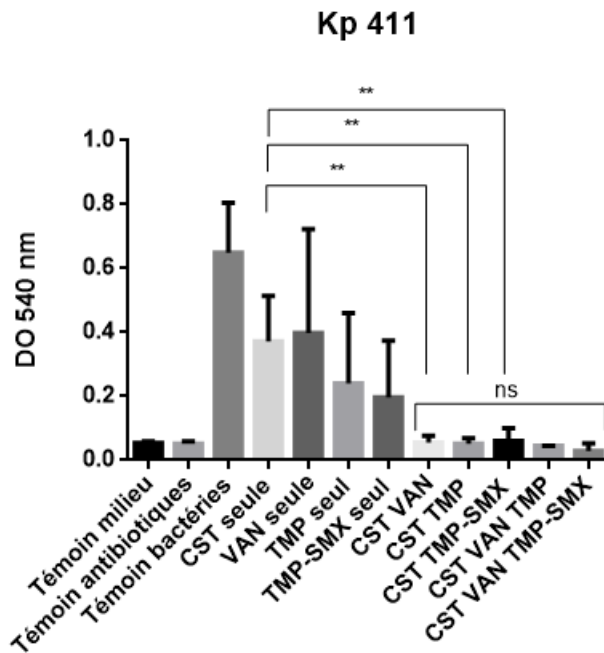
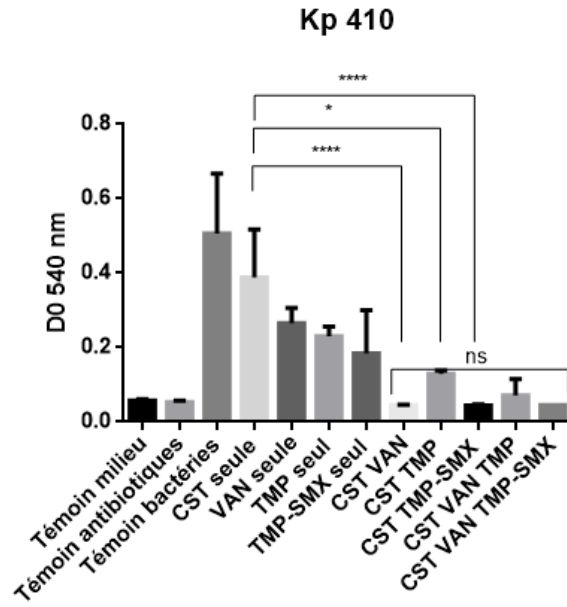
Annexe 6 : Résultats MCBT

Graphiques récapitulatifs de l'absorbance à 540 nm après les tests MCBT sur l'ensemble des isolats de *Klebsiella pneumoniae*.

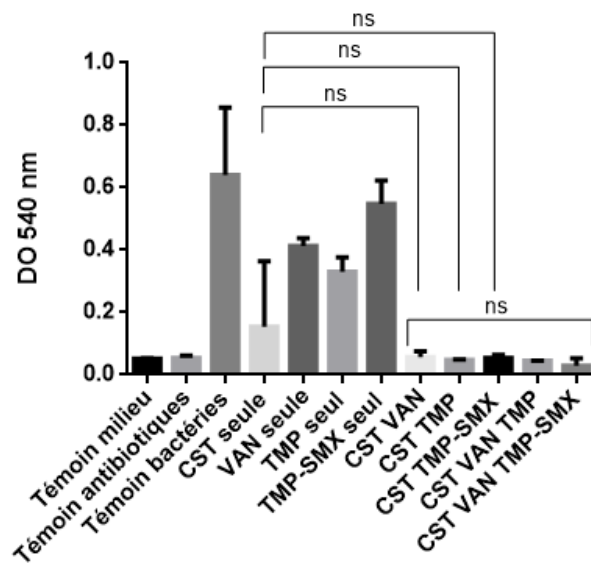
CST = Colistine, Van = Vancomycine, TMP = Triméthoprine, TMP-SMX = Cotrimoxazole, ns = non significatif. n = au minimum 3.



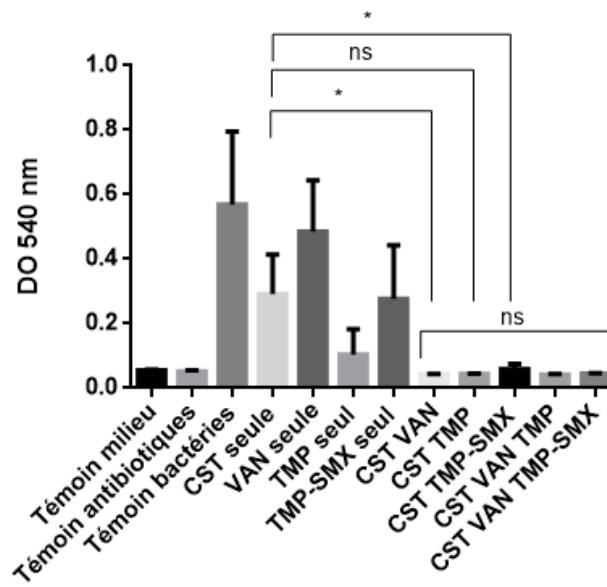


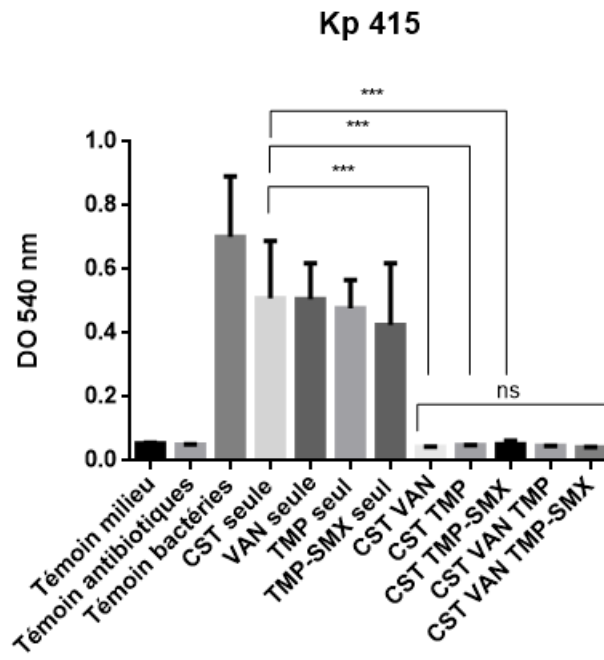
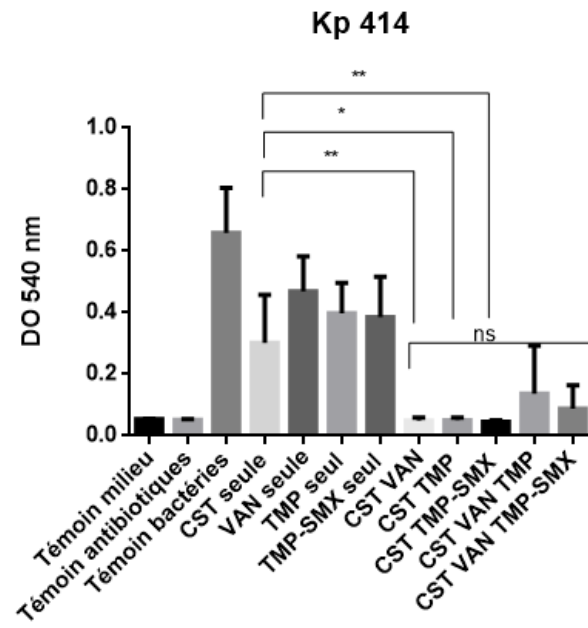


### Kp 412

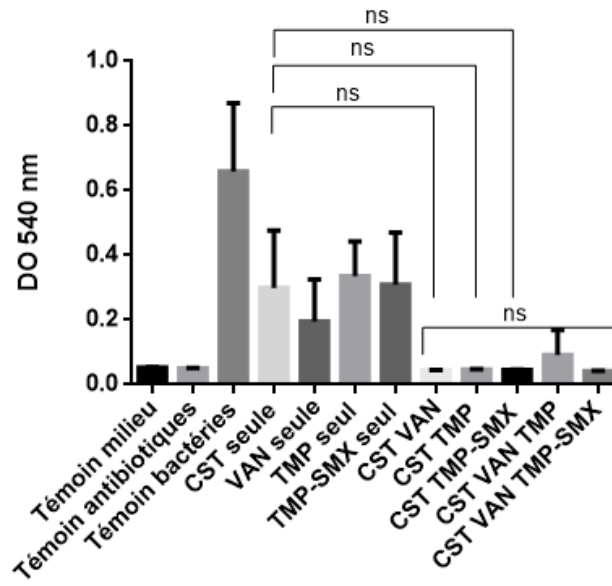


### Kp 413

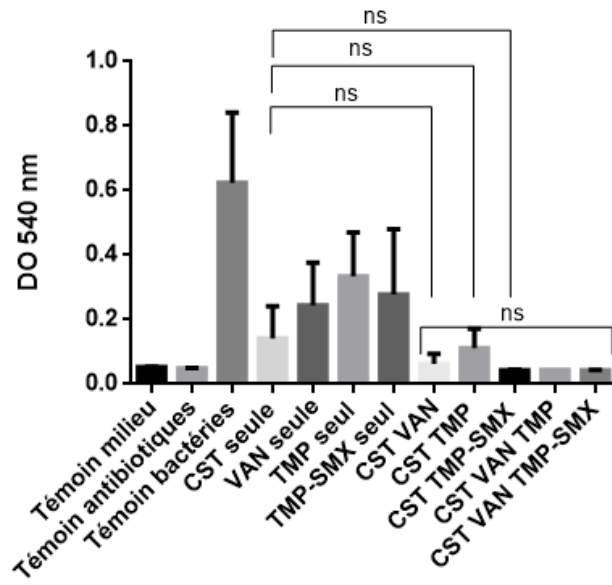




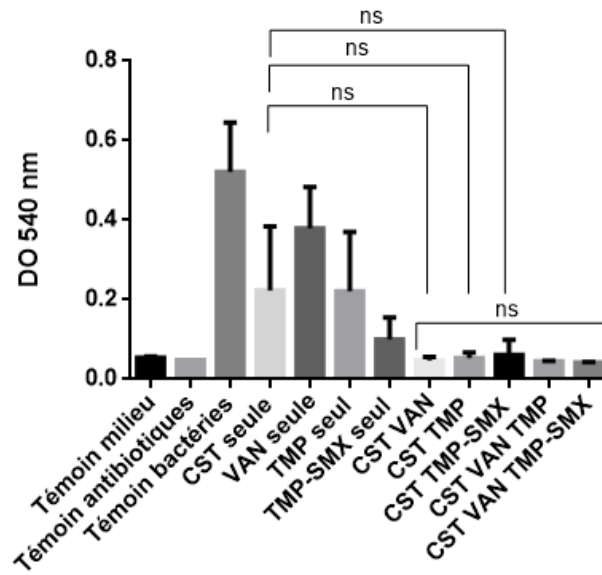
### Kp 416



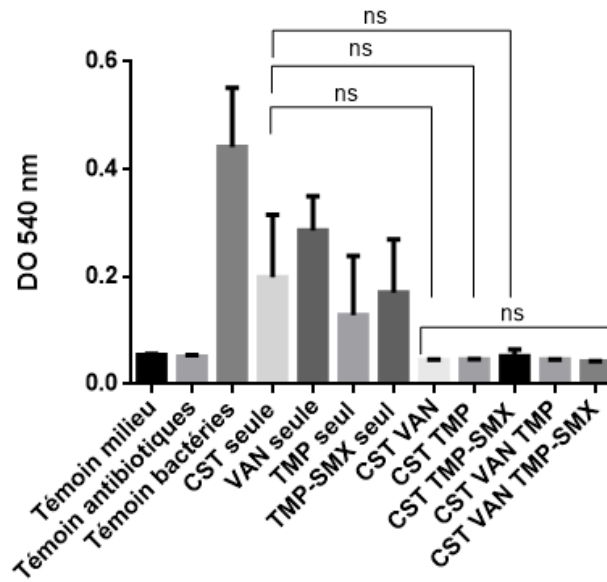
### Kp 417

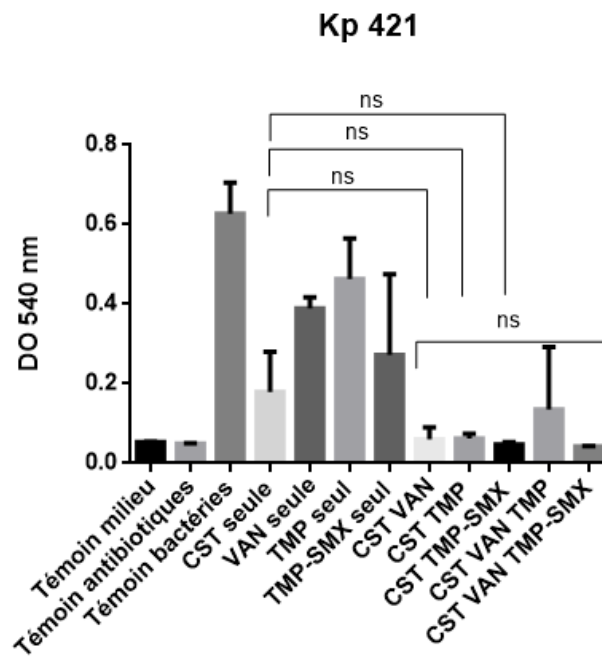
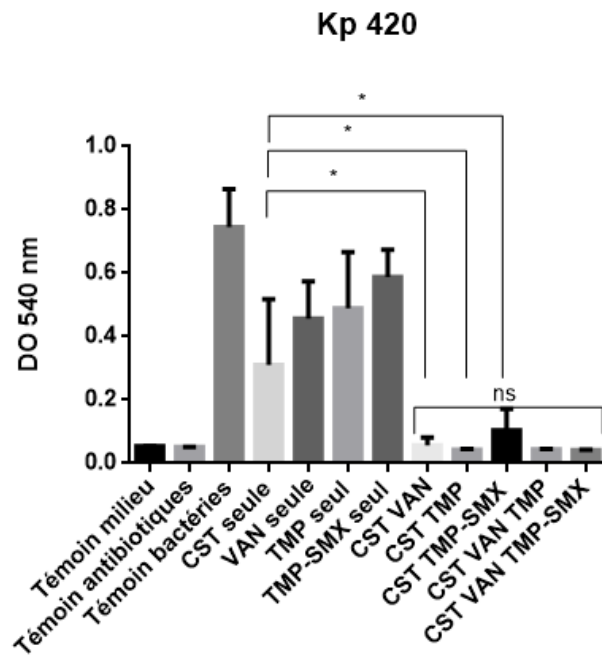


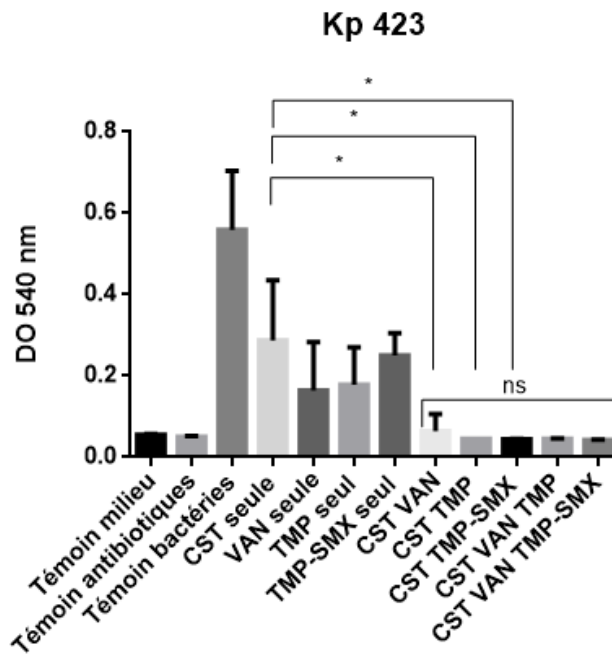
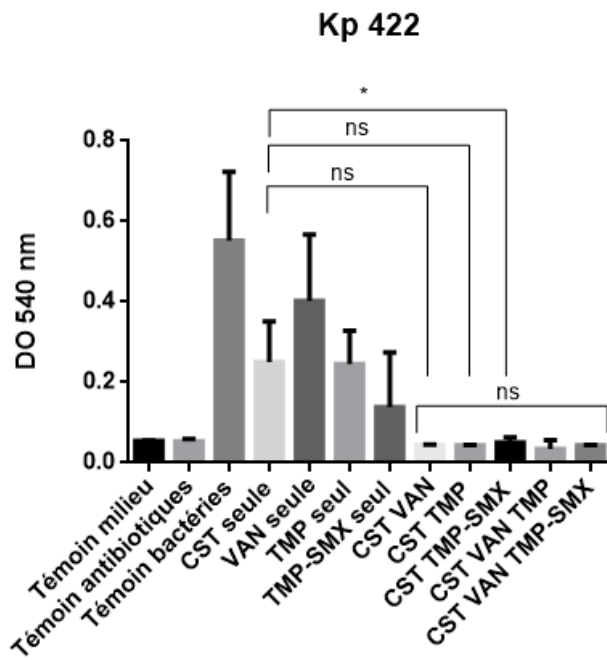
### Kp 418

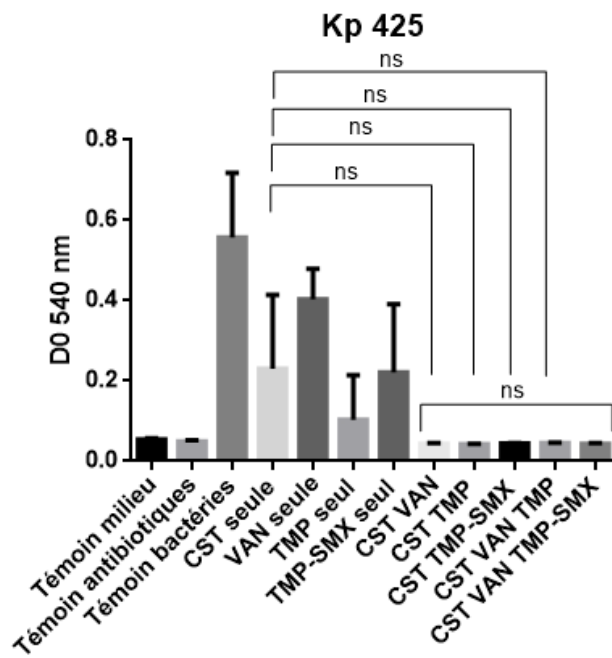
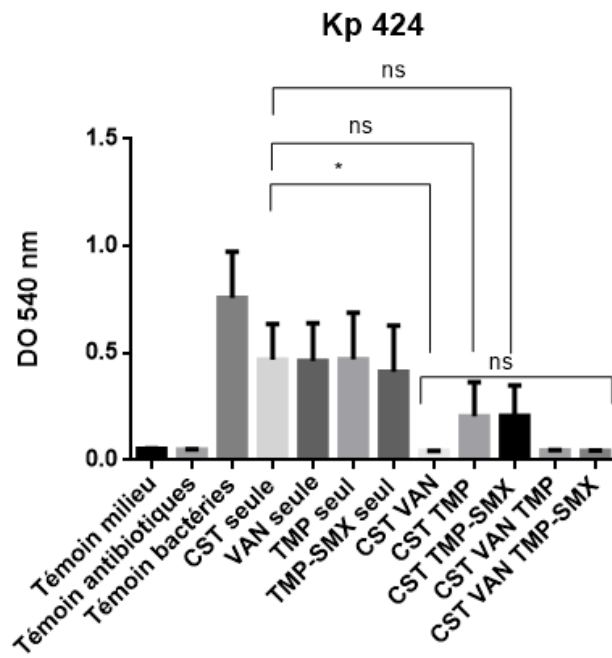


### Kp 419











Annexe 7 : Publication n°1: Unravelling of a mechanism of resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* using atomic force microscopy

---

## **Annexe 8 : Publication n°2: Impact of the culture medium on the expression of virulence factors in colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains**

---

### **ABSTRACT**

The emergence of multidrug-resistant (MDR) *Klebsiella pneumoniae* is a real public health. MDR *K. pneumoniae* presents an increasing challenge to health care. Colistin is the antibiotic of choice used as a last resort. This recent renewed interest in this antibiotic has resulted in the emergence of resistant strains. However, the mechanism of resistance to colistin is not completely elucidated. Currently, the main mechanism demonstrated would involve a modification of the lipopolysaccharide (LPS) with addition of L-Ara4N moiety. The synthesis of L-Ara4N moiety is controlled by two-component systems (TCSs), PmrA/PmrB and PhoP/PhoQ. These TCSs can be triggered by environmental stimuli. But, in the literature, various media (i.e. Mueller Hinton Broth Cation-Adjusted (MHB-CA), Mueller Hinton Broth (MHB), Luria Bertani Broth (LBB)...) are indifferently used to study the expression of genes involved in LPS synthesis during colistin resistance. Moreover, while Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines recommend the use of MHB-CA to achieve colistin Minimum Inhibitory Concentration values, there is no specific recommendation regarding the study of colistin resistance. Here, we investigated the impact of three culture media (i.e. MHB-CA, MHB and LBB) on the expression of LPS as well as L-Ara4N moiety synthesis, combined with two others virulence factors, biofilm production and resistance to serum bactericidal activity; in two colistin-sensitive *K. pneumoniae* strains and their colistin-resistant derivatives. Finally, our results suggests that, *in vitro*, colistin-resistance patterns influence virulence factor profiles; and, discrepancies observed between the different *K. pneumoniae* strains may be due to the culture medium used as well as strain background.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, virulence factors, culture medium, colistin resistance

## 1. Introduction

*Klebsiella pneumoniae* is an important opportunistic pathogen that causes numerous infections including pneumonia, bloodstream, urinary tract infection and septic shock (Podschun and Ullmann, 1998). Clinical outcomes of *K. pneumoniae* infections are related with nature and number of expressed virulence factors (Yu et al., 2007). Indeed this bacterium has many virulence factors such as capsule, hypermucoviscosity, lipopolysaccharide (LPS), iron acquisition system, serum resistance and biofilm formation (Barreto S et al., 2009; Podschun and Ullmann, 1998; Schroll C et al., 2010). Another important feature of *K. pneumoniae* is its ability to resist a large number of antibiotics. Over the past few years, the emergence and the spread of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* strains are associated with an important impact on morbidity and mortality (Cannatelli et al., 2014a). This increase combined with the lack of new antibacterial agents against Gram-negative bacteria (GNB) creates a real challenge in the management of these infections (Giamarellou and Poulakou, 2009; Giamarellou, 2010; Hirsch and Tam, 2010). Consequently the emergence of multidrug resistant *K. pneumoniae* has been pointed by the World Health Organization as a public health threat (Llobet et al., 2015). For these pathogens, colistin is often the only available active antibiotic (Ah et al., 2014).

However, the recent renewed interest in colistin has led to the emergence of resistance in GNB. Colistin resistance is mainly associated with LPS modifications (Moffatt et al., 2010). Such modifications can be obtained by covalent alterations of the lipid A moiety of LPS through the addition of L-Ara4N and phosphoethanolamine, deacylation, hydroxylation (Raetz et al., 2007). Other mechanisms exist like efflux pump and capsule, but they are less documented in the literature (Padilla et al., 2010; Formosa et al., 2015). Recently, in *K. pneumoniae*, a new mechanism of colistin resistance was highlighted (Cannatelli et al., 2013). Indeed, it was demonstrated that mutation / inactivation of *mgrB* can lead to colistin resistance. Disruptions of *mgrB* including insertional inactivation by an IS5 like element can result in the activation of the two-component systems (TCSs), which in turn lead to the upregulation of the *arnBCADTEF* operon, which adds L-Ara4N moiety to lipid A (Cannatelli et al., 2013, 2014a). Moreover, in *K. pneumoniae*, it has been demonstrated that activated PhoP can directly activate *arnBCADTEF* operon in a phenomenon termed the feedforward connector loop (FCL) (Mitrophanov et al., 2008). So the synthesis of L-Ara4N moiety is controlled by TCSs, PhoP/PhoQ and PmrA/PmrB. These TCSs are triggered by specific mutations and environmental stimuli, such as elevated calcium or low magnesium concentration, acid pH and the presence of iron in the medium (Cannatelli et al., 2014b, Girardello et al., 2012, Jayol et al., 2014, Olaitan et al., 2014a,).

Although these TCSs are sensitive to environmental stimuli, various media (*e.g.*, Mueller Hinton Broth, Mueller Hinton Broth Cation-Adjusted, Luria Bertani Broth ...) are used to study gene expression of LPS involved in colistin resistance (Cheng et al., 2010; Henry et al., 2012; Hood et al., 2013). Moreover, while Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI) recommend the use of MHB-CA to achieve colistin MICs, there is no specific recommendation regarding the study of the mechanism of colistin resistance.

Thus, the aim of this work was to study, *in vitro*, the impact of the culture medium on three virulence factors (the gene expression of LPS, biofilm production and serum bactericidal assay) in two colistin-resistant *K. pneumoniae* strains using the colistin susceptible parent strains as comparators. First, we determined whether or not the gene *mgrB* was inactivated in the colistin resistant strains. Secondly, we measured the expression of genes involved in the constitutive pathway of LPS (*lpxA*, *lpxC* and *msbA*) and those involved in the synthesis of the L-Ara4N moiety (*pmrA*, *pmrB*, *pmrD*, *phoP*, *phoQ* and *arnT*) in both colistin susceptible and resistant derivatives. Then, we investigated the impact of the culture medium on biofilm production and serum bactericidal assay, for which LPS is involved.

## **2. Material & Methods**

### **2.1. Bacterial strains and growth conditions**

Two strains of colistin susceptible *K. pneumoniae* were selected from the ABC Platform® Bugs Bank Collection (ABC Platform®, Université de Lorraine, France), Kp1 (low penicillinase) and Kp6 (high penicillinase). These two strains come from different samples, Kp1 from a sputum sampling and Kp6 a blood culture. Their two colistin-resistant derivatives; Kp1m and Kp6m, previously described (Vidailiac et al., 2012), were also included. Mutants were stable over 5 passages on drug-free agar. Cultures were grown in Mueller-Hinton broth (MHB) (Difco, Fischer Scientific, SAS, Illkirch, France), in Mueller-Hinton broth Cation-Adjusted (MHB-CA) (Difco, Fischer Scientific, SAS, Illkirch, France), or in Luria Bertani Broth (LBB) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Mueller-Hinton 2 agar (MH2A) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) was utilized for growth and colony quantification. Media composition is summarized in Table 1.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8

Table 1: Composition of media

	Mueller Hinton Broth Cation-Adjusted		Mueller Hinton Broth		Luria Bertani Broth		Mueller Hinton 2 Agar	
Formula per liter purified water*	Acid Digest of Casein	17.5 g	Acid Digest of Casein	17.5 g	Tryptone	10 g	Acid Digest of Casein	17.5 g
	Beef Extract	3.0 g	Beef Extract	2.0 g	Yeast Extract	5 g	Beef Extract	2.0 g
	Starch	1.5 g	Starch	1.5 g	NaCl	5 g	Starch	1.5 g
							Agar	17.0 g
	Mass concentration (mg/L)							
Composition/ pH	Calcium	20-25	Calcium	2.9-5.9	Calcium	3.3	Calcium	20-25
	Magnesium	10-12.5	Magnesium	3.2-5.2	Magnesium	3.1	Magnesium	10-12.5
	Molar concentration ( $\mu\text{mol/L}$ )							
	Calcium	498-623	Calcium	72-147	Calcium	82.4	Calcium	498-623
	Magnesium	420-510	Magnesium	130-210	Magnesium	130	Magnesium	420-510
	pH							
	7.3 $\pm$ 0.1		7.3 $\pm$ 0.1		6.8-7.2 (2% solution)		7.3 $\pm$ 0.1	

\*According to manufacturer

9  
10  
11  
12  
13  
14  
15

## 16        **2.2. Susceptibility testing**

17        Minimum Inhibitory Concentration values (MICs) for colistin (Sulphate salt, Sigma-Aldrich, Saint Quentin  
18        Fallavier, France) were determined in triplicate according to CLSI guidelines in MHB-CA, in MHB and LBB  
19        (CLSI, 2012).

## 20        **2.3. Genomic characterization**

21        Genomic characterization was realized as described by Formosa et al. (Formosa et al., 2015). RNAs were  
22        extracted using the RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen, 74136) and RNA concentration was measured at 260 nm  
23        using a NanoPhotometer® P-class (Implen, Munich, Germany). Reverse transcription was performed using the  
24        iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, 170-8891). Sequences of primers were designed using Primer 3 (Rozen  
25        and Skaletsky, 2000) and are listed in Table 1S. For *mgrB*, PCR products were analyzed by 1.4% agarose gel for  
26        electrophoresis. A molecular marker (EZ Load 100 bp molecular ruler, Bio-rad, 170-8352) that includes 100-  
27        1000 bp in exact 100 bp increments was used. For the other genes, qPCR was performed using SsoAdvanced  
28        SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). 16S was used as the reference gene. The data  
29        were stored and reprocessed according to the associated software (Bio-Rad CFX Software Manager™ v2.1, Bio-  
30        Rad, Marnes la Coquette, France). Briefly, data were compared to those obtained with the 16S gene using the  
31        threshold cycle ( $2^{\Delta\Delta C_q}$ ) method (relative), and those obtained values were then normalized against the values  
32        obtained for the susceptible strain. Analyses were carried out in triplicate in three independent experiments.

## 33        **2.4. Phenotypic characterization**

### 34        **2.4.1. Serum bactericidal assay**

35        The susceptibility of bacteria to human serum was investigated by the method described elsewhere (Podschun et  
36        al., 2001). Briefly, bacteria were first cultured in MHB, MHB-CA and LBB, for 24 hours at 35°C. Then, 25 µL  
37        of each bacterial suspension ( $3.10^6$  CFU/mL) and 75 µL of human serum were incubated, in 96-well plates, at  
38        37°C. After 0, 1h, 2h and 3h, samples were collected, diluted and cultured on MH2A plates. The number of  
39        colony forming units (CFU) at t = 0 h was taken as 100%. Each experiment was repeated three times.

### 40        **2.4.2. Biofilm Production**

41        Biofilm production was assessed for the mutants, using Crystal Violet staining, as previously described  
42        (Hancock et al., 2011), and Kp1 and Kp6 were used as controls. Briefly, bacteria were firstly cultured in MHB,  
43        MHB-CA and LBB. Then, 1 µL of each bacterial suspension and 100 µL of each culture medium were  
44        incubated, in 96-well plates, for 16 hours at 37°C. After incubation, 100 µL of 0.1% Crystal Violet were added  
45        to each well. After 3 minutes at room temperature, each well was washed with 100 µL of PBS. Then Crystal

46 Violet was extracted with one wash of 200  $\mu$ L of ethyl alcohol and the absorbance was determined at 540 nm in  
47 an UV Spectrophotometer (Thermo Scientific, Villebon sur Yvette, France). Experiments were repeated three  
48 times.

### 49 2.5. Statistical Analysis

50 Statistical analyzes were performed with the GraphPad Prism6<sup>®</sup> software version 6.0e. During multiple  
51 comparisons of results, we performed an ANOVA test followed by a tukey post hoc. And when comparing two  
52 by two, a t-test was performed.

## 53 3. Results

### 54 3.1. Antimicrobial susceptibility

55 MICs for colistin were determined by broth microdilution method in MHB-CA, as recommended by CLSI,  
56 MHB and LBB. Whatever the culture medium used, Kp1 and Kp6 are susceptible to colistin (MIC < 1 mg/L);  
57 and unsurprisingly, Kp1m and Kp6m are resistant to colistin (Table 2).

58 Table 2: Colistin MICs (mg/L) of strains studied

	MHB-CA	MHB	LBB
Kp1	< 1	< 1	< 1
Kp1m	64	8	8
Kp6	< 1	< 1	< 1
Kp6m	128	8	128

59  
60 Nevertheless, if we look carefully, we can see a very wide range in MICs. Indeed, higher MIC values were  
61 obtained when MHB-CA is used; while we obtained “relatively” weaker MIC values, when MHB was used.  
62 When LBB was used, we obtained again very different MICs.

### 63 3.2. Determination of iron concentration in the culture media used

64 In our study, the determination of iron concentration is important. Indeed, the TCSs are susceptible to  
65 environmental stimuli and more particularly to magnesium and iron concentrations, and pH. The magnesium  
66 concentration and pH were given by the supplier but not iron concentration. So, iron concentrations were  
67 determined by ICP-AES (ICP Ultima, Jobin-Yvon Horiba) (Table 3).

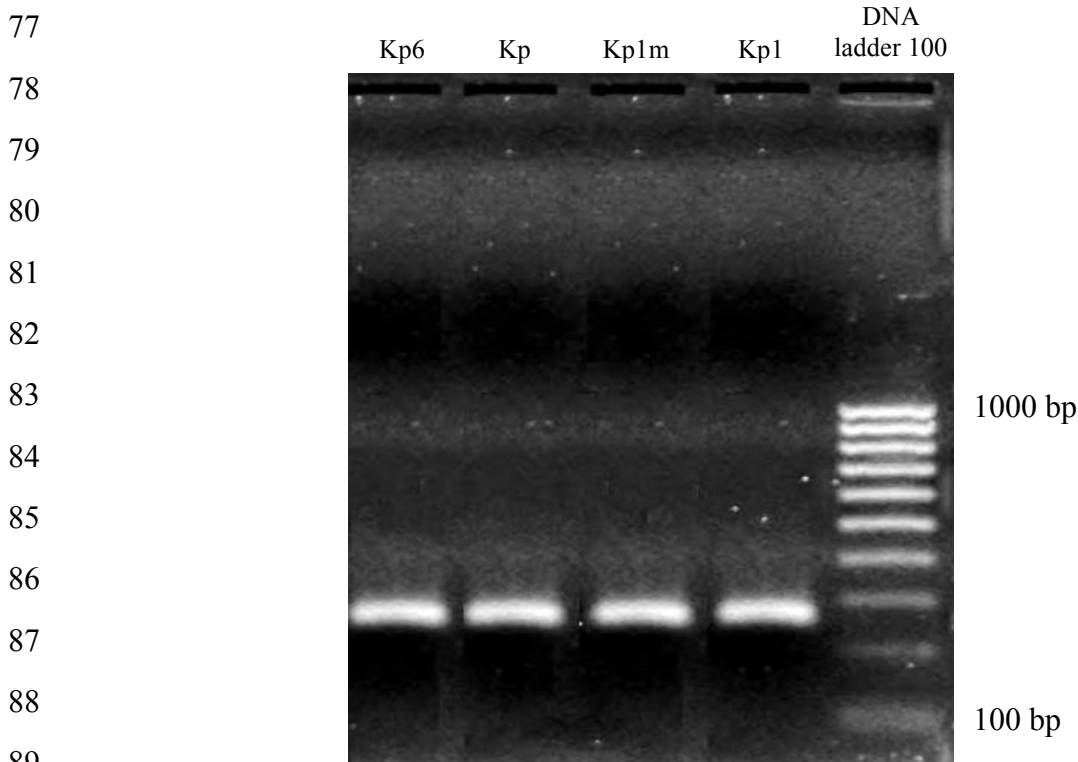
68 Table 3: Iron concentrations (mg/L) of media used

	MHB-CA	MHB	LBB
Iron concentration (mg/L)	0.22	0.27	0.33

### 69 3.3. Genotypic characterization

70  
71 As inactivation of *mgrB* may result in upregulation of the operon *arnBCADTEF* resulting in the addition of the  
72 L-Ara4N moiety to LPS, we first investigated the status of the *mgrB* gene. At *K. pneumoniae*, *mgrB* is a small

73 gene consisting of 144 bp (Olaitan et al., 2014). In order to highlight a possible insertion, the primers were  
74 defined on either side of the coding region. That's why the expected amplicon size is 253 bp. The *mgrB* gene was  
75 amplified by PCR both in Kp1 and Kp6 and their colistin-resistant derivatives, Kp1m and Kp6m. Amplicons  
76 were then subsequently analyzed by 1.4% agarose gel for electrophoresis (Fig 1).



91 Fig.1 1.4% agarose gel electrophoresis of *mgrB* amplicons of Kp1, Kp1m, Kp6 and Kp6m

92 After migration, we observed that amplicons of all the strains had migrated at the same place, between 200 and  
93 300 bp corresponding to the expected size of the amplicons. Therefore, we can conclude that for Kp1m and  
94 Kp6m, *mgrB* does not display an IS5-like insertion (~ 1000 bp) as defined by Olaitan et al. (Olaitan et al.,  
95 2014b) . These results allowed us to conclude that colistin resistance in Kp1m and Kp6m was not mediated by  
96 this type of inactivating insertion.

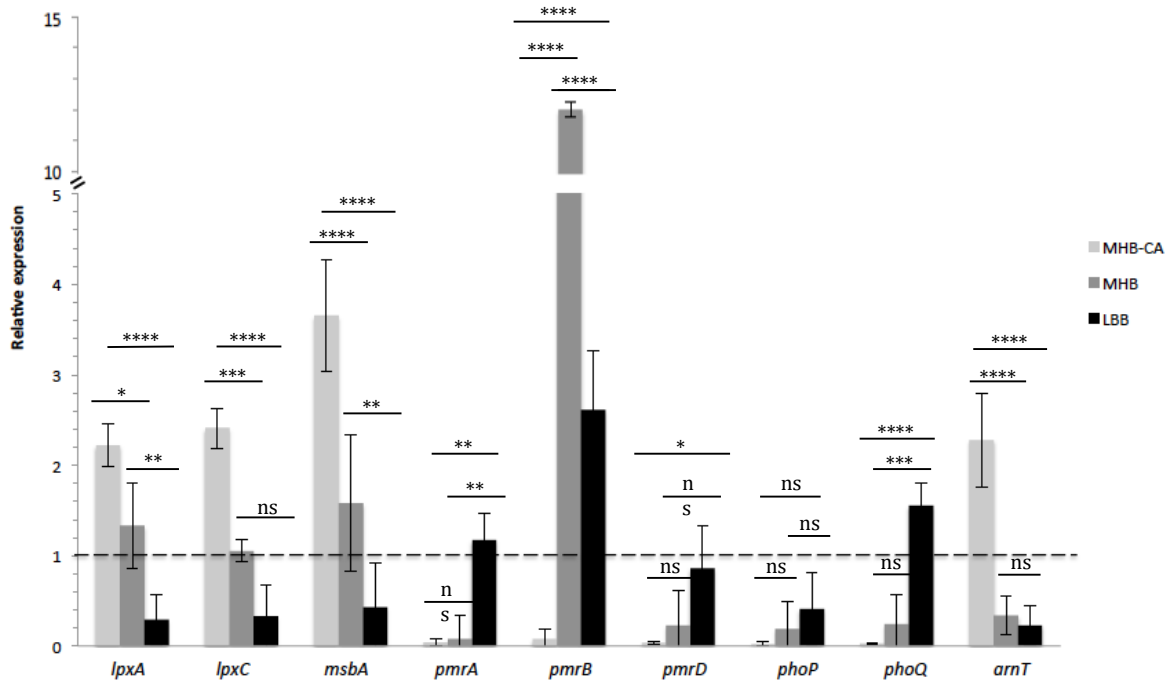
97 On the other hand, in addition to being under the indirect control of *mgrB*, the operon *arnBCADTEF* is also  
98 under the direct control of the TCSs (PmrA/B, PhoP/PhoQ).

100 Expressions of the genes involved in either the constitutive pathway of LPS synthesis or, the addition of  
101 the L-Ara4N moiety were then investigated. Results are presented in Figure 2.

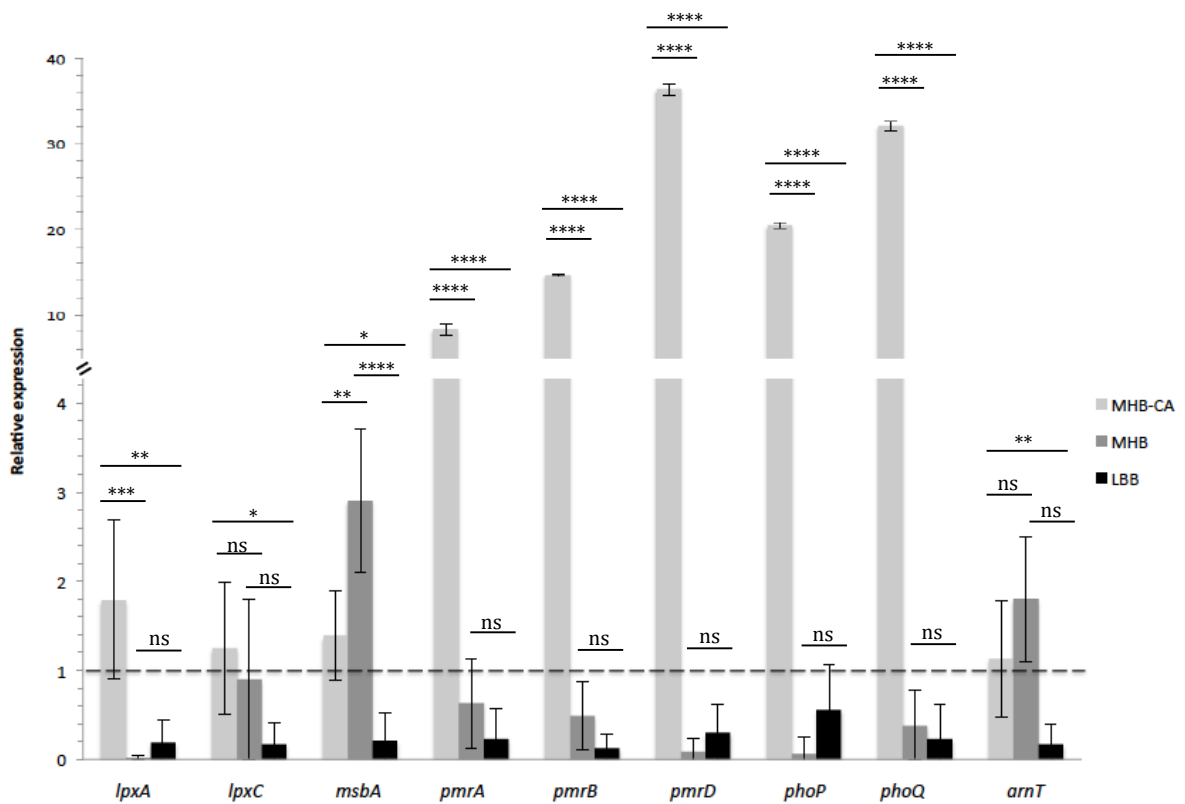
102



103  
104 (a)  
105



106  
107 (b)



108 Fig.2 Monitoring of gene expression in (a) Kp1m (compared with Kp1), and (b) Kp6m (compared with Kp6), in  
109 MHB-CA, MHB and in LBB  
110 ANOVA 2way post hoc tukey, \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ , \*\*\*,  $p < 0.005$ , \*\*\*\*,  $p < 0.001$ , ns: not significant,  
111  $n = 3$

112 Genes involved in the constitutive pathway of LPS synthesis were upregulated in Kp1m compared to Kp1 when  
113 bacterial cells were grown in MHB-CA (*lpxA*:  $2.22 \pm 0.23$ , *lpxC*:  $2.41 \pm 0.22$ , *msbA*:  $3.65 \pm 0.62$ ). In contrast  
114 and interestingly, no modification was observed in MHB (*lpxA*:  $1.33 \pm 0.48$ , *lpxC*:  $1.05 \pm 0.12$ , *msbA*:  $1.58 \pm$   
115  $0.75$ ) and in LBB (*lpxA*:  $0.29 \pm 0.28$ , *lpxC*:  $0.33 \pm 0.35$ , *msbA*:  $0.43 \pm 0.49$ ). On the opposite, the expression of  
116 genes involved in the L-Ara4N moiety synthesis is decreased in all media, MHB-CA, MHB and LBB (except for  
117 *pmrB* which increased in MHB ( $12.01 \pm 0.25$ ) and LBB ( $2.61 \pm 0.65$ ), and for *arnT* which increased in MHB-  
118 CA ( $2.28 \pm 0.52$ )). Cells of Kp6m grown in MHB-CA demonstrated upregulation of genes involved in the L-  
119 Ara4N moiety (*pmrA*:  $8.32 \pm 0.65$ , *pmrB*:  $14.70 \pm 0.14$ , *pmrD*:  $36.38 \pm 0.63$ , *phoP*:  $20.47 \pm 0.29$ , *phoQ*:  $32.11 \pm$   
120  $0.60$ ) compared to Kp6. In contrast no modification of gene expression was observed in MHB and LBB.

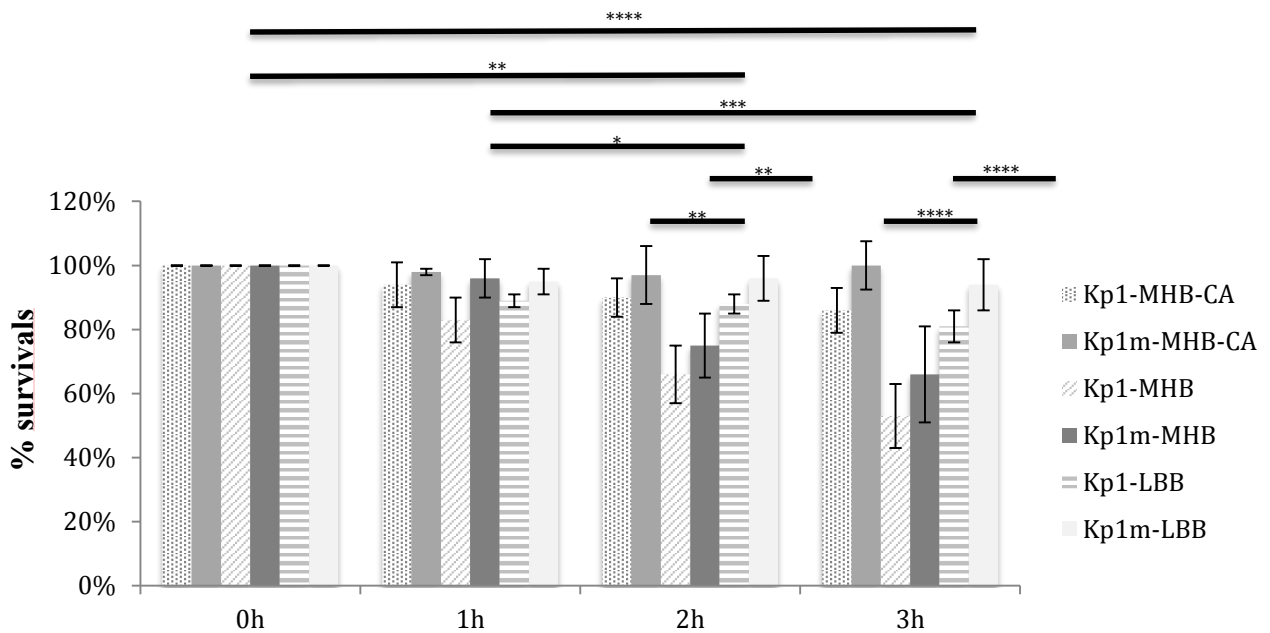
### 121 **3.4. Phenotypic characterization**

#### 122 **3.4.1. Serum bactericidal assay**

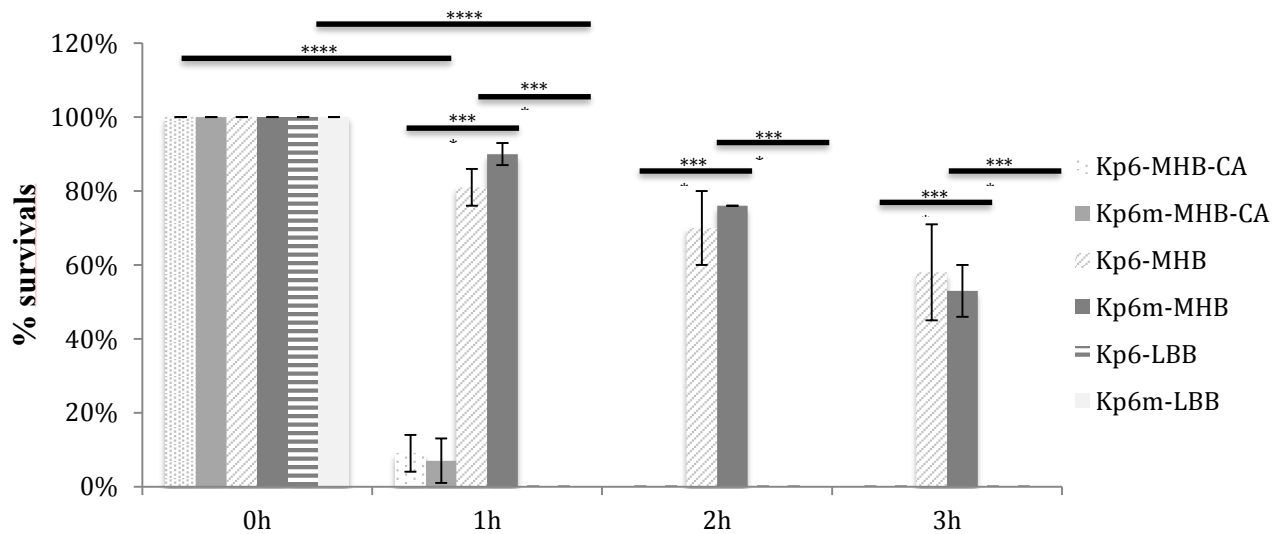
123 Whatever the medium used, Kp1 and Kp1m are resistant to human serum. Indeed, after 3 hours, in the three  
124 media, survivor's rates are above 50% and 80% respectively (Fig 3a). So, we can observe that, in MHB, Kp1  
125 and Kp1m are significantly weaker than in MHB-CA and in LBB ( $p < 0.05$ ). Concerning Kp6 and Kp6m, they  
126 are resistant to human serum (survivor's rates  $> 50\%$ ) in MHB whereas these strains are significantly sensitive in  
127 MHB-CA and LBB ( $p < 0.05$ ). Indeed, for both strains, survivor's rates below 10% after 1 h and reach 0% after  
128 2 h (Fig 3b).

129

130 (a)



131 (b)



132

133 Fig.3 Susceptibility of (a) Kp1 and Kp1m and (b) Kp6 and Kp6m to normal human serum after growth in MHB-  
 134 CA, MHB, and LBB. Results are means of three independent experiments, errors bars indicate standard  
 135 deviations. Only significant results for the mutant strains were represented

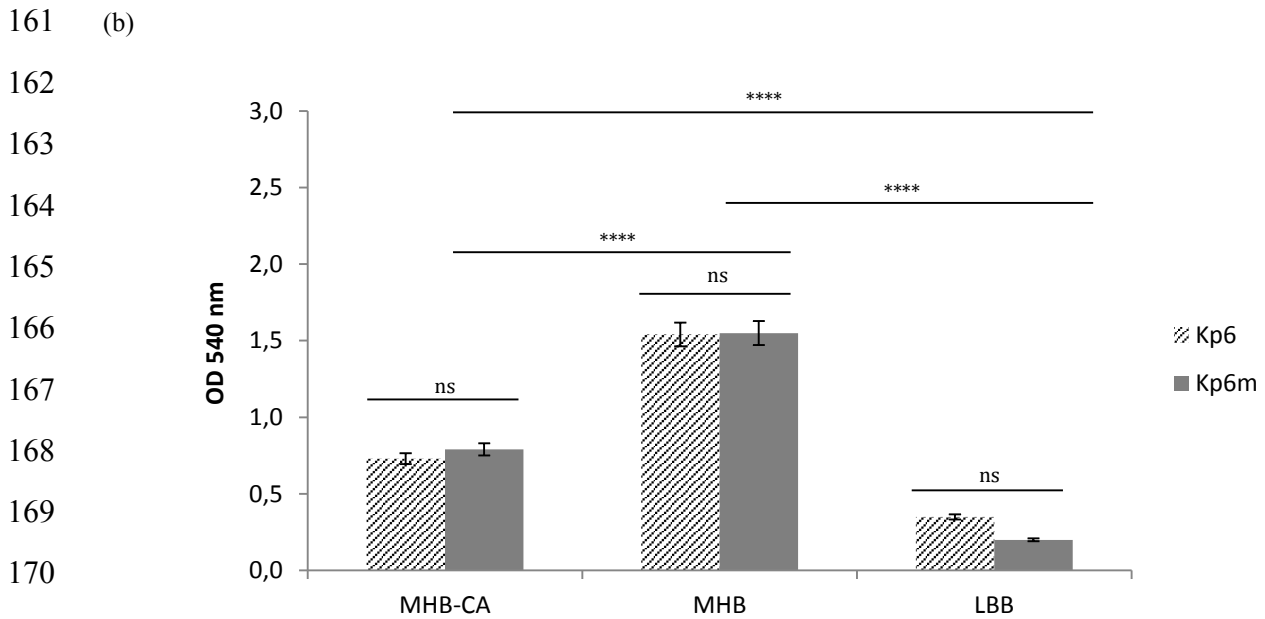
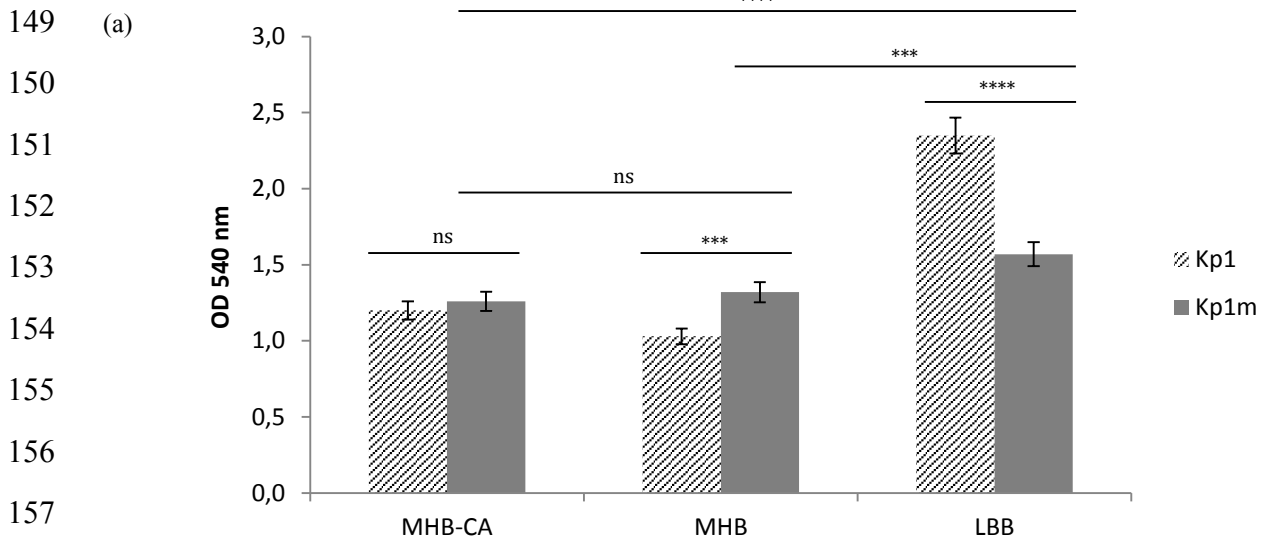
136 ANOVA 2way post hoc tukey, \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ , \*\*\*,  $p < 0.005$ , \*\*\*\*,  $p < 0.001$ ,  $n = 3$

137

138  
139  
140  
141  
142  
143  
144  
145  
146  
147  
148

### 3.4.2. Biofilm production

On the one hand, in MHB, compared to Kp1, Kp1m produced significantly more biofilm ( $1.32 \pm 0.07$  vs.  $1.03 \pm 0.06$ ,  $p < 0.005$ ). However, in MHB-CA, there is no significant difference in biofilm production between Kp1 and Kp1m ( $1.20 \pm 0.06$  vs.  $1.26 \pm 0.07$ ,  $p > 0.05$ ) and in LBB, Kp1 produced significantly more biofilm than Kp1m ( $2.35 \pm 0.12$  vs.  $1.57 \pm 0.08$ ,  $p < 0.01$ ). But Kp1m produced significant more biofilm in LBB than in MHB and MHB-CA (Fig 4a). On the other hand, there is no difference in biofilm production between Kp6 and Kp6m ( $1.54 \pm 0.08$  vs.  $1.55 \pm 0.08$ ,  $p > 0.05$ ) and, Kp6 and Kp6m ( $0.73 \pm 0.04$  vs.  $0.79 \pm 0.04$ ,  $p > 0.05$ ). In contrast, in MHB (vs. MHB-CA and LBB), Kp6m produced significantly more biofilm ( $1.55$  vs.  $0.79$ ,  $p < 0.001$ ;  $1.55$  vs.  $0.20$ ,  $p < 0.001$ ), and the same thing is observed for Kp6 ( $1.54$  vs.  $0.73$ ,  $p < 0.001$ ;  $1.54$  vs.  $0.35$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig 4b). Unlike Kp1 and Kp1m, Kp6 and Kp6m produced less biofilm in LBB.



172 Fig.4 Biofilm formation in (a) Kp1 and Kp1m and (b) Kp6 and Kp6m after growth in MHB-CA, MHB and  
 173 LBB. Biofilm formation was measured by crystal violet staining, and results are means of three independent  
 174 experiments, errors bars indicate standard deviations.

175 ANOVA 2way post hoc tukey, \*\*\*,  $p < 0.005$ , \*\*\*\*,  $p < 0.001$ , ns: not significant,  $n = 3$

176

177

#### 178 4. Discussion

179 *K. pneumoniae* has become an important hospital pathogen, spreading in medical facilities through its virulence  
180 factors and its ability to develop resistance to a wide range of antimicrobials. Indeed, according to the Centers  
181 for Disease Control and Prevention, untreatable and hard-to-treat infections from carbapenem-resistant  
182 *Enterobacteriaceae* bacteria (e.g. *K. pneumoniae*) are on the rise among patients in medical facilities (CDC,  
183 2013). Under these circumstances, colistin became the last-resort treatment for these infections. However, the  
184 important use of colistin has led to the emergence of colistin resistant *K. pneumoniae* strains (Choi and Ko,  
185 2015). Currently, the mechanism of colistin resistance is not fully elucidated but it is known that the addition of  
186 L-Ara4N moiety to lipid A is related to colistin resistance in *K. pneumoniae* (Olaitan et al., 2014b). The  
187 biosynthesis of the L-Ara4N moiety is mediated by TCSs susceptible to medium compounds (e.g. Fe<sup>3+</sup>, Mg<sup>2+</sup>)  
188 (Falagas et al., 2010). Furthermore alterations of the lipid A component of the LPS can directly affect virulence  
189 potential (e.g. changing outer-membrane permeability) (Needham and Trent, 2013). So, the aim of this work was  
190 to study the impact of the culture medium on the gene expression of LPS and its phenotypic expression (e.g.  
191 serum bactericidal assay and biofilm production) in colistin-resistant *K. pneumoniae* strains.

192 First, we determined colistin MICs by broth microdilution according to CLSI (CLSI, 2012). In our  
193 study, we determined colistin MICs in three media, MHB-CA, MHB, and LBB, and we observed that colistin  
194 MIC values of both strains are higher in MHB-CA than in MHB. According to the literature, we concluded that  
195 increased MICs were associated with high calcium and magnesium concentration in MHB-CA (Girardello et al.,  
196 2012).

197 Recently, a new mechanism of colistin resistance was discovered, it involves mutation/inactivation of  
198 the *mgrB* gene. This gene encodes a transmembrane protein that exerts negative feedback on the PhoP/PhoQ  
199 regulatory system (Olaitan et al., 2014b). In *K. pneumoniae*, the mutation of *mgrB* can up-regulate the  
200 PhoP/PhoQ system and the operon *arnBCADTEF* responsible for the addition of the L-Ara4N moiety to lipid A  
201 (Cannatelli et al., 2013). Therefore, the *mgrB* gene has been described as a prominent factor for acquired  
202 resistance to colistin (Poirel et al., 2015). Moreover, Jayol and colleagues showed that *mgrB* alteration was the  
203 main mechanism of colistin resistance. In fact, this mechanism has been demonstrated in more than half of the  
204 strains tested (69%) (Jayol et al., 2015). Our results show no insertion or deletion in *mgrB* gene of Kp1m and  
205 Kp6m (Fig 1). Therefore, in our case, insertion/inactivation of *mgrB* does not seem to be responsible for colistin  
206 resistance. Nevertheless, our results corroborate those obtained by Jayol and colleagues, insofar *mgrB* alteration  
207 is not the only mechanism of colistin resistance (Jayol et al., 2015). Indeed, another mechanism of resistance has

208 been identified corresponding to alterations of the TCSs, and it is important to point out that the mechanism of  
209 colistin resistance is complex and incompletely understood. In fact, these authors mentioned that the mechanism  
210 of resistance has not been elucidated in 16% of strains.

211         Given this observation, we decided to investigate the expression of genes of LPS involved in the  
212 mechanism of colistin resistance. Recent studies have highlighted the involvement of TCSs, PmrA/PmrB and  
213 PhoP/PhoQ, in the mechanism of colistin resistance. However, the TCSs are the target of various environmental  
214 compounds. Indeed, in *K. pneumoniae*, transcription of the *pbgP* gene (also called *pmrHFIJKLM* or *arn* operon)  
215 (Cheng et al., 2010) is induced during growth in low  $Mg^{2+}$  (10  $\mu M$ ) via the PhoP/PhoQ system, the PmrD protein  
216 and the PmrA/PmrB system, as well as directly by the PhoP protein binding to the *pbgP* promoter. In the  
217 presence of  $Fe^{3+}$  (100  $\mu M$ ), transcription is activated directly by the PmrA/PmrB system, independently of PmrD  
218 and PhoP/PhoQ (Mitrophanov et al., 2008). As there is no specific recommendation for the medium to be used,  
219 we decided to study the expression of nine genes (*lpxA*, *lpxC*, *msbA*, *pmrA*, *pmrB*, *pmrD*, *phoP*, *phoQ*, and *arnT*)  
220 in MHB-CA, in MHB and in LBB. Our results demonstrated that the expression of the genes involved in the  
221 constitutive pathway of LPS synthesis varied according to the medium used. On the other hand, whatever the  
222 medium used, the expression of the genes involved in the synthesis of the L-Ara4N moiety is decreased. In  
223 contrast, for Kp6m, the expression of all these genes is increased in MHB-CA (except for *lpxA*, *lpxC* and *msbA*)  
224 while the expression of these genes is decreased in MHB and LBB. In our study, it appears that these differences  
225 are not due to the concentrations of magnesium and iron in the culture media. Indeed, according to Mitrophanov  
226 et al., magnesium concentrations (Table 1), of both media seem to be too high to activate directly the PhoP/PhoQ  
227 system, and iron concentrations (Table 3), seem to be too low to activate directly the PmrA/PmrB system  
228 (Mitrophanov et al., 2008). Therefore, it appears that others factors (*e.g.* other medium compounds, background  
229 of strains) would be involved in these changes. In fact, Llobet *et al.* demonstrated that *Klebsiella* remodels its  
230 lipid A in a tissue-dependent manner (Llobet et al., 2015). According to their study, it could be that the origin of  
231 bacterial strains (*e.g.* Kp1, sputum sampling and Kp6, blood culture) influences the expression of the LPS and,  
232 moreover these strains can adapt the expression of its LPS to its environment.

233         The first approach has allowed us to point out the impact of the culture medium on the expression of  
234 LPS, a crucial component for host recognition of Gram-negative infection, in Kp1m and Kp6m. Genetic  
235 modifications of the LPS, causing a change in its expression, participate in the modification of the virulence  
236 potential of bacteria. Therefore, it seemed interesting to combine the study of these genotypic alterations with the  
237 expression of two virulence factors (serum resistance and biofilm production).

238 The bactericidal activity of serum is a natural barrier, and is a very important factor protecting the host  
239 against infections caused by GNB (Frank, 2000). It is known that the structure of the O-specific polysaccharide  
240 chain of LPS plays an important role in the resistance of bacteria to host immune defenses, especially to  
241 complement protein deposition and complement lytic activity (Jankowski et al., 1996; Kłak and Jankowski,  
242 2010). The complement system can be activated by three ways; the classical, the alternative and the lectin  
243 pathways. The lectin pathway is activated when mannan-binding lectin (MBL) present in the host serum attaches  
244 to mannose on the bacteria (Fujita et al., 2004). Some authors have insisted on the importance of LPS structure  
245 on the susceptibility of bacteria to serum bactericidal activity (Bugla-Ploskonska and Doroszkiewicz, 2006;  
246 Kłak and Jankowski, 2010). Here, we observed that, in all media (MHB, MHB-CA and LBB), Kp1 and Kp1m  
247 are resistant to human serum bactericidal activity, whereas Kp6 and Kp6m are susceptible in MHB-CA and  
248 LBB, and resistant in MHB. So, it appears that the culture medium used influences the virulence potential of  
249 bacteria. On the other hand, according to Choi and Ko, we observed that the colistin-resistant mutants developed  
250 from the same parental susceptible strain showed similar phenotypes, suggesting again that the differences might  
251 be mainly dependent upon strain background (Choi and Ko, 2015).

252 Concerning the involvement of LPS in *K. pneumoniae* biofilm production, it has been proven that it  
253 contribute to the structure of biofilm of *K. pneumoniae*. Indeed, gene disruption and microscopic analyses  
254 showed that LPS is involved in the initial adhesion on abiotic (Balestrino et al., 2008). According to Hancock  
255 and colleagues, our data reveals a significant influence of the growth media on the ability of *K. pneumoniae* to  
256 form a biofilm (Hancock et al., 2011). Indeed, Kp6 and Kp6m produce significantly more biofilm in MHB-CA  
257 than in MHB and LBB. In contrast, this difference is clearly less observable between Kp1 and Kp1m, but Kp1m  
258 produce significantly more biofilm than Kp1 in MHB and Kp1 produce significantly more biofilm than Kp1m in  
259 LBB. Consequently, with these differences in biofilm production, it still appears that the culture medium  
260 influences the virulence potential of bacteria.

## 261 **5. Conclusion**

262 This study described for the first time the impact of the culture medium on the virulence factors of colistin-  
263 resistant *K. pneumoniae* strains. The impact of the medium is observed more distinctly on the expression of  
264 virulence factors in Kp6m. Indeed, in MHB-CA (compared to MHB), Kp6m exhibited decreased serum  
265 resistance and reduced biofilm formation whereas the expression of genes involved in the synthesis of L-Ara4N  
266 moiety is increased. According to Choi and Ko, we found that colistin resistance, *via* the upregulation of the  
267 TCSs PmrA/PmrB and PhoP/PhoQ, may result in defects in virulence profile, including serum resistance and



268 biofilm production (Choi and Ko, 2015). And in LBB, (compared to MHB), Kp6m exhibited decreased serum  
269 resistance and reduced biofilm formation too, but the expression of genes involved in the synthesis of L-Ara4N  
270 moiety is not changed. So, Kp6m expresses three virulence profiles according to the culture medium used. In  
271 contrast, there is no difference in the fitness of Kp1m in MHB-CA, MHB and LBB. These findings lead us to  
272 think that, *in vitro*, colistin resistance patterns influence virulence patterns. And, these discrepancies between  
273 virulence pattern and colistin resistance pattern may be depending on strain background and growth media.  
274 However, the *in vivo* relevance of the colistin resistance patterns and the virulence patterns requires further  
275 investigations. Likewise a study of the clinical outcomes of infections due to colistin-resistant *K. pneumoniae*  
276 isolates is necessary.

- 278 Ah YM, Kim AJ, Lee JY. Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. Int J Antimicrob Agents 2014;44:8-15.  
279
- 280 Balestrino D, Ghigo JM, Charbonnel N, Haagensen JA, Forestier C. The characterization of functions involved  
281 in the establishment and maturation of *Klebsiella pneumoniae* in vitro biofilm reveals dual roles for surface  
282 exopolysaccharides. Envir Microbiol 2008;10:685-701.  
283
- 284 Barreto S, Zambrano M, Araque M. Phenotypic variations of susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* strains of  
285 nosocomial origin and their association with biofilm formation. Invest Clin 2009;50:221–229.  
286
- 287 Bugla-Ploskonska G, Doroszkiewicz W. Bactericidal activity of normal bovine serum (NBS) directed against  
288 some *Enterobacteriaceae* with sialic acid-containing lipopolysaccharides (LPS) as a component of cell wall. Pol  
289 J Microbiol 2006;55:169-174.  
290
- 291 Cannatelli A, D’Andrea MM, Giani T, Di PV, Arena F, Ambretti S, Gaibani P, Rossolini GM. *In vivo*  
292 emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by  
293 insertional inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB regulator. Antimicrob Agents Chemother 2013;57:5521–5526.  
294
- 295 Cannatelli A, Giani T, D’Andrea MM, Di Pilato V, Arena F, Conte V, Tryfinopoulou K, the COLGRIT Study  
296 Group, Vatopoulos A, Rossolini GM. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-  
297 producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. Antimicrob Agents Chemother 2014a;58:5696-5703.  
298
- 299 Cannatelli A, Di Pilato V, Giani T, Arena F, Ambretti S, Gaibani P, D’Andrea MM, Rossolini GM. *In vivo*  
300 evolution to colistin resistance by PmrB sensor kinase mutation in KPC carbapenemase-producing *Klebsiella*  
301 *pneumoniae* associated with low-dosage colistin treatment. Antimicrob Agents Chemother 2014b;58:4399–4403.  
302
- 303 Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States.  
304 <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>, 2013 (accessed 14.03.16)  
305
- 306 Cheng HY, Chen YF, Peng HL. Molecular characterization of the PhoPQ-PmrD-PmrAB mediated pathway  
307 regulating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* CG43. J Biomed Sci 2010;17:60.  
308
- 309 Choi MJ, Ko KS. Loss of Hypermucoviscosity and increased fitness cost in colistin-resistant *Klebsiella*  
310 *pneumoniae* sequence type 23 strains. Antimicrob Agents Chemother 2015;59:6763-6773.  
311
- 312 Clinical and laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria  
313 that grow aerobically. Approved standard, 9<sup>th</sup> ed. CLSI document M07-A9. 2012, Clinical and Laboratory  
314 Standards Institute, Wayne, PA.  
315
- 316 Falagas ME, Rafailidis PI, Matthiou DK. Resistance to polymyxins: Mechanism, frequency and treatment  
317 options. Drug Resist Updat 2010;13:132-138.  
318
- 319 Formosa C, Herold M, Vidaillac C, Duval RE, Dague E. Unravelling of a mechanism of resistance to colistin in  
320 *Klebsiella pneumoniae* using atomic force microscopy. J Antimicrob Chemother 2015;70:2261-2270.  
321
- 322 Frank MM, 2000. Complement deficiencies. Pediatr Clin North Am 2000;47:1339-1354.  
323
- 324 Fujita T, Matsushita M, Endo Y. The lectin-complement pathway – its role in innate immunity and evolution.  
325 Immunol Rev 2004;198:185-202.  
326
- 327 Giamarellou H, Poulakou G. Multidrug-resistant Gram-negative infections. What are the treatment options?  
328 Drugs 2009;69:1879-1901.  
329
- 330 Giamarellou H. Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: how to treat and for how long. Int. J Antimicrob  
331 Agents 2010;36 suppl 2:S50-54.  
332
- 333 Girardello R, Bispo PJM, Yamanaka TM, Gales AC. Cation concentration variability of four distinct Mueller-  
334 Hinton agar brands influences polymyxin B susceptibility results. J Clin Microbiol 2012;50:2414-2418.  
335

336 Hancock V, Witsø IL, Klemm P. Biofilm formation as a function of adhesion, growth medium, substratum and  
337 strain type. *Int J Med Microbiol* 2011;301:507-576.

338

339 Henry R, Vithanage N, Harrison P, Seeman T, Coutts S, Moffatt JH, Nation RL, Li J, Harper M, Adler B, Boyce  
340 JD. Colistin-resistant, lipopolysaccharide-deficient *Acinetobacter baumannii* responds to lipopolysaccharide loss  
341 through increased expression of genes involved in the synthesis and transport of lipoproteins, phospholipids, and  
342 poly- $\beta$ -1,6-N-acetylglucosamine. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:59-69.

343

344 Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an  
345 emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:1119-1125.

346

347 Hood MI, Becker KW, Roux CM, Dunman PM, Skaar EP. Genetic determinants of intrinsic colistin tolerance in  
348 *Acinetobacter baumannii*. *Infect Immun* 2013;81:542-551.

349

350 Jankowski S, Rowinski S, Cisowska A, Gamian A. The sensitivity of *Hafnia alvei* strains to the bactericidal  
351 effect of serum. *FEMS. Immunol Med Microbiol* 1996;13:59-64.

352

353 Jayol A, Poirel L, Brink A, Villegas MV, Yilmaz M, Nordmann P. Resistance to colistin associated to a single  
354 amino acid change in protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* isolates of worldwide origin. *Antimicrob*  
355 *Agents Chemother* 2014;58:4762-4766.

356 Jayol A, Poirel L, Nordmann P. Deciphering mechanisms responsible for colistin resistance in *Klebsiella*  
357 *pneumoniae*. [www.ricai.org](http://www.ricai.org) communication n°171, 2015 (accessed 14.03.16).

358

359 Klak M, Jankowski S. The influence of lipopolysaccharides isolated from *Enterobacteriaceae* strains on the  
360 bactericidal activity of normal cord serum. *Adv Clin Exp Med* 2010;19:57-64.

361

362 Llobet E, Martinez-Moliner V, Moranta D, Dahlström Käthe M, Regueiro V, Tomas A, Cano V, Pérez-Gutierrez  
363 C, Frank CG, Fernandez-Carrasco H, Insua JL, Salimen TA, Garmendia J, Bengoechea JA. Deciphering tissue-  
364 induced *Klebsiella pneumoniae* lipid A structure. *PNAS* 2015;112:6369-6378.

365

366 Mitrophanov AY, Jewett MW, Hadley TJ, Groisman EA. Evolution and Dynamics of regulatory architectures  
367 controlling polymyxin B resistance in Enteric bacteria. *PLoS Genet* 2008;4:e1000233

368

369 Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JDF, Vinogradov E, Seemann T, Henry R, Crane B, St Michael F, Cox  
370 AD, Adler B, Nation RL, Li J, Boyce JD. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by  
371 complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:4971-4977.

372

373 Needham BD, Trent MS. Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis. *Nat*  
374 *Rev Microbiol* 2013;11:467-481.

375

376 Olaitan AO, Diene SM, Kempf M, Berrazeg M, Bakour S, Gupta SK, Thongmalayvong B, Akkhavong K,  
377 Somphavong S, Paboriboune P, Chaisiri K, Komalamisra C, Adelowo OO, Fagade OE, Banjo OA, Oke AJ,  
378 Adler A, Assous MV, Morand S, Raoult D, Rolain JM. Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella*  
379 *pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to  
380 inactivation of the PhoP/PhoQ regulator mgrB: an epidemiological and molecular study. *Int J Antimicrob Agents*  
381 2014a;44:500-507.

382

383 Olaitan AO, Morand S, Rolain J.M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in  
384 bacteria. *Front Microbiol* 2014b;5:1-10.

385

386 Padilla E, Llobet E, Domenech-Sanchez A, Martinez-Martinez L, Bengoechea JA, Alberti S. *Klebsiella*  
387 *pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents*  
388 *Chemother* 2010;54:177-183.

389

390 Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. As nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods,  
391 and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:589-603.

392

393 Podschun R, Pietsch S, Höller C, Ullmann U. Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their  
394 expression of virulence factors. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:3325-3327.

395 Poirel L, Jayol A, Bontron S, Villegas MV, Ozdamar M, Türkoglu S, Nordmann P. The *mgrB* gene as a key  
396 target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:75-80.  
397  
398 Raetz CRH, Reynolds M, Trent MS, Bishop RE. Lipid A modification systems in Gram-negative bacteria. *Annu*  
399 *Rev Biochim* 2007;76:295-329.  
400  
401 Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*  
402 2000;132:365-386.  
403  
404 Schroll C, Barken KB, Krogfelt KA, Struve C. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*  
405 biofilm formation. *BMC Microbiol* 2010;10:179–188.  
406  
407 Vidailiac C, Benichou L, Duval RE. In vitro synergy of colistin combinations against colistin-resistant  
408 *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Antimicrob Agents*  
409 *Chemother* 2012;56:4856-4861.  
410  
411 Yu VL, Hansen DS, Ko WC, Sagnimeni A, Klugman KP, von Gottberg V, Goossens H, Wagener MM, Benedi  
412 VJ, International Klebsiella Study Group. Virulence characteristics of *Klebsiella* and clinical manifestations of  
413 *K. pneumoniae* bloodstream infections. *Emerg Infect Dis* 2007;13:986–993  
414  
415  
416

417 **Annexe 9 : Publication n°3 : *In vitro* effect of unconventional colistin combinations**  
418 **against colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates**  
419

---

420

421

422

**ABSTRACT**

423

424

425 The emergence of multidrug-resistant (MDR) *Klebsiella pneumoniae* with the lack of new antibacterial agent  
426 against Gram-negative bacteria is a real public health. Consequently, MDR *K. pneumoniae* presents an  
427 increasing challenge to health care. For these infections, colistin is often the only active antibiotic, but resistant  
428 strains have appeared leading scientists to focus on antibiotic combinations. So this study evaluated the potential  
429 for synergy of colistin combined with vancomycin, or trimethoprim, or trimethoprim-sulfamethoxazole (1/19)  
430 against 18 isolates of colistin-resistant *K. pneumoniae* by using time-kill assay (TKA), checkerboard (CB), and  
431 Etest® methods. For colistin-vancomycin, synergy was observed in 5.6% with CB method. For colistin-  
432 trimethoprim and colistin-trimethoprim/sulfamethoxazole, synergy was observed in 11.1% with CB method and  
433 in 16.7% and 27.8% with Etest® method, respectively. In time-kill assays, all tested combinations were  
434 synergistic and bactericidal against 80% (4/5) CST-R *K. pneumoniae* at 0.25XMIC and 0.5XMIC.  
435 Consequently, unconventional antibiotic combinations seem to be a good therapeutic alternative in the absence  
436 of an effective molecule.

437

438

439

440

441

442

443 Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, Colistin resistance, antibiotics combinations, Checkerboard method, Etest,

444 Time-Kill Assay

445

446

447  
448  
449  
450  
451  
452  
453  
454  
455  
456  
457  
458  
459  
460  
461  
462  
463  
464  
465  
466  
467  
468  
469  
470  
471  
472  
473  
474  
475

## 1. Introduction

Recently an increase in infections caused by multidrug-resistant (MDR) *Klebsiella pneumoniae* was observed (Boucher et al., 2009). This increase combined with the lack of new antibacterial agents against Gram-negative bacteria (GNB) creates a real challenge in the management of such infections (Hirsch et al., 2010) (Giamarellou et al., 2009 & 2010). For infections caused by MDR *K. pneumoniae*, colistin (CST) is often the only available active antibiotic (Ah et al., 2014). However, the recent renewed interest in this antibiotic has resulted in the emergence of CST-resistant strains, for which treatment options are limited or non-existent (Antoniadou et al., 2007). This context had led physicians and scientists to focus on antibiotic combinations. In the literature, several studies have assessed the activity of polymyxins when combined with other antimicrobials. *In vitro* synergy against MDR *K. pneumoniae* has been demonstrated when CST is combined with rifampicin and carbapenems (imipenem, meropenem, doripenem) (Nastro et al., 2013; Clancy et al., 2013; Tascini et al., 2013). However, the mechanism of action of CST is incompletely elucidated. All hypotheses converge towards a disruption of the outer membrane that would cause lysis of the bacterial cell. Indeed, thanks to electrostatic interactions, colistin (cationic polypeptide) would interact with lipopolysaccharide (anionic structure) at the outer membrane of GNB. CST would then compete with the divalent cations: magnesium ( $Mg^{2+}$ ) and calcium ( $Ca^{2+}$ ), causing local disruption of the outer membrane of these bacteria. This disturbance would result in increased permeability, leakage of cytoplasmic contents and finally death of the bacteria (Li et al., 2006). Increased permeability of the outer membrane secondary to CST exposure should lead to increased permeability to substances that are usually excluded and may enhance the activity of hydrophobic antibiotics (Gordon et al., 2010). Therefore, we wanted using unconventional antibiotic combinations to take advantage of this property in order to create a gap, at the level of the outer membrane, favourable to the passage of large molecule (vancomycin) and / or hydrophobic (trimethoprim). Moreover, in the literature, these combinations have already been proven on the GNB (Simmons, 1970; Rosenblatt and Stewart, 1974; O'Hara et al., 2013). In addition, we have previously demonstrated synergy for three antibiotics combinations: colistin-vancomycin, colistin-trimethoprim and colistin-trimethoprim/sulfamethoxazole; against *Acinetobacter baumannii* and *K. pneumoniae* but on a limited number of isolates (Vidaillac et al., 2012). Consequently, the aim of our study was to confirm the potential for synergy of CST plus vancomycin (VAN), trimethoprim (TMP), or trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP/SMX) against eighteen colistin-resistant (CST-R) *K. pneumoniae* isolates.

476 **2. Materials & Methods**

477 **Bacterial strains and media**

478 Eighteen clinical isolates of *K. pneumoniae* colistin resistant (CST-R) were used. For all experiments only two  
479 media were used: Cation-adjusted Mueller Hinton broth (MHB-CA, BD, 212322) for all *in vitro* experiments;  
480 Cation-adjusted Mueller Hinton agar (MHA-CA, BD, 211438) when performing synergy evaluation using the  
481 Etest® method and TKA.

482 **Antimicrobial agents**

483 CST sulphate salt (Sigma-Aldrich, C4461-1G), VAN (INRESA), TMP (Sigma-Aldrich, T7883-5G) and  
484 sulfamethoxazole (Sigma-Aldrich, S7507-10G) were used. Each stock solution was freshly prepared according  
485 to Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI, 2009). Etest® strips of CST (537300), VAN  
486 (412488), TMP (523600) and TMP/SMX (1/19) (412481) were obtained by Biomérieux (Craponne, F-69290).

487 **Antimicrobial susceptibility assays**

488 MICs were determined using broth microdilution method as recommended by the CLSI, by Etest® method and  
489 Vitek2® according to manufacturer instructions.

490 **Synergy testing**

491 Three methods were used and compared to assess the potential for synergy of antibiotic combinations:  
492 checkerboard method, Etest® method and TKA. Analyses were performed in triplicate on 3 different  
493 experiments.

494 **Checkerboard method**

495 Antibiotic combinations tested for each strain were CST + VAN, CST + TMP and CST + TMP/SMX (1/19), as  
496 described by Elipoulos & Moellering (Eliopoulos & Moellering, 1991).

497 When evaluating the potential for synergy, antibiotics were tested from 0.06 to 8 times the MIC of the antibiotic.  
498 Therefore, 64 antibiotic combinations were tested. The results are read after 18-24 h of incubation at 35°C.  
499 Bacterial growth was evaluated by reading the turbidimetry at 540 nm and comparing to positive and negative  
500 controls. The nature of the drug interaction (i.e. synergy, indifference and antagonism) was evaluated by  
501 calculating the fractional inhibitory concentration index (FICI). FICI was calculating by using the following  
502 formula:  $FICI = (MIC1 \text{ in combination}/MIC1 \text{ alone}) + (MIC2 \text{ in combination}/MIC2 \text{ alone})$ . The FICI were  
503 interpreted as follows:  $FICI \leq 0.5 =$  synergy,  $FICI > 0.5 \text{ to } \leq 4 =$  indifference and  $FICI > 4 =$  antagonism (Pillai  
504 et al., 2005).

505

506 **Etest® method**

507 The same antibiotic combinations were tested. “Cross or 90° angle method” was used, previously described by  
508 White (White et al., 1996). This method consists of depositing the Etest® strip in a cross formation with an  
509 angle of 90° on the inoculated MHA-CA plate. The results are read after 18-24 h of incubation at 35°C.  
510 Calculating the FICI assessed the potential for synergy of antibiotic combinations.

511 **Time-kill Assay**

512 The same antibiotic combinations were tested by TKA, as described CLSI 1999 (CLSI, 1999). MIC values tested  
513 for antibiotic combinations are 0.25 or 0.5 of the MIC of each antibiotic alone. Samples were tested at 0, 2, 4, 8  
514 and 24 h. For each experiment, viable bacteria were counted by performing three spots of 10 µL of appropriate  
515 dilutions. Each MHA-CA plate was incubated for 18 to 24 hours at 35°C. TKA curves were constructed by  
516 making the average number of colonies ( $\log_{10}$  (CFU/mL)). To confirm the results obtained by checkerboard  
517 method and Etest® method, TKA was performed on 5 strains CST-R (408, 409, 411, 419, 422) defined as  
518 representative of the sample according to the different behaviours observed during the evaluation of the potential  
519 for synergy of antibiotic combinations. Each isolate was tested against CST alone, and in combination. Synergy  
520 was defined as a  $\geq 2 \log_{10}$  decrease in colony count after 24 h by the combination compared to that of the most  
521 active single agent alone (CST). Indifference was defined as  $< 2 \log_{10}$  increase or decrease in colony count at 24  
522 h by the combination compared to that of the most active single agent alone (CST). Antagonism was defined as a  
523  $\geq 2 \log_{10}$  increase in colony count after 24 h by the combination compared to the most active single agent alone  
524 (Pillai, 2005). The bactericidal activities of drug combinations were defined as a  $\geq 3 \log_{10}$  CFU/mL (99.9%)  
525 reduction compared to the most active drug at 24 h.

526 **3. Results**

527 **Antimicrobial susceptibility assays**

528 MIC values obtained by the three methods are presented Table 1. The results highlight discrepancies in MIC  
529 values between the different techniques. Indeed, for determination of MICs CST, VAN, TMP, TMP/SMX  
530 (1/19), the agreement rate between the three methods are 88.9%, 100.0%, 83.3% and 61.1%, respectively. The  
531 overall concordance rate between the three methods is 83.3%.

532

533



534 Table 1: Averages Etest® method, broth microdilution, Vitek2® MIC values (µg/mL) for CST-R *Klebsiella pneumoniae* isolates

	CST			VAN			TMP			TMP/SMX (1/19)		
	Etest®	Broth	Vitek2®	Etest®	Broth	Vitek2®	Etest®	Broth	Vitek2®	Etest®	Broth	Vitek2®
408	16	128	≥ 16	256	256	∅	32	> 256	≥ 16	32	> 256	≥ 320
409	32	16	≥ 16	256	256	∅	32	> 256	≥ 16	32	> 256	≥ 320
410	32	16	≥ 16	256	256	∅	32	> 256	≥ 16	32	> 256	40
411	24	256	0.5	256	256	∅	32	< 1	≤ 0.5	32	4	≤ 20
412	16	16	≥ 16	256	256	∅	32	> 256	≥ 16	32	> 256	≥ 320
413	256	256	≥ 16	256	256	∅	32	< 1	≥ 16	32	4	≥ 320
414	64	64	≥ 16	256	256	∅	32	> 256	≥ 16	32	> 256	≥ 320
415	32	16	≥ 16	256	256	∅	32	> 256	≥ 16	32	> 256	≥ 320
416	16	8	≥ 16	256	256	∅	32	> 256	≥ 16	32	> 256	≥ 320
417	32	32	≥ 16	256	256	∅	32	> 256	≥ 16	0.25	> 256	≤ 20
418	16	16	≥ 16	256	256	∅	0.38	< 1	≤ 0.5	0.19	16	≤ 20
419	32	16	≥ 16	256	256	∅	32	16	8	32	16	40
420	32	16	≥ 16	256	256	∅	32	> 256	≥ 16	32	> 256	≥ 320
421	32	64	≥ 16	256	256	∅	32	> 256	≥ 16	32	> 256	≥ 320
422	256	256	≥ 16	256	256	∅	32	< 1	8	32	> 256	≥ 320
423	256	256	≤ 0.5	256	256	∅	0.38	< 1	≤ 0.5	0.125	4	≤ 0.5
424	12	16	≥ 16	256	256	∅	32	> 256	≥ 16	32	> 256	≥ 320
425	16	16	≥ 16	256	256	∅	0.5	2	≤ 0.5	0.25	64	≤ 20
Agreement rate % (N)	88.9 (16/18)			100 (18/18)			83.3 (15/18)			61.1 (11/18)		
Overall concordance % (N)	83.3 (60/72)											

535 CST: colistin, VAN: vancomycin, TMP: trimethoprim, SMX: sulfamethoxazole

536 **Synergy testing**

537 The results obtained for checkerboard and the Etest<sup>®</sup> cross method are presented Table 2.

538 For CST-VAN combination, synergy was observed in 5.6% with checkerboard method whereas no synergy was  
539 observed with Etest<sup>®</sup> cross method. For CST-TMP combination, synergy was observed in 11.1% with  
540 checkerboard method and in 16.7% with Etest<sup>®</sup> cross method and for CST-TMP/SMX (1/19) combination,  
541 synergy was observed in 11.1% with checkerboard method and in 27.8% with Etest<sup>®</sup> cross method. Moreover,  
542 antagonism was only detected by checkerboard method. For these combinations, antagonism was observed in  
543 16.7% (CST-VAN), 38.9% (CST-TMP), and 44.4% (CST-TMP/SMX (1/19)) respectively.

544 Of the eighteen clinical isolates of *K. pneumoniae*, only one strain (408) was susceptible to the three antibiotic  
545 combinations tested regardless of the technique used. Moreover, whatever the technique used, we observed  
546 similar results for two combinations. In fact, CST-TMP and CST-TMP/SMX were synergistic for three strains  
547 (411, 413 and 422) using the Etest<sup>®</sup> cross method while these combinations were antagonistic for six strains  
548 (409, 412, 415, 416, 420 and 424) using the checkerboard method. With the exception of strain 419 susceptible  
549 only to the CST-TMP combination.

550 To confirm these results, the potential for synergy and bactericidal activity of each combination was further  
551 evaluated by static time-kill assays. TKA was performed on 5 strains CST-R (408, 409, 411, 419, 422) defined  
552 as representative of the sample according to the results of the checkerboard and the Etest<sup>®</sup> cross method.

553

554

555 Table 2: Checkerboard and Etest® results for CST-R *Klebsiella pneumoniae* isolates

556

Antibiotic combinations	CST-VAN		CST-TMP		CST-TMP/SMX (1/19)	
Method	Checkerboard	Etest®	Checkerboard	Etest®	Checkerboard	Etest®
408	0.31/ Syn	1.00/ Ind	0.39/ Syn	2.00/ Ind	0.45/ Syn	1.50/ Ind
409	2.24/ Ind	1.00/ Ind	4.06/ Ant	2.00/ Ind	4.06/ Ant	2.00/ Ind
410	1.38/ Ind	0.87/ Ind	2.73/ Ind	2.00/ Ind	0.89/ Ind	2.00/ Ind
411	4.08/ Ant	0.83/ Ind	1.50/ Ind	0.18/ Syn	0.83/ Ind	0.09/ Syn
412	1.94/ Ind	1.50/ Ind	4.06/ Ant	2.00/ Ind	4.06/ Ant	2.00/ Ind
413	4.71/ Ant	2.00/ Ind	2.21/ Ind	0.50/ Syn	1.50/ Ind	0.07/ Syn
414	2.33/ Ind	0.87/ Ind	3.35/ Ind	2.00/ Ind	4.06/ Ant	1.25/ Ind
415	2.17/ Ind	1.25/ Ind	4.71/ Ant	2.00/ Ind	4.06/ Ant	2.00/ Ind
416	1.50/ Ind	1.25/ Ind	4.21/ Ant	1.25/ Ind	4.06/ Ant	1.00/ Ind
417	1.83/ Ind	1.50/ Ind	4.06/ Ant	2.00/ Ind	1.39/ Ind	1.25/ Ind
418	0.92/ Ind	2.00/ Ind	1.71/ Ind	2.00/ Ind	1.43/ Ind	1.25/ Ind
419	3.00/ Ind	1.25/ Ind	0.14/ Syn	1.25/ Ind	2.02/ Ind	0.39/ Syn
420	2.25/ Ind	2.00/ Ind	4.06/ Ant	2.00/ Ind	4.06/ Ant	2.00/ Ind
421	2.75/ Ind	1.00/ Ind	3.39/ Ind	2.00/ Ind	4.06/ Ant	2.00/ Ind
422	3.67/ Ind	2.00/ Ind	3.03/ Ind	0.21/ Syn	0.47/ Syn	0.07/ Syn
423	5.10/ Ant	0.75/ Ind	1.81/ Ind	0.53/ Ind	0.75/ Ind	0.39/ Syn
424	1.99/ Ind	2.00/ Ind	4.06/ Ant	2.00/ Ind	4.06/ Ant	2.00/ Ind
425	2.02/ Ind	1.50/ Ind	0.77/ Ind	2.00/ Ind	1.00/ Ind	1.03/ Ind
Agreement rate % (N)	77.8 (14/18)		33.4 (6/18)		27.8 (5/18)	
Overall concordance % (N)	46.3% (25/54)					

557 Syn: Synergy, Ind: Indifference, Ant: Antagonism

558 FICI ≤ 0.5: Syn; 0.5 < FICI ≤ 4: Ind; FICI > 4: Ant

559

560 The results obtained for TKA are presented in Figure 1 & 2, and Table 3.

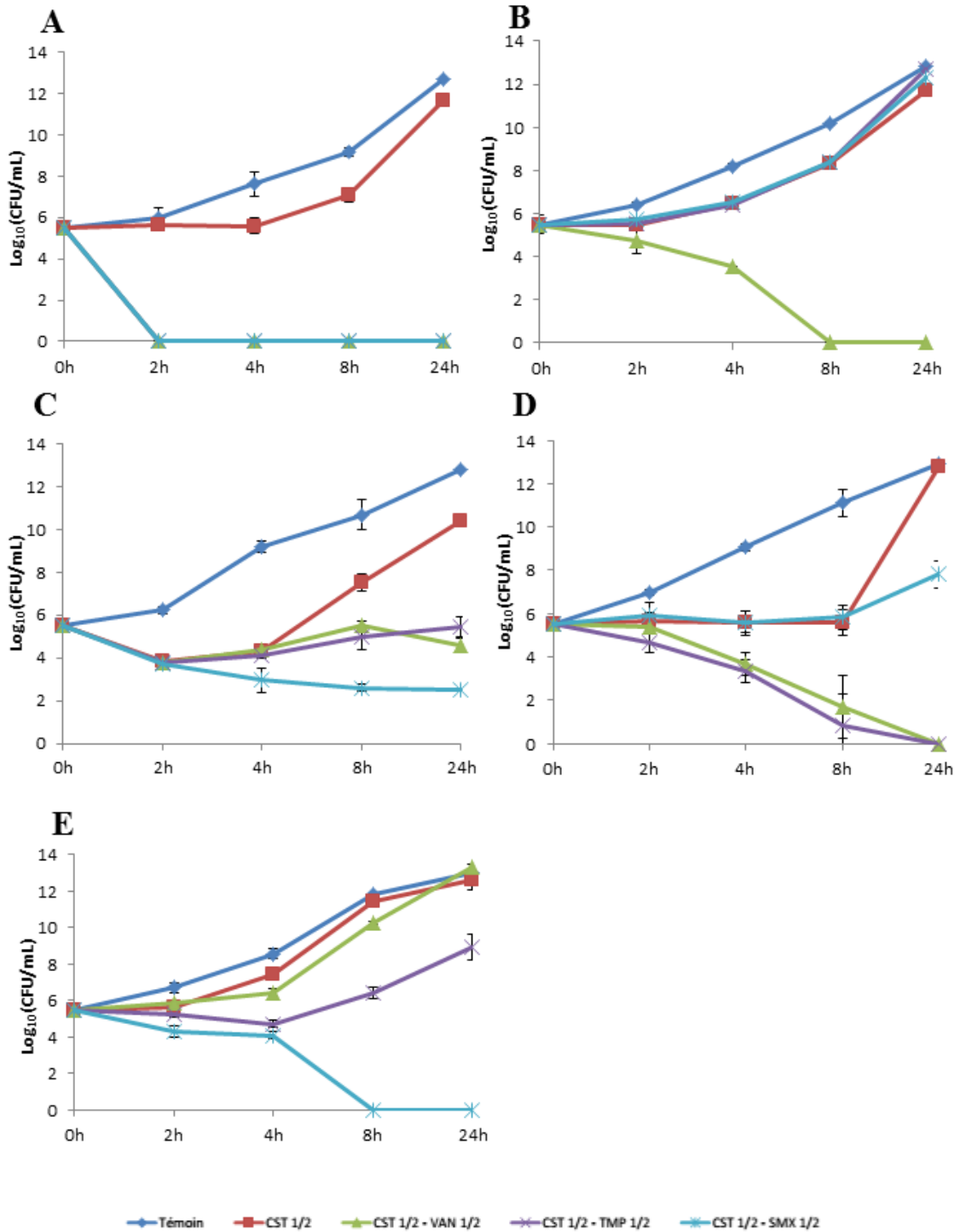
561

562 With TKA, no antagonism was observed. CST-VAN combination demonstrated synergy at 0.5X MIC and 0.25X  
563 MIC against four strains (408, 409, 411 and 419) and bactericidal activity was achieved in 2 h against one strain  
564 (408) and in 4 to 24 h for other strains (409, 411 and 419) (Figure 1 and Table 3).

565 CST-TMP or -TMP/SMX combinations demonstrated synergy at 0.5X MIC against four strains (408, 411, 419,  
566 and 422) and sustained bactericidal activity was achieved in 2 to 24 h (Figure 1 and Table 3). These antibiotic  
567 combinations demonstrated synergy at 0.25X MIC against three strains, 408, 419 (only for CST-TMP) and 422  
568 (only for CST-TMP/SMX), and sustained bactericidal activity was achieved in 2 to 8 h (Figure 2).

569

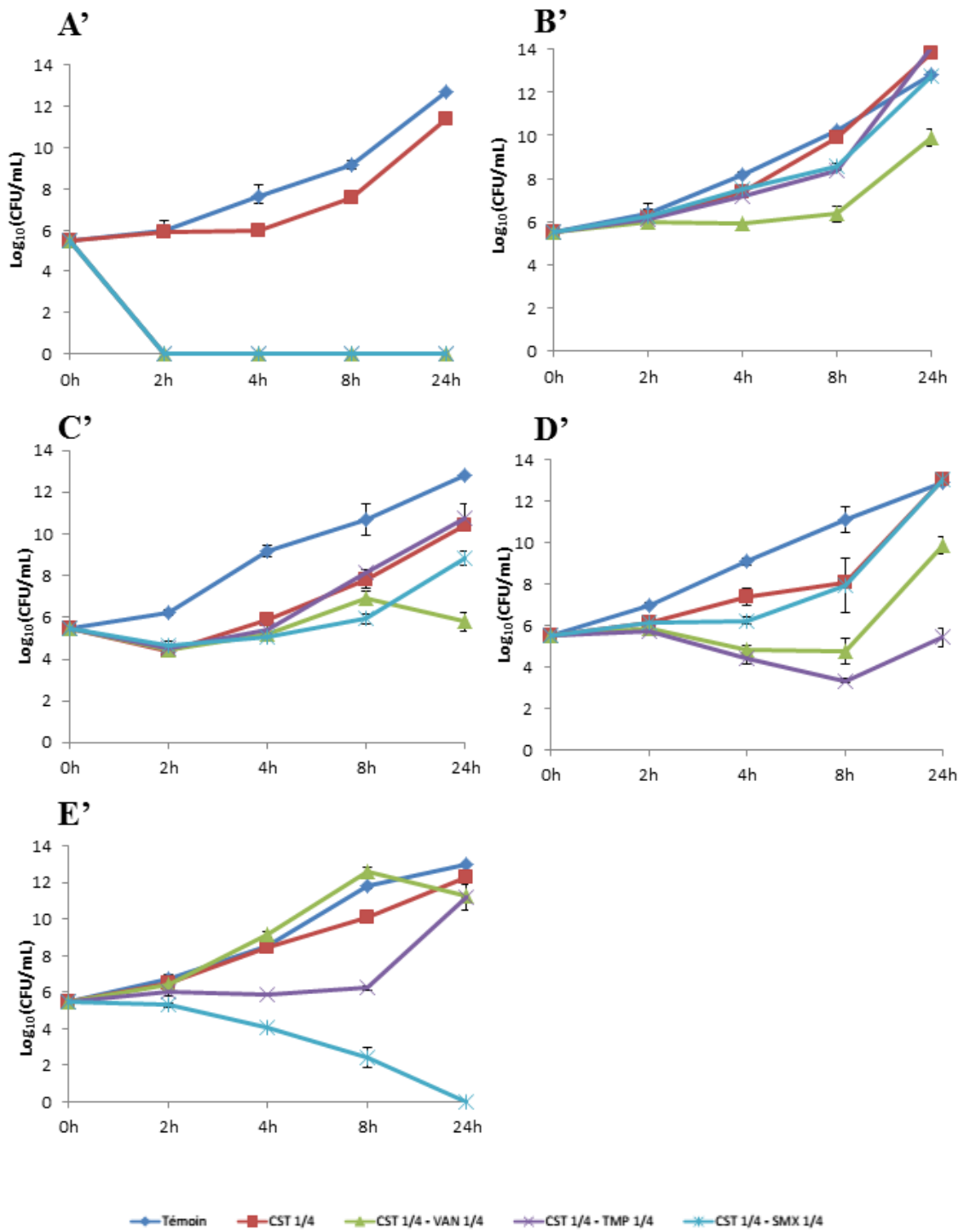
570



572  
573

574

575 Figure 1: *In vitro* evaluation of the TKA of CST combinations at 0.5X MIC against CST-R *K. pneumoniae* (A)  
 576 408, (B) 409, (C) 411, (D) 419 and (E) 422  
 577 Tested alone at 0.5X MIC, CST has no effect.  
 578



579  
580  
581

582 Figure 2: *In vitro* evaluation of the TKA of CST combinations at 0.25X MIC against CST-R *K. pneumoniae* (A')  
583 408, (B') 409, (C') 411, (D') 419 and (E') 422  
584 Tested alone at 0.25X MIC, CST has no effect.  
585

586

587 Table 3: *In vitro* evaluation of the checkerboard method and time-kill assay of CST combinations at 0.5X and 0.25X MIC<sup>a</sup>

588

	CST-VAN			CST-TMP			CST-TMP/SMX (1/19)		
	0.5*MIC	0.25*MIC	∑ FIC	0.5*MIC	0.25*MIC	∑ FIC	0.5*MIC	0.25*MIC	∑ FIC
408	-11.7 ± 0.3	-11.4 ± 0.2	0,3	-11.7 ± 0.3	-11.4 ± 0.2	0,4	-11.7 ± 0.3	-11.4 ± 0.2	0,4
409	-11.7 ± 0.1	-3.9 ± 0.3	2,2	+1.0 ± 0.2	+0.2 ± 0.3	4,1	+0.6 ± 0.1	-1.1 ± 0.1	4,1
411	-5.8 ± 0.7	-4.6 ± 0.4	4,1	-5.0 ± 0.7	+0.4 ± 0.6	1,5	-7.9 ± 0.3	-1.6 ± 0.3	0,8
419	-12.8 ± 0.3	-3.1 ± 0.3	3,0	-12.8 ± 0.3	-7.5 ± 0.6	0,1	-5.0 ± 0.9	0.0 ± 0.2	2,0
422	+0.7 ± 0.8	0.0 ± 0.1	3,7	-3.7 ± 0.4	-0.1 ± 0.8	3,1	-12.6 ± 0.6	-11.3 ± 0.1	0,5

589 <sup>a</sup>CST, colistin; VAN, vancomycin; TMP, trimethoprim; SMX, sulfamethoxazole

590

591

### **Agreement between methods**

The overall agreement between checkerboard method and the Etest® cross method is 46.3%. The agreement between the checkerboard and the Etest® cross method, for each antibiotic combination, is 77.8% (CST+VAN) 33.4% (CST+TMP) and 27.8% (CST+TMP/SMX 1/19) (Table 2).

For the 5 CST-R isolates tested by TKA, the overall agreement between checkerboard method, Etest® cross method and TKA is 13.3%. The best correlation is obtained between the checkerboard method and TKA (40.0%). The agreement between the checkerboard method and Etest® cross method is 26.7%, and finally between TKA and Etest® cross method is 13.3%.

### **4. Discussion**

*Klebsiella pneumoniae* is an important cause of healthcare-associated infections. Indeed, according to the Centers for Disease Control and Prevention, untreatable and hard-to-treat infections from carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (e.g. *K. pneumoniae*) are on the rise among patients in medical facilities (CDC, 2013). Consequently, colistin (CST) became the last-resort treatment for these infections. However, the important use of CST has led to emergence of CST-R *K. pneumoniae* strains (Choi and Ko, 2015). Thus, the depletion of the therapeutic arsenal, due to the absence of new antibiotics active against Gram-negative MDR bacteria, associated with the spread of multidrug-resistant bacteria lead to potential therapeutic impasses. This lack of new molecules has pushed scientists to look at antibiotic combinations. The aim of this work was to evaluate the potential of synergy of unconventional antibiotics (colistin-vancomycin, colistin-trimethoprim and colistin-trimethoprim/sulfamethoxazole) against eighteen CST-R *K. pneumoniae* isolates.

First, a difference in MICs values was found according to the technique used for the CST-R *K. pneumoniae* isolates. In fact, two isolates (411 and 423) were determined susceptible to CST by Vitek® 2 and resistant with Etest® and broth microdilution method. These results are in favour of the manufacturer's note dated May 31, 2017 (Note BioMérieux). Indeed, extensive investigations have highlighted a high rate of errors (susceptible categorized strains instead of resistant) with CST Vitek® 2 AST-GN compared to the agar dilution technique and compared to the microdilution method (as recommended by EUCAST and CLSI). Another hypothesis may also be made and would support the conclusions of Lo-Ten-Foe and colleagues (Lo-Ten-Foe et al., 2007). Indeed, the authors emphasized the lack of sensitivity of Vitek®2 in the detection of hetero-resistance of populations (Lo-Ten-Foe et al., 2007). This phenomenon has already been demonstrated in *K. pneumoniae* could also be a cause of erroneous results (Vidailiac et al., 2012).



Secondly, concerning antibiotic combinations, CST-TMP and CST-TMP/SMX combinations seem more effective than CST-VAN combination with the Etest® and broth microdilution method. However, a high rate of antagonism was observed with the checkerboard method, whereas no antagonism was detected with the Etest® method. This underestimation of the antagonistic effect by the Etest® method is due, in our study, to the use of MDR isolates, for which the MICs are equal to the maximum of the strips. Therefore, when an antibiotic combination is tested and without effect, the FIC<sub>max</sub> will be equal to two (indifference) whereas with the technique of the checkerboard the FIC<sub>max</sub> will be equal to sixteen (Antagonism). Concerning the results obtained with TKA method, four out of five isolates were synergistic and bactericidal for CST-VAN combination at 0.25 and 0.5 of the MIC. Similarly, for the other two combinations, four out of five isolates were synergistic and bactericidal at 0.5 of the MICs and 2/5 isolates were synergistic and bactericidal at 0.25 of the MICs. No antagonism was detected irrespective of the antibiotic combination considered.

Therefore, in CST-R *K. pneumoniae* isolates, these unconventional antibiotic combinations seem to be a good therapeutic alternative in the absence of an effective molecule. However, it is difficult to compare the results obtained with the different techniques, despite the existence of numerous rules in order to standardize as much as possible the results obtained. This difficulty of comparison is an old and recurrent phenomenon in the literature and our results support these observations (Pankey et al., 2013; White et al., 1996; Bonapace et al., 2000; Orhan et al., 2005; Kiratisin et al., 2010; Miyasaki et al., 2012). Through our study, we could conclude that these three methods are complementary. Indeed, all the synergistic results detected with the Etest® or the checkerboard method were confirmed by TKA. However, the Etest® method is not a satisfactory method because it is not discriminating enough (antagonism in MDR bacteria).

Thirdly, Vidaillac et al. concluded that CST resistance appeared to promote the *in vitro* activity of these unconventional antibiotic combinations (Vidaillac et al., 2012). So, we chose to study these antibiotic combinations in 15 CST-S of *K. pneumoniae* isolates with Etest® and checkerboard method. At the end of our experiments, we observed a higher rate of synergy with CST-S isolates than with CST-R isolates (Supp data). Consequently, it appears that CST resistance doesn't promote the *in vitro* activity of these unconventional antibiotic combinations.

Finally, these unconventional antibiotic combinations seem to be a good therapeutic alternative in the absence of an effective molecule. Further investigation of the mechanism of CST resistance may help in the development of new therapeutic agents against MDR *K. pneumoniae*.

## BIBLIOGRAPHY

- Ah YM, Kim AJ, Lee JY (2014) Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. Int J Antimicrob Agents. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.02.016>.
- Antoniadou A, Kontopidou F, Poulakou G et al (2007) Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of multiclonal cluster. J Antimicrob Chemother 59:786-790.
- BioMérieux Note Ref: AH/im-FSCA 3490. Cartes Vitek® 2 Antibiogramme : AST-N240 (ref.413205) et AST-XN05 (ref.413230) Colistine
- Bonapace CR, White RL, Friedrich LV, et al (2000) Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with Etest, time-kill, and checkerboard methods. Diagn Microbiol Infect Dis 38:43-50.
- Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS et al (2009) Bad Bugs, No Drugs: No ESCAPE ! An update from the infectious diseases society of America. Clin Infect Dis 48:1-12.
- Centers for Disease Control and Prevention (2013) Antibiotic resistance threats in the United States. <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>(accessed 14.03.16)
- Choi MJ, Ko KS (2015) Loss of Hypermucoviscosity and increased fitness cost in colistin resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 23 strains. Antimicrob Agents Chemother 59:6763-6773.
- Clancy CJ, Chen L, Hong JH, Cheng S, Hao B, Shields RK, et al (2013) Mutations of the ompK36 porin gene and promoter impact responses of sequence type 258, KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains to doripenem and doripenem-colistin. Antimicrob Agents Chemother 57(11):5258-65.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (1999) Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents, 1<sup>st</sup> ed.. CLSI, Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2009) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically ; approved standard, 9th ed. CLSI, Wayne, PA.
- Eliopoulos GM, Moellering RC (1991) Antimicrobial combinations, p432-492. In Lorian V (ed), Antibiotics in laboratory medicine. Williams & Wilkins CO., Baltimore, MD.
- Giamarellou H, Poulakou G (2009) Multidrug-resistant Gram-negative infections. What are the treatment options? Drugs 69:1879-1901.
- Giamarellou H (2010) Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: how to treat and for how long. Int J Antimicrob Agents 36(S2):S50-54.
- Gordon NC, Png K, Wareham DW (2010) Potent synergy and sustained bactericidal activity of a vancomycin-colistin combination versus multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 54(12):5316-5322.
- Hirsch EB, Tam VH (2010) Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. J Antimicrob Chemother 65(6):1119-1125.
- Kiratisin P, Apisarnthanarak A, Kaewdaend S (2010) Synergistic activities between carbapenems and other antimicrobial agents against *Acinetobacter baumannii* multidrug resistant and extensively drug-resistant isolates. Int J Antimicrob Agents 36:243-246.
- Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, et al (2006) Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. Lancet Infect Dis 6(9):589-601.
- Lo-Ten-Foe JR, de Smet AMGA, Diederens BMW, et al (2007) Comparative evaluation of the Vitek2, disk diffusion, Etest, broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for Colistin in clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* Strains. Antimicrob Agents Chemother 51:3726-3730.

- Miyasaki Y, Morgan MA, Chan RC et al (2012) *In vitro* activity of antibiotic combinations against multidrug resistant strains of *Acinetobacter baumannii* and the effects of their antibiotic resistant determinants. FEMS Microbiol Lett 328:26-31.
- Nastro M, Rodríguez CH, Monge R, Zintgraff J, Neira L, Rebollo M, et al (2014) Activity of the colistin-rifampicin combination against colistin-resistant, carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. J Chemother 26(4):211-6.
- O'Hara JA, Ambe LA, Casella LG, Townsend BM, Pelletier MR, Ernst RK, et al (2013) Activities of vancomycin-containing regimens against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains. Antimicrob Agents Chemother 57(5):2103-8.
- Orhan G, Bayram A, Zer Y et al (2005) Synergy tests by Etest and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*. J Clin Microbiol 43:140-143.
- Pankey GA, Aschcraft DS, Dornelles A (2013) Comparison of 3 Etest® methods and time kill assay for determination of antimicrobial synergy against carbapenemase-producing *Klebsiella* species. Diagn Microbiol Infect Dis 77:220-226.
- Pillai SK, Moellering RC, Eliopoulos GM (2005) Antimicrobial combinations, p365-440 In : Lorian V (ed), Antibiotics in laboratory Medicine. 5th ed. Philadelphia, PA : Lippincott Williams and Wilkins.
- Rosenblatt JE, Stewart PR (1974) Combined activity of sulfamethoxazole, trimethoprim and polymyxin B against Gram-negative bacilli. Antimicrob Agents Chemother 6:84-92.
- Simmons NA (1970) Colistin, sulphamethoxazole, and trimethoprim in synergy against Gram-negative bacteria. J Clin Path 23:757-764.
- Tascini C, Tagliaferri E, Giani T, Leonildi A, Flammioni S, Casini B, et al (2013) Synergistic activity of colistin plus rifampin against colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 57(8):3990-3.
- Vidaillac C, Benichou L, Duval R.E (2012) *In vitro* synergy of colistin combinations against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae* isolates. Antimicrob Agents Chemother 56:4856-4861.
- White RL, Burgess DS, Manduru M et al (1996) Comparison of three different *in vitro* methods of detecting synergy: Time-kill, checkerboard, and Etest. Antimicrob Agents Chemother 40:1914-1918.

# Résistance à la colistine chez *Klebsiella pneumoniae*

---

Thèse soutenue le 30 mars 2018  
Par Marine HEROLD épouse MANUELLI

## RESUME

La diffusion des bactéries multirésistantes à Gram négatif (BMR-GN) associée à une diminution du nombre de nouveaux antibiotiques représente un véritable enjeu de santé publique. Ces dernières années, la colistine connaît un regain d'intérêt, constituant parfois la seule alternative thérapeutique lors d'infection à BMR-GN. La colistine est qualifiée d'antibiotique de « dernier recours ». Cependant, il a été constaté l'apparition de souches résistantes à la colistine. L'objectif principal de ce travail de thèse a été d'étudier le(s) mécanisme(s) de résistance à la colistine chez *K. pneumoniae*. Afin de mener à bien notre projet, nous nous sommes intéressés à deux aspects de la problématique. Dans un premier temps, nous avons cherché à mieux comprendre le mécanisme de résistance en associant un suivi de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse du LPS à une étude phénotypique de trois facteurs de virulence (production de biofilm, sensibilité au sérum et étude de structure de la capsule) dans différentes conditions de culture (différents milieux de culture ou présence de différentes concentrations de colistine). A l'issue de cette première partie, nous avons constaté que ces deux paramètres influençaient l'expression des gènes ainsi que les différents facteurs de virulence étudiés. D'autre part, avant la commercialisation du Zerbaxa® et du Zavicefta® en 2016 (molécules actives contre les BMR-GN), il existait un réel manque de molécules actives contre les bactéries à GN. Ainsi en l'absence de nouvelles molécules et avec la propagation des BMR-GN, les impasses thérapeutiques se multipliaient. Par conséquent, dans cette deuxième partie, nous avons choisi d'évaluer le potentiel de synergie de plusieurs associations antibiotiques. Nous avons étudié 3 associations de 2 antibiotiques à l'aide de 3 techniques, puis nous avons étudié des associations de plus de 2 antibiotiques à l'aide d'une seule technique. A l'issue de nos expérimentations, nous avons montré que l'association de deux antibiotiques était suffisante pour obtenir un effet antibactérien optimal.

**Mots clés :** Résistance à la colistine, *Klebsiella pneumoniae*, facteurs de virulence

## ABSTRACT

The global spread of multidrug-resistant (MDR) Gram-negative bacteria associated with a decrease in the number of new antibiotic therapies is a major public health issue. Colistin is often referred to as the "last-resort" antibiotic, used as the only therapeutic alternative for MDR Gram-negative bacteria infection, which explains the current renewal of interest in this antimicrobial agent. However, the appearance of colistin-resistant bacterial strains has been already observed. The main objective of this PhD work was to study the colistin resistance mechanism(s) in *K. pneumoniae* by looking at two aspects of the problem. First, we sought to better understand the mechanism of resistance by associating a follow-up of the bacterial lipopolysaccharides (LPS) synthesis genes expression to a phenotypic study of three bacterial virulence factors (biofilm production, serum sensitivity and capsule) under different culture conditions - different culture media or presence of different concentrations of colistin. On the other hand, before the marketing of Zerbaxa® and Zavicefta® in 2016 (active molecules against MDR Gram-negative bacteria), there was a real lack of molecules against Gram-negative bacteria. Thus in the absence of new molecules and with the spread of MDR-Gram-negative bacteria, the therapeutic impasses multiplied. Therefore, in this second part, we chose to evaluate the synergistic potential of several antibiotic associations. Thus we compared the impact of several combinations of 2 antibiotics to a combination of more than 2 antibiotics on bacteria, by using different methods. At the end of our experiments, we showed that the combination of two antibiotics was sufficient to obtain an optimal antibacterial effect.

**Keywords:** Colistin resistance, *Klebsiella pneumoniae*, bacterial virulence factors