

Évaluation de la spectrométrie de masse Maldi-ToF et du séquençage multi-génique pour l'identification des Raoultella en bactériologie médicale

Jordan Leroy

▶ **To cite this version:**

Jordan Leroy. Évaluation de la spectrométrie de masse Maldi-ToF et du séquençage multi-génique pour l'identification des Raoultella en bactériologie médicale. Bactériologie. 2015. dumas-01235814

HAL Id: dumas-01235814

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01235814

Submitted on 4 Dec 2015

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.

UNIVERSITE DE PICARDIE JULES VERNES
UFR DE MEDECINE

Année 2015 N° 2015 - 128

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT

DE DOCTEUR EN MÉDECINE

EVALUATION DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI-ToF ET DU SEQUENÇAGE MULTI-GENIQUE POUR L'IDENTIFICATION DES *RAOULTELLA* EN BACTERIOLOGIE MEDICALE

Présentée et soutenue publiquement le 02 octobre 2015 à 10 heures
Par Jordan Leroy

Jury

Président : Monsieur le Professeur Duverlie Gilles

Assesseurs : Madame le Professeur Castelain Sandrine
Monsieur le Docteur Gaillot Olivier

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Guihéneuf Raphaël

Remerciements

A Monsieur le Professeur Duverlie Gilles,

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier
(Virologie, biologie)

Chef de service du laboratoire de Virologie

Pôle biologie, pharmacie et santé des populations
Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens

Doyen, Directeur de l'Unité de Formation et de Recherche de Pharmacie d'AMIENS

Chevalier dans l'Ordre des Palmes Académiques

Vous me faites l'honneur de présider cette thèse. Veuillez accepter mes remerciements et soyez assurés de ma profonde reconnaissance.

A Madame le Professeur Castelain Sandrine.

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

(Bactériologie, virologie-hygiène hospitalière)

Laboratoire de Virologie, laboratoire de Bactériologie

Chef de service du laboratoire de Bactériologie

Pôle biologie, pharmacie et santé des populations

Vous me faites l'honneur de juger ce travail.
Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez exprimé pour ce sujet, ainsi que pour les conseils que vous avez pu me prodiguer au cours de mes semestres au sein de votre service.
Soyez assurés de mon plus profond respect et de ma reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Gaillot Olivier

Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier

Laboratoire de Bactériologie –Hygiène, Centre de Biologie Pathologie, CHRU Lille

Responsable du Centre National de Référence Haemophilus influenzae

Vous me faites l'honneur de juger ce travail.
Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez exprimé pour ce sujet.
Soyez assurés de ma sincère considération.

A Monsieur le docteur Guihéneuf Raphaël

Assistant Hospitalo-Universitaire

Laboratoire de Bactériologie

Pôle biologie, pharmacie et santé des populations
Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens

Je te remercie infiniment de m'avoir proposé un second sujet de thèse,
Merci pour ton encadrement et tes conseils avisés tout au long de l'élaboration de cette thèse.
Puisse ce travail être le reflet de mon profond respect, de ma gratitude et de toute ma sympathie.

Je tiens à remercier tout d'abord mon épouse Lilia sans qui je n'aurais pu effectuer ces longues années d'études et surtout pour le plus beau cadeau qui m'ait été donné, Eliott notre fils. Merci pour ta patience.

Je remercie ma mère qui a toujours été présente pendant les bons moments comme dans les mauvais. Je suis très fier de toi ainsi que de papa, qui reste pour moi un exemple d'humilité et de grande force malgré la maladie.

A mes grands-parents en « or » qui sont toujours disposés à narrer leurs expériences de vie.
A ma sœur et mon beau-frère, c'est toujours un plaisir de pouvoir faire un JDR.
A mon oncle Eric, ma tante Betty, fanny et coco, viva españa.

A tous mes amis : Fabrice, Walter, Florent, pizzo,….avec qui j'ai partagé et partage toujours d'excellents moments. Non le VBH n'est pas mort.

A feu le Docteur Yves Coquel qui m'a donné l'envie d'effectuer des études de médecine.

A tous mes co-internes Amiennois, avec qui j'ai partagé beaucoup de moments de fou rire et sourtout Antoine, vive l'Imuno-Team.

Je remercie tous les techniciens en microbiologie, particuliérement les techniciens de bactériologie pour avoir consacré du temps à me former. Merci aussi à tous les techniciens de la plateforme d'oncobiologie moléculaire sans qui ce travail n'aurait pu aboutir.

Enfin j'aimerais aussi exprimer toute ma gratitude et ma reconnaissance à tous mes Maitres qui sur les bancs de la faculté m'ont enseigné l'art médical avec beaucoup de conviction et de passion.

« Tout ce que vous voulez que les hommes fassent pour vous, faites-le de même pour eux »
Mathieu 7 : 12

A mon père.

Liste des Abréviations **9**

Introduction **10**

PREMIERE PARTIE : Revue de la littérature **12**

I .Taxonomie et description des genres Klebsiella et Raoultella : 12

A. Position phylogénétique du genre Klebsiella : **12**

B. Historique du genre *Klebsiella* : **12**

1. Origines du genre : 12
2. Apport de l'Hybridaton ADN–ADN chez le genre *Klebsiella* : 13
3. Apport de la phylogénie moléculaire : 15
   a) Le cluster I : *K. oxytoca* 16
   b) Le cluster V : contenant *K. pneumoniae sensu lato* 17
   c) Le cluster IV : contenant *Enterobacter aerogenes* 17
   d) Les clusters II et III : *K. terrigena*, *K. planticola* et *K. ornithinolytica* 17

C. Le genre *Raoultella* : **18**

D. Espèces récemment décrites dans le genre *Klebsiella* : **21**

II.Bactériologie médicale 22

A. Facteur de virulence du genre *Klebsiella :* **22**

1. Définitions : 22
2. Facteurs de virulence : 22
   a) La capsule : 22
   b) Pili (fimbriae) : 24
   c) Le pili de type I : 24
   d) Le pili de type III : 25
   e) Les lipopolysaccharides et la résistance au complément : 25
   f) Les sidérophores : 26
   g) Cytotoxines : 27

B. Pouvoir pathogène des espèces du genre *Klebsiella* : **28**

1. *Klebsiella pneumoniae sensu lato* 28
2. *Klebsiella pneumoniae subsp. ozaenae* 30
3. *Klebsiella pneumoniae subsp. rhinoscleromatis* 31
4. *Klebsiella variicola* 31
5. *Klebsiella oxytoca* 32
6. *Klebsiella granulomatis* 33

C. Pouvoir pathogène des espèces du genre *Raoultella :* **34**

1. *Raoultella ornithinolytica* 34
2. *Raoultella planticola* 37
   a) Sepsis bactériémique : 37
   b) Concernant les infections cutanées et des parties molles : 37
   c) Infections urinaires : 38
   d) Infections abdominales : 38
3. *Raoultella terrigena* 40

D. Diagnostique bactériologique : **41**

1. Identification phénotypique : 41
   a) Caractère d'identification commun du genre *Klebsiella* : 41
   b) Caractères d'identification à l'espèce chez *Klebsiella* et *Raoultella* : 42
2. Identification génotypique : 44
3. Identification moléculaire par analyse spectrométrique des protéines totales : ... 44

E. Sensibilité aux anti infectieux des *Raoultella* : **46**

SECONDE PARTIE : Etude expérimentale **48**

I. Objectif de l'étude 48
II. Matériels et méthodes 48
A. Bactéries et conditions de culture : **48**
B. Identification par spectrométrie de masse : **49**
1. Procédure : 49
2. Critères de validation : 49
3. Dendrogrammes : 49
C. Etude de l'activité ornithine décarboxylase : **50**
D. Identification par séquençage génétique : **50**
1. Extraction des acides nucléiques : 50
2. Amplification des gènes cibles *gyrB, rpoB, speF :* 51
3. Vérification de l'amplification et purification : 52
4. Séquençage des gènes : 52
5. Analyse des séquences : 52
III. Résultats 54
B. Identification par spectrométrie de masse MALDI-ToF : **54**
1. Résultats de l'identification pour les 30 isolats cliniques : 55
2. Analyse phylétique des similitudes de spectre de masse MALDI-ToF : 56
C. Identification génétique moléculaire : **57**
1. Identification basée sur l'homologie de la séquence du gène *rpoB* : 57
2. Identification par assignation phylogénétique basée sur la séquence du gène *rpoB :* 59
3. Identification basée sur l'homologie de la séquence du gène *gyrB* : 62
4. Identification par assignation phylogénétique basée sur la séquence du gène *gyrB* : 63
5. Analyse phylogénétique par concaténation *gyrB-rpoB* : 65
6. Analyse phylogénétique pour le gène *speF :* 67

Discussion **69**

Conclusion et Perspectives **73**

Annexes **74**

Références **77**

Liste des Abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique
AAHC : *Antibiotic Associated Hemorragic Colitis*
ARNr : ARN de la petite sous-unité ribosomale du 30S des procaryotes

BLSE : Béta Lactamase à Spectre Elargi
BPCO : Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive
MALDI-ToF: *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of Flight*
MLST : *MultiLocus Sequence Typing*
ST : Séquence Type

Introduction

Les espèces du genre *Klebsiella* sont une cause importante d'infections communautaires ou nosocomiales et sont donc à juste titre d'un intérêt en bactériologie médicale (1). Celles-ci sont souvent la cause d'infections urinaires, respiratoires. Parmi les bacilles à Gram négatif ce genre est le deuxième pathogène couramment impliqué dans les bactériémies après *Escherichia coli* (2). La taxonomie de ce genre est en perpétuel renouvèlement ce qui complique l'identification précise des espèces pour le microbiologiste. Ainsi certaines espèces du genre *Klebsiella*/*Raoultella* sont difficiles à discriminer en laboratoires de microbiologie médicale (3). Ce qui pose un double problème pour les acteurs de santé concourant aux soins du patient. Problème d'une part pour le microbiologiste retrouvant une culture positive pour une espèce du genre *Klebsiella* ou apparentée de considérer l'espèce comme significative et pathogène probable. Et d'autre part pour le clinicien la problématique de la décision d'une antibiothérapie.

La microbiologie est une discipline en perpétuelle évolution. Jusqu'à la fin du XXème siècle elle est basée sur la bactériologie dite « pasteurienne » : c'est-à-dire fondée sur les caractères phénotypiques de la bactérie. Cependant ces caractères ont montré leur limite quand à la caractérisation des espèces. Tout particulièrement pour les espèces des genres *Klebsiella* et *Raoultella* parfois confondues entre elles (4). La microbiologie connait un second bond en avant par le développement des techniques de biologie moléculaire. Ainsi dans le groupe des Entérobactéries jusqu'aux années 1990 aucune étude discriminative puissante n'avait permis d'élaborer une taxonomie pertinente, jusqu'à l'avènement de l'utilisation des séquences du gène de l'ARNr 16S comme outil d'étude des relations phylogénétiques entre ces microorganismes (5). Les résultats de l'analyse de séquences, couplés aux autres techniques d'identifications conventionnelles ont permis de scinder le genre *Klebsiella* en deux genres distinct : *Klebsiella* et *Raoultella*. Plus récemment avec l'arrivée de la protéomique par spectrométrie de masse, les laboratoires d'analyses médicales disposent d'un outil permettant d'une part, l'identification rapide par l'analyse des protéines bactériennes totales et, d'autre part, une utilisation pour la taxonomie bactérienne (6). Cependant, cet outil discrimine mal *Klebsiella oxytoca* du genre *Raoultella*, particulièrement *Raoultella ornithinolytica* (7). L'identification correcte des isolats cliniques des genres *Klebsiella/Raoultella* est importante pour améliorer la caractérisation épidémiologique de ce groupe bactérien. Ainsi, malgré la description du genre *Raoultella* il y a une quinzaine d'années, il reste encore difficile de pouvoir identifier préccisemment les espèces de ce genre

dans la pratique quotidienne d'un laboratoire de biologie médicale. Le développement de méthode d'identification de routine robuste tant pour *Klebsiella* que *Raoultella* est donc nécessaire.

Dans une première partie bibliographique, nous passerons en revue les données de la littérature sur la place des espèces du genre *Klebsiella* et du genre *Raoultella* en médecine et leur diagnostic bactériologique différentiel. Puis, nous exposerons les résultats du travail expérimental comparant l'identification du genre *Raoultella* par spectrométrie de masse MALDI-ToF et à une approche par séquençage multi-génique.

PREMIERE PARTIE : Revue de la littérature

I .Taxonomie et description des genres *Klebsiella et Raoultella :*

A. Position phylogénétique du genre Klebsiella :

L'histoire du genre *Klebsiella* est caractérisée par une taxonomie sans cesse remaniée et vivement débattue reflétant l'histoire florissante et pleine de rebondissements de la systématique bactérienne (8).

Le genre *Klebsiella* fait partie de la branche gamma du phylum des *Proteobacteria* (9). Les gammaprotéobactéries constituent le plus grand sous groupe des protéobactéries, composées de 14 sous-groupes et 28 familles dont celle des *Enterobacteriacea*, unique famille de l'ordre des *Enterobacteriales* (10). *Klebsiella* fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae* qui constitue un très vaste ensemble de genres et d'espèces représentant presque trois quarts des isolements d'un laboratoire de bactériologie médicale (11).

La majorité des bactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* partagent les caractéristiques communes suivantes (12) : bacilles à Gram négatif non sporulé , immobiles chez *Klebsiella* ou mobiles par ciliature péritriche, non exigeante en culture, aérobie-anaérobie facultatifs avec un métabolisme fermentatif, des activités catalase et nitrate réductase positive.

B. Historique du genre *Klebsiella* :

1. Origines du genre :

La première description du genre *Klebsiella* date de la fin du XIX^{e} siècle. Un bacille capsulé fut isolé chez un patient présentant un rhinosclérome par Anton Von Frisch en 1882 (13). Au cours de la même année un microbiologiste allemand Carl Friedländer mit en évidence ce même organisme dans des poumons de patients décédés de pneumopathie. Cette bactérie fut quelques années plus tard nommée en conséquence *" hyallococcus pneumoniae "* (Schroeter-1889). Le genre *Klebsiella* fut créé par Treviscan (1885) en honneur du microbiologiste allemand Edwin Klebs. Ainsi en 1897 le genre *Klebsiella* contenait les espèces *Klebsiella pneumoniae* (bacille de Friedländer) et *K. rhinoscleromatis* (bacille de Von Frisch). En 1893 " *bacillus mucosus ozaene* " fut décrit par Abel dans les sécrétions d'un

patient présentant un ozéne (14). Ce n'est qu'en 1925 que cette bactérie fut incluse dans le genre *Klebsiella* (9).
De ce fait la subdivision du genre *Klebsiella* s'est effectuée en trois espèces, d'importance médicale, correspondant aux pathologies qu'elles causent : *Klebsiella pneumoniae, Klebsiella ozaenae* et *Klebsiella rhinoscleromatis* (8).

Carl von Flügge (1886) a pu décrire la présence de bacilles retrouvés dans du vieux lait. Cet organisme fut nommé "*Aerobacter oxytocum "*. Caractérisé par la production d' indole et une activité gélatinase (5), Lautrop la renomma *Klebsiella oxytoca* en 1956 (9).

Cependant avec l'avènement de nouvelles techniques, la taxonomie s'est affinée. Ainsi la classification des espèces du genre *Klebsiella* a continuellement été revisité (2).

2. Apport de l'Hybridaton ADN–ADN chez le genre *Klebsiella* :

Cette technique s'est développée aux cours des années soixante et a été utilisée pour le genre *Klebsiella* durant les années 1970 en complément des études taxonomiques numériques basées sur les caractères d'identification phénotypiques et biochimiques.

Elle permet la comparaison de la totalité du génome de deux bactéries par la mesure du degré d'homologie entre les deux ADN. Elle repose sur la renaturation *in vitro* de deux brins d'ADN hétérologues (chaque brin provenant de deux bactéries comparées). Plus les espèces sont proches, moins de mésappariements surviennent pendant l'hybridation. Une espèce est alors définie génétiquement comme le rassemblement de souches qui ont des relations ADN-ADN se traduisant par (i) un pourcentage d'hybridation ADN-ADN $\geq$ 70% et (ii) une stabilité thermique des hybrides $\leq$ 5°C (15).

Cette méthode a permis de confirmer l'unicité de l'espèce *Klebsiella pneumoniae* avec 73 à 100% d'homologie entre *K. pneumoniae subspecies pneumoniae, K. pneumoniae subsp. rhinoscleromatis, K. pneumoniae subsp. oazaenae* (5). C'est pourquoi ces deux espèces sont considérées comme des sous espèces de *K. pneumoniae* dans le *Bergey's manual of systematic Bacteriology* (9).

Concernant *K. oxytoca*, longtemps considérée comme un biovar de *K. pneumoniae,* l'analyse par hybridation ADN-ADN a révélé que ce taxon était bien distinct de *K. pneumoniae* (16).

L'ensemble des organismes liés aux *Klebsiella* isolées de l'environnement (groupes J,K,L and M) ont été reclassés en quatre espèces distinctes appartenant au genre *Klebsiella* : *K. terrigena*, *K. planticola*, *K. trevisanii* et *K. ornithinolytica* (8).
Les tests d'utilisations des sources de carbones et les études ADN-ADN ont confirmé l'individualisation de *K. planticola* et de *K. terrigena*. De plus une forte homologie par hybridation ADN-ADN (99%) entre *K. planticola* et *K. trevisanii* fut retrouvée ce qui amena les auteurs à regrouper celles-ci dans une même espèce (17). *K. terrigena* et *K. planticola* ont révélé part ailleurs être plus proches entre elles que de *K. pneumoniae* et *K. oxytoca* (5).
Le groupe des souches ornithine-décarboxylase positives (ODC) considéré autrefois comme *Klebsiella oxytoca* a été proposé comme une espèce à part entière du genre *Klebsiella* et fut nommé *Klebsiella ornithinolytica* en 1989 (18). Cependant *K. ornithinolytica* a présenté des résultats d'homologie avec *K. planticola* identique. L'ODC étant le seul caractère les distinguant (9). Des souches ODC positives et indole négatives se sont révélées être des souches appartenant à l'espèce *K. pneumoniae* après hybridation ADN-ADN (19). L'homologie ADN-ADN entre les autres espèces de *Klebsiella* s'est révélée être particulièrement basse pour *K. ornithinolytica :* 16-37% avec *K. pneumoniae*, 11-49% avec *R. planticola* et 18-45 % avec *R. terrigena*, à l'exeption de *K. oxytoca* (33 à 78% d'homologie-ADN-ADN) (5) .

Une espèce bactérienne est toujours définie traditionnellement à partir de l'hybridation ADN-ADN, qui est une technique lourde, complexe et onéreuse. De plus celle-ci ne permet que la comparaison d'ADN deux à deux, ce qui a pu mener à des résultats erronés lorsque la souche type n'est pas représentative de son espèce, ce qui peut être le cas pour les espèces décrites avant l'avènement de nouvelles techniques d'identification génomique. Toutes ces raisons expliquent pourquoi cette technique tend à être abandonnée au profit d'autres approches moléculaires (15).

3. Apport de la phylogénie moléculaire :

Dans les années 1970, il a été montré que les relations phylogéniques entre les êtres vivants pouvaient être déterminées en comparant leurs séquences nucléiques. Des travaux ont pu montrer que le gène de l'ARNr 16S (*rrs*) avait plusieurs avantages dont le fait qu'il code pour un ARN ribosomal de fonction constante dans l'évolution et qu'il soit présent parmi presque toutes les bactéries, existant comme une famille multigénique ou opérons (20) (21); ce gène peut donc servir d'horloge moléculaire pour suivre l'évolution bactérienne (22). Les séquences du gène de l'ARNr 16S ont ainsi joué un rôle majeur dans l'étude de la phylogénie et de la taxonomie bactérienne (23). Une vaste analyse phylogénétique de plusieurs membres de la famille des *Enterobactriaceae* a démontré que la comparaison des séquençages de l'ARNr 16S a le même pouvoir discriminant phylogénétique que la technique de réassociation ADN-ADN (5).

Notons toutefois que concernant les pourcentages de similarité, il n'y a pas de valeur seuil clairement établie au-delà de laquelle la communauté scientifique s'accorde pour définir le rang d'espèce. La plupart des taxonomistes acceptent des seuils de 97% pour le genre et de 99% pour l'espèce (22). Alors que certains auteurs suggèrent 99.5% d'homologie pour l'espèce (24).

Le genre *Klebsiella* n'à été soumis à cette analyse qu'au début du XXI^{e} siècle (8). Cinq clusters très proches ont été trouvés (5) bien qu'une autre étude fait mention de seulement trois clusters distincts mais sur la base des fragments de gènes ARNr 16S et *rpoB*(8) (Figure 1).

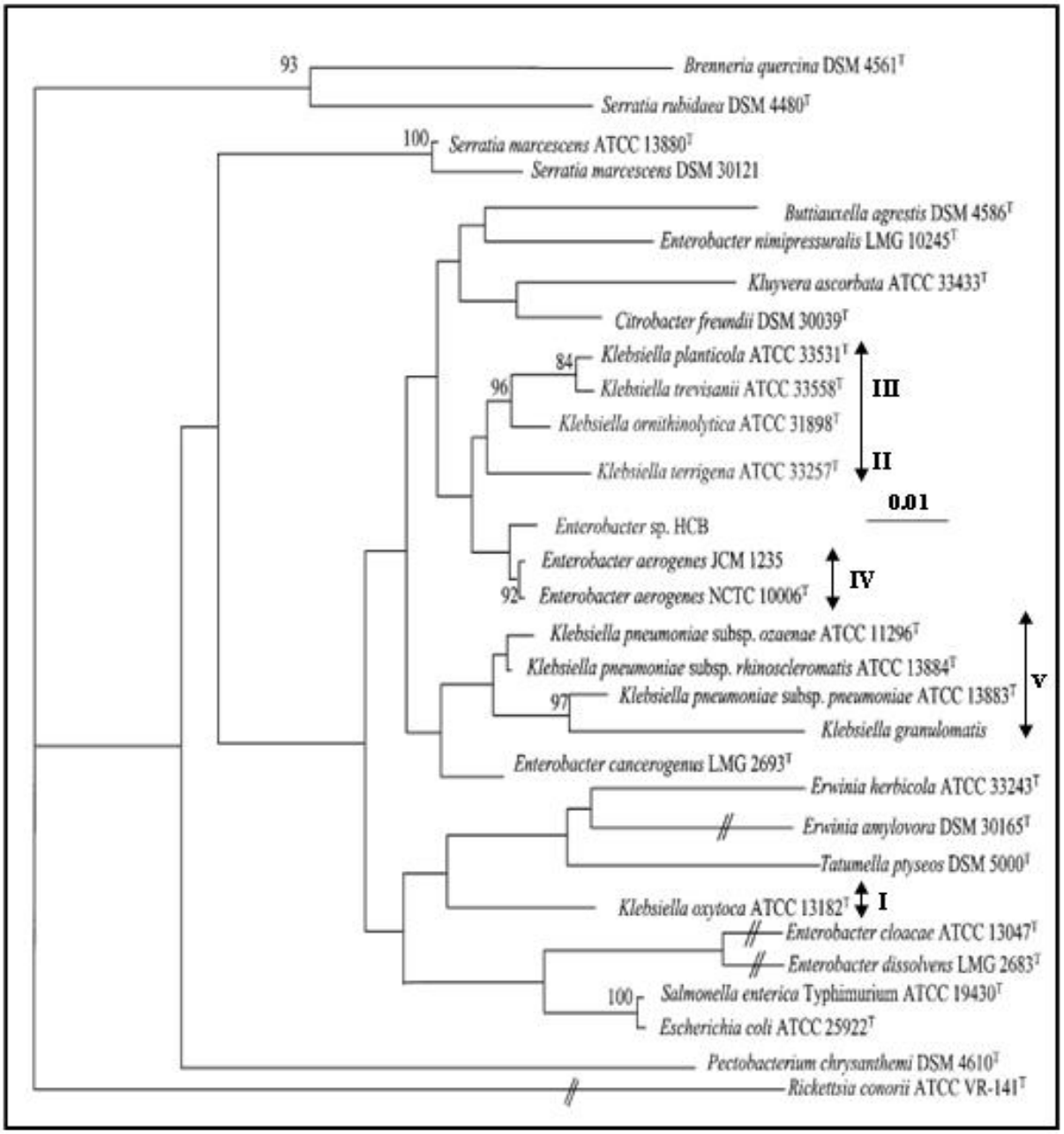


Figure 1. Dendrogramme dérivé de la comparaison des séquences d'ARNr 16S de membres de divers genres de la famille des *Enterobacteriaceae*, dont neuf *Klebsiella* et trois espèces du genre *Raoultella*, déterminé par la méthode de *neighbour-joining* de Jukes & Cantor et Kimura (25). Les valeurs (%) de Boostraps pour 100 réplications ou ré-échantillonnages effectués sont indiquées à chaque nœud (uniquement les valeurs supérieures à 70). La barre indique l'échelle. D'après Drancourt et al. IJSEM 2001.

a) Le cluster I : *K. oxytoca*

En concordance avec les analyses d'hybridations ADN-ADN les souches de *K. oxytoca* forment un génogroupe distinct de *K. pneumoniae* avec une position taxonomique incertaine (5)(8). De plus les résultats indiquent une probable subdivision en deux sous-espèces. Ces

résultats ont été confirmés par des études de séquençage d'autres gènes tel que *gyrA* et *parC* (5). (Figure 3.)

b) Le cluster V : contenant *K. pneumoniae sensu lato*

Les résultats ont montré une grande similitude des séquences de *K. rhinoscleromatis* , *K. ozaenae* et *K. pneumoniae* (niveau supérieur à 97%).

c) Le cluster IV : contenant *Enterobacter aerogenes*

Enterobacter aerogenes (*Klesbsiella* mobilis) a été positionné dans le genre *Klebsiella* suite aux données de la taxonomie numérique (26) et d'homologie de l'ADN-ADN qui ont montré qu'elle était plus proche de *Klebsiella* (47-64%) que d'*Enterobacter cloacae* (44%) (27). Une confusion dans la nomenclature britannique a amené à nommer un biogroupe de *K. pneumoniae* comme « *Klebsiella aerogenes* ». *K. pneumoniae* est alors divisée en *K. edwardsii subsp. edwadisii, K. edwardissi subsp. Atlantae* et *K. aerogenes*. Cependant l'étude d'hybridation ADN-ADN de ces souches n'a pas mis en évidence de différence significative, montrant qu'elles correspondent à une seule espèce qu'est *K. pneumoniae* (9). De plus les données de comparaison de séquence du gène de l'ARNr 16S ont confirmé celles de l'hybridation avec plus de 97,7 à 99,0 % de similitude avec les espèces du genre *Klebsiella* (5) . Ainsi il existe toujours un cluster parmi les espèces de *Klebsiella* indiquant que le genre *Enterobacter* est polyphylétique. Bien que non consensuel, une publication l'intègre parmi le groupe des *Klebsiella* faisant mention d'un cinquième cluster (5).

d) Les clusters II et III : *K. terrigena, K. planticola et K. ornithinolytica*

Ce groupe est caractérisé par sa croissance à 10°C, et l'utilisation du L-sorbose comme source de carbone (8) (Tableau 1). Les séquences des gènes *rrs* et de *rpoB* chez *K. planticola* et *K. trevisanii* ont montré plus de 99,9% de similitude confirmant bien qu'il s'agit d'une seule espèce. Il faut donc considérer *Klebsiella trevisanii* comme un synonyme de *Klebsiella planticola. K. ornithinolytica* présente un niveau d'homologie plus élevé avec *K. planticola* (96%) qu'avec *K. oxytoca*. *K. terrigena* semble être un taxon bien individualisé des autres espèces (5).

C. Le genre *Raoultella* :

L'analyse des séquences de gènes universels ARNr 16S et *rpoB* (gène codant pour la sous-unité β-de l'ARN polymérase), confirmée par les données phénotypiques et écologiques (croissance à basse température, espèces retrouvées dans l'environnement [plantes, sol, eau]), ont amené à proposer un reclassement en deux genres distincts et des modifications de combinaison avec la création du genre *Raoultella* (8). *R. ornithinolytica* montrait 98% d'homologie avec *R. planticola*. *R. terrigena* est bien individualisé des deux autres espèces de *Raoultella* par sa séquence du gène *rpoB* (Figure 2).

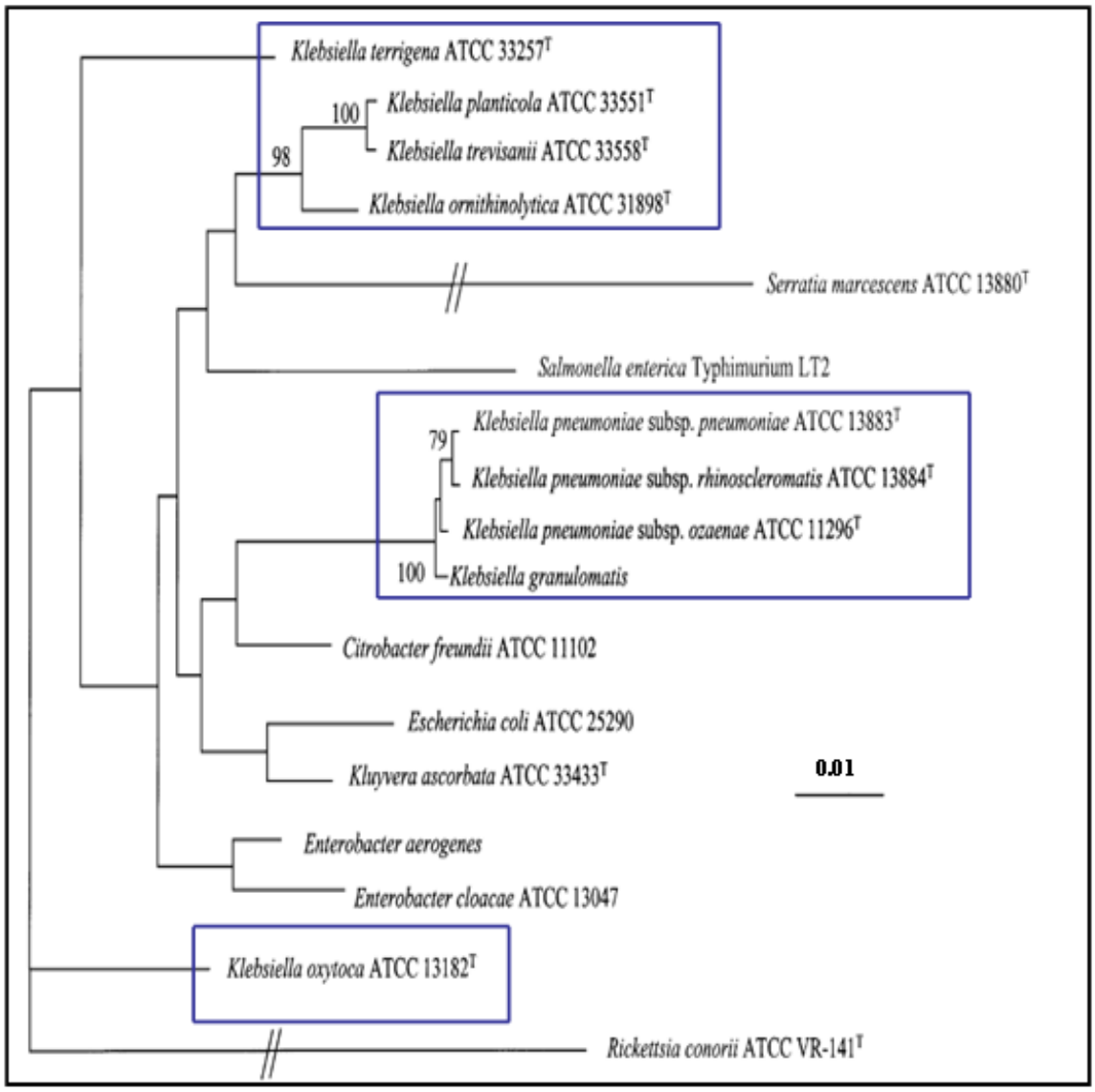


Figure 2. Dendrogramme dérivé de la séquence partielle du gène *rpoB* des membres de divers genres de la famille des *Enterobacteriaceae*, incluant neuf espèces de *Klebsiella (Raoultella),* déterminé par méthode de *neighbour-joining* de Jukes & Cantor (28) et Kimura (25). Les valeurs (%) de Boostraps sur 100 réplications sont indiquées à chaque nœud (uniquement les valeurs supérieures à 70%). La barre indique l'échelle. D'après Drancourt et al. IJSEM 2001.

Cependant cette nomenclature est toujours débattue. Ainsi certains auteurs ne reconnaissent pas le genre *Raoultella* (1). En effet, comme nous avons pu le voir, pour de nombreux auteurs, la comparaison de séquence du gène de l'ARNr 16S utilisée seule n'est pas un outil assez puissant dans la discrimination des espèces d'un genre lorsque le pourcentage d'homologie est trop important (>97%). C'est pourquoi d'autres fragments de gènes tel que *rpoB* (présent en une seule copie dans le génome) ou *gyrB* (codant pour la sous unité β de l'ADN gyrase) sont des outils plus puissants pour la discrimination des espèces (29)(30). Ainsi d'autres gènes doivent être utilisés pour évaluer cette nouvelle classification, d'autant que le dendrogramme obtenu à partir d'un fragment interne de *rpoB* de 512 nucléotides propose une phylogénie polyphylétique pour les genres *Klebsiella* et *Raoultella* nouvellement délimités (Figure 2) (5) (9).

L'analyse des comparaisons des séquences de *gyrA* et *parC* ont, elles, montré des résultats différents avec la présence de deux groupes : le premier est composé de *K. pneumoniae* avec trois sous-groupes, le deuxième comprenant *K. oxytoca*, *R. planticola*, *R. ornithinolytica* et *R. terrigena* avec des homologies de 100% vis-à-vis de *K. ornithinolytica* et *K. planticola* et un taxon bien différencié pour *K. terrigena*. *K. oxytoca* étant scindé en deux clusters ou phylogroupes (KoI et KoII*)* (31).

La validité du genre *Raoultella* a pu être confirmé par l'analyse de la séquence des gènes *tuf* (codant le facteur d'élongation Tu) et *atpD* (sous unité β de F-ATPase) effectué dans la famille des Entérobactéries (32). Une publication utilisant la technique de polymorphisme de longueur des fragments amplifiés a confirmé ces résultats (AFLP) (33).

Très récemment a été décrit une nouvelle espèce appartenant au genre *Raoultella*. Il s'agit de *Raoultella electrica sp.nov*. isolée à partir d'un biofilm de l'anode d'une pile à combustible microbienne. Cette espèce à été confirmée par l'hybridation ADN-ADN, le gène *rrs* et les gènes de ménages *gyrA*, *rpoB* et *parC* (34) Un arbre phylogénétique à pu être créé à partir de ces données (Figure 3).

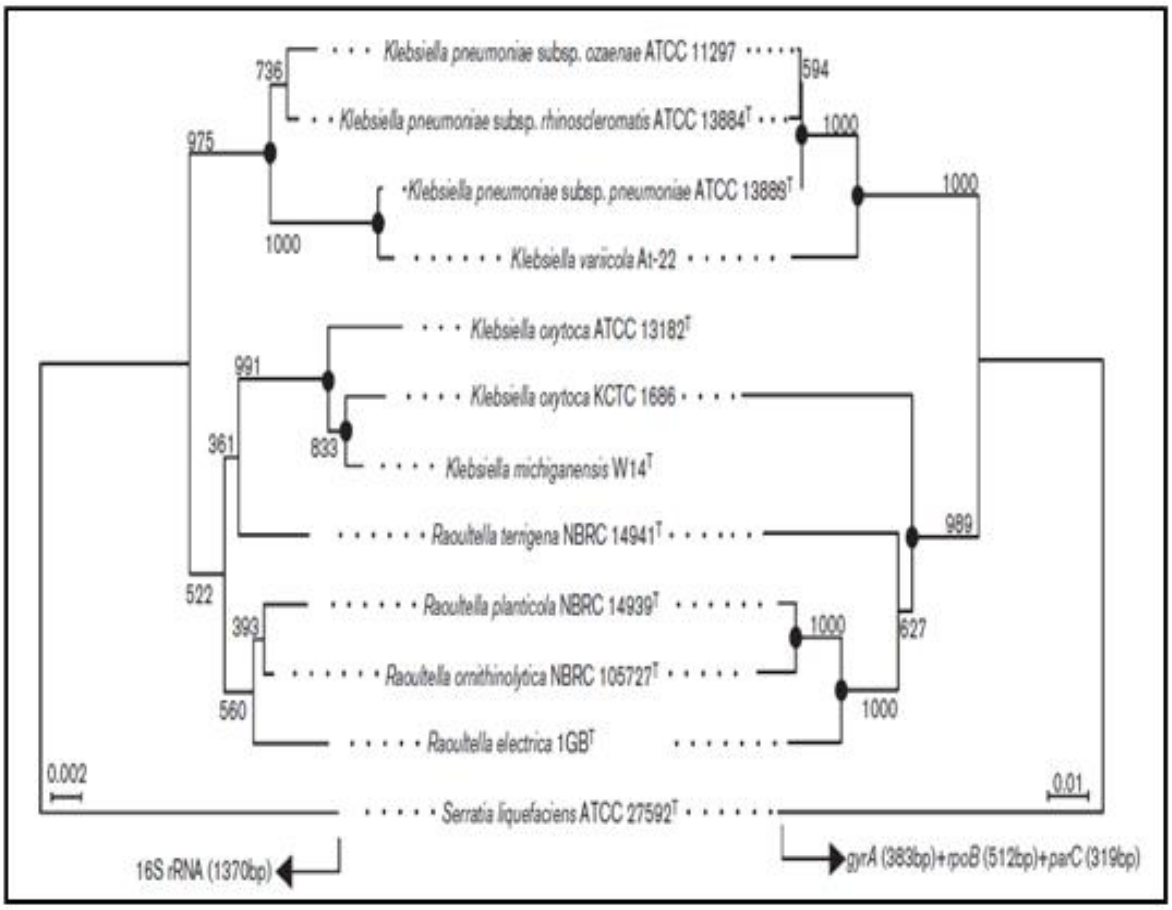


Figure 3. Dendrogramme reconstruit à partir de l'analyse comparative des gènes de l'ARNr16S et de trois gènes de ménage (*gyrA*, *rpoB* et *parC*) des séquences montrant la relation de la souche 1GB^{T} avec les genres *Raoultella* et *Klebsiella.* L'arbre a été construit par utilisation de la méthode de *neighbour-joining* selon saitou & Nei et kimura (35)(25). Les cercles pleins représentent des nœuds supportant une valeur supérieure à 80% de probabilités de répétions ou boostrap sur 1000 réplications. La barre indique 0.2 et 1% de substitution de nucléotide. D'après Z. kiruma et al. 2014 IJSEM (34).

Les données semblent montrer deux embranchements distincts entre *K. pneumoniae* et le complexe *K. oxytoca-Raoultella spp* avec des valeurs de boostraps très importantes (1000 et 989).

Cette étude confirme que *R. planticola* et *R. ornithinolytica* sont difficilement discriminables puisque très proche génétiquement. De plus *R. terrigena* est bien individualisée des deux autres espèces du genre *Raoultella,* ce qui confirme toutes les études précédentes.

Un arbre phylogénétique basé sur des séquences du gène ARNr 16S a montré que la souche 1GB^{T} est étroitement liée aux membres du genre *Raoultella.* L'homologie de séquence de l'ARNr 16S concernant *Raoultella electrica* et *R. ornithynolitica* sont de 99.4% (valeur supérieure au seuil communément admis pour individualiser une espèce). Mais cette hyopthèse n'est pas supportée par une branche forte sur le dendrogramme (Figure 3).

Ainsi les similitudes, basées sur les séquences concaténées de trois gènes de ménages (*gyrA, rpoB, parC*), entre *Raoultella electrica, R. planticola* et *R. ornithinolytica* sont respectivement

de 94 à 96 %. Ce qui renforce l'idée que *R. electrica* est très proche de *R. ornithinolytica* mais suffisamment distincte pour justifier de nommer une nouvelle espèce dans le genre *Raoultella* (34).

D. Espèces récemment décrites dans le genre *Klebsiella* :

Il s'agit de *Klebsiella michiganensis* (36), *Klebsiella quasipneumoniae subsp. quasipneumoniae subsp. nov.* et *Klebsiella quasipneumoniae subsp. similipneumoniae* (37)

Enfin les données plus récentes de séquençage multigénique ont permis d'individualiser pour *K. pneumoniae* trois groupes phylogénétiques nommé KpI regroupant : *K. pneumoniae subsp pneumonia* , *K. ozaenae* et *K. rhinoscleromatis* ; KpII pour *Klesbisella quasipneumoniae sensu lato* et KpIII correspondant à *Klebsiella variicola* et son synonyme *de Klebsiella singaporensis* (38).

Il convient d'examiner les isolats associés au rhinosclérome et à l'ozène comme des clones de *K. pneumoniae* qui ont acquis des propriétés de pathogénicités particulières, plutôt que des entités séparées phylogénétiques qui méritent le statut de sous-espèce uniquement de par leur pathogénicité humaine spécifique (39).

II.Bactériologie médicale

A. Facteur de virulence du genre *Klebsiella :*

1. Définitions :

Les termes "facteur de pathogénicité" et "facteur de virulence" sont utilisés comme synonyme par certains auteurs, tandis que d'autres font une distinction claire entre les deux. Dans le cadre de ce travail nous définirons le terme "pathogène" comme la capacité d'une bactérie à causer la maladie (notion qualitative) tandis que la "virulence" comme degré de pathogénicité (notion quantitative) de toutes les espèces bactériennes (2).
Les facteurs de virulence se définissent en effet comme n'importe quel composant d'un agent microbien qui est nécessaire ou qui potentialise sa capacité à provoquer une maladie (40).

2. Facteurs de virulence :

L'étude des facteurs de virulence est importante car nous assistons à l'émergence progressive dans le monde de souche ayant un pouvoir pathogène important (41).
Afin de ne pas alourdir notre propos nous passerons en revue succinctement les facteurs de virulence chez *Klebsiella spp*. En effet, les nombreuses études menées concernant ces facteurs de virulence ont révélé cinq facteurs de virulence majeurs(1)(2)(42)(Figure 3). Il faut toutefois garder à l'esprit que ces facteurs ont été étudiés essentiellement chez *K. pneumoniae.*

a) La capsule :

Les espèces du genre *Klebsiella* sont entourées d'une capsule polysacharidique qui a été historiquement le premier facteur de virulence décrit (9). La capsule est essentielle à la virulence de *Klebsiella* (43) . Celle-ci est composée de sous unités de sucres répétés (de quatre à six) formant de fines fibres dessinant un épais faisceau recouvrant la surface bactérienne en couches épaisses (44). Actuellement 78 sérotypes ont été répertoriés. La distribution de ces sérotypes capsulaires plus particulièrement chez *K. pneumoniae* est variable dans le monde (45).

La capsule (antigène-K) joue un rôle crucial en protégeant la bactérie de l'opsonisation, de la phagocytose mais aussi contre l'action du complément par l'inhibition de

l'activation de la sous composante C3b (46). De plus, celle-ci joue un rôle d'inhibition de la différentiation et des capacités fonctionnelles des cellules *macrophagiques* in vitro (9).
De nombreux travaux ont été effectués afin d'établir une corrélation entre un sérotype et le site d'infections cliniques avec des résultats contradictoires. Les différences géographiques dans les sérotypes ont sans doute contribué à cette confusion (2). De plus, le degré de virulence conféré par type antigènique K particulier pourrait être relié à la teneur en mannose des polysaccharides de la capsule (2).

Cependant, il apparait que les sérotypes K1 et K2 sont considérés comme les plus virulents chez *K. pneumoniae* dans les infections communautaires et dans les études expérimentales animales (42). Le sérotype K2 est l'un des plus souvent retrouvé dans le cadre d'infections communautaires urinaires, de pneumonie et de bactériémie chez des patients ayant des comorbidités sous-jacentes. Ce sérotype est prédominant pour les isolats humains dans le monde entier, alors que celui-ci est très rarement retrouvé dans l'environnement (2).
Concernant les isolats de K1, ils semblent peu fréquents en Amérique du Nord, Europe et Australie mais sont retrouvés fréquemment au nord de Taïwan. C'est aussi le plus couramment retrouvé chez des patients ayant un abcès hépatique compliqué de métastases septiques au système nerveux central et oculaire indépendamment des pathologies sous-jacentes chez l'hôte (47).

Toutefois, les sérotypes K1 et K2 de *K. pneumoniae* sont rarement rencontrés dans les infections nosocomiales (48).

Soulignant l'importance de la capsule, une liste toujours croissante de régulateurs de transcription de l'expression du gène de la capsule a été identifiée tel que Mag A, RmpA (49). Tandis que les souches cliniques classiques de *Klebsiella spp* produisent une capsule nécessaire pour l'infection des patients présentant des comorbidités à long terme, de nouvelles souches hyper-virulentes de *K. pneumoniae* associées à des abcès du foie et capables de causer des maladies chez des individus jeunes et sains ont vu le jour depuis une trentaine d'années (50). Ces souches hypermuqueuses ont été décrites initialement en Asie (Taïwan, Corée, Vietnam et Japon) mais un nombre croissant de nouveaux cas est rapporté dans le monde entier (50). Ce phénotype est souvent associé avec la présence le facteur de transcription RmpA augmentant la production de la capsule (51).

Bien que plusieurs études ont démontré que l'absence de corrélation entre phénotype hypermuqueux et survenue d'abcès hépatique pyogène, les souches utilisées ayant des mutations dans les gènes régulateurs de la capsule, notamment *rmpA* et *magA* mais aucune

délétée pour les gènes de synthèse de la capsule, il est difficile de conclure sur un lien pathognomonique entre production d'une caspule et la survenue d'abcès hépatique.
En outre, l'analyse clonale de plus de 102 souches d'isolats cliniques et environnementaux ne trouve pas d'association de *magA* avec les abcès hépatiques, ce qui suggère que la présence de la capsule avec fond clonal spécifique peut être plus important que la présence de *magA* (39)

De la même manière, des études très récentes ont remis en question la vision simpliste d'une association entre un sérotype capsulaire à un site infectieux ou une pathologie. L'étude large des gènes de virulence chez les sérotypes capsulaires les plus virulents (K1 et K2) a montré que le potentiel de pathogénicité dépendait plus du génotype de la souche que de son sérotype (39). Il a été retrouvé une proportion faible de complexes clonaux virulents parmi les sérotypes K1 et K2 par la technique MLST sur une analyse mondiale de souches (52) : ainsi le sérotype capsulaire ne permet pas de prévoir la virulence d'une souche puisqu'il existe une diversité de clones plus ou moins virulents exprimant ce sérotype (39).

b) *Pili* (*fimbriae*) :

La première étape cruciale du processus infectieux est caractérisée par le rapprochement du microorganisme des muqueuses puis l'adhérence aux cellules de l'hôte. Les stratégies d'adhésions employées peuvent être très variées et sont fonctions des différents microorganismes.

Concernant le groupe des Entérobactéries, cette propriété est généralement attribuée aux différents types de *pili* (ou *fimbriae*). Il s'agit de projection filamenteuse localisée à la surface des bactéries, ayant une dimension de 10µm de long pour un diamètre compris entre 1 et 11µm. Ils sont constitués par la polymérisation d'une même sous-unité polypeptidique, la piline, assemblée à des polypeptides mineurs dont les adhésines (53) (54).
Parmi les différents types de *pili* décrits chez les Enterobactéries, deux sont prédominants chez *Klebsiella spp*, le pili de type I et III (2). Tous deux ont été retrouvés chez *K. pneumoniae*, *K. oxycota*, *R. planticola* et *R. terrigena* (9).

c) Le *pili* de type I :

Il est celui qui a été le plus investigué. Ce *pili* est capable de se lier aux glycoprotéines de surface de l'hôte composées de mannanes (2).

Des études sur l'animal ont permis de mettre en évidence pour *K. pneumoniae :* premièrement, une adhésion aux cellule de l'urothélium responsable d'infection du tractus urinaire et probablement de pyélonéphrite (55) et secondairement, de mettre en lumière une adhésion aux cellules ciliées trachéales (56). L'adhésion au tractus respiratoire induit un défaut de résistance à la colonisation des voies aériennes supérieures, avec pour conséquence une prolifération de bactérie pathogène opportuniste. Cette altération peut se traduire par le développement de pneumonie, surtout chez les patients bénéficiant d'une ventilation mécanique au long cours (2).
Ainsi, l'adhésion par ces organelles facilite la colonisation du tractus urogénital et respiratoire, première étape déterminante de l'infection (57).

d) Le *pili* de type III :

Bien que son nom, -l'hémagglutinine *Klebsiella-like* mannose-résistante (MR / K-HA)- implique que ce type *fimbriae* soit synthétisé exclusivement par le genre *Klebsiella,* des études ultérieures ont démontré que les *pili* de type III sont retrouvés chez d'autres genres de la famille des *Enterobacteriaceae* (57).
Initialement décrit comme permetant l'adhésion des *Klebsiella* aux racines des plantes (58), ces *pili* ont été retrouvés plus tard comme ayant la capacité de se lier à différentes cellules humaines. Les souches de *K. pneumoniae* exprimant le *pili* de type III sont ainsi capables d'adhérer aux cellules endothéliales, à l'épithélium du tractus respiratoire et aux cellules uro-épithéliales (59)(60). Au niveau rénal, ces *pili* permettent l'adhésion bactérienne à la membrane basale, la capsule de Bowman et à la chambre urinaire (61).

Plus récemment, des études *in vitro* ont pu montrer que ce *pili* jouait un rôle important dans la formation du biofilm sur des surfaces abiotiques comme les sondes vésicales (62). Il a pu être démontré qu'en plus des *fimbriae* de type I, celles de type III influencent la colonisation des voies urinaires et jouent donc un rôle important dans les infections sur sonde (62) et de façon plus large dans le cadre d'infections nosocomiales secondaires à la mise en place de dispositifs intra-vasculaires (63).

e) Les lipopolysaccharides et la résistance au complément :

L'activité bactéricide du sérum est conférée par les protéines du complément qui font partie de l'immunité inné. L'activation d'une cascade des protéines du complément permet la formation du complexe d'attaque membranaire. Celui-ci est constitué d'un assemblage de

facteurs de protéines de C5b-8 recrutant plusieurs C9 se polymérisant pour former des pores dans la bicouche lipidique membranaire des bactéries à Gram négatives (64). Les microorganismes tels que *Klebsiella spp* ont cependant développé des stratégies pour contourner l'effet bactéricide des constituants du sérum humain.

Les lipopolysaccharides (LPS) sont composés de trois parties distinctes ; l'antigène O (O-ag) qui est composé d'un nombre variable de sucre, le *core* qui fait le lien entre l'antigène O et le lipide A (65).

Le rôle du LPS reste encore controversé. Des études montrent qu'il intervient dans la résistance au complément (66) (67), alors qu'une autre remet en cause cette idée suggérant que seule la capsule permet cette résistance au complément (65). Il existe huit antigènes O connus (68). L'antigène O1 est le plus fréquent dans le monde (2) (67). Il a pu être démontré que ce sérotype associé au sérotype capsulaire K1 jouait un rôle important dans le cadre d'abcès hépatique particulièrement retrouvé en Asie (67). Outre le fait qu'il confère une résistance à l'action du complément, il pourrait jouer un rôle dans la dissémination bactérienne au cours des infections invasives (67).

f) Les sidérophores :

La croissance bactérienne chez l'hôte est limitée non seulement par les mécanismes de défense de l'hôte, mais aussi par l'approvisionnement en fer disponible. En effet, le fer est au centre de nombreuses fonctions pour la bactérie. Celui-ci est essentiel pour la croissance bactérienne et les réactions d'oxydo-réduction (2).

Chez l'hôte, les concentrations en fer sont extrêmement faibles dans le milieu extérieur puisque cet élément est lié de manière intracellulaire à des protéines telles que l'hémoglobine, la ferritine et, au niveau extracellulaire à des protéines de haute affinité comme la lactoferrine et la transferrine. Les concentrations sont de l'ordre de 10^{-18}/L, bien trop basses pour permettre une croissance bactérienne (69).

Afin de pouvoir capter le maximum de fer, les bactéries produisent et sécrètent des protéines de faible poids moléculaire chélatrices de fer appelées sidérophores. Ceux-ci ont une plus haute affinité que les protéines produites par l'hôte pour le fer et sont capables de lier le fer de façon compétitive (2).

Les sidérophores peuvent être partagés en deux grandes familles. Ils possèdent soit un groupement 2,3-dihydroxybenzoïque (famille des phénolates-catécholates) comme l'entérobactine (aussi connu comme entérocholine), soit ce sont des acides hydroxamiques (famille des hydroxamates) comme l'aérobactine (70).

La quasi-totalité des souches chez *Klebsiella* produisent l'entérocholine alors qu'une minorité produit l'aérobactine. Dans les modèles animaux, les souches de *Klebsiella* possédant l'entérobactine n'étaient pas plus virulentes que celles ne possédant pas ce type de sidérophore (71). En revanche, il a été démontré sans équivoque une corrélation entre la virulence des souches de *K. pneumoniae* possédant le sérotype K1 ou K2 associé à la présence d'un plasmide codant pour l'aérobactine (72)

L'effet de la modulation de la concentration de fer chez l'hôte a pu être caractérisé chez l'animal pour *K. pneumoniae*. Après l'administration parentérale de fer dans un modèle chez le cobaye, la susceptibilité aux infections à *K. pneumoniae* augmentait de façon spectaculaire (73).

Ainsi la production des deux sidérophores par *Klebsiella* contribue à sa croissance et l'aérobactine contribue indirectement à la pathogénicité (2).

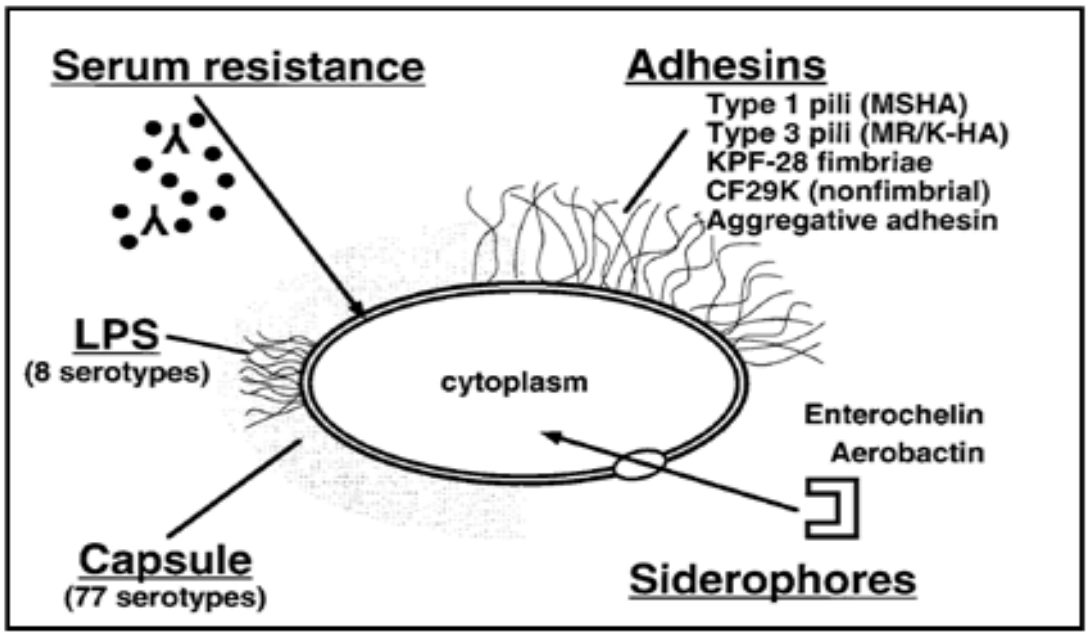


Figure 4. Représentation schématique des facteurs de virulences chez *Klebsiella*, d'après R. PODSCHUN et al. Clin Microbio Rev, 1998(2).

g) Cytotoxines :

Comme chez les autres Enterobacteriaceae, plus particulièrement étudiés chez *Escherichia coli* , d'autres facteurs de virulences ont pu être retrouvés de façon sporadique chez *Klebsiella spp* telle que la production de cytotoxine, d'entérotoxine et d'hémolysine .

Cependant ces facteurs de virulence jouent propablement un rôle mineur ou méconnu chez *Klebsiella* (2).

Toutefois, il est important de noter que les différents facteurs de virulence des souches « environenementales » du genre *Klesbiella* sont similaires aux isolats cliniques plus particulièrement chez *K. pneumoniae* (1). Des comparaisons plus fines du génome semblent nécessaires pour caractériser la virulence des souches cliniques comparativement aux souches environnementales. En effet, il existe une faible prévalence (bien qu'en augmentation) en pathologie humaine des souches du genre Raoultella.

B. Pouvoir pathogène des espèces du genre *Klebsiella* :

Nous présenterons dans cette section les pathologies communes des différentes espèces du genre *Klebsiella* et présenterons de façon plus exhaustive une revue de la bibliographie sur les infections au genre *Raoultella*.

Le genre *Klebsiella* est connu par tous les médecins comme une cause de pneumonie communautaire, particulièrement chez les alcooliques chroniques (74). La plus grande majorité des infections à *Klebsiella* est associée à une hospitalisation. *Klebsiella spp* est avant tout un agent pathogène opportuniste retrouvé chez des patients immunodéprimés et des patients ayant des comorbidités comme le diabète ou la BPCO (2). On estime que *Klebsiella* est impliquée dans 8% des infections nosocomiales en Europe et aux Etats-Unis. Aucune variation géographique en terme de fréquence n'ayant pu être notée (2).
Klebsiella est un genre ubiquitiste et a pu être retrouvée dans l'eau, sur les plantes ainsi que les sols (9).

1. *Klebsiella pneumoniae sensu lato*

Parmi les espèces du genre *Klebsiella, K. pneumoniae* est considérée comme l'espèce la plus importante en bactériologie médicale causant de 75 % à 86 % d'infections à *Klebsiella spp.* (75). La mortalité des infections invasives est élevée, comprise entre 17,5% et 23% (38). Ceci s'explique comme nous l'avons vu par une diversité des facteurs de virulence.

K. pneumoniae est responsable d'une variété de pathologies tant chez l'homme que l'animal (39).

Historiquement, *K. pneumoniae* a été décrite comme l'agent de la pneumonie de Friedländer. Il s'agissait d'une forme hautement létale de pneumopathie communautaire lobaire sévère retrouvée chez des personnes saines (74). Il faut toutefois noter que des prélèvements post-mortem réalisés ont pu mettre en évidence la présence de pneumocoque (76). Cependant une série rétrospective de 1920 à 1960 aux Etats unis considérait *K. pneumoniae* comme une cause très importante de pneumonie communautaire. Son incidence à diminué, puisque dans les années 2000 on estime à moins de 1% des cas de pneumonie de ce type en Amérique du nord (77). Cependant *K. pneumoniae* reste encore une cause importante de pneumopathie dans certains pays incluant des pneumonies lobaires nécrosantes, des abcès pulmonaires, des pleurésies purulentes (77).

K. pneumoniae est un agent pathogène opportuniste prédominant dans le genre *Klebsiella* pour les infections nosocomiales responsable d'infections urinaire sur sonde, respiratoires et de bactériémies (2). Les infections nosocomiales sont causées par un grand nombre de souches diverses de *K. pneumoniae* renforçant l'idée qu'il s'agit plus d'une bactérie opportuniste que d'une bactérie pathogène spécifique, d'autant plus qu'elle affecte des patients débilités (39).

Dans les services de pédiatrie les infections nosocomiales à *K. pneumoniae* sont particulièrement retrouvées chez le prématuré ou dans les unités de soins intensives. Cette espèce est souvent imputée dans les sepsis néonataux (2)

Plus récemment, au milieu des années 80, des cas d'abcès hépatique avec bactériémie à *K. pneumoniae* ont été décrits avec une forte incidence en Asie, principalement à Taïwan. Il s'agit d'une description clinique typique, décrite comme un nouveau syndrome associé à *Klebsiella*. Cette forme clinique se complique parfois de méningite, d'abcès cérébral ,d'arthrite septique et d'endophtalmie (50). Il est important de noter que 70% de ces patients avaient un diabète de type 2 (77). Des cas similaires ont été rencontrés dans une moindre proportion dans les autres régions des globes. Des causes environnementales sont évoquées telles que la colonisation importante du tractus digestif chez des patients ayant cette pathologie (1).

Des cas de méningites sans abcès hépatique ont pu être décrits en Asie. Avec une proportion croissante des cas rapportés dans cette région du globe (8% en 1981 à 18 % durant les années 1987 à 1995). En comparaison, aux Etats-Unis seulement 1.2 % des cas de méningites sont documentés à *K. pneumoniae* (77).

De façon intéressante, il existe une analogie des pathologies retrouvée chez l'homme et l'animal pour *K. pneumoniae*. Ainsi des cas d'infections du tractus respiratoire et urinaire, ainsi que des cas de sepsis et d'abcès ont pu être décrits (78). Les cas des mastites chez les bovins sont bien connus des vétérinaires (9).

2. *Klebsiella pneumoniae subsp. ozaenae*

Celle-ci est responsable d'une rhinite chronique atrophique décrite sous le nom d'ozéne. Cette entité clinique est caractérisée par une atrophie de la muqueuse nasale pouvant aboutir à une ulcération chronique , se compliquant parfois d'une perforation du cartilage nasal et accompagné de rhinohrrées fétides et purulentes (79).
A côté des destructions osseuses habituellement constatées dans les cavités nasales, l'épaississement osseux des parois des sinus maxillaire et ethmoïdale a également été mis en évidence (79).

On pense actuellement que l'ozène a une origine multifactorielle comprenant une combinaison d'une prédisposition génétique et des facteurs environnementaux (80)
De fait, l'isolement fréquent de *K. pneumoniae subsp. ozaenae* chez ces patients confirme l'hypothèse de son pouvoir pathogène. Cependant il est difficile de l'attester puisque d'une part, celle-ci n'est pas systématiquement retrouvée et d'autre part, d'autres bactéries peuvent être retrouvées en culture telles que *Pseudomonas aeruginosa* ou *Proteus mirabilis* (81). L'expérimentation animale a toutefois pu mettre en évidence l'effet inhibiteur sur les battements ciliaires (ciliostase) de *K. ozaenae* ainsi que des autres bactéries retrouvées compromettant la clairance muco-ciliaire et conduisant à une infection persistante (82). Aussi *K. ozaenae* n'apparaît pas comme simple bactérie colonisante opportuniste mais plutôt comme un des agents infectieux des étiologies plurifactorielles de la rhinite chronique primaire (81).
K. ozaenae a été également isolée à partir de surinfections de bronchites chroniques, de bactériémies, d'otites, de mastoïdites et d'infections urinaires sur sondes. (83).

3. *Klebsiella pneumoniae subsp. rhinoscleromatis*

C'est l'Agent causal du rhinosclérome. Il s'agit d'une pathologie granulomateuse chronique rare qui possède un tropisme remarquable pour les voies aériennes supérieures. En effet les lésions se développent habituellement dans les fosses nasales justifiant le terme de rhinosclérome, mais peuvent également siéger sur l'ensemble du tractus respiratoire (pharynx, larynx, trachée, bronche) (84).

Les autres localisations sont rares, et sont appelées « sclérome » : il faut rechercher les atteintes du voile, du cavum, de l'oreille moyenne, des sinus, des glandes lacrymales, de l'épiglotte, du larynx et de l'arbre trachéo-bronchique (14).
Son évolution spontanée est lente, aboutissant à des lésions cicatricielles mutilantes et sténosantes (14).

Le sclérome est une affection endémique. Les régions tempérées subtropicales et tropicales sont les plus touchées (Afrique, Asie, Amérique du sud). Elle reste rare en France. Le milieu rural, la mauvaise hygiène, la promiscuité, la pauvreté et la malnutrition paraissent jouer un rôle dans le développement de cette affection ; les deux sexes sont touchés mais avec une prédilection féminine (85). La transmission se fait par contact direct et par les sécrétions nasales (13).

Le diagnostic positif doit être évoqué devant toute rhinite chronique croûteuse, résistant au traitement habituel, ainsi que devant toute lésion nasale pseudotumorale d'aspect atypique chez des malades originaires des zones d'endémie (79)(86).

Il repose sur la bactériologie et l'histologie (recherche de *Klebsiella rhinoscleromatis*) : cette recherche s'effectue dans les sécrétions nasales, dans les frottis de muqueuse pathologique, dans les tissus pathologiques par mise en culture d'un broyat de fragment prélevé par biopsie

L'examen histologique recherche des plages de cellules spumeuses de Mukulicz, contenant *Klebsiella rhinoscleromatis*. Cet aspect est pathognomonique de l'affection. Le prélèvement se réalise sur toute lésion bourgeonnante ou paraissant évolutive (14).

4. *Klebsiella variicola*

Cette espèce qui a été décrite en 2004, est retrouvée de façon abondante dans les plantes. Elle représenterait moins de 10% des isolats cliniques précédemment considérés

comme *K. pneumoniae* (87). Il est difficile de distinguer par des tests biochimiques *K. variicola* de *K.*
pneumoniae (9). En conséquence, l'importance clinique de *K. variicola* est probablement sous estimée puisque confondue. Ainsi seuls deux cas on pu être rapportés dans la littérature et attestés par une identification génotypique (38) dont un sepsis d'issue fatale chez un patient avec antécédent de cancer du sinus maxillaire et présentant une infection bactérienne de sinusienne (88).

L'autre cas clinique concerne une patiente âgée de 27 ans avec un contexte de lupus érythémateux systémique compliqué d'une atteinte rénale. Plusieurs séries d'hémocultures prélevées étaient positives à *K. variicola* (89).
Il semble y avoir une mortalité plus élevée chez les patients ayant une bactériémie avec des isolats appartenant à l'espèce *K. variicola*, bien qu'aucun facteur de virulence propre à cette espèce ne soit mis en évidence (38)(88).

Devant ce constat il y'a une nécessité importante de pouvoir développer des techniques d'identification de cette espèce au bénéfice du patient. La spectrométrie de masse pourra peut-être répondre à ce problème dans le futur (38).

5. *Klebsiella oxytoca*

Il s'agit d'une bactérie ubiquitaire dans l'environnement. Celle-ci est isolée de la peau, des selles, tant chez l'animal que chez l'homme (90). Ainsi *K. oxytoca* fait partie du microbiote intestinale et isolée en culture dans 8 à 10% des selles chez l'enfants et l'adulte sains (91).

Klebsiella oxytoca est la deuxième espèce la plus couramment rencontrée parmi le genre *Klebsiella* en pathologie humaine puisqu'on compte entre 13% et 25 % d'infections imputées à cette espèce (1).

Tout comme *K. pneumoniae* elle est considérée comme une bactérie pathogène opportuniste et retrouvée dans le cadre d'infections nosocomiales tant chez l'adulte que chez l'enfant , notamment dans les services de néonatalogie (92). Elle est impliquée dans les infections pulmonaires, infections urinaires sur sondes, bactériémies, arthrites septiques, infections hépatobilaires (92) .
Des cas d'empyème pleuraux ont été décrits (93).

De plus *K. oxytoca* est une étiologie à évoquer dans le cadre de colite hémorragique post-antibiotique (AntibioticAssociatedHemorragicColitis, AAHC) (90). Les signes cliniques typiquement associés sont les diarrhées hémorragiques survenant lors d'une antibiothérapie, des douleurs abdominales intenses. La coloscopie révèle la présence d'ulcération localisée au colon droit (94). Les signes cliniques se résorbent après l'arrêt de l'antibiothérapie (95).
Plusieurs arguments ont pu étayer son implication pathogénique dans les AAHC. Au cours de la phase aiguë on retrouve une prolifération colique rapide de *K. oxytoca*. La charge bactérienne isolée en coproculture étant significativement différente entre un patient présentant une AAHC d'un patient sain (94).
La production d'une toxine cytotoxique à pu être identifiée et semble être un facteur de virulence qui expliquerait en partie l'entéropathogénicité de cette espèce (95). Cependant une série de plus de 3500 patients avec une diarrhée en contexte nosocomial retrouvait des souches cytotoxinogènes, mais sans tableau de colite hémorragique associée (96).
Très récemment une étude génotypique a pu mettre en évidence une hétérogénicité des souches de *K. oxytoca* isolées chez un même patient suggérant un fond génétique commun entre les souches colonisantes digestives et entéropathogènes avec un possible transfert horizontal du gène de la toxine entre différents ST (séquence-type) (97).

6. *Klebsiella granulomatis*

Initialement connue comme *Donovania granulomatis* ou *Calymmatobacterium granulomatis.* Il existe des similitudes morphologiques et sérologiques entre *C. granulomatis* et *Klebsiella spp* ou *K. pneumoniae*. En 1999, l'analyse phylogénique effectuée par *Carter et al.* (gènes ARNr 16S et *phoE*) montra plus de 99 % de similitudes entre *C. granulomatis* et *K. pneumoniae* et *K. rhinoscleromatis* justifiant son reclassement dans le genre *Klebsiella* (98).

Néanmoins, une autre analyse phylogénique, effectuée par séquençage de gènes, ne montra qu'une similitude de 95% et 94 % respectivement entre *C. granulomatis* et le genre *Klebsiella*. Les auteurs conclurent que *C. granulomatis* est bien une espèce unique distincte des autres micro-organismes de la sous classe des protéobactéries (99).
En dépit de cela, des travaux récents ont renforcé la classification proposée par Carter et al : une étude de 2003 sur l'ARNr 16S a mis en exergue sa position phylogénétique très proche de *K. pneumoniae* (5).

Le réservoir de la bactérie est probablement digestif. Par ailleurs, celle-ci pourrait également coloniser la muqueuse vaginale (100).

La donovanose est présente en région intertropicale et dans certaines zones d'endémie telles que l'Inde, l'Australie, le Brésil et l'Afrique du sud (101).

Considérée comme une maladie sexuellement transmissible, elle entraîne des ulcérations génitales généralement indolores d'évolution chronique. La lésion initiale s'étend par contiguïté et auto-inoculation réalisant des lésions en feuille de livre (« *kissing lesion* » des Anglo-Saxons). Il n'y a pas d'adénopathie satellite, mais il peut exister un pseudobubon Celui-ci est la résultante de la diffusion sous-cutanée de l'infection dans les régions inguinales (102).

Les localisations extragénitales surviennent dans environ 6 % des cas de donovanose. Elles peuvent résulter d'une inoculation directe ou d'une dissémination à partir d'une lésion génitale. Les localisations orales sont les plus fréquentes des formes extragénitales (103).

De rares cas de formes septicémiques ont été décrits et surviennent de façon prédominante chez la femme (102).

En cas de suspicion clinique la confirmation du diagnostic est apportée par la mise en évidence de corps de Donovan dans les prélèvements biologiques (frottis, biopsie) (102).

C. Pouvoir pathogène des espèces du genre *Raoultella* :

Rappelons que les méthodes d'identification du genre *Raoultella* sont insuffisantes parmi les systémes commerciaux d'identification biochimique. Or les identifications données sur les publications concernant les *Raoultella* sont rarement mentionnées et quand elle le sont c'est l'utilisation de sytémes phénotypiques qui prédomine.

1. *Raoultella ornithinolytica*

R. ornthinolytica est une bactérie de l'environnement qui a été isolée à partir d'insectes, de poissons et d'eau saumâtre (104). Cette bactérie, ainsi que les espèces étroitement apparentées (*R. planticola*) a été démontrée comme agent causal d'une réaction anaphylactique (également connu sous le nom de **syndrome scombroïde**) liée à l'ingestion de poisson fortement chargé en histamine. La toxicité de l'histamine résulte de l'expression de l'enzyme histidine décarboxylase qui permet à la bactérie de convertir l'histidine en histamine qui s'accumule en grande quantité dans les muscles du poisson. Ce processus qui peut être contrôlé par une conservation à basse température des aliments (105).

Les symptômes sont retrouvés après l'ingestion de poisson et se manifestent par des bouffées de chaleur, prurit, céphalées et douleurs abdominales. La durée d'incubation varie de 1 minute à 3 heures et les symptômes se résolvent spontanément en quelques heures (105) (106)(107). *R. ornithinolytica* est une cause rare de gastro-entérite aiguë fébrile associée à une bactériémie. Ces signes cliniques peuvent être indiscernables de la fièvre typhoïde causée principalement par *Salmonella* Typhi. Ainsi *R. ornithinolytica* devrait être incluse dans son diagnostic différentiel (105). Un interrogatoire exhaustif du patient, comme la connaissance d'une consommation de poisson ou la notion de mauvaise conservation de l'aliment peut être utile dans le diagnostic nosologique de gastro-entérite aiguë fébrile bactériémique.

Sans être réducteur ou caricatural, la plupart des cas d'infections à *R. ornithinolytica* concerne des patients d'âge élevé, immunodéprimés et présentant de nombreuses comorbidités. Par ailleurs une pathologie néoplasique sous-jacente est souvent retrouvée, ce qui confirme son pouvoir pathogène essentiellement opportuniste (108).

Un cas d'infection cutané sur pied diabétique a été rapporté chez une patiente présentant de nombreuses comorbidités et présentant une plaie ulcéreuse du pied associé à un rash cutané (109). Les hémocultures et l'ECBU étaient négatives. Un prélèvement profond a permis de mettre en évidence *R. ornitinolytica* en présence en culture mono-microbienne. Un traitement par tigécycline avec une amélioration clinique (apyrexie, disparition du rash) suggère un lien de causalité entre l'infection, le rash cutané lié à la libération d'histamine et l'isolement de *R. ornithinolytica*.



Figure 5. (En haut) Éruption maculo-papuleuse du membre inférieur gauche. (En bas) Ulcère profond de la malléole latérale interne jusqu'au talon. D'après *Solak et al. Annals of Saoudi Medicine* 2011 (109).

Des cas de bactériémies ont été rapportés chez des patients présentant des affections malignes sous-jacentes (15 cas sur 16 soit 94%) dans une série rétrospective de dix ans au

Japon. Au total moins de 0.1% de l'ensemble des hémocultures étaient positives à *R. ornithinolytica,* renforçant le faible pouvoir pathogène supposé de cette espèce (110).
Les présentations cliniques étaient variées avec quatre angiocholites, trois sepsis chez des patients neutropéniques, et un cas de choc septique (110).
Le seul patient ne présentant pas d'atteinte maligne sous-jacente était en insuffisance rénale terminale et bénéficiait de dialyse péritonéale. Les pathologies néoplasiques étaient d'origine hématologique et hépatique.
Les auteurs ont pu conclure que les patients âgés avec des antécédents d'interventions biliaires, des infections du tractus biliaire ou ayant une pathologie néoplasique sous-jacente ont un risque élevé de présenter une bactériémie à *R. ornithinolytica* (110).

Une autre étude rétrospective nippone a permis de mettre en exergue des cas d'infections des voies biliaires chez des patients âgés, ayant bénéficié d'explorations biliaires, ayant une pathologie biliaire préexistante et ou atteints de cancers sous-jacents. Il semble que ces critères soient associés à un risque majeur d'infection à *R. ornithinolytica* (111).

Une série de quatre cas d'infections urinaires ont été rapportées au Brésil chez des patients souffrant de cancer (deux cas de cancer de vessie, un cas de cancer de l'utérus, un cas de mycosis fongoïde). Cependant la description de ce pathogène dans le cadre d'infection urinaire est peu habituelle même chez des patients ayant une pathologie néoplasique, renforçant son caractère opportuniste (112). Les facteurs de virulences impliqués dans les infections du tractus urinaire chez *R. ornithinolityca* ne sont probablement pas très distincts de ceux du genre *Klebsiella*. Aucun décès n'a été rapporté consécutivement à ces infections.

Un cas a été décrit à Hawaï chez une patiente d'origine japonaise âgé de 74 ans ayant pour antécédent un traitement par méthotrexate au long cours dans le cadre d'une arthrite rhumatoïde, avec la notion d'une pyélonéphrite à E.coli à BLSE (107).

Plus récemment un cas d'ostéomyélite postopératoire chez un patient de 62 ans a été publié (113).

Enfin, très récemment un cas de choc septique a pu être décrit au Brésil chez un patient ayant une leucémie aiguë lymphoblastique et bénéficiant d'une greffe de moelle (114). Les hémocultures isolaient toutes *R. ornithinolytica* (identification par spectrométrie de masse

et par galerie biochimique). Malgré une antibiothérapie à large spectre par imipénème, co-amoxiclav, tygécycline et secondairement ciprofloxacine, l'évolution était fatale.
L'antibiogramme rapporté dans la publication montrait une résistance aux β-lactamines y compris vis-à-vis des carbapénémes. Aucune exploration complémentaire n'a été faite concernant ce profil de résistance.

2. *Raoultella planticola*

Les infections décrites en pathologie humaine concernant *R. planticola* sont très rares. Il s'agit d'une bactérie de l'environnement retrouvée dans les milieux aquatiques, sols et plantes ne causant que très rarement des infections invasives (115).

Une étude dans un service de pédiatrie néonatale en Allemagne a été conduite sur une période d'un an sur des prélèvements de la flore oro-pharyngé et des coprocultures systématiques. Celle-ci a révélé qu'une grande majorité des isolats de *Klebsiella* se répartissaient entre *K. oxytoca* (72%) et *K. planticola* (8.7%). Le sérotype capsulaire majoritaire était de type K27. Cela suggère une colonisation respiratoire et digestive significative *à R. planticola* en néonatalogie (116).

Dans la littérature, 17 cas d'infections prouvées ont pu être imputés à cette espèce dont 3 infections ont été fatales (115).

a) Sepsis bactériémique :

Le premier cas d'infection documenté connu chez l'homme a été décrit en 1984 en France chez un patient présentant un sepsis et pris en charge en unité de soins intensifs (17). En 1986 deux autres cas ont été décrits. Il s'agissait d'un cas d'endocardite chez un homme de 69 ans documenté à streptocoque, traité par chirurgie cardiaque, compliqué neuf jours plus tard d'un sepsis. Les hémocultures documentaient une infection à *R. planticola* (anciennement *K. trevisani*) (17). Le deuxième cas concernait un patient pris en charge pour pontage coronarien et présentant une pneumopathie documentée à *R. planticola* par les hémocultures et quatre prélèvements respiratoires (10).

b) Concernant les infections cutanées et des parties molles :

Un cas d'infection des tissus mous chez un patients de 11 ans a pu être mis en évidence (117). Une fasciite nécrosante de la poitrine et de l'abdomen consécutif à un

traumatisme (chute sur poubelle métallique) a été publié chez un patient de 66 ans avec pour antécédents une pathologie cardiovasculaire et un diabète de type 2 contrôlé. Les hémocultures et les prélèvements nécrotiques étaient tous positifs à *R. planticola* (identification par ARNr 16 S) (118) (Figure 7).

Les fasciites nécrosantes sont habituellement causées par des streptocoques bêta hémolytiques ou une flore mixte anaérobie-aérobie. Cependant de très rares cas de fasciite impliquant une espèce environnementale ont été décrits.

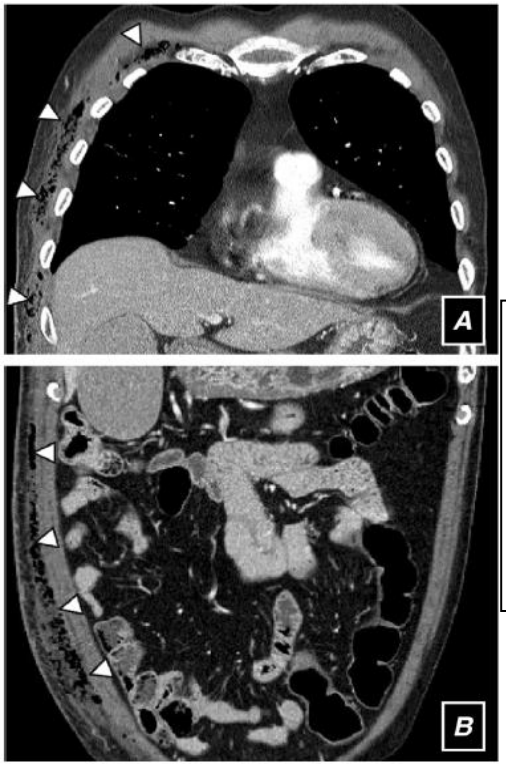


Figure 6. D'après Si-Hyun Kim et al. BMC Infect Dis 2012 (118)

TDM thoraco (A) abdomino-pelviens (B) montrant : un œdème des tissus mous, une infiltration de la graisse au contact de l'aponévrose, un épaississement musculaire.Ainsi que la présence de gaz sur la face antérolatérale thoracique et la paroi abdominale (fléches)

c) Infections urinaires :

Un cas d'infection urinaire (cystite) a été décrit en 2013 (15).

d) Infections abdominales :

En 2007 des auteurs ont pu mettre en évidence un cas de pancréatite aigüe, associé à un abcès rétro-péritonéal, avec *R. planticola* isolées à deux reprises de liquide péritonéal (119).

Plusieurs cas de cholécystites avec sepsis ont été rapportés chez des patients immunodéprimés et ayant subi une intervention procédurale avec cholangio-pancréatographie rétrograde endoscopique (CPRE) (115)(120).

Un cas de gastro-entérite avec bactériémie à *R. planticola* a pu être publié chez un patient de 63 ans ayant consommé du poisson (sole) probablement mal cuit. Le jour même de la consommation du poisson, le patient a manifesté des troubles digestifs à type de douleurs abdominales avec diarrhées suggérant un lien direct avec la bactérie isolée. Ce patient n'a cependant pas présenté de syndrome scombroïde comme précédemment décrit (121). La fréquence de ce type d'infection peut être sous-estimée compte tenu de la difficulté à isoler en culture cette bactérie parmi les autres *Enterobacteriaceae* ce qui peut porter à confusion. Il est donc important de prêter une attention toute particulière à cette bactérie dans le cadre de diarrhée et fièvre, notamment après la consommation de poisson afin de préciser la réalité d'un pouvoir entéropathogène authentique.

References	Clinical manifestation	Age	Treatment	Outcome
Freney J et al. (1984)[5]	Septicemia	47/male	Cefotaxim, tobramycin	Recovered
Freney J et al. (1986)[6]	Bacteremia	57/male	Ceftriaxon	Recovered
Freney J et al. (1986)[6]	Septicemia	69/male	Ceftriaxon, tobramycin	Recovered
Alves MS et al. (2007)[8]	Pancreatitis	45/male	Imipenem, amikacin	Recovered
Mariana C et al. (2009)[9]	Pneumonia	83/female	Carbapenem	Died
Mariana C et al. (2009)[9]	Leukemia	64/male	Imipenem/doxycycline	Died
Wolcott R et al. (2010)[10]	Surgical site/fracture	66/male	Ertapenem	Recovered
O' Connell K et al. (2010)[11]	Soft tissue infection	30/male	Ciprofloxacin	Recovered
Teo I et al. (2012)[12]	Cholecystitis	62/female	Co-amoxiclav	Recovered
Kim Si K et al. (2012)[13]	Necrotizing fasciitis	66 /male	Ceftriaxon, levofloxacin, tigecycline	Recovered
Kazuhisa Y et al. (2012) [14]	Cholangitis/septic shock/cancer	65/male	Pipracillin-tazobactam	Recovered
Jae H et al. (2012)[15]	Cholangitis/cancer	75/male	Cefotaxime, metronidazole	Died
Amy Y.H et al. (2012) [16]	Bacteremia	59/male	Pipracillin-tazobactam	Recovered
Olson DS Jr, et al. (2013)[17]	Urinary tract infection	89/male	Ciprofloxacin	Recovered
Puerta S et al. (2013) [18]	Bacteremia/gastroenteritis	63/male	Cefotaxime	Recovered
Current report	Central venous line exit site infection	15 months/female	Ampicillin, gentamicin, metronidazole	Recovered

Figure 7. Revue de la littérature des infections documentées à *R. planticola* d'après Ershadi A et al **(115)**

Une étude a comparé la présence des facteurs de virulence connus chez *K. pneumoniae* aux souches cliniques de *R. planticola* afin de préciser son pouvoir pathogène (122).

Les sérotypes capsulaires prédominant chez *R. planticola* étaient K14, K2 et K70 pour respectivement 13% , 8.7%, 8.7% des 92 isolats cliniques isolées (122). Concernant *K. pneumoniae* le sérotype capsulaire prédominant est le K2, réputé plus virulent avec le K1 (123) .

Par ailleurs, en ce qui concerne les autres facteurs de virulence (pili type I et III, entérobactine) les isolats cliniques de *R. planticola* étaient très similaires aux souches cliniques de *K. pneumoniae* (Figure 9) (122).

Cette étude a permis de mettre en lumière les capacités de pathogénicité potentielles de *R. planticola* et tend à comparer cette espèce à *K. pneumoniae* du point de vue de la virulence (122) .

Property	Number of isolates (%) positive	
	K. planticola (n = 92)	K. pneumoniae (n = 207)
MSHA	76 (83)	177 (86)
MR/K-HA	63 (69)	145 (70)
No haemagglutination	4 (4.3)	9 (4.3)
Serum resistance*	28 (30.4)	52 (25.1)
Enterobactin production	92 (100)	205 (99)
Aerobactin production	2 (2.2)	11 (5.3)

*Grades 5 or 6.

Figure 8.
Distribution des facteurs de virulence pour *R. planticola* et *K. pneumoniae*
MSHA: *pili* type I
MR/K-HA: *pili* type III
AEROBACTINE : sidérophore

D'après R Podschun et al. J. Med. Microbiol 2000

Devant les données de la littérature il apparait évident que *R. planticola* est une bactérie pathogène opportuniste émergente. Celle-ci est capable de provoquer des infections significatives chez des hôtes différents et dans des organes différents. Au vu des connaissances actuelles quatre scénarios possibles d'infections ont pu être dégagés (115) :

1- Infection consécutive à un traumatisme avec contamination hydrique/tellurique
2- Infection nosocomiale
3- Infection chez l'immunodéprimé
4- Diarrhée et bactériémie chez l'immunocompétent

3. *Raoultella terrigena*

Bien qu'occasionnellement retrouvée chez l'homme la signification clinique de cette espèce reste incertaine. Le taux d'isolement reste très bas, renforçant l'idée d'un faible pouvoir pathogène de cette espèce. En effet cette bactérie initialement décrite en 1981 anciennement nommé *K. terrigena* a été isolée de l'eau et du sol (9)(124). En 1991 *R. terrigena* a pu être isolée dans 0.9% des coprocultures pour 5377 échantillons de fèces d'humains sans pathologie notoire. En 1992 un travail de la même équipe réalisé sur 2355 isolats cliniques positif à *Klebsiella* (pour la plupart respiratoire) a pu retrouver 10 isolats de

R. terrigena (isolé d'urine, de plaies, de prélèvement bronchopulmonaire) soit 0.4% des prélèvements (116). Cependant s'agissant de prélèvements polymicrobiens son rôle pathogénique restait flou.

Deux cas ont été publiés à ce jour d'infection monomicrobienne à *R. terrigena* suggérant une pathogénicité opportuniste élective de cet organisme.

La première infection clinique a été signalée en 2007 chez un homme de 47 ans après une transplantation hépatique. Celui-ci a développé un sepsis, une pneumopathie et une endocardite à *R. terrigena* produisant une β-lactamase à spectre étendu (BLSE). Les prélèvements respiratoires et valves cardiaques étaient positifs à *R. terrigena* et à Staphyloccoque à coagulase négative multi-résistant. Le patient étant probablement colonisé à *R. terrigena* BLSE avant la transplantation expliquant l'inefficacité de la ticarcilline-tazobactam en prophylaxie (125).

Le deuxième cas concerne un patient de 69 ans ayant bénéficié d'une pancrético-duodénectomie pour un cancer pancréatique compliqué d'un sepsis avec développement d'une collection profonde intra-abdominale ponctionné et drainé (culture polymicrobienne), les hémocultures étaient toutefois positives à *R. terrigena* ainsi que les cultures de liquide de drains (126).

D. Diagnostique bactériologique :

1. Identification phénotypique :

a) Caractère d'identification commun du genre *Klebsiella* :

Il s'agit d'un bacille à Gram négatif de 0.3-1.0 x 0.6-6.0 μm, disposé isolément, par paires ou en courtes chaines, souvent capsulé. La bactérie est immobile (à l'exception de *K. mobilis*). Son métabolisme est aérobie-anaérobie facultatif. Comme toutes les entérobactéries l'activtié catalase est positive, au contraire de l'activité cytochrome-oxydase. Le test de Voges-Proskauer étant habituellement positif tandis que l'indole et l'uréase sont variables. Il n'y a habituellement pas de croissance bactérienne à 10°C pour ce genre.

Le genre *Klebsiella* n'est pas particulièrement exigeant en facteurs de croissance ni ne nécessite de milieu spécifique (9). L'aspect des cultures est en général très florissant : colonies grasses de 3 à 4 mm de diamètre en 24 à 48h (11).

b) Caractères d'identification à l'espèce chez *Klebsiella* et *Raoultella* :

Les caractères biochimiques majeurs utilisés pour la discrimination des espèces sont donnés sur le tableau ci-dessous (Tableau 1).

Test	*K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*	*K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*	*K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*	*K. oxytoca*	*K. planticola**	*K. terrigena*	*K. ornithinolytica*
Growth at 10 °C	−	−	−	+	+	+	+
Indole	−	−	−	+	+	−	+
Ornithine decarboxylase	D	−	−	−	−	−	+
Voges–Proskauer reaction	+	−	−	+	+	+	D
Utilization of the following as a carbon source:							
4-Aminobutyrate	+	−	−	+	+	−	+
Benzoate	−	−	−	+	+	+	−
m-Coumarate	+	−	−	+	+	−	+
Dulcitol	−	−	−	+	−	−	−
L-Fucose	−	+	+	+	+	+	+
D-Glucosamine	+	−	+	+	+	+	−
3-*O*-Methyl-D-glucose	−	−	−	−	+	+	+
Histamine	−	−	−	−	+	+	−
5-Ketogluconate	−	−	−	+	+	+	−
D-Melezitose	−	−	−	+	+	+	−
Palatinose	+	−	−	+	+	+	+
Phenylacetate	−	−	−	+	+	+	−
Putrescine	−	−	−	+	+	+	−
Quinate	+	−	−	+	+	+	−
L-Rhamnose	−	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	−	−	−	+	+	+	+
D-Tagatose	−	−	−		−	−	−
L-Tartrate	−	+	+	+	−	−	−
Meso-Tartrate	−	−	+	+	+	+	+
D-Turanose	−	+	−	−	+	+	−

* Including *K. trevisanii* isolate.

Tableau 1. Caractéristiques phénotypiques de différentiation des espèces du genre Klebsiella.
D'après M. Drancourt et al. IJSEM 2001

L'identification correcte des espèces chez *Klebsiella* et *Raoultella* n'est pas chose aisée en laboratoire de microbiologie, puisque les espèces partagent entre elles de nombreux caractères communs. Ainsi les systèmes d'identification biochimique dont les systèmes automatisés, avec des tests d'identifications plus ou moins nombreux proposent des performances d'identifications qui semblent acceptables mais non optimales concernant le genre *Raoultella* (111). En effet ces systèmes d'identifications (VITEK 2, MicroScan, API-20E) ont été évalués comparativement au séquençage génique et ont montré la nécessité de

test additionnel pour la distinction notamment de *R. ornithinolytica* ODC négative et *K. oxytoca* (127).

Les systèmes d'identifications conventionnels ne semblent pas manifester de problème pour l'identification des sous-espèces de *K. pneumoniae*. Il semble cependant que des isolats ont pu être mal identifiés puisqu'il s'agissait réstropectivement de *R. planticola* ou *R. terrigena* (128) .
K. variicola se distingue par sa croissance à 10°C, un test de Voges-Prokauer positif, la fermentation du L-sorbose, et l'absence de production d'indole. Peu d'isolats de cette espèce ont été identifiés jusqu'à présent (87).

L'espèce *K. oxytoca* est phénotypiquement caractérisée par la positivité des tests indole et gélatinase dans 80% des cas (129).

Le genre *Raoultella* possède les caractères du genre *Klesbiella* mais elle se distingue de celle-ci : par sa température de croissance à 10°C (bien que certains isolats de *K. oxytoca* puisse croitre à 10°C°), le test de Voges-Proskauer étant toujours positif. Ces bactéries sont isolées de l'environnement (eau, sol, plantes).
Il a été proposé notamment pour différencier le genre *Raoultella* de *Klebsiella* de tester l'histamine puisque les espèces du genre *Klebsiella* n'en produisent pas (106).

L'identification de *R. planticola* et *R. terrigena* est rendue difficile par le fait que ces deux espèces ne sont pas codées dans le thésaurus de certaines galeries d'identification, et sont alors confondues avec *K. pneumoniae* et *K. oxytoca* (3). En effet des isolats cliniques identifiés comme *R. planticola* ont montré une production d'indole comme *K. oxytoca* (130).

L'identification de *R. planticola* repose sur la croissance à 10 ° de cette espèce et l'étude de la production d'indole variable, de l'ODC négative et de l'assimilation de quatre sources carbonées dont l'éthanolamine, le D-mélézitose, l'histamine, dl-3-hydroxybutyrate (3). Ces mêmes tests permettent l'identification de *R. terrigena* (indole et ODC négative). La limitation de ce système tient aux quatre tests supplémentaires non utilisés en routine pour l'identification des isolats d'entérobactéries que les auteurs ont proposés (3). D'autres auteurs ont proposé de réduire à 3 tests supplémentaires dont l'histamine, la croissance à 10°C et l'assimilation de D-mélézitose (4) (Tableau 2).

Raoultella ornithinolytica se distingue de *R. planticola* et de *K. oxytoca* par un test positif pour l'ornithine-décarboxylase (ODC). Cependant une étude a démontré que des souches d'origine animale identifiées comme *R. ornithinolytica* par séquençage génique (ARNr 16S, *rpoB*) étaient dépourvues d'activité ODC. Ce qui complexifie la distinction des souches de *K. oxytoca* de *R. ornithinolitica* et *R. planticola*. Une analyse moléculaire suggère la présence d'une copie du gène codant l'ODC pour les souches de *R. planticola* et *R. ornithinolytica* ODC négatives et deux copies pour les souches de *R ornithinolytica* ODC positives (131). Notons que certaines souches de *K. pneumoniae* peuvent être ODC positives. Cela pose un réel problème pour l'analyse des données épidémiologiques disponibles pour cette espèce.

Bacterial species[a]	Test result[b]				
	Indole	Growth at 10°C	Histamine	D-melezitose	Ornithine
K. pneumoniae/ *K. variicola*	−	−	−	−	−
K. oxytoca	+	+	−	+/−	−
R. planticola	+/−	+	+	−	−
R. terrigena	−	+	+	+	−
R. ornithinolytica	−	+	+	−	+

Tableau 2. Tests proposés pour la différenciation du genre *Klebsiella* et *Raoultella*. D'après Alves et al. JCM 2006.

2. Identification génotypique :

L'identification des espèces des genres *Klebsiella* et *Raoultella* peut maintenant se faire de manière fiable à partir du séquençage des gènes de ménage (petit nombre de gène ayant des fonctions essentielles à la cellule) tels que *gyrA* et *parC* (31) ou *rpoB* (8). L'utilisation du seul ARNr 16S, partiel ou complet, avec un pourcentage d'homologie significative aux séquences de références ≥ 99% semble insuffisant pour une discrimination des espèces les plus récemment décrites (36) (37).

3. Identification moléculaire par analyse spectrométrique des protéines totales :

Les laboratoires de microbiologie sont actuellement en pleine mutation grâce à l'utilisation de la spectrométrie de masse de type MALDI-ToF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight*). L'obtention d'un spectre caractéristique ou « empreinte spectrale » d'une espèce donnée est à la base de l'utilisation de la spectrométrie de masse pour l'identification microbienne, et cette technique constitue une véritable révolution

au sein des laboratoires de microbiologie clinique. En quelques années, la spectrométrie de masse s'est développée dans le but d'obtenir des spectres de masses reproductibles, permettant d'identifier les isolats au niveau de la famille, du genre, de l'espèce, et parfois de la sous-espèce (132).

Cette technique à l'avantage d'être peu coûteuse et rapide. Elle repose sur l'ionisation par laser des protéines des bactéries préalablement co-cristallisées dans une matrice d'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique, les différents produits d'ionisation étant ensuite détectés en fonction de leur temps de vol dans un champ électrique. On obtient ainsi un spectre spécifique des composants cellulaires, majoritairement des protéines ribosomales, qui est alors comparé à une base de données spectrales de référence (6). La ressemblance avec les spectres de la base est évaluée informatiquement, ce qui permet de stratifier la qualité de l'identification bactérienne. Ainsi, dans le système que nous utilisons (spectromètre de masse Microflex, logiciel d'analyse spectrale BioTyper, Brüker Daltonics, France) (133), les résultats sont exprimés en log score allant de 0 à 3 correspondant à une similitude avec les spectres de la base de données allant de 0 à 100 %. Le calcul de ce score tient compte de la concordance des pics (même rapport m/z) et de la corrélation d'intensité entre les pics similaires. Selon les recommandations du fabricant, trois niveaux d'identification sont établis :

•un log score inférieur à 1,7 correspond à une absence d'identification fiable

•un log score compris entre 1,7 et 2 correspond à une identification fiable au niveau du genre

•un log score supérieur ou égal à 2 correspond à une identification fiable au niveau de l'espèce

L'identification des espèces du genre *Raoultella* par MALDI-ToF est problématiques car les spectres de références pour *R. planticola* et *R. ornitinolytica* sont très similaires et ressemblent à ceux de *K. oxcytoca* (134). Une grande différence entre le meilleur score et le deuxième meilleur score de la base de données permet une bonne discrimination entre les espèces et certains auteurs indiquent qu'une différence de 10% des valeurs de log-score est requise pour l'identification correcte des bactéries à Gram négatif (135).

L'application de cette règle aisée et rapide a été proposée dans une publication pour différencier *R. planticola* et *R. ornithinolytica* de *K. oxytoca.* Ainsi lorsqu'un écart supérieur et égal à 10% était retrouvé, l'identification était valide. Si l'écart était inférieur à 10 % l'identification était rejetée. Cette méthode s'est révélée être supérieure à la méthode

d'identification par galerie API 20E. Cependant cette règle est rarement utilisable car le nombre d'isolats cliniques du genre *Raoultella* est limité et les critères rarement retrouvés. Par ailleurs la technique de l'analyse des séquences par l'ARN 16 S s'est révélée bien plus performante (134). Notons que les auteurs on utilisé l'ARNr 16S comme gold standard pour l'identification de *R. ornithynolitica* et *K. oxytoca*. Or comme nous avons pu le voir celui-ci n'a pas un pouvoir discriminant assez fort pour la discrimination de ces deux espèces proches.

E. Sensibilité aux anti infectieux des Raoultella :

Les isolats cliniques de *Raoultella* et *Klebsiella* sont généralement confondus rendant la caractérisation de résistance aux antibiotiques ardue. Ainsi les données de la littérature concernant ce nouveau genre sont encore peu nombreuses.

Les espèces du genre *Raoultella* sont généralement sensibles vis-à-vis des antibiotiques ayant une efficacité contre les bactéries à Gram négatif couramment usités en thérapeutique : β-lactamines, aminosides ; fluoroquinolones ; tigécycline, doxycycline ; cotrimoxazole ,colistine (11)(107)(108)(110).

Vis-à-vis des β-lactamines ce genre possède comme *Klebsiella* une pénicillinase ou β-lactamase chromosomique de classe A (porté par le gène blaTEM-1) lui conférant une résistance vis-à-vis des aminopénicllines et carboxypénicillines mais avec restauration de leurs activités quand l'acide clavulanique est ajouté à ces molécules (136).
L'étude de la β-lactamase de classe A des *Raoultella* a permis d'en caractériser deux nouvelles : il s'agit respectivement de PLA-1 pour *R. ornithinolytica* et ORN-1 pour *R. planticola* avec 94% d'homologie.
L'analyse de la séquence pourrait suggérer d'un transfert de gène horizontal issu d'un ancêtre commun. Fait intéressant la région chromosomique portant le gène *bla* était plus proche de *K. oxytoca* que de *K. pneumoniae* (136).

La caractérisation du gène de la β-lactamase chez *R. terrigena* (TER-1) a pu être effectuée montrant 78% d'identité pour PLA -1 et ORN-1, 69.9% pour TEM-1 et 38.7% pour l'enzyme KOX de *K. oxytoca* (137).

Concernant les céphalosporines les isolats testés ont montré une bonne activité. Cependant la possibilité d'une sensibilité intermédiaire à la céfalotine et à la céfoxitine a été documentée (110) (108).

Un cas de *R. terrigena* avec un phénotype de BLSE est rapporté sans caractérisation de l'enzyme (125).

Deux souches de *R. planticola* et une souche de *R. ornithinolytica* ayant acquis des gènes portant la résistance aux carbapénèmes ont pu être décrits en 2007 et 2008.
Ces souches provenaient de trois patients hospitalisés aux Etats Unis (New Jersey et Ohio) ayant tous reçu de nombreux antibiotiques dont des carbapénèmes. Toutes les souches abritaient blaTEM-1 mais hébergeaient aussi le gène blaKPC-2 et blaKPC-3 (138).
Plus récemment en 2014 un cas de pneumonie nosocomiale à *R. planticola* et résistant au carbapénèmes a été décrit. Cette souche hébergeait le gène *bla*KPC-2 (6).

Concernant les fluoroquinolones aucune résistance n'a été rapportée à ce jour (108).

SECONDE PARTIE : Etude expérimentale

I. Objectif de l'étude

L'identification des espèces du genre *Raoultella* dans un laboratoire de bactériologie médicale n'est pas aisée. Le séquençage n'est pas actuellement une technique utilisable en routine puisque fastidieuse et encore onéreuse.

De nombreux auteurs ont ainsi proposé des algorithmes d'identifications phénotypiques et biochimiques pour la discrimination des genres *Klebsiella* et *Raoultella* avec des performances variables. Mais aucune des techniques n'est convaincante.

Cependant avec l'arrivée de la spectrométrie de masse le système d'identification par galerie est progressivement abandonné. Une étude a proposé une règle d'identification par spectrométrie de masse qui ne permet malheureusement pas une bonne identification de tous les isolats cliniques.

Nos objectifs étaient les suivants : -i) comparer les données du séquençage multigénique (gènes *gyrB* et *rpoB*) à l'identification par spectrométrie de masse de type MALDI-ToF pour les isolats cliniques de *Raoultella spp.* -ii) construction d'une base utilisateur de spectres de référence dans notre laboratoire permettant une identification robuste des *Raoultella*.

II. Matériels et méthodes

A. Bactéries et conditions de culture :

Un total de trente souches d'isolats cliniques a été collecté pendant 18 mois (février 2014 à juillet 2015) au CHU d'Amiens. Il s'agissait de souches identifiées par spectrométrie de masse MALDI-ToF comme *R. ornithinolytica* (discriminée ou non de *R. planticola* ou *K. oxytoca*). Aucun de nos isolats n'a été identifié comme R. terrigena. Par ailleurs nous avons intégré une souche (n°027) provenant d'un contrôle externe de qualité identifié comme *Raoultella ornithinolytica* servant de contrôle positif et une souche identifiée comme *K. pneumoniae* (n°022) comme contrôle négatif. Deux isolats ont été exclus de l'étude puisque les cultures se sont révélées être contaminées.

Les souches étaient conservées en tube gélosé (milieu de Le Minor) puis cultivé sur gélose lactosé au BCP (pourpre de bromocrésol) incubé entre 18 et 24h à 37°C.

B. Identification par spectrométrie de masse :

1. Procédure :

Les spectres de masse ont été obtenus à l'aide du spectromètre Microflex (Brüker Daltonics, France) et analysés par le logiciel IVD MALDI-Biotyper version 2.2. Pour chaque souche, une colonie était déposée et brièvement séchée sur une plaque en acier réutilisable de 96 puits. Chaque dépôt était recouvert de 1,1 Ml de matrice (acide α-cyano-4-hydroxycinnamique). Cinq dépôts par souche ont été effectués avec trois passages successifs de la plaque permettant l'acquisition de quinze spectres.

2. Critères de validation :

Nous avons conservé la valeur-seuil de score (≥ 2,0) recommandée par le fournisseur pour valider l'identification à l'espèce, mais l'expérience acquise nous fait proposer des critères supplémentaires avec deux niveaux d'interprétations :

- **Identification certaine** : score de la meilleure identification ≥ 2,0 et écart avec le score de l'identification de l'espèce suivante ≥ 0,20.

- **Discrimination insuffisante** : score de la meilleure identification ≥ 2,0 mais écart avec le score de l'identification de l'espèce suivante < 0,20.

Seuls les résultats obtenus pour les deux premiers dépôts étaient pris en compte pour l'identification retenue, avec une reproductibilité inter-dépôt pour valider une identification certaine.

3. Dendrogrammes :

Pour construire les dendrogrammes de similitude spectrale, nous avons inclus –i) des spectres représentatifs des différentes espèces (souche-type comprise), sélectionnés parmi l'ensemble des spectres de référence de la base de donnée du fabricant, -ii) les spectres de référence

construits dans la base utilisateur pour nos isolats cliniques à partir des quinze spectres acquis. Les dendrogrammes ont été construits à l'aide du logicile Maldi-Biotyper 3.

C. Etude de l'activité ornithine décarboxylase :

L'activité ornithine décarboxylase des souches a été explorée par galerie biochimique (API 20^{E}, Biomérieux, Marcy l'Etoile). Brièvement, il s'agit d'un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés (cas de l'ODC) ou révélés par l'addition de réactifs. Un isolat d'*Escherichia coli* a été utilisé comme contrôle positif pour l'ODC et l'indole (140).

D. Identification par séquençage génétique :

1. Extraction des acides nucléiques :

L'ADN bactérien a été extrait à partir de deux techniques, en effet certains extraits ne contenaient pas une concentration d'acide nucléique significative (quantification par NanoDrop™, Thermo Scientific Instruments).

a) Thermolysat manuel :

A partir de suspensions bactériennes dans 200 µL d'eau distillée par une série de deux chocs thermiques, alternant entre bain sec à 95°C pendant 10 minutes et congélation à -80°C pendant 15 minutes. Après centrifugation 1 min à 11 000 g, 150 µL de surnageant du thermolysat étaient stockés à -20°C avant utilisation.

b) Extraction automatisée :

Les extraits d'ADN total sont préparés à partir d'une culture sur gélose lactosé au BCP incubé 18-24h à 37°C en aérobiose. Une suspension standardisée à 0,2 MacFarland est réalisée dans des ampoules de 2 Ml de NaCl à 0,85%. L'extraction de l'ADN total bactérien est réalisée par l'extracteur NucliSENS EasyMAG (Biomerieux™) selon les

recommandations du fournisseur. On obtient un éluat d'extrait d'ADN d'environ 50Ml qui est conservé au congélateur à -20°C.

2. Amplification des gènes cibles *gyrB, rpoB, speF :*

Des fragments internes de respectivement 512 paires de bases (pb) pour rpoB, 970 pb pour le gène gyrB et 672 pb pour *speF* (codant pour le gène de l'ODC) ont été amplifiés à l'aide des amorces décrites par Drancourt *et al*. (8) , Dauga *et al*. (141) et Walckenaer *et a.l* (131) (Tableau 3).

Tableau 3. Amorces utilisées dans l'étude.

Gène cible	Amorce (séquence)	Taille du fragment (Pb)	cible	Référence
gyrB	01-F (5'-TAARTTYGAYGAYAACTCYTAYAAAGT-3') 02-R (5'-CMCCYTCCACCARGTAMAGTT-3')	970	**sous unité β ADN Gyrase**	Dauga et al. 2002
rpoB	CM7-F (5'-AACCAGTTCCGCGTTGGCCTGG-3') CM 31b-R (5'-CCTGAACAACACGCTCGGA- 3')	512	**sous unité β ARN polymérase**	Drancout et al. 2001
speF	F1g (5'-CGGCGATCTGCTCTG ACGTTGCAT-3') F1d (5'-TGCATCATAAAGGCGTTGTTCA-3')	672	**ODC**	Walckenaer et al. 2008

0.5 Ml des couples d'amorces (sens et antisens) dilués à 0,2 Mm ajoutés à 12.5 Ml de Master Mix 2X (biotechrabbit), 9 Ml d'eau et de 2.5 Ml d'extrait d'ADN pour un volume final à 25 Ml.

Le programme de la réaction d'amplification effectuée dans le thermocycleur était variable selon le gène à amplifier (Tableau 4).

Tableau 4. Programme d'amplification des gènes utilisés dans l'étude

Gène	Activation	Dénaturation	Hybridation	Elongation	Extension final
gyrB	94°C – 5min	94°C – 30sec	50°C – 45sec	72°C – 60 sec	72°C – 5 min
rpoB			55°C – 20sec		
speF			60°C -30sec		
Nb de cycles	1	30			1

3. Vérification de l'amplification et purification :

Afin de s'assurer de la qualité des produits d'amplifications ou amplicons, nous avons réalisé une électrophorèse en gel à 1% d'agarose. La migration s'est réalisée sous un champ magnétique réglé à 75 V pendant 45 minutes dans un tampon tris-EDTA. Un marqueur de poids moléculaire SmartLadder MW-1700-10 (Eurogentec™) est déposé à chaque extrémité du gel pour estimer la taille des fragments amplifiés et séparés. Les bandes sont révélées par un marqueur fluorescent GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain a l'aide d'un transilluminateur.

Les produits d'anplifications ont été ensuite purifiés par le réactif l'ExoSAP-IT®PCR Product Cleanup selon les recommandantions du fabricant.

4. Séquençage des gènes :

La réaction d'amplification préalable au séquençage a été réalisée a l'aide du BigDye®terminator (v3.1 Cycle sequencing, Applied Biosystems™) Le mix contient 4 Ml de « Mix RR 100 » (contenant les nucléotides marqués), 2 Ml de tampon 5X, 3.2 Ml d'amorces (Foward et Reverse) concentrées a 1 Mm précédemment citées, 10 µl d'eau et 0.8 Ml de produit de PCR.

Le programme de la PCR de marquage effectué dans un thermocycleur comprend une étape de dénaturation initiale d'1 minute puis 25 cycles alternant une étape de dénaturation a 96°C pendant 10 secondes, une étape d'hybridation a 50°C pendant 5 secondes et une étape d'élongation a 60°C pendant 4 minutes. Les produits de séquençage sont ensuite purifiés à l'aide du kit de purification BigDyeR Xterminator™. La migration était réalisée sur le séquenceur 3500xl DX Genetic Analyzer (Applied Biosystem®).

5. Analyse des séquences :

Toutes les séquences obtenues ont été en première intention comparées aux bases de séquences *Bacteria gyrB stringent* et *bacteria rpob stringent* du logiciel en ligne LeBibi v.5 (*Bio Informatic Bacteria Identification https ://umr5558-bibiserv.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi*,) (142). L'analyse des séquences du gène *speF* a été effectuée par le programme de comparaison de séquence en ligne *Nucleotide BLAST* (BLAST®) avec la base de données nucléotidique de GenBank® (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of

Medicine). Des arbres phylogénétiques on été construits à partir des séquences souches de références (souches-types ou souches caractérisées génétiquement, Tableau 5). Puis en incluant les séquences des isolats cliniques, à l'aide du *pipeline* de bio-informatique en ligne phylogeny.fr (143) , utilisant le logiciel d'alignement ClustalW avec retrait des positions incomplètes, une phylogénie inférée selon la méthode du *neighbour-joining* (valeurs de *bootstrap* calculées pour 1000 répétitions) et construction des dendrogrammes par le logiciel *TreeDyn* (144) (145)(146)(147). Un arbre phylogénétique à été construit après avoir concaténé (association bout à bout) les fragments amplifiés des gènes *rpoB* et *gyrB.*

Tableau 5. Séquences utilisées pour les analyses phylogénétiques

		N° accession GenBank®		
Espèce	**Souche**	***rpoB***	***gyrB***	***speF***
K. pneumoniae	**CIP 82.91^{T}**		AJ300550	
	ATCC 13883	DQ673324	DQ673328	
K. quasipneumoniae subsp. quasipneumoniae	**01A030^{T}**	HG933775	NZ_CBZR010000003*	
K. quasipneumoniae subsp. Similipneumoniae	**07A044^{T}**	HG933774	NZ_CBZR010000026*	
K. pneumoniae subsp. rhinoscleromatis	ATCC 13884			NZ_ACZD00000000*
K. variicola	DSM 15968		CP010523*	
	F2R9	AY367356		
K. michiganensis	**W14 ^{T}**	JQ269337	JQ284304	
K. oxytoca	**LMG 3055 ^{T}**		JX425093	
	ATCC 13182 ^{T}	AY367363		
	JKo3			AP014951*
K/R. ornithinolytica	**ATCC 31898 ^{T}**	AF129447		DQ251484
	strain 811		NZ_JURX01000150*	
	S12		NZ_CP010557*	
	B6	CP004142		CP004142
K. trevisanii	**ATCC 33558^{T}**	AF129450		
K/R. planticola	LMG 7870		JX425101	
	ATCC 33531^{T}	AF129449	NZ_JMPP01000014*	DQ251481
K/R. terrigena	**LMG 3222 ^{T}**		JX425102	
	DSM 2687 ^{T}		GQ426105	
	ATCC 33257^{T}	AF129448		
R. electrica	**1GB^{T}**	AB828205		
P. mirabilis	**ATCC 29906^{T}**	U77445	AJ300546	NZ_ACLE00000000*

Souche-type d'espèce ou de sous-espèce en gras
***** issu d'un génome complet ou d'une contiguité

Notons par ailleurs, qu'il nous à été impossible d'inclure systématiquement les mêmes souches-types ou souches caractérisées génétiquement dans nos dendrogrammes puisqu'il n'existe pas à ce jour de séquençage du gène *gyrB* et *speF* pour certaines d'entre elles.

III. Résultats

A. Caractérisation biochimique :

Parmi nos 30 isolats cliniques sélectionnés, seules les souches 027 et 031 avaient une activité ODC positive associée à une production d'indole positif, caractères classiquement retenus pour l'identification de *R. ornithinolytica*. Cela confirme les données de la littérature qui montrent qu'il existerait des souches ODC négatives parmi les *Raoultella ornithinolytica.*

B. Identification par spectrométrie de masse MALDI-ToF :

Le thésaurus de spectre de référence du système Biotyper ne contient pas de spectres des espèces récemment décrites proches de *K. pneumoniae* ni de la nouvelle espèce décrite du genre *Raoultella electrica.* (Tableau 6).

Tableau 6. Espèces de *Klebsiella* et *Raoultella* présentes dans le thésaurus de la base Biotyper et répartition des spectres de références entre souche-type et autres isolats.

Souches types (n)	**Autres souches (n)**	**Absentes**
K. oxytoca (1)	*K. oxytoca* (7)	*K. michiganensis*
K. pneumoniae ssp ozaenae (3)	*K. pneumoniae sensu lato* (4)	*K. quasipneumoniae subsp. quasipneumoniae*
K. pneumoniae ssp pneumoniae (2)	*K. pneumoniae ssp pneumoniae* (1)	*K. quasipneumoniae subsp. Similipneumoniae*
K. pneumoniae ssp rhinoscleromatis (2)	*R. ornithinolytica* (11)	*R. electrica*
K. variicola (1)	*R. planticola* (5)	
R. ornithinolytica (2)	*R. terrigena (4)*	
R. planticola (1)		
R. terrigena (1)		

Toutes les espèces ont au minimum une souche type référencée dans la base de données mise à part les nouvelles espèces récemment décrites. Notons qu'il existe parmi le genre *Raoultella* un nombre important de souches non référencées dans une collection internationale (isolats cliniques ?) de *R. ornithinolytica* dans la base de données.

1. Résultats de l'identification pour les 30 isolats cliniques :

Pour nos 30 isolats cliniques, nous avons obtenu 16 identifications de certitude selon nos critères, 13 souches restants insuffisamment discriminées à l'espèce (Tableau 7).

Tableau 7. Synthèse des identifications par MALDI-ToF-Biotyper

Espèces	Identifications certaine	Identification incertaine	Total
K. oxytoca	3	4	7
R. ornithinolytica	13	6	19
R. planticola	0	3	3

Parmi les septs souches identifiées comme *K. oxytoca*, trois étaient certaines, avec un score élevé et une bonne répétabilité. Cependant pour les quatres autres souches identifiées comme *K. oxytoca*, *R. ornithinolytica* est proposée en second choix avec un écart sur l'espèce inférieur à 0.20 ne permettant pas de conclure à une bonne identification (Tableau8). Comme le montrent les données de la littérature, la discrimination entre *K. oxytoca* et *R. ornithinolytica* est difficile. C'est pourquoi l'indice de confiance est toujours de C pour les identifications même certaines de *K. oxytoca.*

Pour les trois isolats où *R. planticola* est proposée en 1er choix, *R. ornithinolytica* est proposée systématiquement en second choix. Aucune souche de *R. planticola* n'est d'identification certaine (Tableau 7).

Dix-neuf souches ont été identifiées comme *R. ornithinolytica* avec treize identifications certaines. Le tableau 8 détaille les résultats d'identification obtenus pour tous nos isolats. Notre souche contrôle (n°022) a bien été identifiée comme *K. pneumoniae*.

Tableau 8.Résultats de l'identification des 30 isolats cliniques par MALDI-Biotyper

n ° isolats clinique	Identification SM-MT	second choix proposé si insufissament discriminé*
1	*R. planticola*	*R. ornithinolytica*
2	*R. ornithinolytica*	
3	*R. ornithinolytica*	*R. planticola*
4	*K. oxytoca*	*R.ornithinolytica*
5	*K. oxytoca*	
6	*R. ornithinolytica*	
7	*R. planticola*	*R. ornithinolytica*
8	*K. oxytoca*	*R. ornithinolytica*
9	*R. ornithinolytica*	
10	*R. ornithinolytica*	
11	*R. ornithinolytica*	
13	*R. ornithinolytica*	*R. planticola*
14	*K. oxytoca*	*R. ornithinolytica*
15	*R. ornithinolytica*	
16	*K. oxytoca*	
17	*R. ornithinolytica*	*K. oxytoca*
19	*R. ornithinolytica*	*R. planticola*
20	*R. ornithinolytica*	
21	*R. ornithinolytica*	*K. oxytoca*
22	*K. pneumoniae ssp pneumoniae*	
23	*R. ornithinolytica*	
24	*R. ornithinolytica*	*R. planticola*
25	*R. ornithinolytica*	
26	*R planticola*	*R. ornithinolytica*
27	*R. ornithinolytica*	
28	*K. oxytoca*	*R. ornithinolytica*
29	*R. ornithinolytica*	
30	*R. ornithinolytica*	
31	*R. ornithinolytica*	
32	*K. oxytoca*	

*écart avec le score de l'identification l'espèce suivante < 0,20
Identification certaine : score de la meilleure identification ≥ 2,0 et écart avec le score de l'identification de l'espèce suivante ≥ 0,20
Discrimination incertaine : score de la meilleure identification ≥ 2,0 et écart avec le score de l'identification l'espèce suivante < 0,20

2. Analyse phylétique des similitudes de spectre de masse MALDI-ToF :

Aucune valeur n'est attribuable via ces dendrogrammes en l'absence d'échelle de distance et d'évaluation statistique de clades proposés puisque aucune relation phylogénique n'a pu être encore attestée. Cependant celui-ci a l'avantage, à l'instar de l'analyse génomique, d'être basée sur une analyse globale du contenu bactérien composé majoritairement de protéines ribosomales (6).

Trois dendrogrammes ont ainsi été assemblés (Figures supplémentaires, Annexes A1, A2 et A3).

Pour le premier nous avons inclus les spectres de référence de la base MALDI-Biotyper des *Raoultella* et *Klebsiella* (A1), un deuxiéme comprend les spectres de nos 30 isolats cliniques (A2) et enfin pour le troisième nous avons compilé les spectres de nos isolats cliniques avec une sélection des spectres de référence les plus représentatifs de la base du fabricant dont *Proteus mirabilis* pour enraciner l'arbre phylétique (A3). Ces dendrogrammes recoupent au moins partiellement les groupes phylogénétiques définis.

Il sembe y avoir une très grande hétérogénicité pour les souches référencées comme *R. ornithinolytica* dans la base MALDI-Biotyper. En effet certaines souches référencées sont regroupées avec les souches de *R. terrigena* et d'autres avec *R. planticola.* Ceci explique en partie la difficulté pour le systéme MALDI-ToF à discriminer les espèces *R. ornithinlytica* et *R. planticola* (Annexes 1).

Bien qu'artificiels nous avons pu constater quatre grands clusters présents parmis nos isolats cliniques comparés à certains spectres de la base Biotyper (Annexes 3).
Un grand sensemble (figuré en vert) regroupe la majorité des souches identifiées comme *R. ornithynolytica* par ailleurs ODC négatives et les souches identifiées comme *R. planticola*. Deux autres ensembles (figurés en mauve et bleu) sont formés par nos deux souches ODC positives (027 et 031). Enfin un autre grand ensemble (figuré en orange) est formé pour les souches identifiées comme *K. oxytoca*.

C. Identification génétique moléculaire :

1. Identification basée sur l'homologie de la séquence du gène *rpoB* :

Nous avons soumis nos 30 isolats cliniques à un séquençage du géne *rpoB* (Tableau 9).

Tableau 9. Résultats de l'identification des 30 isolats cliniques par séquençage du gène *rpoB*

Identifiant	*Identification**	% ident**
001	***R. planticola***	**99**
002	***R. ornithinolytica***	**99**
003	***R. planticola***	**99**
004	***K. oxytoca***	**99**
005	***K. oxytoca***	**99**
006	***R. ornithinolytica***	**100**
007	***R. planticola***	**99**
008	***K. oxytoca***	**99**
009	***R. ornithinolytica***	**99**
010	***R. ornithinolytica***	**99**
011	***R. ornithinolytica***	**100**
013	***R. ornithinolytica***	**99**
014	***K. oxytoca***	**99**
015	***R. ornithinolytica***	**99**
016	***K. oxytoca***	**99**
017	***Kluyvera intermedia-K. oxytoca***	**96**
019	***R. planticola***	**100**
020	***R. ornithinolytica***	**99**
021	***Kluyvera intermedia***	**96**
022	***K. pneumoniae subsp. pneumoniae***	**100**
023	***R. ornithinolytica***	**99**
024	***R. ornithinolytica***	**99**
025	***R. ornithinolytica***	**100**
026	***R. planticola***	**99**
027	***R. ornithinolytica***	**99**
028	***K. oxytoca***	**100**
029	***R. ornithinolytica***	**99**
030	***R. ornithinolytica***	**99**
031	***R. ornithinolytica***	**99**
032	***K. oxytoca***	**100**

* identification d'espèce proposée par la base *rpoB* Lebibi
** identification fiable si identité ≥ 98 %

Le gène *rpoB* a permis de mettre en évidence la présence de cinq souches identifiées comme *R. planticola* avec une identification robuste (4 souches avec une identificaton à 99% et une autre à 100%). Une identification pour *R. ornithinolytica* avec un pourcentage d'identification élevé et sans ambiguïté est proposée pour 15 de nos isolats.

Deux souches (017 et 021) ont été identifiées comme *Kluyvera intemedia* mais avec un pourcentage d'homologie non significatif. Enfin, aucune difficulté n'a été constatée pour l'identificaton de *K. pneumoniae* et *K. oxytoca*.

2. Identification par assignation phylogénétique basée sur la séquence du gène *rpoB :*

Un arbre des souches de références séquencé du gène *rpoB* à été établi afin de pouvoir le comparer à nos isolats cliniques (Figure 9). Notons que les branches portant chaque nœud ne sont pas robustes.

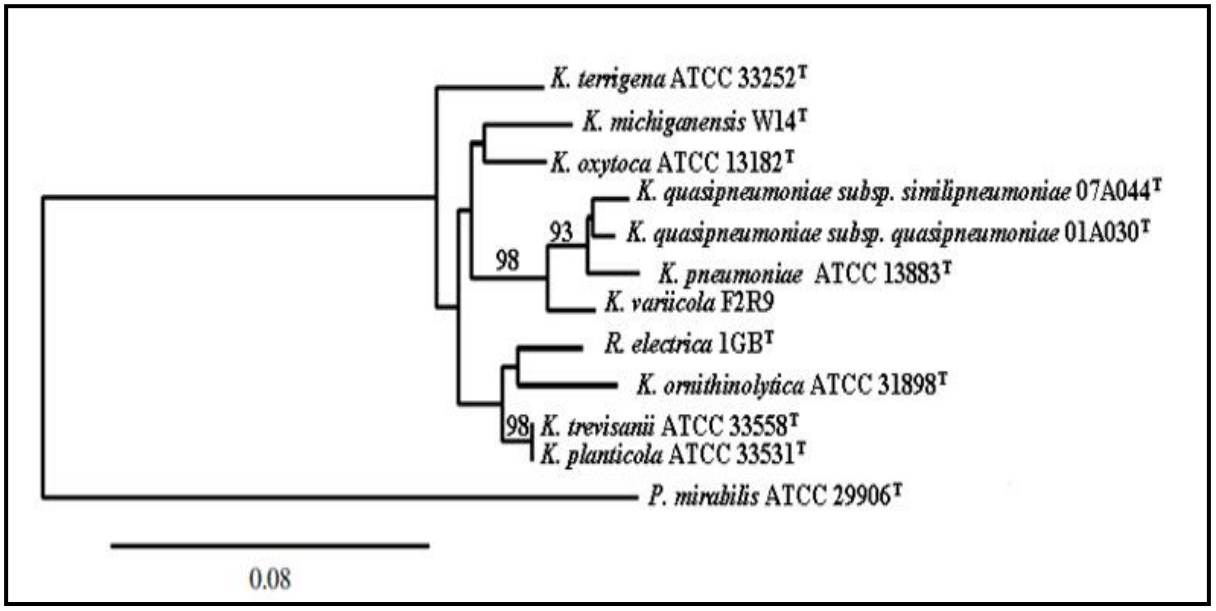


Figure 9. Arbre phylogénétique construit par comparaison des séquences du gène *rpoB* des souches-types par la méthode de *neighbour-joining*. Seules les valeurs de *bootstrap* (calculées pour 1000 répétitions) supérieures à 70 % sont indiquées. L'échelle représente 8 substitutions pour 100 nucléotides.

Il semble que *K. ocytoca* soit très proche de *K. michiganensis* malgé une valeur de *boostrap* non significative. Des valeurs de *boostrap* élevées sont retrouvées dans le groupe des espèces apparentées à *K. pneumoniae* (*K. quasipneumoniae et K. variicola*).
Comme déjà montré *K. trevisanii* et *R. planticola* sont des synonymes avec une homologie très forte entre les séquences de *rpoB.*

K. terrigena semble être un taxon ayant une position incertaine. Curieusement celui-ci est éloigné des souches de références des autres espèces du genre *Raoultella*. Bien qu'il serait hasardeux de le conclure étant donné la faible valeur de la branche portant ce taxon.

Pour confirmer les résultats d'identification basée sur l'homologie des séquences de *rpoB,* un dendrogramme incluant nos trentes souches cliniques comparées aux souches de références a été construit (Figure 10). Concernant les souches proches de *K. oxytoca*, on remarque que l'isolat 08 est très proche de *K. michiganensis* avec une valeur de *boostrap* significative. Pour la souche 05 le cluster formé avec la souche-type de

K. oxytoca ATCC 13182^{T} est soutenu par une branche forte (valeur de *bootstrap* à 96%) mais de position incertaine. Enfin deux groupes homogènes portés par un nœud avec 100% d'identité ont pu être identifiés, formés respectivement par les souches 004-014-028-032 et 016-021.

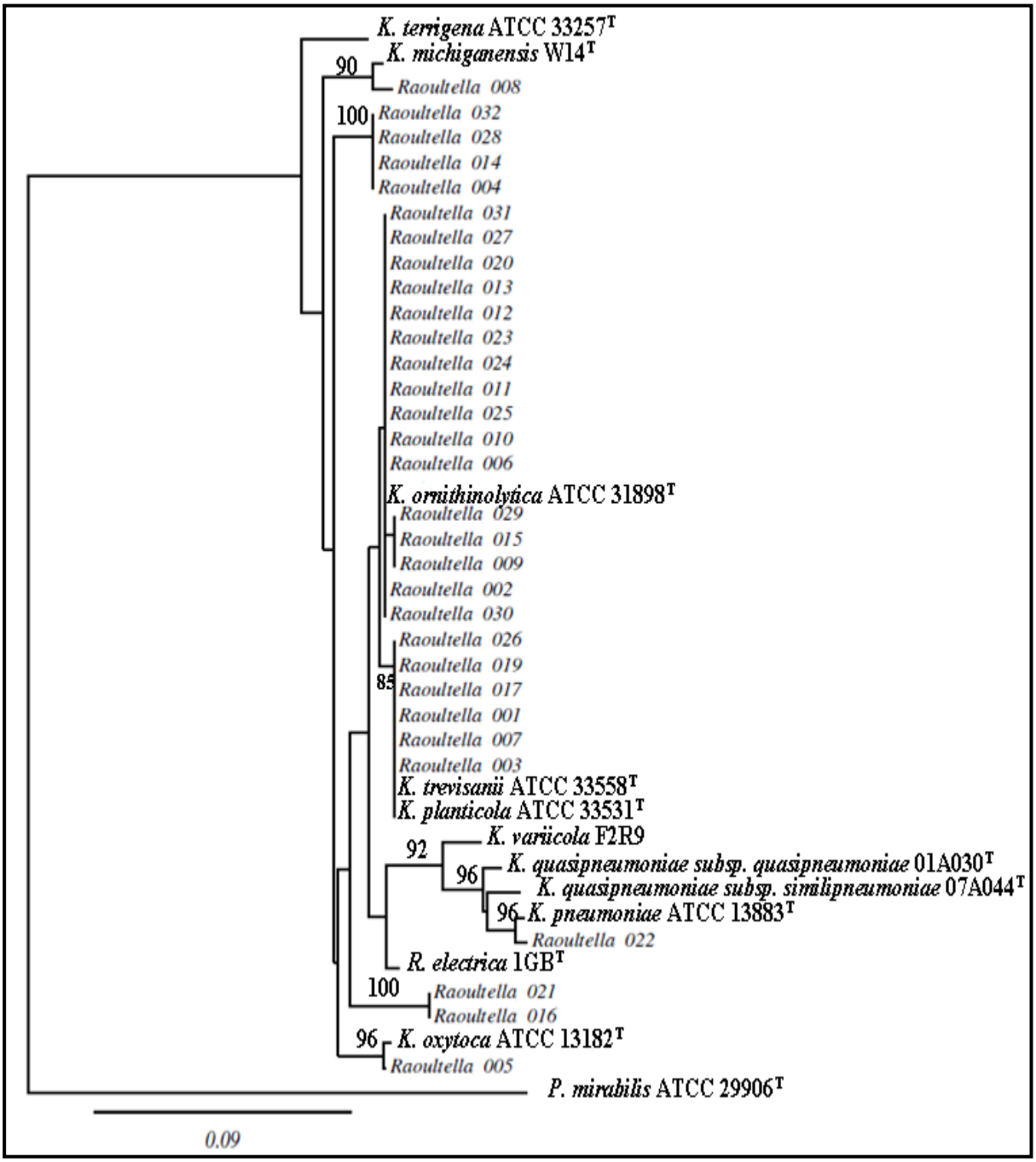


Figure 10. Arbre phylogénétique construit par comparaison des séquences du gène *rpoB* des souches-types et des isolats cliniques par la méthode de *neighbour-joining*. Seules les valeurs de *bootstrap* (calculées pour 1000 répétitions) supérieures à 70 % sont indiquées. L'échelle représente 9 substitutions pour 100 nucléotides.

Comme attendu la souche 022 est très proche de la souche type de *K. pneumoniae* ATCC 13883^{T}.

Un groupe très proche de la souche de référence de *K. planticola* ATCC 33531^{T} et de son homologue *K. trevisanii* est retrouvé porté sur des valeurs de boostrap relativement importantes (85%), confirmant l'identification basée sur le pourcentage d'homologie. Curieusement l'isolat clinique 017 clusterise avec ces souches de *R. planticola*. Enfin un autre clade homogéne semble présent regroupé par 17 isolats cliniques autour de la souche de *R. ornithynolytica* ATCC 31898. Malheureusement la valeur de bootstrap supportant ce branchement est faible pour la distinction *R. planticola/R. ornithinolytica*. Les identifications retenues après analyse phylogénétique sont résumées dans le tableau 10.

Tableau 10 Résultats de l'identification des 30 isolats cliniques par séquençage du gène *rpoB*

Identifiant	*Identification**	% ident**
001	***R. planticola***	**99**
002	***R. ornithinolytica***	**99**
003	***R. planticola***	**99**
004	***K. oxytoca***	**99**
005	***K. oxytoca***	**99**
006	***R. ornithinolytica***	**100**
007	***R. planticola***	**99**
008	***K. oxytoca***	**99**
009	***R. ornithinolytica***	**99**
010	***R. ornithinolytica***	**99**
011	***R. ornithinolytica***	**100**
013	***R. ornithinolytica***	**99**
014	***K. oxytoca***	**99**
015	***R. ornithinolytica***	**99**
016	***K. oxytoca***	**99**
017	***Kluyvera intermedia-K. oxytoca***	**96**
019	***R. planticola***	**100**
020	***R. ornithinolytica***	**99**
021	***Kluyvera intermedia***	**96**
022	***K. pneumoniae subsp. pneumoniae***	**100**
023	***R. ornithinolytica***	**99**
024	***R. ornithinolytica***	**99**
025	***R. ornithinolytica***	**100**
026	***R. planticola***	**99**
027	***R. ornithinolytica***	**99**
028	***K. oxytoca***	**100**
029	***R. ornithinolytica***	**99**
030	***R. ornithinolytica***	**99**
031	***R. ornithinolytica***	**99**
032	***K. oxytoca***	**100**

* identification d'espèce proposée par la base *rpoB* lebibi et supportée par le dendrogamme déduit de la comparaison des séquences.
** Identification proposée par lebibi

3. Identification basée sur l'homologie de la séquence du gène *gyrB* :

Comme le montre le tableau les identifications brutes obtenues par lebibi sur la base du gène *gyrB* ne permettent pas une discrimination pertinente de *K. oxytoca* et *R. ornithinolytica*. En effet les pourcentages d'homologie aux séquences de référence varient sans qu'un seuil discriminant puisse être facilement retenu. Notons cependant que des souches *K. oxytoca* sont proposées isolément avec des disparités d'identité (entre 96-100%).

Tableau 11. Résultats de l'identification des 30 isolats cliniques par séquençage du gène *gyrB*

Identifiant	*Identification**	% ident
1	***R. planticola***	**99**
2	***R. ornithinolytica***	**99**
3	***R. planticola***	**99**
4	***K. oxytoca***	**97**
5	***K. oxytoca***	**100**
6	***R. ornithinolytica***	**99**
7	***R. planticola***	**99**
8	***K. michiganensis***	**100**
9	***R. ornithinolytica***	**99**
10	***R. ornithinolytica***	**100**
11	***R. ornithinolytica***	**98**
13	***R. ornithinolytica***	**99**
14	***K. oxytoca***	**97**
15	***R. ornithinolytica***	**99**
16	***K. oxytoca***	**97**
17	***K. oxytoca***	**92**
19	***R. planticola***	**99**
20	***R. ornithinolytica***	**99**
21	***Kluyvera intermedia***	**96**
22	***K. pneumoniae***	**96**
23	***R. ornithinolytica***	**99**
24	***R. ornithinolytica***	**99**
25	***R. ornithinolytica***	**99**
26	***R. planticola***	**99**
27	***R. ornithinolytica***	**98**
28	***K. oxytoca***	**96**
29	***R. ornithinolytica***	**99**
30	***R. ornithinolytica***	**100**
31	***R. ornithinolytica***	**100**
32	***K. oxytoca***	**96**

* identification d'espèce proposée par la base *gyrB* Lebibi

Deux isolats cliniques 017 et 021 ne semblent pas étre bien idéntifiés sur la base du *gyrB*. L'identification de *R. planticola* a pu être obtenue pour cinq isolats cliniques (souches 001, 003, 007, 019 et 026) avec un pourcentage d'homologie acceptable. L'isolat 022 (contrôle *K. pneumoniae*) n'est identifié qu'avec un pourcentage d'identité de 96%.

4. Identification par assignation phylogénétique basée sur la séquence du gène *gyrB* :

Les valeurs de *boostrap* portées par les différentes branches pour les souches-types sur l'arbre déduites des séquences de *gyrB*, à l'exception de *R. ornithinolytica* représentée par des isolats cliniques/environnementaux, sont significativement plus élevées que pour *rpoB* permettant une meilleure évaluation des relations phylogénétiques entre les genres *Raoultella* et *Klebsiella* (Figure 11).

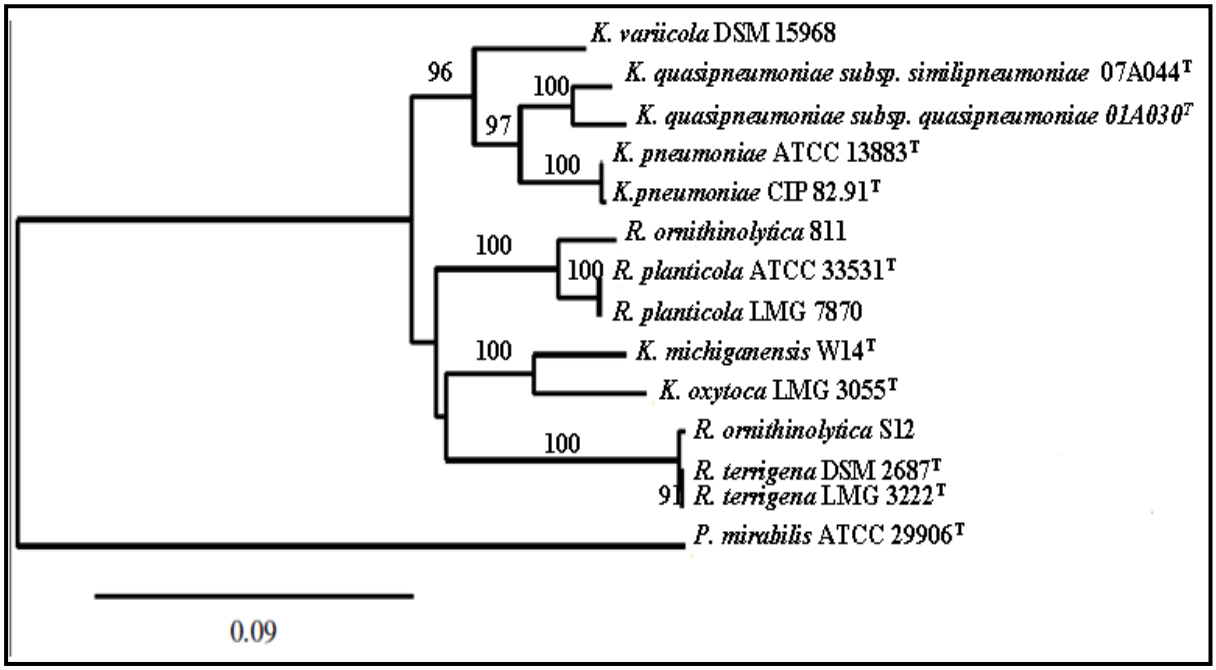


Figure 11. Arbre phylogénétique construit par comparaison des séquences du gène *gyrB* des souches-types par la méthode de *neighbour-joining*. Seules les valeurs de *bootstrap* (calculées pour 1000 répétitions) supérieures à 70 % sont indiquées. L'échelle représente 9 substitutions pour 100 nucléotides.

Sans pouvoir obtenir des valeurs importantes de *bootstrap* entre les différents clusters, il semble exister quatres groupes distincts sur ce dendrogramme.

Un génogroupe est formé par les sous espéces de *K. pneumoniae* porté chacun par des branches fortes.

On retrouve un groupe formé par les souches types *K. oxytoca* LMG 3222^T et *K. michiganensis* $W14^T$ avec 100% de valeur de *bootstrap*.

La souche *R. ornithinolytica* S12 semble avoir une forte identité avec les deux souches-filles de la souche-type de *R. terrigena* ; il s'agit très certainement d'une identification incorrecte. Une branche robuste supporte ce nœud avec 100% de position certaine.

Enfin, un clade très robuste regroupant les espèces de *R. planticola* et l'isolat *R. ornithinolytica 811* est retrouvé. Ainsi sur la base du géne *gyrB,* il semble y avoir une disparité au sein des souches type de l'espèce *R. ornithinolytica*.

Concernant l'arbre phylogénétique du gène *gyrB* des souches-types et de nos isolats cliniques (Figure 12), aucun de nos isolats n'a d'identité avec la souche *R. ornithinolytica* S12 proche de *R. terrigena.*

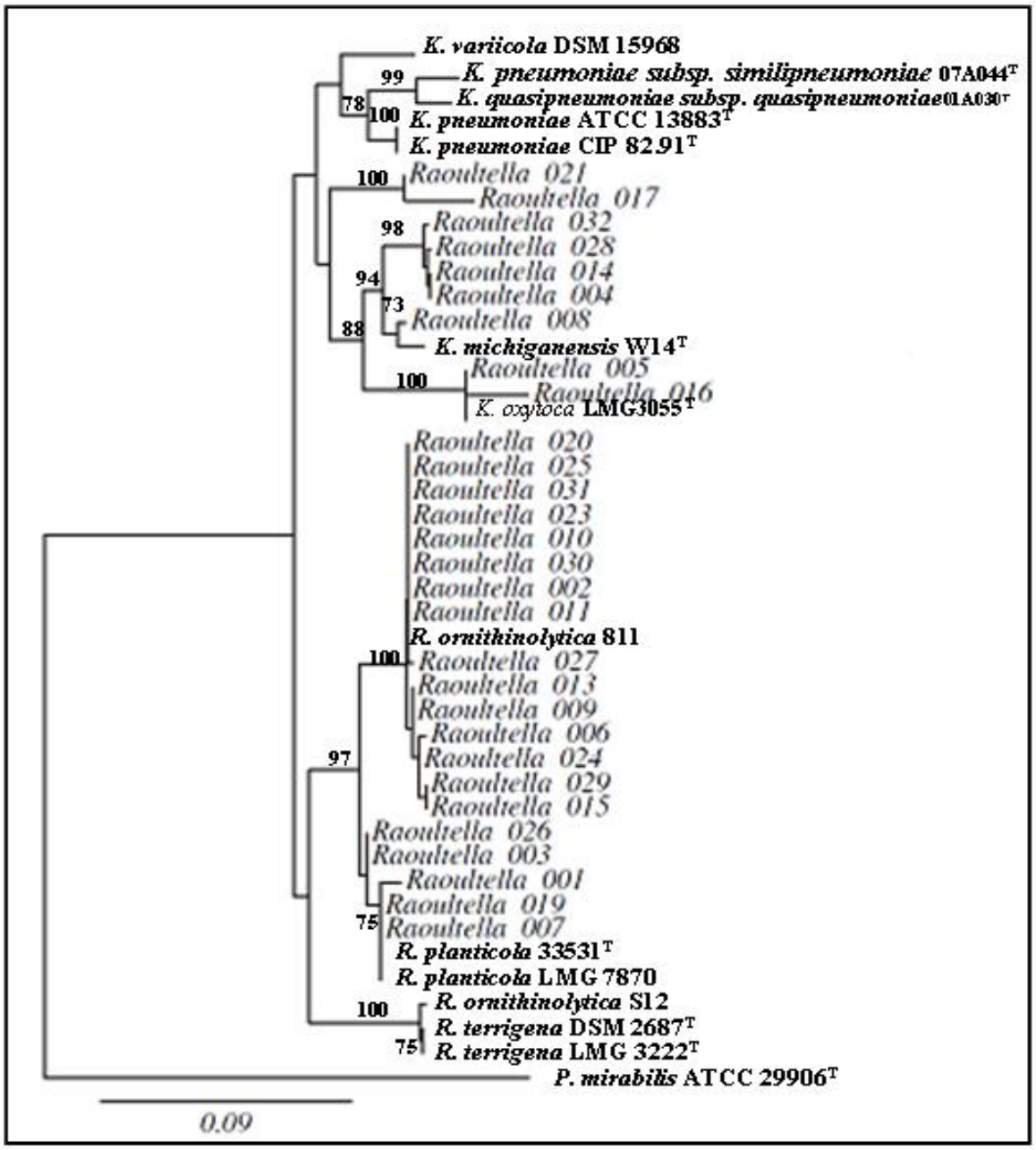


Figure 12. Arbre phylogénétique construit par comparaison des séquences du gène gyrB des souches-types et de 29 isolats cliniques par la méthode de *neighbour-joining*. Seules les valeurs de *bootstrap* (calculées pour 1000 répétitions) supérieures à 70 % sont indiquées. L'échelle représente 9 substitutions pour 100 nucléotides.

Tous les isolats cliniques identifiés comme *R. planticola* se regroupent avec les deux souches types de *R. planticola* (LMG 3222 ^{T}et DSM 2687^{T}). Une subdivision est dessinée sur l'arbre au sein de ce groupe sans valeurs de boostrap significatives.

La majorité de nos isolats forme un grand ensemble avec la souche *R. ornithinolytica* 811, porté par une branche extrémemement robustes. Nos deux souches 017 et 021 difficilement identifiables sur la base du gène gyrB se regroupent entre elles à proximité *K. oxytoca/K. michiganensis*. Chaque branche de cet ensemble est portée par des valeurs d'identité solides dont, un sous groupe regroupant comme pour *rpoB* les isolats 004-014-028-032, un autre formé par la souche 008 et K. michiganensis et enfin un cluster est formé par deux isolats cliniques 005 et 016 avec la souche référencée *K. oxytoca* LMG 3055^{T}.

5. Analyse phylogénétique par concaténation *gyrB-rpoB* :

Afin de pouvoir augmenter la puissance de l'identification génétique nous avons concaténé les séquences de deux gènes *gyrB* et *rpoB* pour chacun de nos isolats cliniques ainsi que pour les souches de références sélectionnées (Figure 13).

Les isolats 004-014-028-032 sont vraisemblablement apparentés à *K. oxytoca,* ces souches ont une identité de 100% vis-à-vis de la souche *K. oxytoca* JKo3.
De plus *K. oxytoca* semble subdivisé en deux sous-groupes, en effet le pourcentage d'idendité pour chaque nœud portant ces branches est très robuste. La souche 008 a une identité très forte avec *K. michiganensis.* Les isolats cliniques 005 et 016 très proches de la souche-type de *K. oxytoca,* forment un cluster spécifique, ce qui permet de supposer que nous retrouvons les deux phylogroupes décrits pour *K. oxytoca.*

Tous nos isolats cliniques identifiés comme *R. planticola* sont regoupés au sein d'un groupe porté par des branches fortes (valeur de *bootstrap* à 91% pour la branche commune).

Enfin 16 isolats cliniques sont regroupés de manière homogène autour de la souche *Raoultella ornithinolytica* B6. Notons par ailleurs que les deux souches 027 et 031 qui sont ODC positives se regroupent autour de cette souche-type.

A la différence des résultats bruts d'identification des isolats, les résultats sur l'arbre permettent de mieux préciser par l'alignement des séquences la position de chacune d'entre

elles. Ainsi les 16 isolats positionnés sur ce nœud solide sont très propablement des souches de *R. onithinolytica*. Le positionnement de la souche-type de *R. terrigena* reste flou en l'absence d'isolat génétiquement proche.

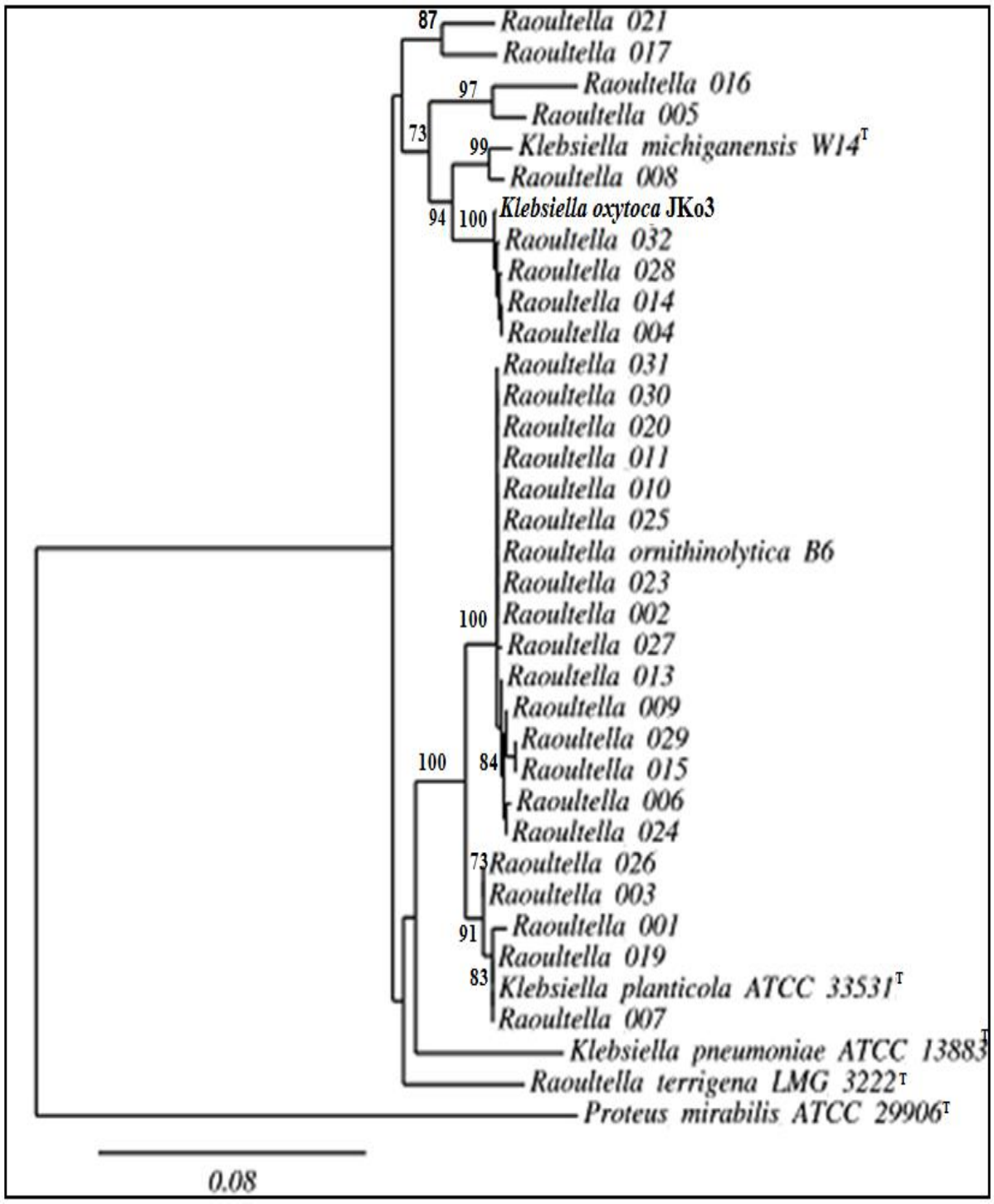


Figure 13. Arbre phylogénétique construit par concaténation des séquences du gène *gyrB et* rpoB des souches-types et de 29 isolats cliniques par la méthode de *neighbour-joining*. Seules les valeurs de *bootstrap* (calculées pour 1000 répétitions) supérieures à 70 % sont indiquées. L'échelle représente 8 substitutions pour 100 nucléotides.

6. Analyse phylogénétique pour le gène *speF :*

Nous avons pu séquencer le géne *speF* codant pour l'ODC pour 12 isolats cliniques (Tableau 12).

Tableau12. Résultats de l'identification de 12 souches par séquençage du gène s*peF*

Identifiant	***Identification****	**% ident****
4	***K. oxytoca***	**97**
7	***R. planticola***	**99**
8	***K. oxytoca***	**99**
14	***K. oxytoca***	**99**
17	***K. oxytoca***	**85**
19	***R. planticola***	**99**
21	***K. oxytoca***	**86**
22	***K. pneumoniae***	**94**
26	***R. planticola***	**99**
27	***R. ornithinolytica***	**100**
28	***K. oxytoca***	**98**
32	***K. oxytoca***	**98**

* identification d'espèce proposée par la base *speF NCBI/ Blast* Home

Les isolats cliniques 017 et 021 ont un pourcentage d'identité très bas pour *K. oxytoca* confirmant leur éloignement génétique. Une identification de certitude à 100% pour *R. ornithinolytica* est retrouvée pour la souche 027, en concordance avec les données biochimiques.

Les données de l'arbre phylogénétique pour *speF* permettent de mieux appréhender la répartition des isolats (Figure 14).

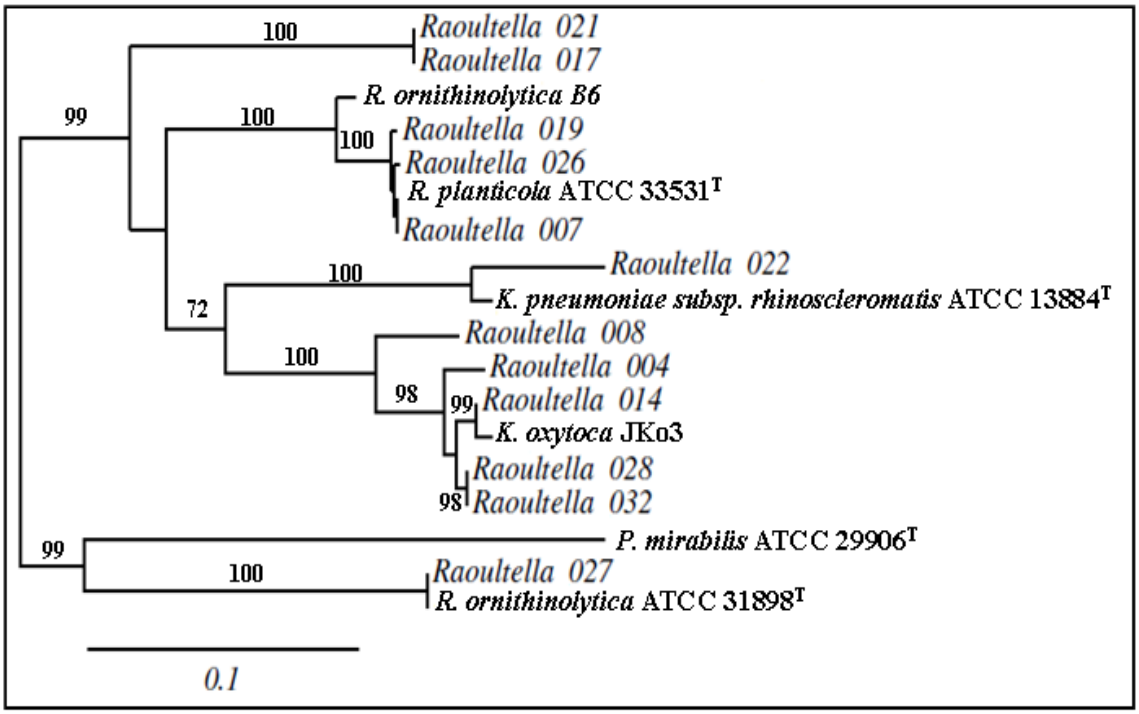


Figure 14. Arbre phylogénétique construit par comparaison des séquences du gène *speF* des souches-types et de 12 isolats cliniques par la méthode de *neighbour-joining*. Seules les valeurs de *bootstrap* (calculées pour 1000 répétitions) supérieures à 70 % sont indiquées. L'échelle représente 1 substitution pour 100 nucléotides.

La souche de *Raoultella ornithinolytica B6* a une position très proche des souches d'isolats cliniques et type de *Raoultella planticola* avec des branches supportant ces nœuds avec des valeurs d'identité de 100%. Un sous groupe formé par l'isolat 027 ODC positif et la souche type de *R. ornithinolytica* ATCC 31898^{T} ODC positive (décrite par *Drancourt et al*.) est éloigné de l'ensemble des autres isolats cliniques, position non retrouvée sur les précédents dendrogrammes. En l'absence d'amplification à partir des ADN extraits, il a été impossible de séquencer le gène *speF* pour nos isolats cliniques identifiés comme *R. ornithinolytica*.

.

Discussion

Nos résultats confirment les données de la littérature sur l'existence de souches *R. onithinolytica* ODC négatives. De fait, l'ODC ne peut être le facteur discriminant de *R. onithinolytica*, à la fois des autres espèces du genre et de *K. oxytoca* malgré sa description éponyme historique (131). Il s'agit d'un réel problème pour les laboratoires de bactériologie médicale utilisant un systéme d'identification phénotypique de pouvoir identifier précisément au genre et à l'espèce, particulièrement pour *Raoultella spp.* et *Klebsiella oxytoca*.

Au laboratoire du CHU Amiens-Picardie l'utilisation de galerie d'identification biochimique a été abandonnée au profit de l'utilisation de la spectrométrie de masse, bien qu'utilisée occasionnellement pour certaines identifications bactériennes spécifiques. En effet l'arrivée du système MALDI-Biotyper a permis d'obtenir une identification rapide, peu coûteuse et fiable sur la majorité des isolats courants.

Cependant, nous étions confrontés aux mêmes difficultés d'identification concernant la discrimination de *K. oxytoca* et des espèces du genre *Raoultella* particulièrement pour *R. ornothinolytica* et *R. planticola*. Comme le suggèrent nos résultats (Tableaux 7 et 8) concernant l'identification par MALDI-Biotyper, l'identification de *R. planticola* est problématique puisque qu'aucune identification certaine n'a été obtenue. De plus les identifications pour *K. oxytoca* et *R. ornithinolytica* ont montré un rendement non acceptable avec respectivement : 3 isolats sur 7 identifications certaines pour *K. oxytoca* et 13 identifications certaines sur 19 pour *R. ornithinolytica.* Au vu de ces résultats, il apparaît difficile de pouvoir donner une identification pertinente de ces souches par le système MALDI-Biotyper. Ceci peut être expliqué notamment par l'extrême hétérogénicité des souches de *R. ornithinolytica* dans la base commerciale Biotyper (probablement dû au mode de recueil [isolats cliniques ou environnementaux] et d'identification de ces souches principalement basée sur le gène *rrs*).

Devant ces observations, il a été proposé de collecter les souches de *R. ornithinolytica* identifiées comme telles ou proposées en seconde identification pour *K. oxytoca*.

Nous avons décidé de séquencer le gène *rpoB* pour nos isolats cliniques comme mentionné par la publication *princeps* décrivant le genre *Raoultella* (8) et d'y ajouter deux autres gènes encore non utilisés dans la littérature pour *gyrB* ou partiellement pour *speF* (131) afin d'obtenir une identification multi-génique plus fine.

L'identification par le séquençage du gène *ropB* (Tableaux 9 &10 ; Figure 10) semble très intéressante pour la discrimination des souches du genre *Raoultella.* Cependant l'analyse de la phylogénie des isolats cliniques comparée aux souches-types ou référencées a révélé que nos branches n'étaient pas portées par des valeurs importantes de *bootstrap* pour pouvoir permettre une identification correcte pour le genre *Raoultella*. Ainsi, *rpoB* ne permet pas à lui seul de pouvoir identifier les espèces du genre *Raoultella*.

Les résultats bruts pour le gène *gyrB* (Tableau 11) montrent qu'il ne permet pas une identification précise. Par contre le dendrogramme construit d'après la comparaison des séquences du gène *gyrB* (Figure 12) a permis une meilleure compréhension des relations phylogénétiques entre nos souches et les séquences de références. En effet la majorité des branches était portée par des nœuds très robustes, permettant une meilleure identification comme décrit pour d'autres groupes d'*Enteorbacteriaceae* (141).

La concaténation des gènes *rpoB* et *gyrB* (Figure 13) nous permet au final d'obtenir un dendrogramme plus discriminant et permettant l'identification de chacun de nos isolats cliniques. Celui-ci nous permet de donner quelques conclusions très interessantes.

Ainsi on visualise un grand cluster autour de *K. oxytoca* divisé en deux phylogroupes :

- Un groupe porté par un nœud robuste formé par les souches 016 et 005 identifiées comme *Klebsiella oxytoca* et proche des souches tpes *K. oxytoca* ATCC13182^{T}/LMG 3055^{T}.

- Un autre groupe subivisé en deux est formé, là encore porté par des branches très solides ; le premier sous groupe correspond à la souche 008 qui semble être vraisembablement *K. michiganensis* associé à la souche-type de cette espèce (*K. michiganensis* W14^{T}), et le second sous-groupe (isolats 004-014-029-032) rassemblé avec la souche référencée *K. oxytoca JKo3* sur une branche à 100% de valeur de *boostrap*. On peut retenir l'identification *K. oxytoca* pour ces isolats en considérant cette espèce comme polyphylétique, sur les données décrites par deux publications anciennes (31) (33) et une autre beaucoup plus récente (97) décrivant deux phylogroupes KoI et KoII. Cependant en l'absence de séquence disponible caractérisée pour ces deux phylogroupes, nous ne pouvons affirmer cette hypothèse. Nous pouvons à défaut considérer ces souches comme *K. oxytoca-like* ou *K. oxytoca sensu lato.*

Concernant la discrimination des espèces du genre *Raoultella* des valeurs de *bootstraps* extrémement robustes ont pu être obtenues avec des branches à 100%. Un ensemble formé par *R. planticola* est clairement identifiable. Ainsi cinq de nos isolats ont pu être identifiés comme tels.

Un grand groupe homogène de souches est formé autour de la souche entièrement séquencée de *R. ornithinolytica* B6 avec une valeur de boostrap à 100% pour la branche le supportant, nous incitant de conclure que ces isolats correspondent bien au *genomospecies Raoultella ornithinolytica*.

Nous avons eu des difficultés dans le séquençage du gène *gyrB* concernant notre contrôle négatif identifié comme *K. pneumoniae* avec seulement 96% d'identité. Cela nous a amené à ne pas l'inclure dans nos dendrogrammes reconstruits déduit des séquences du gène *gyrB* et concaténées *rpoB-gyrB.*

Les souches 017 et 021, regroupées avec une idendité importante mais de position incertaine, ont étaient difficilement identifiables sur la base des gènes *gyrb* et *rpoB.* Un risque de contamination n'est pas à exclure puisqu'en autre *Kluyvera intermedia* est une bactérie environnementale. Cependant nous avons tenté de construire notre arbre avec séquences des souches-types du genre *Kluyvera* (données non présentées) mais ces isolats n'étaient jamais associés avec la souche-type de *Kluyvera intermedia*, réfutant cette identification.

Enfin malheureusement il nous à été impossible d'obtenir le séquençage du gène *speF* (Tableau 8) pour l'ensemble de nos isolats cliniques. Cependants nous avons pu mettre en évidence plusieurs points interessants sur la base du dendrogramme basé sur *speF* (Figure 14).

Il y a bien une hétérogénicité des souches de *Raoultella ornithinolytica* pour le gène de l'ODC. La souche type identifiée comme *R. ornithinolytica* ATCC 31898^{T} dans la publication *princeps* est décrite comme ODC positive (8). Or notre isolat clinique 027 est lui ODC positif et avec une homologie de la séquence *speF* de 100%. Ce groupe forme un cluster distinct des autres isolats séquencés pour le gène *speF* (nœud avec une valeur de boostrap à 99%) qui n'ont pas été identifiés génétiquement comme *R. ornithinolytica*. Cependant, on note avec intérêt que la souche *R. ornithinolytica* B6 dont l'ensemble du génome a été séquencé se retrouve avec une souche-type de *R. planticola* et 3 isolats cliniques identifiés comme tels. Or l'étude de nos isolats cliniques par concaténation des gènes *rpoB* et *gyrB* a montré de maniére très fiable que ce groupe homogène possédait une idendité de 100% avec

cette souche-type (Figure 13). On peut donc logiquement penser que ce positionnement reflète celui qu'auraient nos isolats ODC négatifs. Comme nous n'avons pu séquencer ces souches avec le gène *speF* il est impossible de confirmer notre hypothèse. Mais cela confirme que la distinction basée sur cette seule activité biochimique n'est pas pertinente à l'heure de la taxonomie multi-génique.

Après avoir proposé une identification génétique la plus précise pour nos isolats, nous les avons comparés aux résultats d'identitification par MALDI-Biotyper. Un tableau de synthèse à été réalisé (Figure A4) et une analyse par espèce à été effectuée (Tableau 12).

Tableau 12 .comparatif des identifications par MALDI-ToF et du séquençage des 2 gènes séquencés sur nos 30 isolats cliniques.

	Identification SM-MT		**Identification Multi-génique**		
Espèce	**Identification certaine**	**Identification acceptable**	***rpoB-gyrB***	**concordance**	**discordance**
R. planticola	0	**3**	5	3	**2**
R. ornithinolytica	13	**6**	15	15	**4**
K. oxytoca	3	**4**	8	7	**1**
K. pneumoniae	1	0	0	1	0

Au final on trouve quatre discordances entre le système MALDI-Biotyper et l'identification génétique pour *R. ornithinolytica* : deux isolats confondus avec *R. planticola* et deux isolats qui correspondraient à *K. oxytoca sensu lato*. A chaque fois, l'identification par MALDI-Biotyper était incertaine.

Concernant *R. planticola* même si les trois identifications où nous avons retenu cette espèce n'étaient pas discriminantes, elles ont été confirmées par l'analyse génétique. De plus les deux discordances entre *R. planticola* et *R. onithinolytica* confirment que la confusion va dans le sens d'un sous-diagnostic de *R. planticola*.

La mauvaise qualité des identifications de *K. oxytoca* est sans doute liée à l'hétérogénéité génétique de cette espèce que nous avons retrouvée, l'identification de la souche 008 *K. michiganensis* restant très proche de *K. oxytoca*.

Conclusion et Perspectives

- L'ODC n'est pas un caractère discriminant puissant pour la discrimination de *Raoultella ornithinolytica* et doit être abandonné.

- Le séquençage isolé du gène *rpoB* nous semble insuffisant pour l'identification des espèces du genre *Raoultella*. De fait, nous proposons pour le laboratoire du CHU-Amiens-Picardie la combinaison du séquençage du gène *gyrB* avec le gène *rpoB* comme méthode d'identification de référence pour *R. ornithinolytica, R. planticola* et *K. oxytoca*.

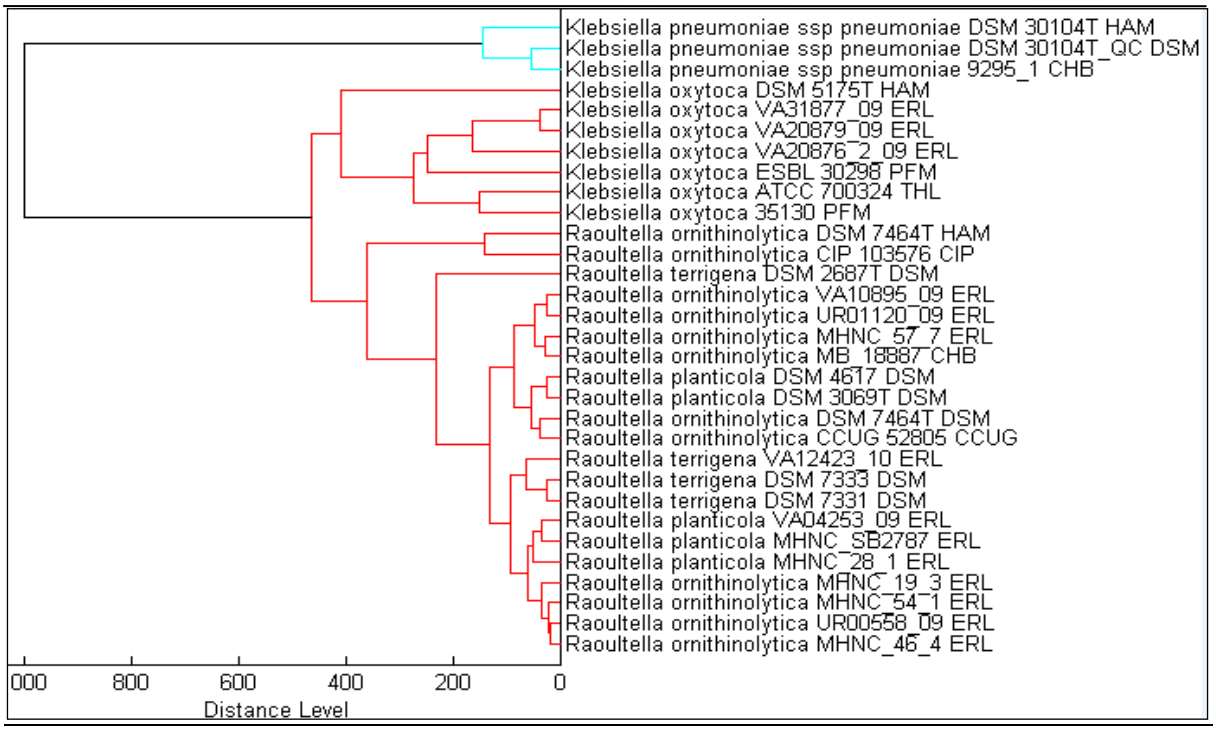
- Pour l'identification en routine avec le système MALDI-Biotyper, l'identification de *K. oxytoca* reste fiable, dans la limite de l'hétérogénéité de cette espèce. Concernant la discrimination *R. ornithinolytica/R. planticola*, on peut proposer de considérer ces deux espèces comme un complexe génomique qui est alors relativement bien identifié.

- Nous avons pu mettre en évidence parmi nos isolats cliniques la présence de différents sous-groupes pour *K. oxytoca*, dont un isolat correspondant à l'espèce *K. michiganensis*. Des études complémentaires doivent être menées pour préciser si nos sous-groupes correspondent aux deux phylogroupes précédemment décrit. Concernant l'identification par MALDI-Biotyper en routine, il n'y a pas de confusion de *K. oxytoca* avec *R. ornithinolytica,* s'il l'on considère cette espèce au sens large.

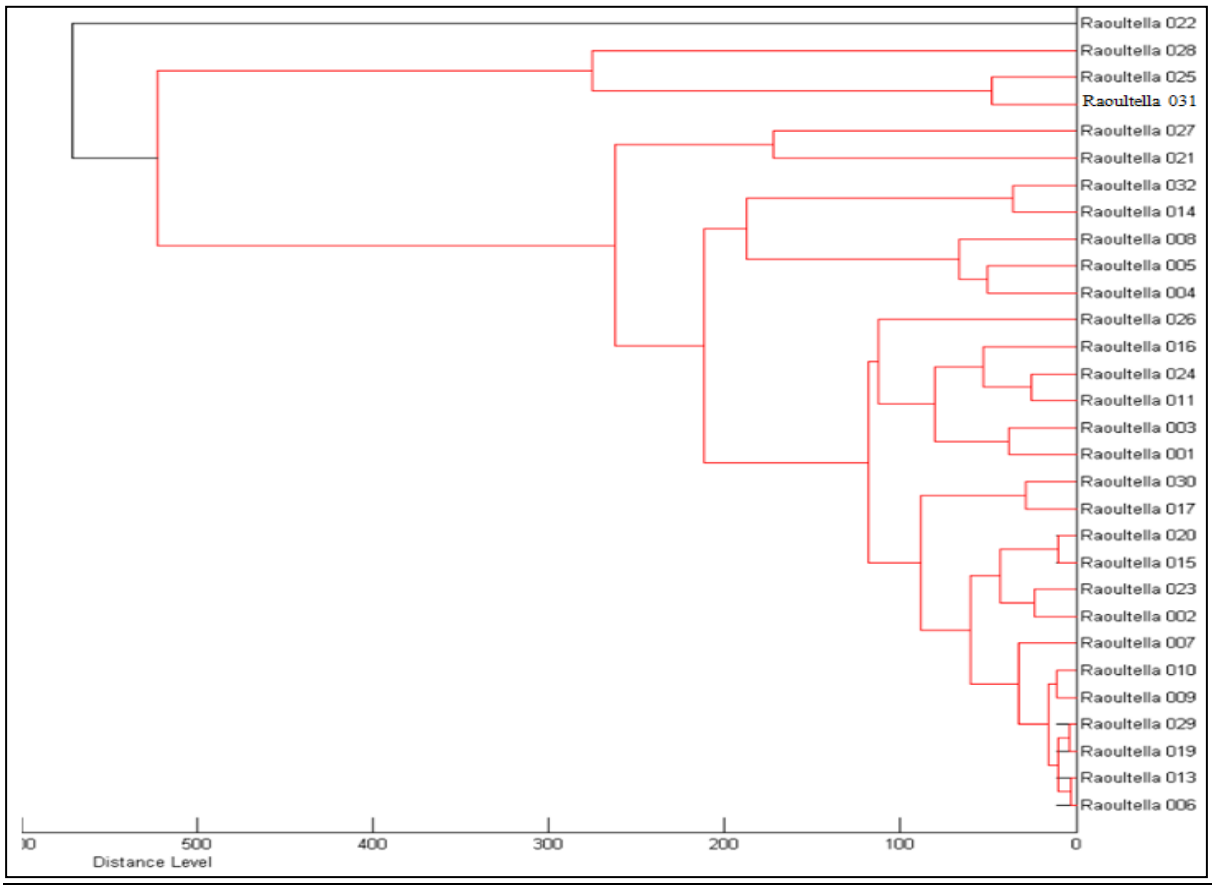
- Ainsi il apparaît important de pouvoir poursuivre le séquençage du gène *speF* afin de confirmer notre hypothèse sur l'hétérogénicité des souches de *R. ornithinolytica* vis-à-vis de l'activité enzymatique conférée par ce gène et sa pertinence ou non sur le plan phylogénétique (présence de deux sous-espèces ou gène acquis par transfert horizontal ?).

- Enfin en complément de la base commerciale marquée IVD du système MALDI- Biotyper, nous pouvons construire sur la base des données *gyrB-rpoB* et des dendrogrammes de similitude de spectre une base utilisateur dédiée pour améliorer la discrimination des espèces de *Raoultella* et des sous-groupes de *K. oxytoca sensu lato*.

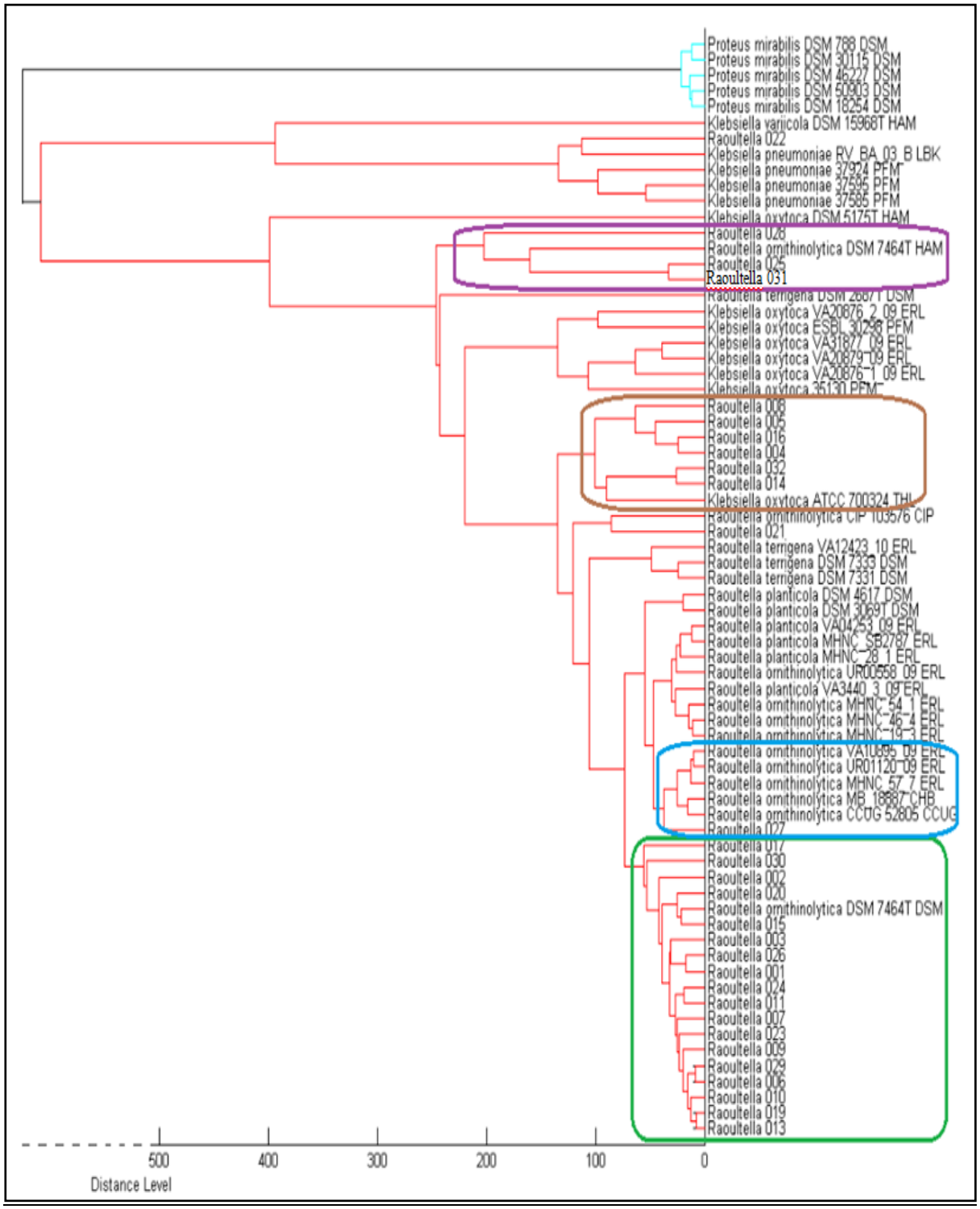
Annexes



a) Figure A1. Dendrogramme déduit de la comparaison des spectres de références de *Raoultella* et *Klebsiella* de la base Biotyper.



b) Figure A2. Dendrogramme déduit de la comparaison des spectres obtenus pour l'ensemble des 30 isolats cliniques étudiés.



c) Figure A3. Dendrogramme déduit de la comparaison des spectres des 30 isolats cliniques et des spectres représentatifs issus de la base Biotyper.

d) Figure A4. Tableau de synthèse des résultats d'identification.

Identification SM-MT	Identification Multi-gènique *rpoB, gyrB*
R. planticola	*R. planticola*
R. ornithinolytica	*R. ornithinolytica*
R. ornithinolytica	*R. planticola*
K. oxytoca	*K. oxytoca**
K. oxytoca	*K. oxytoca*^{T}
R. ornithinolytica	*R. ornithinolytica*
R. planticola	*R. planticola*
K. oxytoca	*K. michiganensis*
R. ornithinolytica	*R. ornithinolytica*
R. ornithinolytica	*R. ornithinolytica*
R. ornithinolytica	*R. ornithinolytica*
R. ornithinolytica	*R. ornithinolytica*
K. oxytoca	*K. oxytoca**
R. ornithinolytica	*R. ornithinolytica*
K. oxytoca	*K. oxytoca*^{T}
R. ornithinolytica	*K. oxytoca*
R. ornithinolytica	*R. planticola*
R. ornithinolytica	*R. ornithinolytica*
R. ornithinolytica	*Klebsiella sp*
K. pneumoniae	*K. pneumoniae*
R. ornithinolytica	*R. ornithinolytica*
R. ornithinolytica	*R. ornithinolytica*
R. ornithinolytica	*R. ornithinolytica*
R planticola	*R. planticola*
R. ornithinolytica	*R. ornithinolytica*
K. oxytoca	*K. oxytoca**
R. ornithinolytica	*R. ornithinolytica*
R. ornithinolytica	*R. ornithinolytica*
R. ornithinolytica	*R. ornithinolytica*
K. oxytoca	*K. oxytoca**

Rouge : identification incertaine
Vert : identification certaine
^{T} : Isolat proche de la souche de référence *K. oxytoca* ATCC 131182^{T}
* Souche proche de la souche de référence *K. oxytoca* JKo3

Références

1. Broberg CA, Palacios M, Miller VL. Klebsiella: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. F1000Prime Rep [Internet]. 1 août 2014 [cité 1 sept 2015];6. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4126530/

2. 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.

3. Monnet D, Freney J. Method for differentiating Klebsiella planticola and Klebsiella terrigena from other Klebsiella species. J Clin Microbiol. avr 1994;32(4):1121-2.

4. Alves MS, Dias RC da S, de Castro ACD, Riley LW, Moreira BM. Identification of Clinical Isolates of Indole-Positive and Indole-Negative Klebsiella spp. J Clin Microbiol. oct 2006;44(10):3640-6.

5. Boye K, Hansen DS. Sequencing of 16S rDNA of Klebsiella: taxonomic relations within the genus and to other Enterobacteriaceae. Int J Med Microbiol IJMM. févr 2003;292(7-8):495-503.

6. Murray PR. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. nov 2010;16(11):1626-30.

7. de Jong E, de Jong AS, Smidts-van den Berg N, Rentenaar RJ. Differentiation of Raoultella ornithinolytica/planticola and Klebsiella oxytoca clinical isolates by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. Diagn Microbiol Infect Dis. avr 2013;75(4):431-3.

8. 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.

9. Treviscan 1885 et al;, Patrick A. D.Grimont and Francine Grimont. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. New York: Springer-Verlag; p. 685-93.

10. Willey J, Sherwood L, Woolverton C, Prescott LM, Coyette J, Mergeay M. Microbiologie. 4e édition. Bruxelles: De Boeck; 2013. 1184 p.

11. Bactériologie médicale: Techniques usuelles - François Denis, Marie-Cécile Ploy, Christian Martin, Edouard Bingen, Roland Quentin - Livres.

12. Freney J. Précis de bactériologie clinique. Éd. ESKA; 2007. 1764 p.

13. de Pontual L, Ovetchkine P, Rodriguez D, Grant A, Puel A, Bustamante J, et al. Rhinoscleroma: a French national retrospective study of epidemiological and clinical features. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 1 déc 2008;47(11):1396-402.

14. Herrak L, Maslout A, Benosmane A. Le sclérome trachéal et le rhinosclérome: À propos d'un cas. Rev Pneumol Clin. avr 2007;63(2):115-8.

15. Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PAD, Kämpfer P, Maiden MCJ, et al. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. Int J Syst Evol Microbiol. 1 mai 2002;52(3):1043-7.

16. Jain K, Radsak K, Mannheim W. Differentiation of the Oxytocum Group from Klebsiella by Deoxyribonucleic Acid-Deoxyribonucleic Acid Hybridization. Int J Syst Evol Microbiol. 1 oct 1974;24(4):402-7.

17. Freney J, Gavini F, Alexandre H, Madier S, Izard D, Leclerc H, et al. Nosocomial infection and colonization by Klebsiella trevisanii. J Clin Microbiol. mai 1986;23(5):948-50.

18. Sakazaki R, Tamura K, Kosako DY, Yoshizaki E. Klebsiella ornithinolytica sp. nov., formerly known as ornithine-positiveKlebsiella oxytoca. Curr Microbiol. 18(4):201-6.

19. Farmer JJ, Davis BR, Hickman-Brenner FW, McWhorter A, Huntley-Carter GP, Asbury MA, et al. Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. J Clin Microbiol. janv 1985;21(1):46-76.

20. Clarridge JE. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Clin Microbiol Rev. oct 2004;17(4):840-62.

21. Wang M, Cao B, Yu Q, Liu L, Gao Q, Wang L, et al. Analysis of the 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer region in Klebsiella species. J Clin Microbiol. nov 2008;46(11):3555-63.

22. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. J Clin Microbiol. sept 2007;45(9):2761-4.

23. Olsen GJ, Woese CR. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. janv 1993;7(1):113-23.

24. Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Tse H, Yuen K-Y. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. Clin Microbiol Infect. 1 oct 2008;14(10):908-34.

25. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol. déc 1980;16(2):111-20.

26. Bascomb S, Lapage SP, Willcox WR, Curtis MA. Numerical classification of the tribe Klebsielleae. J Gen Microbiol. juin 1971;66(3):279-95.

27. Brenner DJ, Steigerwalt AG, Fanning GR. Differentiation of Enterobacter aerogenes from Klebsiellae by Deoxyribonucleic Acid Reassociation. Int J Syst Evol Microbiol. 1 oct 1972;22(4):193-200.

28. Jukes TH. Recent advances in studies of evolutionary relationships between proteins and nucleic acids. Space Life Sci. mars 1969;1(4):469-90.

29. Mollet C, Drancourt M, Raoult D. rpoB sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. Mol Microbiol. 1 déc 1997;26(5):1005-11.

30. Watanabe K, Nelson J, Harayama S, Kasai H. ICB database: the gyrB database for identification and classification of bacteria. Nucleic Acids Res. 1 janv 2001;29(1):344.

31. Brisse S, Verhoef J. Phylogenetic diversity of Klebsiella pneumoniae and Klebsiella oxytoca clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, gyrA and parC genes sequencing and automated ribotyping. Int J Syst Evol Microbiol. 1 mai 2001;51(3):915-24.

32. Paradis S, Boissinot M, Paquette N, Bélanger SD, Martel EA, Boudreau DK, et al. Phylogeny of the Enterobacteriaceae based on genes encoding elongation factor Tu and F-ATPase beta-subunit. Int J Syst Evol Microbiol. sept 2005;55(Pt 5):2013-25.

33. Jonas D, Spitzmüller B, Daschner FD, Verhoef J, Brisse S. Discrimination of Klebsiella pneumoniae and Klebsiella oxytoca phylogenetic groups and other Klebsiella species by use of amplified fragment length polymorphism. Res Microbiol. févr 2004;155(1):17-23.

34. Kimura Z, Chung KM, Itoh H, Hiraishi A, Okabe S. Raoultella electrica sp. nov., isolated from anodic biofilms of a glucose-fed microbial fuel cell. Int J Syst Evol Microbiol. 1 avr 2014;64(4):1384-8.

35. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol. juill 1987;4(4):406-25.

36. Saha R, Farrance CE, Verghese B, Hong S, Donofrio RS. Klebsiella michiganensis sp. nov., a new bacterium isolated from a tooth brush holder. Curr Microbiol. janv 2013;66(1):72-8.

37. Brisse S, Passet V, Grimont PAD. Description of Klebsiella quasipneumoniae sp. nov., isolated from human infections, with two subspecies, Klebsiella quasipneumoniae subsp. quasipneumoniae subsp. nov. and Klebsiella quasipneumoniae subsp. similipneumoniae subsp. nov., and demonstration that Klebsiella singaporensis is a junior heterotypic synonym of Klebsiella variicola. Int J Syst Evol Microbiol. sept 2014;64(Pt 9):3146-52.

38. Maatallah M, Vading M, Kabir MH, Bakhrouf A, Kalin M, Nauclér P, et al. Klebsiella variicola is a frequent cause of bloodstream infection in the stockholm area, and associated with higher mortality compared to K. pneumoniae. PloS One. 2014;9(11):e113539.

39. Brisse S, Fevre C, Passet V, Issenhuth-Jeanjean S, Tournebize R, Diancourt L, et al. Virulent Clones of Klebsiella pneumoniae: Identification and Evolutionary Scenario Based on Genomic and Phenotypic Characterization. PLoS ONE [Internet]. 25 mars 2009 [cité 1 sept 2015];4(3). Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2656620/

40. Schaechter M, Medoff G, Eisenstein BI, Flandrois J-P. Microbiologie et pathologie infectieuse. Paris: De Boeck; 1999. 1000 p.

41. Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, Baker S, Whitehouse CA, Dance D, et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in Klebsiella pneumoniae, an urgent threat to public health. Proc Natl Acad Sci U S A. 7 juill 2015;112(27):E3574-81.

42. Lin H-A, Huang Y-L, Yeh K-M, Siu LK, Lin J-C, Chang F-Y. Regulator of the mucoid phenotype A gene increases the virulent ability of extended-spectrum beta-lactamase-producing serotype non-K1/K2 Klebsiella pneumonia. J Microbiol Immunol Infect [Internet]. [cité 31 août 2015]; Disponible sur: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1684118214002072

43. Highsmith AK, Jarvis WR. Klebsiella pneumoniae: selected virulence factors that contribute to pathogenicity. Infect Control IC. févr 1985;6(2):75-7.

44. 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.

45. Hsu C-R, Lin T-L, Pan Y-J, Hsieh P-F, Wang J-T. Isolation of a Bacteriophage Specific for a New Capsular Type of Klebsiella pneumoniae and Characterization of Its Polysaccharide Depolymerase. PLoS ONE [Internet]. 2 août 2013 [cité 31 août 2015];8(8). Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3732264/

46. 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.

47. Fang C-T, Lai S-Y, Yi W-C, Hsueh P-R, Liu K-L, Chang S-C. Klebsiella pneumoniae Genotype K1: An Emerging Pathogen That Causes Septic Ocular or Central Nervous System Complications from Pyogenic Liver Abscess. Clin Infect Dis. 8 janv 2007;45(3):284-93.

48. Tsay R, Siu LK, Fung C, Chang F. Characteristics of bacteremia between community-acquired and nosocomial klebsiella pneumoniae infection: Risk factor for mortality and the impact of capsular serotypes as a herald for community-acquired infection. Arch Intern Med. 13 mai 2002;162(9):1021-7.

49. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet J-C, Lina G, Bes M, et al. Association between Staphylococcus aureus strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. Lancet. 2 mars 2002;359(9308):753-9.

50. Shon AS, Bajwa RPS, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) Klebsiella pneumoniae. Virulence. 15 févr 2013;4(2):107-18.

51. Shon AS, Russo TA. Hypervirulent Klebsiella pneumoniae: the next superbug? Future Microbiol. 1 juin 2012;7(6):669-71.

52. Bialek-Davenet S, Criscuolo A, Ailloud F, Passet V, Jones L, Delannoy-Vieillard A-S, et al. Genomic Definition of Hypervirulent and Multidrug-Resistant Klebsiella pneumoniae Clonal Groups. Emerg Infect Dis. nov 2014;20(11):1812-20.

53. Jones GW, Isaacson RE. Proteinaceous bacterial adhesins and their receptors. Crit Rev

Microbiol. 1983;10(3):229-60.

54. Brinton CC. The Structure, Function, Synthesis and Genetic Control of Bacterial Pili and a Molecular Model for Dna and Rna Transport in Gram Negative Bacteria*. Trans N Y Acad Sci. 1 juin 1965;27(8 Series II):1003-54.

55. Fader RC, Davis CP. Effect of piliation on Klebsiella pneumoniae infection in rat bladders. Infect Immun. nov 1980;30(2):554-61.

56. Fader RC, Gondesen K, Tolley B, Ritchie DG, Moller P. Evidence that in vitro adherence of Klebsiella pneumoniae to ciliated hamster tracheal cells is mediated by type 1 fimbriae. Infect Immun. nov 1988;56(11):3011-3.

57. Clegg S, Gerlach GF. Enterobacterial fimbriae. J Bacteriol. mars 1987;169(3):934-8.

58. Korhonen TK, Tarkka E, Ranta H, Haahtela K. Type 3 fimbriae of Klebsiella sp.: molecular characterization and role in bacterial adhesion to plant roots. J Bacteriol. août 1983;155(2):860-5.

59. 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.

60. 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.

61. Tarkkanen A-M, Allen BL, Westerlund B, Holthöfer H, Kuusela P, Risteli L, et al. Type V collagen as the target for type-3 fimbriae, enterobacterial adherence organelles. Mol Microbiol. 1 août 1990;4(8):1353-61.

62. Murphy CN, Mortensen MS, Krogfelt KA, Clegg S. Role of Klebsiella pneumoniae type 1 and type 3 fimbriae in colonizing silicone tubes implanted into the bladders of mice as a model of catheter-associated urinary tract infections. Infect Immun. août 2013;81(8):3009-17.

63. Murphy CN, Clegg S. Klebsiella pneumoniae and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. Future Microbiol. août 2012;7(8):991-1002.

64. Taylor PW. Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against gram-negative bacteria. Microbiol Rev. mars 1983;47(1):46-83.

65. Clements A, Gaboriaud F, Duval JFL, Farn JL, Jenney AW, Lithgow T, et al. The Major Surface-Associated Saccharides of Klebsiella pneumoniae Contribute to Host Cell Association. PLoS ONE [Internet]. 26 nov 2008 [cité 31 août 2015];3(11). Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2583945/

66. Hsieh P-F, Liu J-Y, Pan Y-J, Wu M-C, Lin T-L, Huang Y-T, et al. Klebsiella pneumoniae Peptidoglycan-Associated Lipoprotein and Murein Lipoprotein Contribute to Serum Resistance, Antiphagocytosis, and Proinflammatory Cytokine Stimulation. J Infect Dis. 15 nov 2013;208(10):1580-9.

67. Hsieh P-F, Lin T-L, Yang F-L, Wu M-C, Pan Y-J, Wu S-H, et al. Lipopolysaccharide O1 Antigen Contributes to the Virulence in Klebsiella pneumoniae Causing Pyogenic Liver Abscess. PLoS ONE [Internet]. 12 mars 2012 [cité 1 sept 2015];7(3). Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3299736/

68. Vinogradov E, Perry MB. Structural analysis of the core region of the lipopolysaccharides from eight serotypes of Klebsiella pneumoniae. Carbohydr Res. oct 2001;335(4):291-6.

69. Bullen JJ, Rogers HJ, Griffiths E. Role of iron in bacterial infection. Curr Top Microbiol Immunol. 1978;80:1-35.

70. Payne SM. Iron and virulence in the family Enterobacteriaceae. Crit Rev Microbiol. 1988;16(2):81-111.

71. Miles AA, Khimji PL. Enterobacterial chelators of iron: their occurrence, detection, and relation to pathogenicity. J Med Microbiol. nov 1975;8(4):477-90.

72. Nassif X, Sansonetti PJ. Correlation of the virulence of Klebsiella pneumoniae K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin. Infect Immun. déc 1986;54(3):603-8.

73. Khimji PL, Miles AA. Microbial iron-chelators and their action on Klebsiella infections in the skin of guinea-pigs. Br J Exp Pathol. avr 1978;59(2):137-47.

74. Carpenter JL. Klebsiella Pulmonary Infections: Occurrence at One Medical Center and Review. Rev Infect Dis. 7 janv 1990;12(4):672-82.

75. Acheampong D. O. BLK. Occurrence and species distribution of Klebsiella isolates: A case study at Komfo Anokye Teaching Hospital (KATH) in Ghana. Adv Appl Sci Res. 2011;2:187-93.

76. Austrian R. Concerning Friedländer, Gram and the Etiology of Lobar Pneumonia, an Historical Note. Trans Am Clin Climatol Assoc. 1960;71:142-9.

77. Ko W-C, Paterson DL, Sagnimeni AJ, Hansen DS, Von Gottberg A, Mohapatra S, et al. Community-acquired Klebsiella pneumoniae bacteremia: global differences in clinical patterns. Emerg Infect Dis. févr 2002;8(2):160-6.

78. Brisse S, van Duijkeren E. Identification and antimicrobial susceptibility of 100 Klebsiella animal clinical isolates. Vet Microbiol. 25 févr 2005;105(3–4):307-12.

79. De Champs C, Vellin JF, Diancourt L, Brisse S, Kemeny JL, Gilain L, et al. Laryngeal scleroma associated with Klebsiella pneumoniae subsp. ozaenae. J Clin Microbiol. nov 2005;43(11):5811-3.

80. Medina L, Benazzo M, Bertino G, Montecucco CM, Danesino C, Martinetti M, et al. Clinical, genetic and immunologic analysis of a family affected by ozena. Eur Arch Otorhinolaryngol. 26 mars 2003;260(7):390-4.

81. Bist SS, Bisht M, Purohit JP. Primary Atrophic Rhinitis: A Clinical Profile, Microbiological and Radiological Study. ISRN Otolaryngol [Internet]. 19 nov 2012 [cité 4 sept 2015];2012. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3671697/

82. J L Ferguson TVM. Effect of Klebsiella Ozaenae on Ciliary Activity In Vitro: Implications in the Pathogenesis of Atrophic Rhinitis. Otolaryngol--Head Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg. 1990;102(3):207-11.

83. Goldstein EJ, Lewis RP, Martin WJ, Edelstein PH. Infections caused by Klebsiella ozaenae: a changing disease spectrum. J Clin Microbiol. oct 1978;8(4):413-8.

84. Gaillard J, Haguenauer JP, Romanet P, Dubreuil C, Seguinard M. [Laryngeal subglottic localization of rhinoscleroma]. J Fr Oto-Rhino-Laryngol Audiophonol Chir Maxillo-Faciale. mai 1979;28(5):319, 321-2.

85. Ben Gamra O, Zribi S, Hriga I, Chiraz null, Mbarek null, Khedim A El. [Rhinoscleroma]. Tunis Médicale. déc 2006;84(12):833-6.

86. Amoils CP, Shindo ML. Laryngotracheal manifestations of rhinoscleroma. Ann Otol Rhinol Laryngol. mai 1996;105(5):336-40.

87. 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.

88. Seki M, Gotoh K, Nakamura S, Akeda Y, Yoshii T, Miyaguchi S, et al. Fatal sepsis caused by an unusual Klebsiella species that was misidentified by an automated identification system. J Med Microbiol. 1 mai 2013;62(5):801-3.

89. Berry GJ, Loeffelholz MJ, Williams-Bouyer N. An Investigation into Laboratory Misidentification of a Bloodstream Klebsiella variicola Infection. J Clin Microbiol. août 2015;53(8):2793-4.

90. Gorkiewicz G. Nosocomial and antibiotic-associated diarrhoea caused by organisms other than Clostridium difficile. Int J Antimicrob Agents. mars 2009;33, Supplement 1:S37-41.

91. Savino F, Cordisco L, Tarasco V, Calabrese R, Palumeri E, Matteuzzi D. Molecular identification of coliform bacteria from colicky breastfed infants. Acta Pædiatrica. 1 oct 2009;98(10):1582-8.

92. Darby A, Lertpiriyapong K, Sarkar U, Seneviratne U, Park DS, Gamazon ER, et al. Cytotoxic and Pathogenic Properties of Klebsiella oxytoca Isolated from Laboratory Animals. PLoS ONE [Internet]. 24 juill 2014 [cité 4 sept 2015];9(7). Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4109914/

93. Suthers E, Rosenstengel A, Hart J, Lewis JR, Kay I, Waterer G, et al. Pleural empyema caused by Klebsiella oxytoca: A case series. Respirology. 1 avr 2015;20(3):507-9.

94. Zollner-Schwetz I, Högenauer C, Joainig M, Weberhofer P, Gorkiewicz G, Valentin T, et al. Role of Klebsiella oxytoca in Antibiotic-Associated Diarrhea. Clin Infect Dis. 11 janv

2008;47(9):e74-8.

95. Högenauer C, Langner C, Beubler E, Lippe IT, Schicho R, Gorkiewicz G, et al. Klebsiella oxytoca as a Causative Organism of Antibiotic-Associated Hemorrhagic Colitis. N Engl J Med. 7 déc 2006;355(23):2418-26.

96. Cheng VCC, Yam W-C, Tsang L-L, Yau MCY, Siu GKH, Wong SCY, et al. Epidemiology of Klebsiella oxytoca-associated diarrhea detected by Simmons citrate agar supplemented with inositol, tryptophan, and bile salts. J Clin Microbiol. mai 2012;50(5):1571-9.

97. Herzog KAT, Schneditz G, Leitner E, Feierl G, Hoffmann KM, Zollner-Schwetz I, et al. Genotypes of Klebsiella oxytoca Isolates from Patients with Nosocomial Pneumonia Are Distinct from Those of Isolates from Patients with Antibiotic-Associated Hemorrhagic Colitis. J Clin Microbiol. mai 2014;52(5):1607-16.

98. 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.

99. Kharsany AB, Hoosen AA, Kiepiela P, Kirby R, Sturm AW. Phylogenetic analysis of Calymmatobacterium granulomatis based on 16S rRNA gene sequences. J Med Microbiol. sept 1999;48(9):841-7.

100. Goldberg J. Studies on granuloma inguinale. V. Isolation of a bacterium resembling Donovania granulomatis from the faeces of a patient with granuloma inguinale. Br J Vener Dis. juin 1962;38:99-102.

101. Richens J. Donovanosis (granuloma inguinale). Sex Transm Infect. déc 2006;82 Suppl 4:iv21-2.

102. Clyti E, Pradinaud R. Donovanose. EMC - Mal Infect. févr 2004;1(1):2-9.

103. Velho PENF, Souza EM de, Belda Junior W. Donovanosis. Braz J Infect Dis Off Publ Braz Soc Infect Dis. déc 2008;12(6):521-5.

104. Henriques IS, Fonseca F, Alves A, Saavedra MJ, Correia A. Occurrence and diversity of integrons and beta-lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. Res Microbiol. déc 2006;157(10):938-47.

105. Morais VP, Daporta MT, Bao AF, Campello MG, Andrés GQ. Enteric Fever-Like Syndrome Caused by Raoultella ornithinolytica (Klebsiella ornithinolytica). J Clin Microbiol. 3 janv 2009;47(3):868-9.

106. Kanki M, Yoda T, Tsukamoto T, Shibata T. Klebsiella pneumoniae Produces No Histamine: Raoultella planticola and Raoultella ornithinolytica Strains Are Histamine Producers. Appl Environ Microbiol. juill 2002;68(7):3462-6.

107. Nakasone ES, Kaneshiro R, Min K, Tokeshi J. Emergence of Raoultella ornithinolytica on O'ahu: A Case of Community-acquired R. ornithinolytica Urinary Tract Infection. Hawaii J Med Public Health J Asia Pac Med Public Health. mai 2015;74(5):174-5.

108. Chun S, Yun JW, Huh HJ, Lee NY. Low virulence? Clinical characteristics of

Raoultella planticola bacteremia. Infection. oct 2014;42(5):899-904.

109. Solak Y, Gul EE, Atalay H, Genc N, Tonbul HZ. A rare human infection of Raoultella ornithinolytica in a diabetic foot lesion. Ann Saudi Med. févr 2011;31(1):93-4.

110. Chun S, Yun JW, Huh HJ, Lee NY. Clinical characteristics of Raoultella ornithinolytica bacteremia. Infection. févr 2015;43(1):59-64.

111. Haruki Y, Hagiya H, Sakuma A, Murase T, Sugiyama T, Kondo S. Clinical characteristics of Raoultella ornithinolytica bacteremia: a case series and literature review. J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother. sept 2014;20(9):589-91.

112. García-Lozano T, Pascual Plá FJ, Aznar Oroval E. [Raoultella ornithinolytica in urinary tract infections. Clinical and microbiological study of a series of 4 oncologic patients]. Med Clínica. 4 août 2013;141(3):138-9.

113. Schmutz N, Adler T, Schelhorn N, Wirz S, Fricker R. [Postoperative Osteomyelitis of a Distal Phalanx Caused by Raoultella ornithinolytica]. Handchir Mikrochir Plast Chir Organ Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft Handchir Organ Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft Mikrochir Peripher Nerven Gefasse Organ V. 19 mai 2015;

114. Kaya S, Bayramoğlu G, Sönmez M, Köksal İ. Raoultella ornithinolytica causing fatal sepsis. Braz J Infect Dis Off Publ Braz Soc Infect Dis. avr 2015;19(2):230-1.

115. Ershadi A, Weiss E, Verduzco E, Chia D, Sadigh M. Emerging pathogen: a case and review of Raoultella planticola. Infection. déc 2014;42(6):1043-6.

116. Podschun R. Isolation of Klebsiella terrigena from human feces: biochemical reactions, capsule types, and antibiotic sensitivity. Zentralblatt Für Bakteriol Int J Med Microbiol. avr 1991;275(1):73-8.

117. O' Connell K, Kelly J, Niriain U. A Rare Case of Soft-Tissue Infection Caused by Raoultella planticola. Case Rep Med. 2010;2010.

118. Kim S-H, Roh KH, Yoon YK, Kang DO, Lee DW, Kim MJ, et al. Necrotizing fasciitis involving the chest and abdominal wall caused by Raoultella planticola. BMC Infect Dis. 17 mars 2012;12:59.

119. Alves MS, Riley LW, Moreira BM. A case of severe pancreatitis complicated by Raoultella planticola infection. J Med Microbiol. mai 2007;56(Pt 5):696-8.

120. Yokota K, Gomi H, Miura Y, Sugano K, Morisawa Y. Cholangitis with septic shock caused by Raoultella planticola. J Med Microbiol. mars 2012;61(Pt 3):446-9.

121. Puerta-Fernandez S, Miralles-Linares F, Sanchez-Simonet MV, Bernal-Lopez MR, Gomez-Huelgas R. Raoultella planticola bacteraemia secondary to gastroenteritis. Clin Microbiol Infect. mai 2013;19(5):E236-7.

122. Podschun R, Fischer A, Ullman U. Expression of putative virulence factors by clinical isolates of Klebsiella planticola. J Med Microbiol. févr 2000;49(2):115-9.

123. 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.

124. izard D, Ferragut C, Gavini F, Kersters K, De Ley J, Leclerc H. Klebsiella terrigena, a new species from soil and water. Int J Syst Bacteriol. 1981;31:116-27.

125. Goegele H, Ruttmann E, Aranda-Michel J, Kafka R, Stelzmueller I, Hausdorfer H, et al. Fatal endocarditis due to extended spectrum betalactamase producing Klebsiella terrigena in a liver transplant recipient. Wien Klin Wochenschr. 2007;119(11-12):385-6.

126. Shaikh MM, Morgan M. Sepsis caused by Raoultella terrigena. JRSM Short Rep. juin 2011;2(6):49.

127. Park JS, Hong KH, Lee HJ, Choi SH, Song SH, Song K-H, et al. Evaluation of three phenotypic identification systems for clinical isolates of Raoultella ornithinolytica. J Med Microbiol. avr 2011;60(Pt 4):492-9.

128. Hansen DS, Aucken HM, Abiola T, Podschun R. Recommended Test Panel for Differentiation of Klebsiella Species on the Basis of a Trilateral Interlaboratory Evaluation of 18 Biochemical Tests. J Clin Microbiol. 8 janv 2004;42(8):3665-9.

129. Boye K, Hansen DS. Sequencing of 16S rDNA of Klebsiella: taxonomic relations within the genus and to other Enterobacteriaceae. Int J Med Microbiol IJMM. févr 2003;292(7-8):495-503.

130. Monnet D, Freney J, Brun Y, Boeufgras JM, Fleurette J. Difficulties in identifying Klebsiella strains of clinical origin. Zentralblatt Für Bakteriol Int J Med Microbiol. janv 1991;274(4):456-64.

131. Walckenaer E, Leflon-Guibout V, Nicolas-Chanoine M-H. How to identify Raoultella spp. including R. ornithinolytica isolates negative for ornithine decarboxylase? The reliability of the chromosomal bla gene. J Microbiol Methods. déc 2008;75(3):405-10.

132. Schumann P, Maier T. Chapter 13 - MALDI-TOF Mass Spectrometry Applied to Classification and Identification of Bacteria. In: Michael Goodfellow IS and JC, éditeur. Methods in Microbiology [Internet]. Academic Press; 2014 [cité 15 sept 2015]. p. 275-306. Disponible sur: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0580951714000063

133. Gravet A, Gessier M. Spectrométrie de masse et microbiologie. Immuno-Anal Biol Spéc. oct 2013;28(5–6):297-308.

134. de Jong E, de Jong AS, Smidts-van den Berg N, Rentenaar RJ. Differentiation of Raoultella ornithinolytica/planticola and Klebsiella oxytoca clinical isolates by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. Diagn Microbiol Infect Dis. avr 2013;75(4):431-3.

135. Saffert RT, Cunningham SA, Ihde SM, Jobe KEM, Mandrekar J, Patel R. Comparison of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometer to BD Phoenix automated microbiology system for identification of gram-negative bacilli. J Clin Microbiol. mars 2011;49(3):887-92.

136. Walckenaer E, Poirel L, Leflon-Guibout V, Nordmann P, Nicolas-Chanoine M-H. Genetic and Biochemical Characterization of the Chromosomal Class A β-Lactamases of Raoultella (formerly Klebsiella) planticola and Raoultella ornithinolytica. Antimicrob Agents

Chemother. 1 janv 2004;48(1):305-12.

137. Walckenaer E, Delmas J, Nicolas-Chanoine M-H. Genetic, biochemical characterization and mutagenesis of the chromosomal class A b-lactamase of Raoultella (formerly Klebsiella) terrigena. Pathol Biol. 2015;6.

138. Castanheira M, Deshpande LM, DiPersio JR, Kang J, Weinstein MP, Jones RN. First descriptions of blaKPC in Raoultella spp. (R. planticola and R. ornithinolytica): report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. J Clin Microbiol. déc 2009;47(12):4129-30.

139. Xu M, Xie W, Fu Y, Zhou H, Zhou J. Nosocomial pneumonia caused by carbapenem-resistant Raoultella planticola: a case report and literature review. Infection. avr 2015;43(2):245-8.

140. API20E.pdf [Internet]. [cité 8 sept 2015]. Disponible sur: http://www.techmicrobio.eu/documentation_fabricants/Biomerieux%20et%20API/API%20et%20ID%20galeries/API20E/API20E.pdf

141. Dauga C. Evolution of the gyrB gene and the molecular phylogeny of Enterobacteriaceae: a model molecule for molecular systematic studies. Int J Syst Evol Microbiol. mars 2002;52(Pt 2):531-47.

142. lebibi Quick BioInformatic Phylogeny of Prokaryotes [Internet]. [cité 22 sept 2015]. Disponible sur: https://umr5558-bibiserv.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi

143. Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, et al. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. Nucleic Acids Res. 1 juill 2008;36(Web Server issue):W465-9.

144. Dereeper A, Audic S, Claverie J-M, Blanc G. BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. BMC Evol Biol. 2010;10:8.

145. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 11 nov 1994;22(22):4673-80.

146. Castresana J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. Mol Biol Evol. avr 2000;17(4):540-52.

147. Elias I, Lagergren J. Fast computation of distance estimators. BMC Bioinformatics. 2007;8:89.

Titre de la Thèse : Evaluation de la spectrométrie de masse MALDI-ToF et du séquençage multi-génique pour l'identification des *Raoultella* en bactériologie médicale.

Mots-clés : *Raoultella, Klebsiella,* MALDI-ToF, Identification génomique, *gyrB, rpo, speF*.

Résumé :

Introduction : La taxonomie du genre *Klebsiella* est en perpétuel renouvèlement. Sur la base du séquençage des gènes de l'ARN 16S et *rpoB,* il a été proposé une modification de combinaison avec un reclassement en deux genres disctincts du genre *Klebsiella* avec la description du nouveau genre *Raoultella. Raoultella ornithinolytica* est positive pour l'ODC. Cependant les espèces du genre *Raoultella* restent difficiles à identifier tant par des systèmes d'identification phénotypiques que plus récemment par la spectrométrie de masse MALDI-ToF.

Matériels et méthodes : trente isolats cliniques initialement identifiés comme *R. ornithinolytica* par MALDI-Biotyper ont été soumis à une identification par galerie API 20E et par séquençage des gènes *rpoB, gyrB, speF*.

Résultats : Seuls deux isolats étaient ODC positifs**.** Aucun isolat clinique de *R. planticola* n'est d'identification certaine par MALDI-Biotyper. *R. ornithinolytica* et *K. oxytoca* sont difficilement discriminées. Le séquençage bigénique *rpoB* et g*yrB* permet une identification robuste de ces deux espèces et la sudivision de *Klebsiella oxytoca* en plusieurs phylo-groupes. L'analyse du gène *speF* confirme l'hétérogénicité des isolats de *R. ornithinolytica* constaté sur l'ODC variable.

Discussion : L'ODC n'est pas un caractère fiable pour la confirmation de l'identification de *R. ornithinolytica* en routine. Le gène *rpoB* seul n'est pas suffisamment discriminant pour identifier le genre *Raoultella*. Il doit être complété par le gène *gyrB.* La construction d'une base utilisateur à partir des souches correctement caractérisées devrait permettre une identification fiable en routine.

Evaluation of the MALDI-ToF mass spectrometry and multilocus sequencing for identification of *Raoultella* in medical bacteriology.

Keywords: *Raoultella, Klebsiella*, MALDI-ToF, genomic identification, *rpoB, gyrB, speF*.

Introduction: The taxonomy of the genus *Klebsiella* is in perpetual renewal. Based on the gene sequencing of 16S rRNA and *rpoB,* it was proposed a change in combination with a reclassification in two disctincts *genus* for *Klebsiella genus* with the description of the new *genus Raoultella*. *Raoultella ornithinolytica* is positive for the ODC. However, the species of *genus Raoultella* are difficult to identify by phenotypic identification systems and more recently by MALDI-ToF mass spectrometry.

Materials and Methods: thirty clinical isolates initially identified as *R. ornithinolytica* by MALDI-Biotyper were subjected to identification API 20E strip and by sequencing the *rpoB, gyrB,* and *speF* genes.

Results: Only two isolates were positives ODC. No clinical isolate of *R. planticola* is correctly identified by MALDI-ToF. *R. ornithinolytica* and *K. oxytoca* are hardly discriminated. Bi-locus sequencing *gyrB* and *rpoB* allows robust identification of these two species and *Klebsiella oxytoca* sudivision into several phylogroups. Analysis of *speF* gene confirms the heterogeneity of *R. ornithinolytica* isolates found on variable ODC.

Discussion: The ODC is not a reliable character for the confirmation of the identification of *R. ornithinolytica* routinely. The *rpoB* gene alone is not sufficiently discriminating to identify the *genus Raoultella*. It should be completed by the *gyrB* sequencing. Building a user base from properly characterized strains should allow reliable identification routine.