

## SIGLES ET ABREVIATIONS

<b>AB</b>	: Collection du département de Bactériologie, Copenhague, Danemark
<b>ADH</b>	: Arginine dihydrolase
<b>ADN</b>	: Acide désoxyribonucléique
<b>AIC</b>	: Akaike's Information Criterion
<b>API</b>	: Appareil et Procédés d'Identification
<b>ARN</b>	: Acide ribonucléique
<b>ATCC</b>	: American Type Culture Collection, Maryland USA
<b>BA</b>	: MBL de <i>B. anthracis</i>
<b>BCII</b>	: MBL de <i>B. cereus</i>
<b>BIC</b>	: Critères d'information Bayésien
<b>BIC</b>	: Bayesian Information Criterion
<b>BlaB</b>	: MBL de <i>E. (anciennement Chryseobacterium) meningoseptica</i>
<b>BLSE</b>	: bêta-lactamase à spectre élargi
<b>BMR</b>	: Bactéries Multi-résistantes
<i>C. balustinum</i>	: <i>Chryseobacterium balustinum</i>
<i>C. gleum</i>	: <i>Chryseobacterium gleum</i>
<i>C. indologenes</i>	: <i>Chryseobacterium indologenes</i>
<i>C. indoltheticum</i>	: <i>Chryseobacterium indoltheticum</i>
<i>C.meningosepticum</i>	: <i>Chryseobacterium meningosepticum</i>
<i>C. scophthalmum</i>	: <i>Chryseobacterium scophthalmum</i>
<b>CA-SFM</b>	: Comité d'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
<b>CAT</b>	: Chloramphénicol acétyltransférase
<b>CCGU</b>	: Collection de Culture de l'université de Göteborg
<b>CDC</b>	: Centers for Disease Control and Prevention
<b>CFB</b>	: <i>Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides</i>
<b>CFU</b>	: Colonies Formant Unité
<b>CGB</b>	: MBL de <i>Chryseobacterium Gleum</i>
<b>CGB-1</b>	: MBL de <i>C. gleum</i>
<b>CHNU</b>	: Centre Hospitalier National Universitaire
<b>CLED</b>	: Cystéine, Lactose, Electrolyte déficient
<b>CLIN</b>	: Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales.
<b>CMI</b>	: Concentration Minimale Inhibitrice
<b>CphA</b>	: MBL de <i>A. hydrophila</i>
<b>CSF</b>	: Cerebro Spinal Fluid (LCR)
<b>CW</b>	: Gélose <i>Clostridium welchii</i>
<b>DGU</b>	: Dénombrement des Germes Urinaires
<b>EDTA</b>	: Ethylene-Di-amine-Tetra-acetic acid
<i>F. balustinum</i>	: <i>Flavobacterium balustinum</i>
<i>F. breve</i>	: <i>Flavobacterium breve</i>
<i>F. gleum</i>	: <i>Flavobacterium gleum</i>
<i>F. indologenes</i>	: <i>Flavobacterium indologenes</i>
<i>F. indoltheticum</i>	: <i>Flavobacterium indoltheticum</i>
<i>F.meningosepticum</i>	: <i>Flavobacterium meningosepticum</i>
<i>F. mizutae</i>	: <i>Flavobacterium mizutae</i>
<i>F. multivorum</i>	: <i>Flavobacterium multivorum</i>
<i>F. odoratum</i>	: <i>Flavobacterium odoratum</i>
<i>F. spiritivorum</i>	: <i>Flavobacterium spiritivorum</i>
<i>F. thalophilum</i>	: <i>Flavobacterium thalophilum</i>

<b><i>F. yabuuchiae</i></b>	: <i>Flavobacterium yabuuchiae</i>
<b>FEZ-1</b>	: MBL de <i>Legionella gormannii</i>
<b>GCS</b>	: Classification de Galsgow
<b>GIFU</b>	: Departement of Microbiology, University School of Medicine, Japan
<b>GLG</b>	: G. L. Gilardi
<b>GOB-1</b>	: MBL de <i>E. (anciennement Chryseobacterium) meningoseptica</i> ,
<b>HALD</b>	: Hôpital Aristide Le Dantec
<b>HO</b>	: Helge Olsen
<b>IN</b>	: Infections Nosocomiales
<b>IND</b>	: MBL de Chryseobacterium INDologenes
<b>IND-1</b>	: MBL de <i>C. indologenes</i>
<b>JCM</b>	: Japan Collection of Microorganisms, Saitama
<b>KOH</b>	: Potasse (K+, OH-)
<b>L1</b>	: MBL de <i>S. maltophilia</i>
<b>LB</b>	: Luria-Bertani.
<b>LBV</b>	: Laboratoire de Bactériologie-Virologie.
<b>LDC</b>	: Lysine décarboxylase
<b>LMC</b>	: Leucémie Myéloïde Chronique
<b>MBL</b>	: Métallo-β-lactamase
<b>MALDI-TOF</b>	: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization
<b>Mb11B</b>	: MBL de <i>Caulobacter crescentus</i>
<b>MEVAG</b>	: Milieu d'Etudes de la Voie d'attaque du Glucose
<b>MH</b>	: Muller Hinton
<b>MUS-1</b>	: MBL de <i>Myroides spp.</i>
<b>NCTC</b>	: National Collection of Type Cultures
<b>ODC</b>	: Ornithine Décarboxylase
<b>OMS</b>	: Organisation Mondiale de la Santé
<b>ONPG</b>	: Orto-Nitro-Phényl-Galactoside
<b>PFGE</b>	: Genotyping by pulsed-field gel electrophoresis
<b>PVD</b>	: Pays en Voie de Développement
<b><i>R. anatipestifer</i></b>	: <i>Riemeriella anatipestifer</i>
<b>RLR</b>	: Ratio de Liaison Relative
<b>SENTRY</b>	: Programme de surveillance de la résistance antimicrobienne (1997-2001)
<b>SFH-1</b>	: MBL de <i>Serratia fonticola</i>
<b>SHV</b>	: BLSE Sulphydryl-Variable
<b>TCBS</b>	: Thiosulfate-Citrate-Bile-Sucrose
<b>TEM</b>	: BLSE produite par <i>E. coli</i> chez un patient Temoneria
<b>THIN-B</b>	: MBL de <i>Janthinobacterium lividum</i>
<b>TSB</b>	: Trypticase Soja Broth
<b>TUS-1</b>	: MBL de <i>Myroides spp</i>
<b>UPGMA</b>	: Unweighted pair group method with arithmetic mean
<b>VIH</b>	: Virus de l'immunodéficience Humaine.
<b><i>W. virosa</i></b>	: <i>Weeksella virosa</i>
<b><i>W. zoohelcum</i></b>	: <i>Weeksella zoohelcum</i>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Dendrogramme illustrant les similarités sur la base de la séquence de l'ARNr cistronique des genres de la superfamille V .....	5
<b>Figure 2:</b> Arbre Phylogénétique sur la base des séquences d'ARN 16S ribosomal des grandes familles de bactéries. ....	7
<b>Figure 3:</b> Colonies jaunâtres de <i>Chryseobacterium indologenes</i> MARS15.....	9
<b>Figure 4:</b> Les colonies jaunâtres de <i>Chryseobacterium indologenes</i> virent au rouge par ajout d'une goutte de potasse (KOH) à 10% (Flexirubine).....	10
<b>Figure 5:</b> Relation entre les groupes génomiques et le groupe IIb de <i>Flavobacterium</i> et les espèces de <i>Flavobacterium</i> non humaines .....	19
<b>Figure 6:</b> AntibioGramme par diffusion en milieu gélosé. ....	23
<b>Figure 7:</b> <i>E. meningosepticum</i> (anciennement <i>Chryseobacterium</i> ). Détection de synergies inhabituelles par la méthode de diffusion utilisant les $\beta$ -lactamines.....	24
<b>Figure 8:</b> Arbre phylogénétique des MBLs Chromosomiques .....	28
<b>Figure 9:</b> Mise en évidence d'une MBL par la méthode de synergie. ....	31
<b>Figure 10:</b> Séquences d'acides aminés des IND-types enzymes de 10 <i>C. indologenes</i> .....	33
<b>Figure 11:</b> Comparaison des séquences d'acides aminés de IND-5.....	34
<b>Figure 12:</b> Alignement des séquences d'acides aminés de IND-1 à IND-6 .....	35
<b>Figure 13:</b> Arbre phylogénétique montrant les relations de IND-6 avec les autres MBLs .....	36
<b>Figure 14:</b> Structure cristalline du IND-7, obtenue par cristallographie aux rayons-X. ....	37
<b>Figure 15:</b> Comparaison des séquences d'acides aminés des IND-type- $\beta$ -lactamases de <i>Chryseobacterium indologenes</i> (IND-1 à IND-15) et <i>Chryseobacterium gleum</i> (CGB-1). ....	38
<b>Figure 16:</b> Arbre Phylogénétique génomique et diagramme de Venn .....	39
<b>Figure 17:</b> Du génotype au phénotype de <i>Chryseobacterium indologenes</i> MARS15. ....	41
<b>Figure 18:</b> Colonies jaunâtres de <i>C. indologenes</i> sur milieu MH. ....	51
<b>Figure 19:</b> Spectre de masse d'identification par MALDI TOF MS .....	52
<b>Figure 20:</b> Mise en évidence d'une MBL par la méthode de synergie . ....	54
<b>Figure 21:</b> Comparaison des séquences d'acides aminés de la MBL 6515 avec le CGB-1. ..	58
<b>Figure 22:</b> Dendrogrammes d'électrophorèse en champ pulsé des 07 souches.....	59
<b>Figure 23:</b> Alignement des séquences d'acides aminés des MBLs des 08 souches .....	64
<b>Figure 24:</b> Arbre d'analyse phylogénétique des 08 MBLs de nos souches .....	65
<b>Figure 25:</b> Représentation Tridimensionnelle de la structure cristalline du IND-7 .....	68

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I:</b> Espèces valides appartenant au genre <i>Chryseobacterium</i> .....	8
<b>Tableau II:</b> Informations épidémiologiques concernant les 12 isolats test des 2 espèces de <i>Flavobacterium</i> .....	12
<b>Tableau III:</b> Concentration en GC de l'ADN et valeur d'homologie ADN-ADN des 12 isolats de <i>Flavobacterium</i> . ....	14
<b>Tableau IV:</b> Caractères utiles pour différencier <i>F. indologenes</i> et <i>F. gleum</i> .....	16
<b>Tableau V:</b> Groupes et sous-groupes génomiques relatifs à l'ADN des bactéries du groupe IIb et <i>F. breve</i> . ....	17
<b>Tableau VI:</b> Caractères positifs et négatifs pour tous les groupes de <i>Flavobacterium</i> IIb et <i>F. breve</i> . ....	20
<b>Tableau VII:</b> Caractères différentiels des groupes génomiques de <i>Flavobacterium</i> du groupe IIb et <i>F. breve</i> . ....	21
<b>Tableau VIII:</b> Capacité de production de Biofilm bactérien des 15 souches de <i>C. gleum</i> dans 03 types de milieux .....	22
<b>Tableau IX:</b> Sensibilité habituelle de <i>E. meningosepticum</i> .....	25
<b>Tableau X:</b> Sensibilité aux $\beta$ -lactamines de 21 souches cliniques de <i>E.</i> (anciennement <i>Chryseobacterium</i> ) <i>meningoseptica</i> .....	26
<b>Tableau XI:</b> MBLs Chromosomiques.....	30
<b>Tableau XII:</b> CIM de $\beta$ -lactamines pour quelques MBLs. ....	40
<b>Tableau XIII:</b> Amorces utilisées pour l'amplification de polymérisation en chaîne PCR des gènes codant pour les MBLs IND et CGB.....	48
<b>Tableau XIV:</b> Profil de sensibilité aux antibiotiques de la souche 8029. Interprétation suivant les recommandations du CA-SFM. ....	53
<b>Tableau XV:</b> Identification d'une souche de <i>Chryseobacterium gleum</i> utilisant les systèmes API 20NE Version 7.0. ....	56
<b>Tableau XVI:</b> Profil de sensibilité aux antibiotiques de la souche 6515. Interprétation suivant les recommandations du CA-SFM. ....	57
<b>Tableau XVII:</b> Caractéristiques démographiques et cliniques des 08 souches, et leur identification suivant les critères du MALDI-TOF (Vitek 2), en comparaison avec l'identification par séquençage de l'ARN 16S ribosomal complétée par le séquençage du gène de résistance. ....	60
<b>Tableau XVIII:</b> Concentration minimale inhibitrice des antibiotiques pour <i>Chryseobacterium spp</i> et les metallo- $\beta$ -lactamase (MBL) correspondant.....	62



## TABLE DES MATIERES

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Première partie : Rappels bibliographiques</b>	
I. GENERALITES SUR LES <i>CHRYSEOBACTERIUM</i> .....	4
I.1. Historique.....	4
I.2. taxonomie (actuelle).....	6
I.3. Caractères bactériologiques .....	9
I.3.1. Examen direct .....	9
I.3.2. Caractères biochimiques .....	11
I.4. Caractères différentiels (Phénotypique et génotypique) de <i>F. indologenes</i> et <i>F. gleum</i> .....	12
I.5. Diversité génétique au sein du groupe IIb de <i>Flavobacterium</i> (actuellement <i>Chryseobacterium</i> ) et caractères différentiels utiles .....	16
I.5.1. Etude de la diversité génomique par Hybridation moléculaire ADN-ADN .....	16
I.5.2. Caractères phénotypiques différentiels .....	20
I.6. Pouvoir Pathogène .....	21
I.7. Résistance des bactéries du genre <i>Chryseobacterium</i> .....	23
I.7.1. Phénotypes sensibles.....	23
I.7.2. Les métallo-β-lactamases.....	27
I.7.3. Le résistome des bactéries du genre <i>Chryseobacterium</i> .....	40
<b>Deuxième partie : Analyse des travaux</b>	
I. PROBLEMATIQUE .....	42
I.1. Le problème global de la résistance aux antibiotiques .....	42
I.2. <i>Chryseobacterium</i> , un pathogène émergeant naturellement résistant aux carbapénèmes .....	43
II. CADRE DE L'ETUDE .....	44
II.1. Laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec .....	44
II.2. Dipartimento di Biotecnologie Mediche. Policlinico Le Scotte. Università di Siena ...	44
II.3. Centre d'Ingénierie des protéines de l'Université de Liège (Belgique) .....	45
III. OBJECTIFS .....	45
III.1. Objectif principal.....	45
III.2. Objectifs spécifiques .....	45
IV. METHODOLOGIE.....	46
IV.1. Informations démographiques et cliniques des patients/Bactéries .....	46

IV.2. Identification taxonomique par API 20NE, spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS) et par séquençage de l'ARN 16S ribosomal .....	46
IV.3. Amplification et séquençage des gènes codant pour les MBL .....	47
IV.4. Analyse clonale .....	48
IV.5. Antibiogramme et détection phénotypiques des MBLs .....	49
V. RESULTATS .....	50
V.1. Résultats article n°1 : <i>Chryseobacterium indologenes</i> chez une femme ayant une Leucémie aiguë au Sénégal .....	50
V.2. Résultats article n°2 : <i>Chryseobacterium gleum</i> chez un homme ayant subi une prostatectomie au Sénégal : Rapport de cas et revue de la littérature .....	55
V.3. Résultats article N°3 : Diversité Génétique des Métallo-β-lactamases des bactéries du genre <i>Chryseobacterium</i> . .....	58
V.3.1. Informations sur les patients et Epidémiologie moléculaire par Electrophorèse en champ pulsé .....	58
V.3.2. Sensibilité aux antibiotiques et type de MBL .....	61
V.3.3. Alignement des séquences des acides aminés des MBL des 08 souches et analyse phylogénétique des MBLs avec 49 MBLs disponible dans la GenBank .....	63
VI. DISCUSSION GENERALE .....	69
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	
<b>ANNEXES</b>	

## **Introduction**

Le genre *Chryseobacterium* (Chruseos, « Or » ; bacterium, « petite tige » : *Chryseobacterium*, « tige jaune », décrit pour la première fois par Vandamme et coll en 1994 [1] est composé d'au moins 45 espèces bactériennes valides. Ce sont des bactéries à Gram négatif, non fermentaires, omniprésentes dans la nature (eaux, sol) et rarement rencontrées en pathologie humaine. Le programme SENTRY de surveillance de la résistance bactérienne, au niveau de 119 hôpitaux en Amérique du Nord, en Europe, en Asie du Pacifique, révèle que les espèces du genre *Chryseobacterium* représentent seulement 0,03% de toutes les espèces bactériennes et 0,27% des bactéries à Gram négatif non fermentaires collectées pendant cinq années de 1997 à 2002 [2]. Des études environnementales révèlent qu'elles survivent dans les eaux potables traitées au chlore destinées à la consommation, et colonisent souvent les lavabos et les robinets, représentant un véritable réservoir d'infections nosocomiales en milieu hospitalier. La colonisation des patients, via les conduits d'eau des équipements hospitaliers (respirateurs artificiels, tubes d'intubations, les humidificateurs, les incubateurs en néonatalogie, les seringues, les perfuseurs,) et la contamination du matériel chirurgical (implants, prothèses) ont été rapportées [3 ; 4]. Agents pathogènes opportunistes, les bactéries du genre *Chryseobacterium* sont impliquées dans des méningites, des septicémies, des pneumonies, des endocardites, des infections oculaires et urinaires, dans la plupart des cas en néonatalogie et chez les patients immunodéprimés (cancer) [5-7]. Les espèces les plus fréquemment rencontrées sont *C. meningosepticum* appartenant actuellement au genre *Elizabethkingia*, *C. odoratum*, *C. multivorum*, *C. breve* et les bactéries du groupe IIb que sont *C. indologenes* et *C. gleum* [8 ; 9]. *C. meningosepticum* est l'espèce bactérienne la plus pathogène et la plus fréquemment isolée en pathologie humaine, suivie de *C. indologenes* et de *C. gleum* [2]. Les mécanismes de pathogénicité des bactéries du genre *Chryseobacterium* ne sont pas totalement élucidés. Cependant, la formation de biofilm au cours d'infections à bactéries des genres *Chryseobacterium* et *Elizabethkingia* a été rapportée [10].

Les espèces du genre *Chryseobacterium* sont rarement responsables d'infections chez l'homme, mais leur implication récente au cours d'infections nosocomiales au Taiwan, et dans d'autres pays (Etats-Unies d'Amérique, Australie, Inde), démontre leur importance croissante comme potentiels pathogènes humains [11-13]. Les défauts d'identification dans les laboratoires d'analyses médicales, peuvent expliquer aussi le faible taux de cas publiés d'infections à *Chryseobacterium spp.* En effet, les galeries api 20 NE (bioMérieux®) d'identification basée sur les caractères biochimiques manquent souvent d'efficacité pour l'identification au niveau espèces de ces bactéries. L'introduction récente de l'identification bactérienne par spectrométrie de masse (MALDI-TOF), suivie du séquençage ARN 16S

ribosomal, permet une identification rapide et précise au niveau espèce des bactéries du genre *Chryseobacterium*.

Malgré leur faible virulence, les bactéries du genre *Chryseobacterium* sont résistantes à plusieurs classes d'antibiotiques y compris les carbapénèmes, qui représentent des antibiotiques à large spectre extrêmement utiles pour le traitement d'infections dues à des bactéries multi-résistantes, donc de fait considéré comme antibiotiques de dernier recours. La résistance aux carbapénèmes est due à la production d'une enzyme hydrolytique, une métallo- $\beta$ -lactamase (MBL) appartenant au groupe B de la classification de Ambler et codée par différents gènes, *bla*<sub>IND</sub> pour *Chryseobacterium* **IND**ologenes, *bla*<sub>CGB</sub> pour *Chryseobacterium* **G**leum (Enzyme de classe B, à l'instar du *bla*<sub>CGA</sub> enzyme de classe A), respectivement. Ces métallo- $\beta$ -lactamases (IND, CGB) sont caractérisées par une diversité génétique importante, et seize types de MBL IND ont été décrits à ce jour, dont le dernier, IND-16 en chine en 2016 [14].

Les métallo- $\beta$ -lactamases représentent d'importants mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines (antibiotiques les plus couramment utilisés en chimiothérapie antibactérienne), en particulier en considération de (a) leur très large spectre d'activité y compris les carbapénèmes, et (b) du fait qu'en raison de leurs différences structurales et catalytiques avec les  $\beta$ -lactamases à sérine active, aucun inhibiteur de ces enzymes n'est actuellement disponible (au contraire des  $\beta$ -lactamases à sérine active pour lesquels des inhibiteurs spécifiques ont permis le développement de combinaisons antibactériennes telles que amoxicilline-acide clavulanique ou plus récemment ceftazidime- avibactam).

Ces caractéristiques font des bactéries du genre *Chryseobacterium* un pathogène émergent d'importance croissante. Les infections urinaires dues à des souches de *C. indologenes* ont été décrites au Burkina Faso, en Inde et en Espagne [13-16]. Au Sénégal, deux cas de méningites dues à une espèce apparentée *Flavobacterium meningosepticum* (actuellement, *Elizabethkingia meningosepticum*) ont été décrits à la fin des années soixante-dix [17], mais *Chryseobacterium indologenes* n'avait jamais été rapportée. Nous venons de publier récemment une souche de *C. indologenes* multirésistante aux antibiotiques au Sénégal, qui représente le deuxième cas en Afrique, si l'on considère celui du Burkina Faso en 2009, et le troisième cas a été publié en Tunisie en 2015 [18 ; 19]. Le monitoring des infections à *Chryseobacterium* à l'hôpital Aristide Le Dantec a permis d'isoler la première souche de *Chryseobacterium gleum* en Afrique, et six autres souches de *C. indologenes* dont deux hébergent de nouveaux variants du gène IND, non encore décrits. La caractérisation moléculaire de ces souches de *Chryseobacterium* multi-résistantes aux

antibiotiques représente le principal objectif de notre travail avec pour objectifs spécifiques de réaliser **i) la caractérisation phénotypique et moléculaire des souches de *Chryseobacterium*** : Huit (08) isolats non-consécutifs isolés de patients hospitalisés au Centre Hospitalier National Universitaire (CHNU) Aristide Le Dantec de Dakar, Sénégal entre 2013 et 2015, **ii) le clonage, production et purification de métallo-bêta-lactamase, iii) la caractérisation fonctionnelle de la métallo-bêta-lactamase purifiée.**

La présente thèse sera structurée en deux parties ; la première partie sera consacrée aux généralités sur les bactéries du genre *Chryseobacterium* et la seconde partie portera sur le travail expérimental contenant les articles publiés.

## **Première partie : Rappels bibliographiques**

## I. GENERALITES SUR LES *CHRYSEOBACTERIUM*

### I.1. Historique

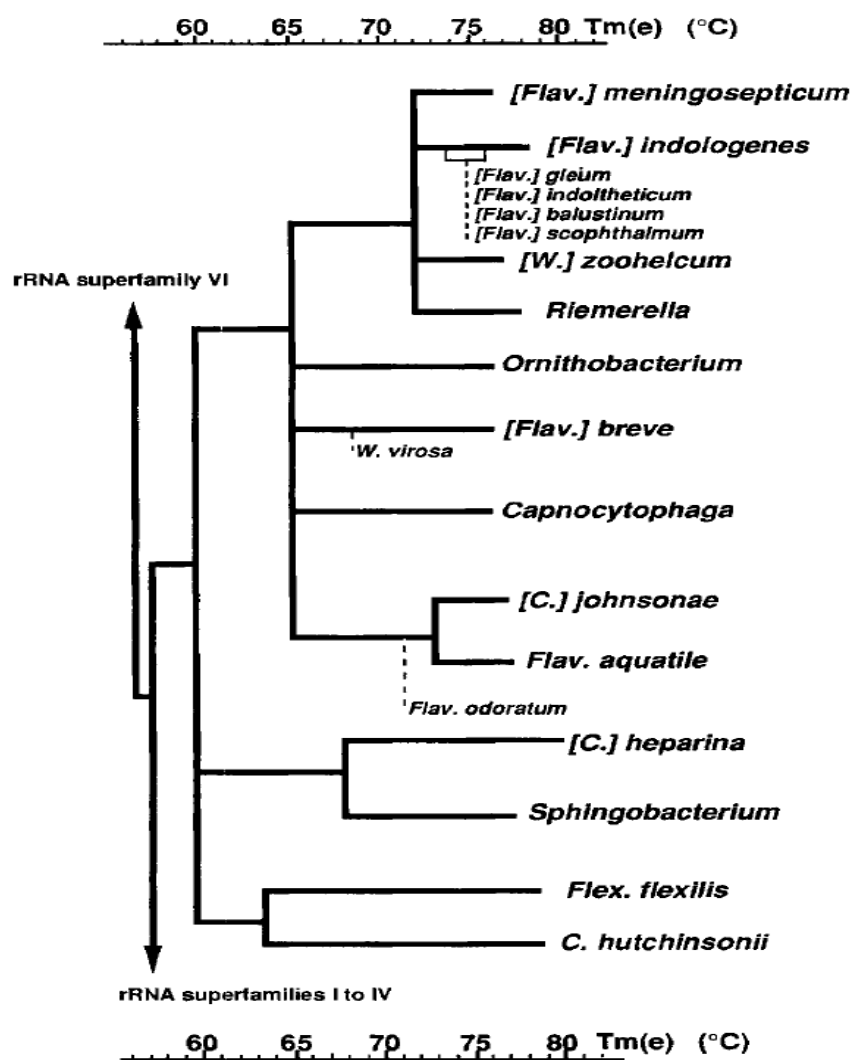
A l'instar des autres anciens genres bactériens, le genre *Flavobacterium* fondé sur des critères taxonomiques de faible importance, a connu une profonde mutation. Ce genre mal défini, est composé de bactéries à pigmentation jaune souvent sans lien génétique tel que défini par les méthodes génomiques actuelles de classification. Tout au long de son histoire, le genre *Flavobacterium* a connu des restrictions et des refontes à plusieurs reprises et la plupart des Flavobactéries connues ont été reclassifiées [20]. Le genre *Flavobacterium* définit vers 1990, dans « Bergey's manual of systematic Bacteriology » fut composé de 7 (sept) espèces différentes [21]. *Flavobacterium aquatile* (espèce type), *F. balustinum*, *F. breve*, *F. meningosepticum*, *F. multivorum*, *F. odoratum* et *F. spiritivorum*. L'espèce type a fait l'objet de plusieurs discussions. L'isolat qui représente le taxon, ne provient ni de la culture originale telle que décrite par Frankland et coll [22] et ne correspond pas à la description originale. Dès lors que cet isolat de *F. aquatile* ne peut être considéré représentatif du taxon, pour plusieurs raisons, Holmes et Owen avaient proposé son remplacement par *F. breve* comme espèce type du genre *Flavobacterium* [20]. Cette proposition avait été rejetée par la commission judiciaire du Comité International de Systématique Bactérienne du fait de l'absence d'une confusion importante si *F. aquatile* est retenu comme espèce type, ni des arguments solides de son rejet dans le code international de nomenclature des bactéries [23].

Une récente classification apparue dans « The prokaryotes, 2<sup>nd</sup> ed, » [24] divise les Flavobactéries en quatre groupes naturels, excluant *F. aquatile*. Le premier groupe inclut, *F. balustinum*, *F. breve*, *F. gleum*, *F. indologenes*, *F. indoltheticum* et *F. meningosepticum*. Le second groupe composé de *F. odoratum*. Le troisième groupe composé de *F. mizutae*, *F. multivorum*, *F. spiritivorum*, *F. thalpophilum* et *F. yabuuchiae*. Ces bactéries forment un groupe considéré comme étant un genre à part entière appelé *Sphingobacterium* [25]. Deux espèces, auparavant appartenant aux groupes If et Ij du CDC (Centers for Disease Control), constituent le quatrième groupe pour lequel un genre à part fut proposé [26 ; 27] et comprenant *Weeksella virosa*, l'espèce type et *Weeksella zoohelcum*.

Un autre problème auquel est confronté le genre *Flavobacterium* est la difficulté de le séparer avec d'autres taxons assez proches comme le genre *Cytophaga* et *Flexibacter*. Plusieurs analyses phylogénétiques réalisées ont permis de préciser les limites taxonomiques au sein du cluster *Flavobacterium-Cytophaga* ARN ribosomal [28 ; 29]. Une des conclusions de ces analyses phylogénétiques est que tous les genres *Flavobacterium*, *Cytophaga*, et *Flexibacter* sont tous polyphylétiques et doivent être redéfinis et divisés en plusieurs genres. Les relations



de ces taxons avec d'autres membres de la superfamille ARNr, comme les genres *Capnocytophaga*, *Ornithobacterium*, *Riemerella* et *Weeksella* ont été décrites et illustrées partiellement par la **Figure 1** qui sont en fait la représentation schématique des résultats de l'hybridation ADN-ARNr.



**Figure 1:** Analyse phylogénétique des bactéries appartenant aux genres du groupe FCF. Dendrogramme illustrant les similarités sur la base de la séquence de l'ARNr cistronique des genres de la superfamille V [29].

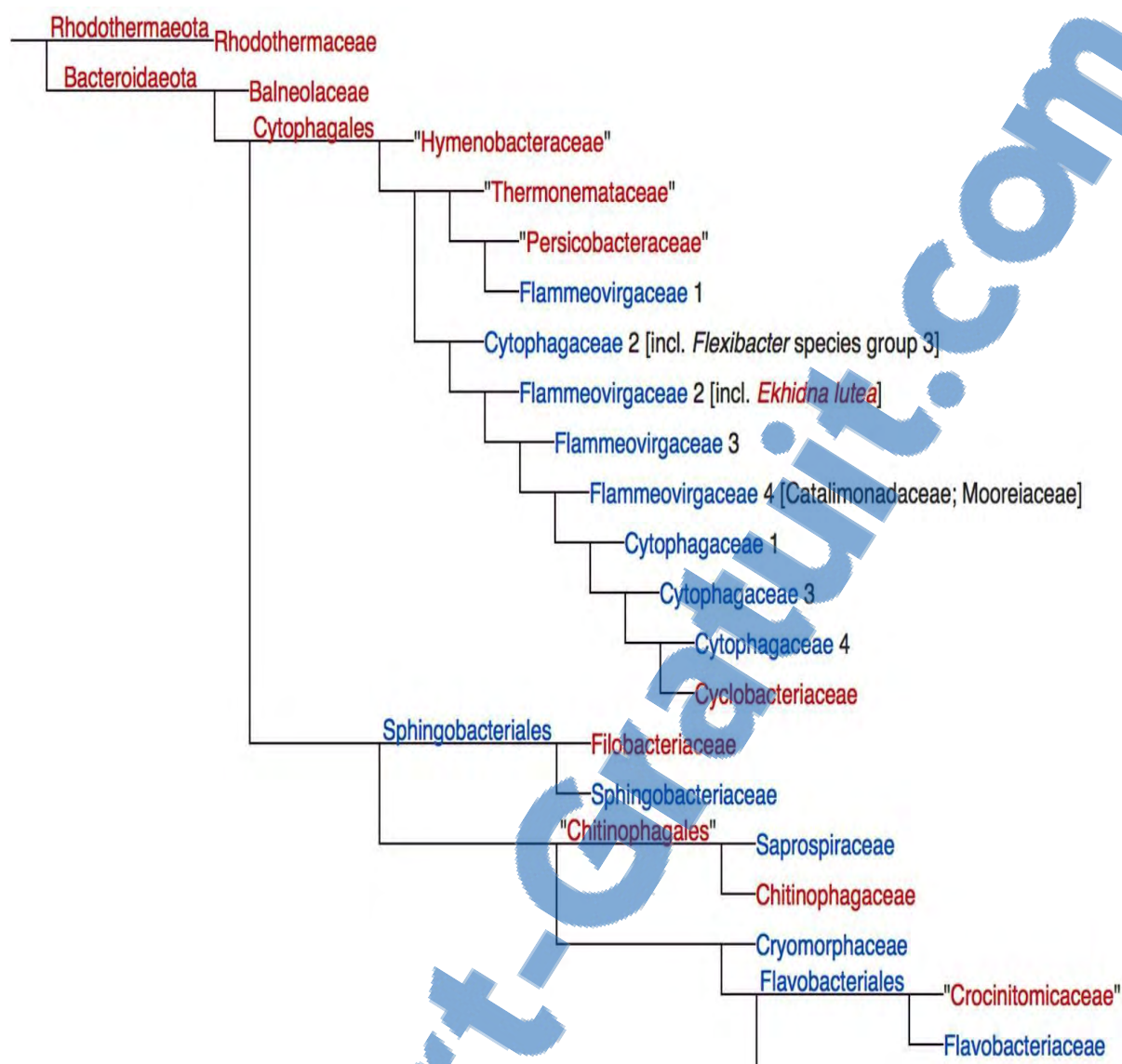
Abréviations: C., *Cytophaga*; Flav., *Flavobacterium* ; Flex., *Flexibacter* ; W., *Weeksella*. Les noms entre crochets, désignent les espèces bactériennes génétiquement mal nommées.

Ces analyses phylogénétiques indiquent que *F. aquatile* ne peut être relié à aucun des 4 groupes de bactéries décrits plus haut. Ces analyses montrent aussi, les relations phylogénétiques existant entre *Flavobacterium meningosepticum*, *Flexibacter flexilis*, et *Cytophaga hutchinsonii*. Selon, ces analyses, il est évident que les Flavobactéries appartenant au groupe naturel décrit par Holmes [24] et collaborateurs, forment un cluster solide au sein duquel, *F. meningosepticum* occupe une position distincte. Cette subdivision en deux groupes correspond à la délimitation phénotypique du CDC en groupe IIa (actuellement, *F. meningosepticum* [30]) et IIb (*F. balustinum*, *F. gleum*, *F. indologenes*, *F. indoltheticum* et certaines bactéries non encore nommées [24]. Les caractéristiques phénotypiques aident aussi à la consolidation de l'appartenance à un genre précis. En effet, les bactéries du genre *Flavobacterium* (*F. balustinum*, *F. gleum*, *F. indologenes*, *F. indoltheticum*, *F. meningosepticum*, et *F. scopthalmum*) disposent toutes de ménaquinone 6, comme quinone respiratoire majeure, avec un même profil d'acides gras.

Ces analyses phylogénétiques garantissent (i) la séparation des genres pour *F. balustinum*, *F. gleum*, *F. indologenes*, *F. indoltheticum*, *F. meningosepticum*, et *F. scopthalmum* (le nom *Flavobacterium* doit être gardé pour l'espèce type, *F. aquatile*) (ii) *W. zoohelcum* (le nom *Weeksella* doit être préservé pour l'espèce type *W. virosa*) et (iii) *R. anatipestifer*. Ainsi, le nom de *Chryseobacterium* a été proposé incluant les bactéries du genre *Flavobacterium* comme *C. balustinum*, *C. gleum*, *C. indologenes*, *C. indoltheticum*, *C. meningosepticum* et *C. scopthalmum*. Les deux anciennes espèces *C. balustinum* décrit par Harrison en 1929 [31] et *C. indoltheticum* décrit par Campbell en 1951 [32] n'ont pas été choisies comme espèces types, du fait qu'elles ne sont pas correctement caractérisées et chacune n'est représentée que par un seul isolat (selon les recommandations du Code International de Nomenclature des Bactéries). *C. gleum* correctement caractérisé avec des caractéristiques génomiques et phénotypiques bien étudiés est proposé comme espèce type du genre *Chryseobacterium* nouvellement créé.

## **I.2. taxonomie (actuelle)**

Les genres *Elizabethkingia*, *Chryseobacterium*, et *Bergeyella* appartiennent à la famille des *Flavobacteriaceae*, à l'ordre des *Flavobacteriales*, à la Classe des *Flavobacteria* et au phylum *Bacteroidetes*. Le phylum *Bacteroidetes* [anciennement connu sous le nom de groupe *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB)], appartenant à la superfamille V sur la base de la séquence de l'ARN ribosomal, est considéré comme une lignée à part entière du monde bactérien (**Figure 2**).



**Figure 2:** « The All-Species living Tree » Project. Arbre Phylogénétique sur la base des séquences d'ARN 16S ribosomal des grandes familles de bactéries [38].

La famille des *Flavobacteriaceae* du groupe CFB, comprend 80 genres incluant *Elizabethkingia*, *Chryseobacterium*, *Bergeyella* et *Riemerella*. Les genres *Chryseobacterium*, *Bergeyella* et *Riemerella* semblent former une branche à part sur la base de la séquence de l'ARN ribosomal et des caractères phénotypiques [33 ; 34]. Les bactéries appartenant à ce groupe sont caractérisées par un défaut du système flagellaire, (immobile), une faible contenance du génome en G + C (30 - 38 mol%), une production de ménaquinones pour la chaîne respiratoire, une importante concentration en acides gras à chaîne ramifiée, un défaut de fermentation des hydrates carbonés et les mêmes profils d'hydrolyse enzymatique.

Actuellement, le genre *Chryseobacterium* (chruseos, « golden » ; bacterium, a « small rod » : *Chryseobacterium*, « a yellow rod ») est composé d'au moins 45 espèces bactériennes valides (Tableau I).

**Tableau I:** Espèces valides appartenant au genre *Chryseobacterium* [35-37].

Genre	Espèces		Espèces	
<b><i>Chryseobacterium</i></b>	<i>Chryseobacterium</i>	<i>antarcticum</i> ,	<i>Chryseobacterium</i>	<i>indoltheticum</i> ,
	<i>Chryseobacterium</i>	<i>anthropi</i> ,	<i>Chryseobacterium</i>	<i>jejuense</i> ,
	<i>Chryseobacterium</i>		<i>Chryseobacterium</i>	<i>jeonii</i> ,
	<i>aquaticum</i> ,	<i>Chryseobacterium</i>	<i>Chryseobacterium</i>	<i>joostei</i> ,
	<i>aquifrigidense</i> ,	<i>Chryseobacterium</i>	<i>Chryseobacterium</i>	<i>koreense</i> ,
	<i>arothri</i> , <i>Chryseobacterium</i>	<i>balustinum</i> ,	<i>Chryseobacterium</i>	
	<i>Chryseobacterium</i>	<i>bovis</i> ,	<i>luteum</i> ,	<i>Chryseobacterium</i>
	<i>Chryseobacterium</i>	<i>caeni</i> ,	<i>marinum</i> ,	<i>Chryseobacterium</i>
	<i>Chryseobacterium</i>		<i>molle</i> ,	<i>Chryseobacterium</i>
	<i>daecheongense</i> ,	<i>Chryseobacterium</i>	<i>oranimense</i> ,	<i>Chryseobacterium</i>
	<i>daeguense</i> , <i>Chryseobacterium</i>	<i>defluvii</i> ,	<i>pallidum</i> ,	<i>Chryseobacterium</i>
	<i>Chryseobacterium</i>		<i>palustre</i> ,	<i>Chryseobacterium</i>
	<i>flavum</i> , <i>Chryseobacterium</i>	<i>formosense</i> ,	<i>piscicola</i> ,	<i>Chryseobacterium</i>
	<i>Chryseobacterium</i>	<i>gambrini</i> ,	<i>piscium</i> ,	<i>Chryseobacterium</i>
	<i>Chryseobacterium</i>		<i>scophthalmum</i> ,	<i>Chryseobacterium</i>
	<i>gleum</i> , <i>Chryseobacterium</i>	<i>gregarium</i> ,	<i>m shigense</i> ,	<i>Chryseobacterium</i>
	<i>Chryseobacterium</i>	<i>haifense</i> ,	<i>soldanellicola</i> ,	<i>Chryseobacterium</i>
	<i>Chryseobacterium</i>	<i>hispanicum</i> ,	<i>solis</i> ,	<i>Chryseobacterium</i>
	<i>Chryseobacterium</i>	<i>hominis</i> ,	<i>taeanense</i> ,	<i>Chryseobacterium</i>
	<i>Chryseobacterium</i>	<i>humi</i> ,	<i>ureilyticum</i> ,	<i>Chryseobacterium</i>
	<i>Chryseobacterium</i>	<i>hungaricum</i> ,	<i>vrystaatense</i> ,	<i>Chryseobacterium</i>
	<i>Chryseobacterium</i>	<i>indologenes</i> ,	<i>wanjuense</i> et	<i>Chryseobacterium</i>
			<i>senegalense</i>	

Jusqu'à une date récente (Années 2000), *Chryseobacterium meningosepticum* (anciennement *Flavobacterium meningosepticum* ou CDCII-a) et *Chryseobacterium miricola* étaient classées au sein du genre *Chryseobacterium*. Cependant, une analyse comparative sur la base de la séquence des gènes de l'ARN 16S ribosomal avec les bactéries du genre *Chryseobacterium* a

permis leur transfert dans un nouveau genre *Elizabethkingia* (en honneur à la reine Elizabeth O.), d'où leur nouveau nom : *Elizabethkingia meningoseptica* et *E. miricola*.

Le genre *Bergeyella* comprend, quant à lui contient une seule espèce bactérienne, *Bergeyella zoohelcum* (anciennement connu sous le nom de *Weeksella zoohelcum*).

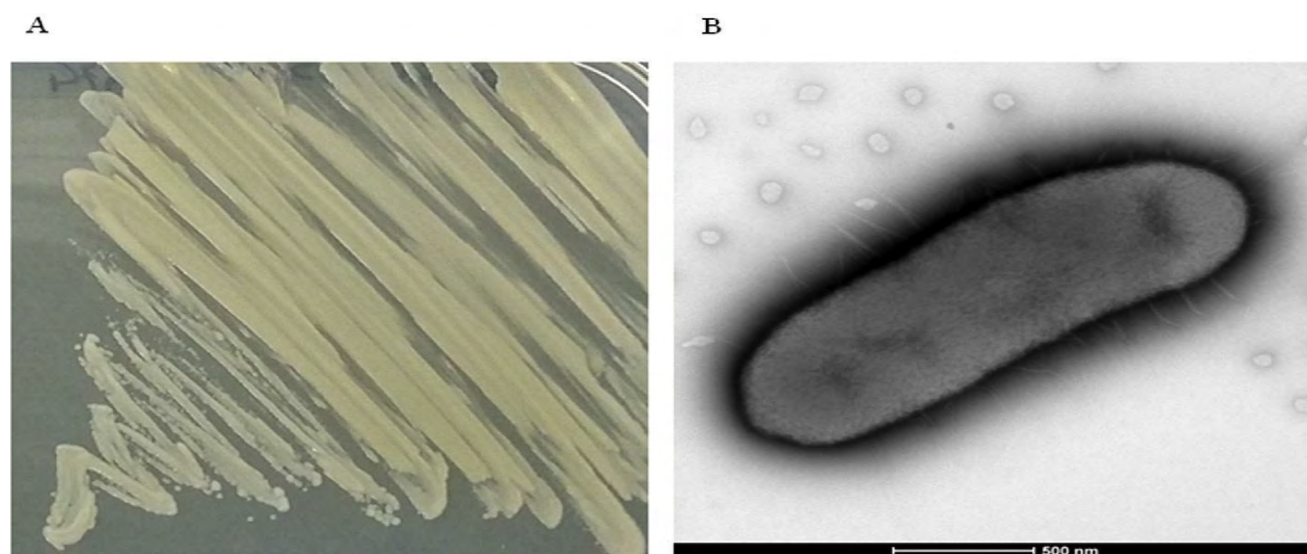
### I.3. Caractères bactériologiques

#### I.3.1. Examen direct

L'observation de la morphologie cellulaire par microscopie électronique à transmission, permet de voir des bâtonnets entourés de fimbriae de 0,5-0,7  $\mu\text{m}$  d'épaisseur sur 1,1-1,3  $\mu\text{m}$  de long (**Figure 3**).

L'identification initiale des bactéries du genre *Chryseobacterium* est basée sur l'observation au microscope optique X100 immersion à l'huile après coloration de Gram : elles se présentent sous forme de bacilles à Gram négatif.

Une suspension de culture sur milieu liquide Lura-Bertani (LB), incubée à la température optimale permet d'observer des bacilles immobiles.



**Figure 3:** Morphologie et aspects culturels de *C. indologenes*. (A), Colonies jaunâtres de *C. indologenes* MARS15 sur Mueller Hinton. (B) Photo de Microscopie électronique de la même bactérie utilisant la technique TechnaiG2 Cryo à un voltage de 200 keV. (Images empruntées à l'équipe du Pr Didier RAOULT, 2016)

Elles cultivent bien à 30°C et 37°C en conditions d'aérobiose. En culture sous LB, elles donnent des colonies circulaires et convexes de 1,0-1,5 mm de diamètre. Certaines espèces poussent avec des colonies mucoïdes, alors que d'autres donnent des colonies brillantes, jaunâtres et lisses (**Figure 3**). Les bactéries du genre *Chryseobacterium* produisent, un pigment de type flexirubine (exception faite de *C. hominis*) qui facilite leur identification (**Figure 4**). Le génome des bactéries du genre *Chryseobacterium* ont une concentration en G+C de l'ordre de 29-39 mol%.



**Figure 4:** Production de Flexirubine par *C. indologenes*. Les colonies jaunâtres de *Chryseobacterium indologenes* virent au rouge par ajout d'une goutte de potasse (KOH) à 10% (Flexirubine). Photo LBV-HALD, 2013.

La capacité d'hémolyse des espèces du genre *Chryseobacterium* est lue sur gélose trypticase soja supplémenté de sang de mouton à 5%. Le trypticase soja est également utilisé pour étudier la tolérance des bactéries à 5°C, 26°C, 37°C, et 42°C. La croissance bactérienne est étudiée sur gélose MacConkey N°3 (Oxoid), thiosulfate-citrate-bile-sucrose (TCBS ; Difco), Mueller Hinton et gélose cétrimide.

*C. hominis* est un bacille à Gram négatif immobile. Elle cultive à 20, 30, et 37°C en aérobie sur gélose ordinaire (Trypticase soja ou gélose au sang) à une température optimale de 30°C. Mais ne cultive pas sur gélose MacConkey, gélose cétrimide ou gélose hypersalée à 3%. Les colonies sont circulaires, et mucoïdes. Certaines produisent un pigment de couleur pâle à distinguer de la flexirubine, dont elle n'est pas productrice.

Les bactéries du genre *Elizabethkingia* sont des bacilles à gram négatif sous forme de bâtonnets de 0,5 x 1,0-2,5 µm, immobiles, ne formant pas de spore. Elles cultivent bien sur

gélose trypticase soja, sur les milieux enrichis à 28-37 °C, mais ne cultivent pas à 5°C ou 40°C. Les colonies circulaires, sont jaune-claires, non pigmentées, semi-translucides et brillantes.

Les bactéries du genre *Bergeyella* sont des Bacilles à Gram négatif, immobiles, aérobies stricts qui cultivent bien sur gélose au sang, mais pas sur gélose MacConkey. Les colonies sont circulaires, brillantes, lisses avec des bords nets.

### **I.3.2. Caractères biochimiques**

La disposition de cytochrome oxydase et de catalase est recherchée en utilisant des disques d'oxydase et de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) respectivement. Le type respiratoire est étudié en inoculant une gélose profonde viande foie à 6%. La production d'acide et de H<sub>2</sub>S est recherchée en utilisant une gélose à 1% de glucose, et une gélose riche en peptones et du Fer. L'hydrolyse de l'alginate de sodium, de l'acide désoxyribonucléique (ADN), de la gélatine, et le tween 80 est cherchée sur une gélose nutritive contenant 0,5 % à 1,50 % de NaCl. La production d'indole, la réduction des nitrates, est recherchée sur gélose nutritive.

Les bactéries du genre *Chryseobacterium* sont des bactéries non fermentaires, et oxydase positive. Elles produisent de l'acide à partir du glucose, du maltose, et l'éthylène glycol. Elles sont indole positif, gélatinase positive, hydrolysent l'esculine et sont Phosphatase alcaline, benzoyl arginine arylamidase) et pyrrolidonyl-aminopeptidase négatives.

*C. hominis* produit de l'acide, par voie oxydative à partir du glucose, du maltose, et de l'éthylène glycol. Elle ne dispose pas d'uréase, de Lysine décarboxylase négative (LDC), d'ornithine décarboxylase négative (ODC), d'arginine dihydrolase négative (ADH). Elle produit de l'indole et du citrate. Elle possède une activité phosphatase alcaline, et benzoyl-arginine arylamidase, mais n'hydrolyse pas l'esculine, ni la gélatine.

Les bactéries du genre *Elizabethkingia* ne disposent pas de catalase, de cytochrome oxydase et de phosphatase, mais dispose de la galactosidase, de la gélatinase et produisent de l'esculine. Elles n'utilisent pas le malonate et ne réduisent pas les nitrates. Elles produisent de l'acide à partir du D-glucose, du D-fructose, lactose, D-maltose, D-mannitol et le tréhalose mais pas à partir du L-arabinose, D-cellobiose, raffinose, sucrose, salicine et du D-xylose. Le génome contient une concentration en G + C de l'ordre 35,0 à 38,2 mol%.

Les bactéries du genre *Bergeyella* disposent de catalase, de cytochrome oxydase, et produisent de l'indole.

#### I.4. Caractères différentiels (Phénotypique et génotypique) de *F. indologenes* et *F. gleum*

En 1983, Yabuuchi et collaborateurs [35], publient une nouvelle espèce bactérienne *F. indologenes*, à partir de 12 isolats de bacilles à Gram négatif produisant un pigment jaune foncé représentant auparavant le groupe IIb. Deux isolats 10795 et 10796 provenant du NCTC (National Collection of Type Cultures, London, U.K) sont inclus parmi ces 12 isolats. L'isolat NCTC 10796 (King 3716 = RH 542 = GIFU 1347) étant désigné comme espèce type des espèces de *F. indologenes*. En 1984, Holmes et collaborateurs [21], étudient également un groupe d'organisme auparavant nommé *Flavobacterium spp.* group IIb incluant le NCTC 10795 en proposant une nouvelle espèce *F. gleum* n'ayant rien en commun avec le *F. indologenes*.

Dans le but de donner les caractéristiques différentielles des espèces de *F. indologenes* et *F. gleum*, Yabuuchi et collaborateurs ont procédé à la culture en aérobie à 30°C de 12 souches de *Flavobacterium* dont 9 *F. indologenes* et 3 *F. gleum* (**Tableau II**).

**Tableau II:** Informations épidémiologiques concernant les 12 isolats test des 2 espèces de *Flavobacterium* [35].

Espèces	GIFU	JCM	ATC C	NCTC	CDC	Expéditeur	Source
<i>F. indologenes</i>	1347 <sup>T</sup>	7627 <sup>T</sup>	2989 <sup>T</sup>	10796 <sup>T</sup>	3716 <sup>T</sup>	R. Hugh	Autopsie trachéale
	1389					T. Oguri	Crachats
	1390					T. Oguri	Urine
	1397					T. Oguri	Crachats
	1398	7628				T. Oguri	Pus
	1455					R. Hugh	Urine
	1592					S. Okuda	Urine
	2119					W. Minamide	Pus
	2136	7629				W. Minamide	Crachats
<i>F. gleum</i>	11963	2409		10795		JCM	Crachats
	11964 <sup>T</sup>	2410 <sup>T</sup>		11432 <sup>T</sup>		JCM	Plaies
	11965	2411		11433		JCM	Vaginal

**Abréviations:** ATCC, American Type Culture Collection, Maryland USA ; CDC, Centers for Disease Control, Georgia, USA. ; GIFU, Departement of Microbiology, Gifu University School of Medicine, Gifu, Japan ; JCM, Japan Collection of Microorganisms, Saitama, Japan ; NCTC, National Collection of Type Cultures, London, UK. ; <sup>T</sup>, Espèce type.



La concentration en Guanine et Cytosine (GC) de l'ADN de ces bactéries a été déterminée par la méthode de Tamaoka et Komagata [39]. L'hybridation moléculaire ADN-ADN a été réalisée par la technique fluorimétrique sur plaque de micro dilution décrite par Ezaki et collaborateurs [40]. Les caractères phénotypiques sont déterminés par des tests biochimiques en tube décrits par Yabuuchi et collaborateurs [35]. La production d'acide par voie oxydative à partir de d'hydrates de carbone est objectivée sur milieux en gélose profonde, 10 jours après inoculation. La capacité des isolats à hydrolyser l'esculine est recherchée sur une gélose à base de cœur supplémenté avec 0,1% d'esculine et 0,05% de citrate ferrique. Les géloses inoculées sont incubées à 4 h, 8 h et 20 h et la réaction est lue sur la pente de la gélose qui noircit en cas de l'hydrolyse de l'esculine. La production d'indole est objectivée par culture d'un bouillon contenant 1% de Tryptone supplémenté avec 0,5% de L-tryptophane. La production d'indole est révélée par ajout de Kovacs.

La concentration en GC des 12 isolats est comprise entre 36,1% et 37,5%. Huit (08) souches, GIFU 1389, 1390, 1397, 1398, 1455, 1592, 2119 et 2136 montrent 80 à 96% d'homologie avec *F. indologenes* 1347<sup>T</sup>, contre 14 à 29% d'homologie avec *F. gleum* 11964<sup>T</sup>. Une souche de référence portant auparavant le numéro GIFU 2007, montre 98% d'homologie avec *F. gleum* 11964<sup>T</sup>, contre 19% d'homologie avec *F. indologenes* 1347<sup>T</sup>. Ces résultats suggèrent que les isolats de *F. indologenes* et *F. gleum* sont des espèces indépendantes (**Tableau III**).

**Tableau III:** Concentration en GC de l'ADN et valeur d'homologie ADN-ADN des 12 isolats de *Flavobacterium*. [35].

Espèces	GIFU	GC %	Ratio d'hybridation avec l'ADN de :			
			1347 <sup>T</sup>	11963	11964 <sup>T</sup>	11965
<i>F. indologenes</i>	1347 <sup>T</sup>	37,5	100	26	25	25
	1389	37,3	87		16	
	1390	37,5	86		16	
	1397	36,9	85		15	
	1398	37,2	96		14	
	1455	36,7	80		16	
	1592	37,0	86		23	
	2119	36,9	90		24	
	2136	36,9	95		29	
<i>F. gleum</i>	11963	36,1	19	100	100	100
	11964	36,2	17	98	100	100
	<sup>T</sup> 11965	36,2	19	97	101	100

Cependant les 12 isolats de *F. indologenes* et *F. gleum* disposent en commun beaucoup de caractères : ce sont des bactéries à Gram négatif en forme de barre et immobiles sans flagelles. Elles cultivent correctement en aérobie sur milieux ordinaires en donnant des colonies translucides jaunâtres virant au rouge par ajout de solution de KOH concentrée à 10%. Les cultures dégagent une forte odeur fruitée. Quand elles sontensemencées au centre d'un milieu semi-solide de recherche de mobilité, elles poussent rapidement en forme de pétales de fleurs joignant les bords de la boîte de pétri en 20 heures d'incubation à la température ambiante. Elles produisent toutes de l'indole, hydrolyse la gélatine, l'esculine et le tween 80. Les colonies noircissent les papiers d'acétate de cellulose suspendus au dessus d'un milieu de Kligler Hajna supplémenté de fer. En culture sur gélose CW (*Clostridium welchii* avec kanamycine), après 48 heures d'incubation apparaissent des zones claires autour

des colonies striées remplacées progressivement par des zones étroites d'opacité. Les bactéries cultivées en milieu MEVAG (Milieu de la Voie d'Attaque du Glucose), produisent de l'acide par voie oxydative à partir du glucose, du maltose, du mannose, et du tréhalose en 48 heures d'incubation. La production d'acide à partir du MEVAG supplémenté de glycogène est faible, et se fait dans un délai relativement long, 3 jours voir plus. La culture sur gélose au sang de mouton, fait apparaître une hémolyse discrète, remplacée progressivement par une décoloration verdâtre autour des colonies denses après 48 heures d'incubation. Les 03 souches de *F. gleum* hydrolysent l'esculine avec une coloration noire clairement visible au bout de 4 heures d'incubation alors que les souches de *F. indologenes* hydrolysent l'esculine au bout de 24 heures d'incubation.

Les caractères suivants sont négatifs pour toutes les 12 souches de *Flavobacterium* : fermentation du glucose, production de l'acétyl-méthyl carbinol, activité acyl-amidase, production de 2-ketogluconate à partir du gluconate, activité L-Lysine, L-ornithine, décarboxylase et L-arginine dihydrolase, production d'acide à partir de l'adonitol, D-arabinose, cellobiose, dulcitol, galactose, inositol, inulin, lactose, mannitol, melezitose, melibiose, raffinose, rhamnose, D-ribose, sorbitol et sucrose.

La croissance sur gélose Mac Conkey, est variable. Aucune souche de *F. gleum* ainsi que les souches de *F. indologenes* 1347T, 1397, 1592, 2119, 2136 ne poussent sur la gélose Mac Conkey contrairement aux souches de *F. indologenes* 1390, 1398 et 1455. L'ajout de zinc, après une recherche négative de nitrates réductase, a permis de noter la présence de l'enzyme en plus de nitrites réductase pour 4 souches de *F. indologenes* (1347T, 1398, 1455 et 1592).

L'espèce type de *F. gleum* ainsi que les 2 souches de référence poussent bien en bouillon de cœur cervelle à 41°C, en produisant de l'acide à partir de L-arabinose, éthanol, salicine et D-xylose. Elles produisent de l'acide phényle-pyruvique à partir de L-phénylalanine, hydrolyse l'esculine après 4 heures d'incubation et alcalinise la gélose de Christensen à l'urée en 40 heures d'incubation. Tous ces tests sont négatifs pour les 09 souches de *F. indologenes*. (**Tableau IV**).

**Tableau IV:** Caractères utiles pour différencier *F. indologenes* et *F. gleum* [35].

Substrat ou test	<i>F. indologenes</i> (n = 9)	<i>F. gleum</i> (n = 3)
<b>Culture à 41°C</b>	0 <sup>a</sup>	3
<b>Phénylalanine désaminase</b>	0	3
<b>Oxydation acide à partir de :</b>		3
<b>L-Arabinose</b>	0	3
<b>Ethanol</b>	0	3
<b>Salicine</b>	0	3
<b>D-xylose</b>	0	3
<b>Hydrolyse de l'esculine à 4h</b>	0	3
<b>Uréase (Christensen)</b>	0	3 <sup>b</sup>

n, le nombre de souche utilisé

<sup>a</sup> nombre de souches positives pour le caractère ou test. <sup>b</sup> nombre de souches nécessitant 2 jours pour alcaliniser la pente.

## **I.5. Diversité génétique au sein du groupe IIb de *Flavobacterium* (actuellement *Chryseobacterium*) et caractères différentiels utiles**

### **I.5.1. Etude de la diversité génomique par Hybridation moléculaire ADN-ADN**

Les bactéries, appartenant au groupe IIb de *Flavobacterium* comme cela a été décrit par Elizabeth. O. King [30], sont probablement les Flavobactéries les plus fréquemment isolées en pathologie humaine. Ces bactéries sont caractérisées par une hétérogénéité phénotypique, et génomique. Deux nouvelles espèces, *Flavobacterium indologenes*, et *Flavobacterium gleum*, ont été décrites à partir des bactéries appartenant au groupe IIB de *Flavobacterium*. Une troisième bactérie *Flavobacterium breve* ayant des caractères phénotypiques proches du groupe IIb de *Flavobacterium*, avec des caractères de pathogénicité similaires a été décrite [21 ; 35 ; 41].

Une étude d'hybridation moléculaire ADN-ADN portant sur 42 bactéries du groupe IIb (incluant les groupes génomiques I-IX) avec pour *F. indologenes* et *F. gleum* comme espèce types, et de *F. breve*, a été réalisée dans le but d'étudier la diversité génétique au sein de ce groupe et de proposer des caractères phénotypiques d'identification. L'ADN radio-marqué des souches suivantes a été utilisé comme référence pour l'hybridation ADN-ADN : *F. balustinum*, *F. breve*, *F. gleum*, *F. indologenes*, *F. meningosepticum*, *F. multivorum*, *F.*

*spiritivorum* et *F. odoratum*. Il y apparaît 3 grands groupes reliés à espèces bactériennes *F. gleum*, *F. indologenes*, et *F. breve* et 08 autres petits groupes contenant chacun une seule souche. Au sein d'un groupe génomique, le ratio de liaison relatif (RLR), à de rares exceptions est de minimum 80% et 70% à respectivement 60°C et 75°C avec maximum 4°C de  $\Delta T_m$ . Le RLR entre groupes génomiques est généralement inférieur à 60% à 60°C ou 40% à 75°C avec un  $\Delta T_m$  supérieur à 10°C (**Tableau V**).

**Tableau V:** Groupes et sous-groupes génomiques relatifs à l'ADN des bactéries du groupe IIb et *F. breve*. [42].

Groupe génomique	Souche <sup>a</sup>	Origine	RLR <sup>b</sup> vs Référence	
			60°C	75°C
I	<i>F. gleum</i>			
	NCTC 11432T ; CCUG 14555 ; F93	Vaginal (Londres)	100	100
	Holmes F129 ; NCTC 11433	Plaie (Londres)	100 (1,6) <sup>c</sup>	96
	Holmes F128	CSF ; (Londres)	100 (2,2)	100
	NCTC 10795 ; Gifu 2007 ; Gifu 11963	Crachats, Caroline du Sud	96 (1,4)	92
	CDC/E 5313	Sang, Pennsylvanie, 1979	95 (2,5)	90
	CCUG 1203 ; B 753	?, Tisserand, CDC, 1971	93 (3,5)	92
	Holmes A6/68 ; F7	Vaginal ; Rochdale, London	89 (5,1)	75
	CCUG 1190 ; K-200	?, Los Angeles, 1971	88 (1,5)	88
	CDC/B 8127	Gorge, Floride 1971	84 (3,3)	72
II	Holmes 424/73	Sang ; Dar-Es-Salam	100	100
III	AB 1225	Eau ; Danemark	100	100
IV	Holmes 554/73	LCR ; Dar-Es-Salam, 1973	100	100
	CDC/F 834	Trachée artère, Porto-Rico, 1981	85 (5,2)	64
V	CDC/A 2236	Liquide pleural ; Arkansas, 1965	100	100
	CDC/D 9587	LCR ; Argentine, 1977	93 (1,4)	91
VI	CCUG 49A	Biopsies ; Göteborg, 1968	100	100
VII	<i>F. indologenes</i>			
	NCTC 10796T ; ATCC 29897	Autopsie trachéale, EUA	100	100
	CDC 3716			
	CDC/C 2492	Langue ; Dakota du SUD, 1972	96 (1,9)	95
	CDC/B 7055	Gorge ; Montana, 1970	94 (1,3)	92
	CCUG 12408 ; B 998	? De D. Hollis, CDC 1982	92 (0,1)	91
	HO 40, 1161	Trachéostome ; Odense, 1964	92 (1,2)	90
	Gifu 1392	Pharynx, Japon	89 (0,0)	85
	CDC/D 5230	Sang ; New Hampshire, 1976	91 (0,3)	78

VIII	Gifu 1390	Urine ; Japon	91 (0,7)	87
	AB 1207	Crachat ; Danemark	91 (2,8)	91
	Gifu 1389	Crachat ; Japon	89 (0,0)	85
	Holmes 145/70 ; F 139	Sang ; London, 1970	88 (2,0)	86
	AB 1541	Liquide de séreuse ; Danemark	100	100
IX	CDC A/6485	Crachat ; Colorado, 1966	81 (2,0)	ND
	NCTC 10797 ; ATCC 29898	Eau de boisson ; Fargo	100	100
	CCUG 11879			
X	CDC/B 2560	Eau ; New Jersey, 1969	89 (1,8)	83
	<i>F. breve</i>			
	NCTC 11099T ; ATCC 29898	Sécrétion bronchique, Suisse	100	100
	Gifu 2292	Echantillon clinique, Japon	85 (2,5)	85
	Gifu 2316	Echantillon clinique, Japon	85 (2,2)	82
XI	Gifu 2318	Echantillon clinique, Japon	85 (3,1)	84
	CCUG 14337A ; CL 200/75	?; London, 1975	88 (1,5)	84
	CCUG 14338 ; CL 666/76	Urine ; Tchécoslovaquie, 1976	83 (1,9)	81
	CCUG 14814 ; ATCC 14234 ; GLG 3169	? de Gilardie, 1983	77 (1,3)	80
	CCUG 14815 ; GLG 3185	Sang ; Gilardie, 1983	82 (1,6)	81
	Gifu 2299	Echantillon clinique, Japon	100	100
	CCUG 12570	Lentille de contact ; Göteborg, 1982	84 (0,9)	70
	Holmes CL 540	Urine ; Munich, 1978	83 (2,3)	69

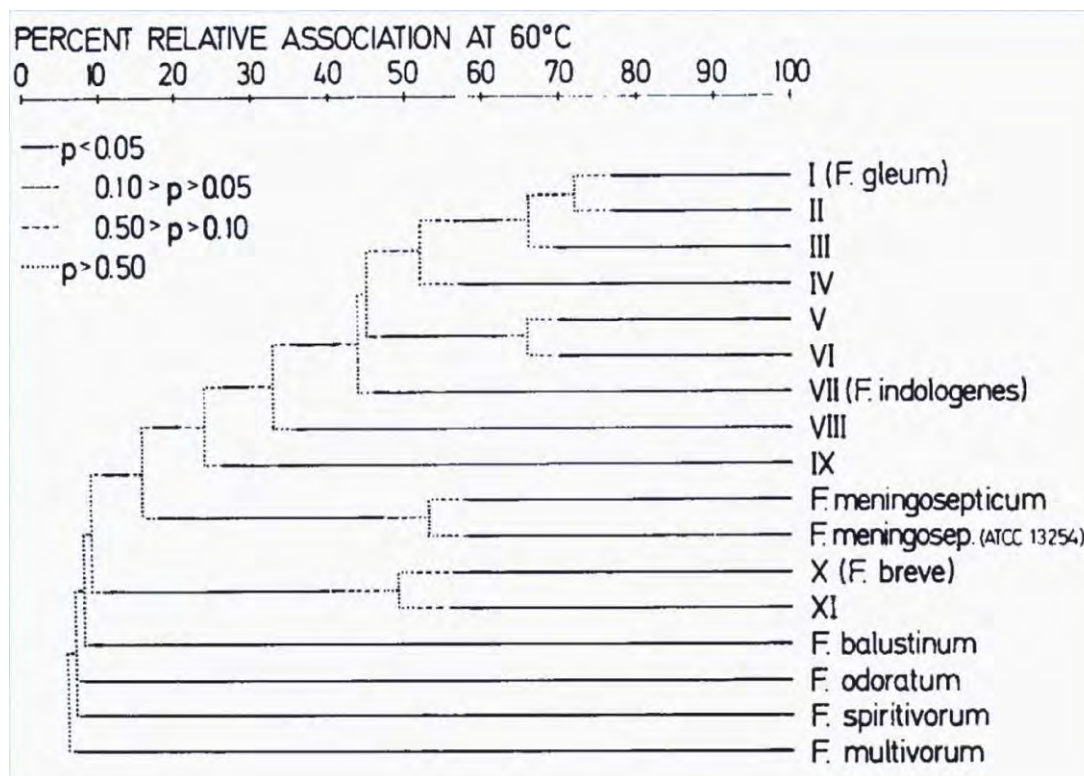
<sup>a</sup> Les souches sont obtenues à partir de personnes ou d'institutions mentionnées dans le tableau. AB : Collection du département de Bactériologie, Copenhague, Danemark ; ATCC : American Type Culture Collection, Rockville, Maryland ; CDC : Centre for Disease Control, Atlanta, Georgia ; CCUG : Collection de Culture de l'université de Göteborg, Suisse ; Gifu : Département de Microbiologie médicale Gifu Université médicale de Japon ; GLG : G. L. Gilardi, New York ; HO : Helge Olsen, Département de Microbiologie clinique, Odense Hôpital de Danemark ; Holmes : Barry Holmes, Laboratoire de Santé publique de Londres.

<sup>b</sup>RLR : Ratio de Liaison Relative «RBR : Relative Binding ratio » ; l'homologie est considérée parfaite pour une Hybridation à 100.

<sup>c</sup>Le chiffre entre parenthèse désigne la différence de température d'élution, entre les hétéroduplexes et les homo-duplexes ( $\Delta T_m$ ).

<sup>T</sup>Type de souche.

Utilisant l'algorithme UPGMA « Unweighted pair group method with arithmetic mean » à partir des fragments d'ADN des différentes souches, un dendrogramme a été construit à la pour visualiser la clonalité des groupes génomiques (**Figure 5**).



**Figure 5:** Analyse clonale des groupes génomiques de *Flavobacterium*. Relation entre les groupes génomiques et le groupe IIb de *Flavobacterium* et les espèces de *Flavobacterium* non humaines [42].

Les souches de référence des groupes I et II fusionnent à 72°C, avec un  $\Delta T_m$  de 5,1 °C et un RLR de 48% à 75°C. les souches du groupe III fusionnent à 66%. Les groupes génomiques V et VI fusionnent à 70% avec un  $\Delta T_m$  de 9,6°C. A un niveau de 45%, un nouveau clone émerge, *F. indologenes*. Au même niveau, l'espèce type *F. meningosepticum* fusionne avec la souche ATCC 13254 de *F. meningosepticum*. Un nouveau clone est formé avec les souches du groupe X et IX, fusionnant avec *F. breve*.

### I.5.2. Caractères phénotypiques différentiels

Les bactéries appartenant au groupe IIb de *Flavobacterium* donnent en culture des colonies rondes, légèrement convexes, brillantes avec une taille variant de 0,5 à 3 mm. Les souches du groupe génomique I (*F. gleum*), sont exceptionnellement plus visqueuses que les autres bactéries. Les colonies des bactéries des groupes X et XI sont légèrement moins colorées en jaune que les Flavobactéries des autres groupes.

La recherche de bêta-galactosidase (ONPG) est négative pour toutes les souches, à 2 h d'incubation sur des colonies de 48 h de culture. Ce résultat est variable utilisant des colonies âgées de 24 h (**Tableau VI**).

**Tableau VI:** Caractères positifs et négatifs pour tous les groupes de *Flavobacterium* IIb et *F. breve*. [42].

Caractères positifs	Caractères négatifs
<b>Oxydase</b>	ONPG à 24 h après 48 h d'incubation
<b>Catalase</b>	Uréase
<b>Indole</b>	Production d'acide à partir de :
<b>Gélatinase</b>	Rhamnose, Lactose, Dulcitol
<b>Production d'acide à partir de :</b>	Galactose, Raffinose, Sorbitol
<b>Glucose</b>	Malibiose, Mélézitose, Inositol
<b>Maltose</b>	Adonitol

ONPG : (Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside) pour la Recherche de bêta-galactosidase,

Les groupes génomiques I à IX, ne peuvent pas être différenciés de façon certaine avec les caractères biochimiques classiques comme le montre le tableau VII. Dans la plupart des cas, quand la discrimination est possible, elle porte sur la différence de production d'acide à partir d'hydrates de carbones et la production d'acide à partir du xylose et de la Salicine est faible et tardive. Le groupe génomique I (*F. gleum*), apparaît homogène sur le plan biochimique, mais n'est pas différenciable sur le plan phénotypique avec les bactéries du groupe II. Ces deux groupes renferment les seules bactéries capables de pousser à 40°C et produisent de l'acide à partir de la salicine. Le groupe génomique VII (*F. indologenes*), est tout aussi homogène et difficilement différenciable de la plupart des bactéries des autres groupes.



Les groupes génomiques X (*F. breve*) et XI sont identiques sur le plan phénotypique et correctement distinguable des autres groupes, par la faible pigmentation jaune des colonies, et une absence de production d'acide à partir du mannose et du tréhalose (**Tableau VII**).

**Tableau VII:** Caractères différentiels des groupes génomiques de *Flavobacterium* du groupe IIb et *F. breve*. [42].

Groupes génomiques	Production d'acide à partir de :								Culture à 40°C	Pigment
	Ara	Xyl	Man	Sucro	Treh	Salc	Fruc	Mant		
I ( <i>F. gleum</i> )	+	+ <sup>a</sup>	+	-	+	d <sup>a, b</sup>	+	-	+	Brillant
II	+	+ <sup>a</sup>	+	-	+	+ <sup>a</sup>	+	-	+	Brillant
III	+	-	+	-	+	-	+	-	-	Brillant
IV	-	-	+	-	+	-	+	+	-	Brillant
V	+	+ <sup>a</sup>	+	-	+	-	+	-	-	Brillant
VI	-	-	+	-	+	-	-	-	-	Brillant
VII ( <i>F.ind</i> )	-	-	+	+ <sup>a</sup>	+	-	+ <sup>a</sup>	-	-	Brillant
VIII	-	-	+	-	+	-	d	-	-	Brillant
IX	-	-	-	-	+	-	-	-	-	Brillant
X ( <i>F. brev</i> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Faible
XI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Faible

a faible réaction, d variable, b (8 sur les 9 souches testées).

Ara, Arabinose ; Xyl, Xylose ; Man, Mannose ; Sucro, Sucrose ; Treh, Tréhalose ; Salc, Salicine ; Fruct, Fructose ; Mant, Mannitol.

## I.6. Pouvoir Pathogène

Le pouvoir pathogène des bactéries du genre *Chryseobacterium* n'est pas encore complètement élucidé. En effet, elles sont considérées comme pathogènes opportunistes fréquemment rencontrés dans la nature, en l'occurrence le sol et les eaux stagnantes. En milieu hospitalier, ces bactéries sont retrouvées dans les systèmes hydriques, les eaux de collections, les surfaces des équipements (humidificateurs, les tubes, les cathéters) [5 ; 10]. Elles représentent moins de 10% des bactéries non fermentaires et non pyocyaniques isolées de prélèvements pathologiques d'origine humaine [6]. La production de film bactérien sur du matériel médical étranger au corps humain (cathéters, tubes..) et l'activité protéolytique joueraient un rôle important dans la virulence des bactéries du genre *Chryseobacterium*,

particulièrement chez les patients portant des sondes à demeure et des cathéters [43]. En effet, une étude réalisée en Taiwan sur une collection de 15 souches de *C. gleum* a montré que 40% d'entre elles produisent un film bactérien (**Tableau VIII**) [44].

La capacité de production du film bactérien a été étudiée sur 03 différents milieux de culture à savoir ; le LB (Luria-Bertani), TSB (Bouillon Trypticase soja) et le M9 (milieu minimal).

**Tableau VIII:** Capacité de production de Biofilm bactérien des 15 souches de *C. gleum* dans 03 types de milieux [44].

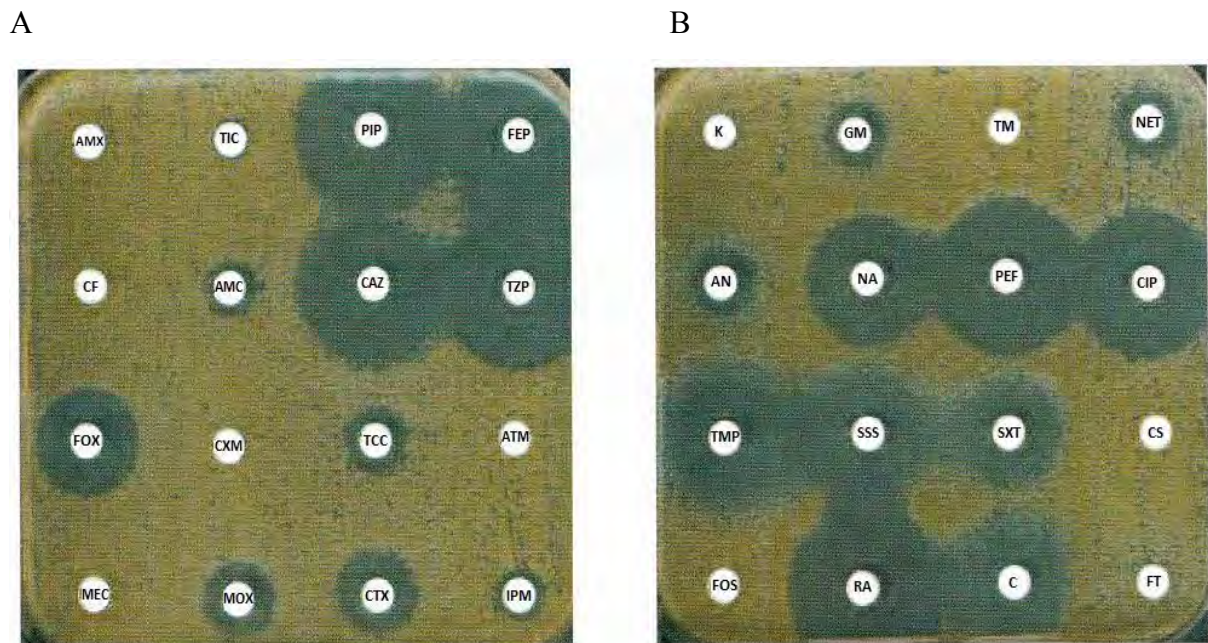
Echantillon	Formation de Biofilm	
	Milieu LB	TSB et M9
Urine (2)	2 (40.0)	0 (0.0)
Crachats (4)	1 (25.0)	0 (0.0)
Plaies (2)	1 (50.0)	0 (0.0)
Liquide d'ascite (1)	1 (100.0)	0 (0.0)
Cathéter veineux central (1)	1 (100.0)	0 (0.0)
Sang (1)	0 (0.0)	0 (0.0)
Inconnu (1)	0 (0.0)	0 (0.0)
Total (15)	6 (40.0)	0 (0.0)

Les infections à *Chryseobacterium spp.* ont été rapportées au cours de septicémie, d'infections urinaires, de péritonites, de broncho-pneumopathies, d'infections péritonéales, d'infections oculaires, d'infections sur plaies chirurgicales, d'endocardites, méningites néonatales, de lésions hépatique [5-7 ; 12 ; 13 ; 18 ; 19]. Chez l'adulte, les infections sont essentiellement iatrogènes et leur pronostic est, en général satisfaisant en dehors de facteurs défavorisants. Parmi les facteurs de risques associés aux infections à *Chryseobacterium*, on retrouve toutes les situations d'immunodépression (VIH, cancer), les longs séjours hospitaliers, l'antibiothérapie au long cours, la disposition de matériels hospitaliers (cathéters veineux, tubes, sondes).

## I.7. Résistance des bactéries du genre *Chryseobacterium*

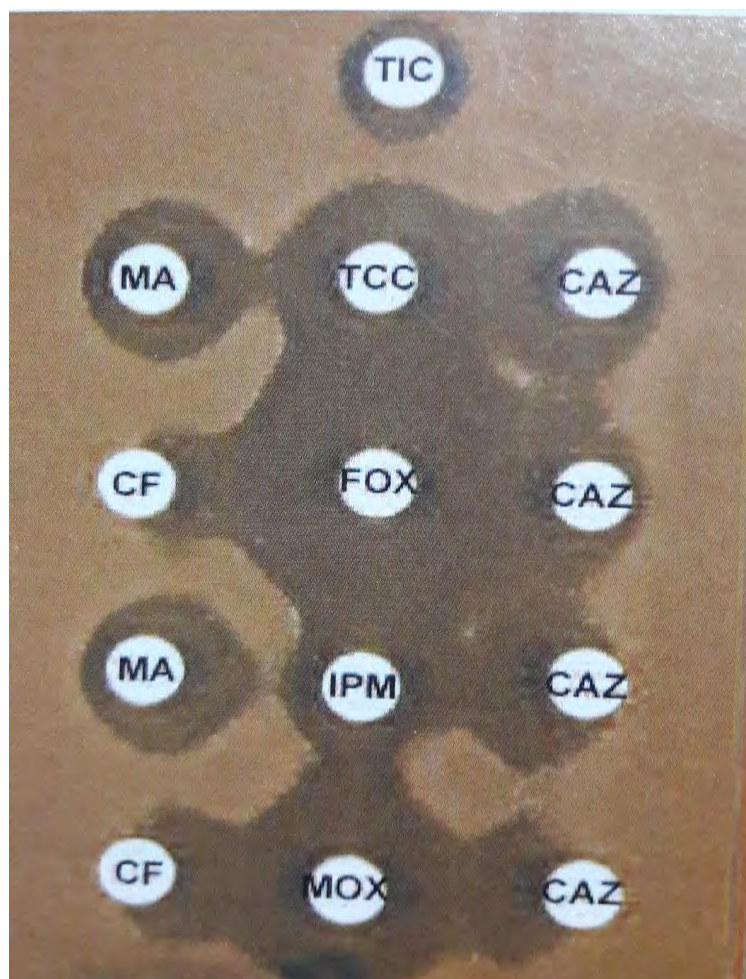
### I.7.1. Phénotypes sensibles

Au sein de la famille des *Flavobacteriaceae*, la sensibilité des antibiotiques est surtout caractérisée par la multi-résistance naturelle à plusieurs classes d'antibiotiques dont les aminoglycosides, les polymyxines, les  $\beta$ -lactamines y compris les carbapénèmes (**Figure 6**).



**Figure 6:** AntibioGramme par diffusion en milieu gélosé (Mueller Hinton) après incubation à 37°C de *C. indologenes* (Photo, Pr Alain PHILIPON). 6A, étude de la sensibilité de 16 antibiotiques de la classe des  $\beta$ -lactamines: AMX, Amoxicilline; TIC, Ticarcilline; PIP, Pipéracilline; FEP, Céfépime; CF, Céfalotine; AMC, Amoxicilline + acide clavulanique; CAZ, Ceftazidime; TZP, Pipértazole; FOX, Céfoxitine; CXM, céfuroxime; TCC, Ticarcilline + acide clavulanique; ATM, Aztreonam; MEC, Mécilliname; MOX, Moxalatame; CTX, Céfotaxime; IPM, Imipénème. 6B, étude de la sensibilité de 16 antibiotiques divers: Aminosides (K, Kanamycine; GM, Gentamycine; TM, Tobramycine; NET, Nétilmycine; AN, Amikacyne; NA) Quinolones (NA, Acide nalidixique; PEF, Péfloxacine; CIP, Ciprofloxacine) TMP, Triméthoprim; SSS, Sulfamides; SXT, Cotrimoxazole; CS, Colistine; FOS, Fosfomycine; RA, Rifampycine; C, Chloramphénicol; FT, Nitrofuranes).

Divers phénotypes de résistance ont été individualisés, en particulier vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines, avec la mise en évidence occasionnelle de synergies entre l'amoxicilline et l'acide clavulaniques [45 ; 46]. Cependant, on notera surtout la résistance aux céphalosporines de 3ème génération et aux carbapénèmes (imipénème, méropénème), aux aminosides tels la gentamicine, tobramycine, amikacine, et enfin aux polymyxines. L'orientation diagnostique, dans ce groupe hétérogène est favorisée par une culture pigmentée en jaune ou en orange, à l'exception principale de *Chryseobacterium* (actuellement *Elizabethkingia*) *meningosepticum*. Cette bactérie montre à l'antibiogramme sur milieu solide, des synergies inhabituelles (**Figure 7**) avec une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques habituellement actifs sur les bactéries à Gram négatif :  $\beta$ -lactamines dont l'imipénème, le méropénème, les aminosides, les tétracyclines et les polymyxines (**Tableau IX**).



**Figure 7:** *E. meningosepticum* (anciennement *Chryseobacterium*). Détection de synergies inhabituelles par la méthode de diffusion utilisant les  $\beta$ -lactamines: TIC, Ticarcilline; CF, Céfalotine; CAZ, Ceftazidime; FOX, Céfoxitine; TCC, Ticarcilline + acide clavulanique; MOX, Moxalactame; IPM, Imipénème; MA, Céfamandole [45; 46].

**Tableau IX:** Sensibilité habituelle de *E* (anciennement *Chryseobacterium*) *meningosepticum* [45].

Antibiotique	CMI (mg/L)	Antibiotique	CMI (mg/L)
<b>Ticarcilline</b>	>128	Norfloxacin	>8
<b>Ticarcilline + CLA</b>	>128	Ofloxacin	4
<b>Pipéracilline</b>	8	Ciprofloxacine	1-2
<b>Pipéracilline-TAZ</b>	8	Gatifloxacine	0,5
<b>Céfotaxime</b>	>8	Lévofloxacine	1-2
<b>Ceftriaxone</b>	>8	Doxycycline	8
<b>Ceftazidime</b>	>16	Minocycline	0,25-1
<b>Céfépime</b>	>8	Tigécycline	0,5
<b>Cefpirome</b>	>32	Cotrimoxazole	2-4
<b>Aztréonam</b>	>32	Chloramphénicol	8-32
<b>Imipénème</b>	>8	Rifampicine	0,5-2
<b>Méropénème</b>	>8	Tobramycine	>16
<b>Vancomycine</b>	16-32	Gentamycine	>16
<b>Teicoplanine</b>	16-32	Nétilmicine	>16
<b>Erythromycine</b>	>32	Amikacine	>16
<b>Azithromycine</b>	>16	Polymixine B	>32
<b>Lincomycine</b>	>32	Linézolide	>16

<sup>a</sup>CLA, acide clavulanique (2mg/L) ; TAZ, Tazobactam (4mg/L).

En routine, la diffusion peut présenter un intérêt taxonomique (phénotype de multirésistance unique) (**Figure 7**) [45 ; 46]. La sensibilité aux antibiotiques est d'une part mieux étudiée en culture en milieu solide à 30°C et d'autre part, outre la multirésistance soulignée plus haut, diverses synergies entre  $\beta$ -lactamines dont les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération peuvent être observées avec l'acide clavulanique, la céfoxitine ou l'imipénème (**Figure 7**). Le **tableau X**, montre l'action synergique de l'acide clavulanique combiné aux céphalosporines même de troisième génération.

En revanche, une sensibilité paradoxale a été rapportée vis-à-vis d'antibiotiques actifs sur les bactéries à Gram positif, tels que la vancomycine, la novobiocine, l'érythromycine et la clindamycine. Cependant, divers travaux ont précisé les discordances qui étaient fonction des techniques utilisées (diffusion ou dilution). Ainsi, Bruun et coll. au cours d'une étude portant sur 52 souches de *E. (Chryseobacterium) meningosepticum*, avaient noté une différence entre la vancomycine et l'acide fusidique qui par diffusion apparaissaient actifs alors que, par dilution ils étaient inactifs [41]. Il convient donc d'abandonner cette notion de sensibilité à la vancomycine [47].

Il apparaît quelques différences liées à une meilleure sensibilité au sein des autres espèces (*C. indologenes*, *C. gleum*, *M. odoratus*, *M. odoratis-simus*). Cependant, l'absence d'échantillonnage conséquent de souches cliniques ne permet pas de conclure l'individualisation réelle de phénotypes de sensibilité aux  $\beta$ -lactamines et aux autres familles d'antibiotiques.

**Tableau X:** Sensibilité aux  $\beta$ -lactamines de 21 souches cliniques de *E.* (anciennement *Chryseobacterium*) *meningoseptica* [45].

CMI (mg/L)	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
Antibiotique									
AMX						13	7	1	
TIC						1	16	3	1
TCC					3	14	4		
PIP	12	8	1						
CEF					4	12		4	1
CFC			9	7	1	2			
FOX	2	14		2	3				
CFM				1	12	5	2	1	
CMC	1	17	3						
CTX			14	4	3				
CXC	7	12	2						
CAZ					2	16	3		
CZC	4	9	8	2					
LXF	1	11	9						
IPM	3	16	2						

AMX, Amoxicilline ; TIC, Ticarcilline ; TCC, Ticarcilline + Acide clavulanique ; PIP, Pipéracilline ; CEF, Cefalotine ; CFC, Cefalotine + Acide clavulanique ; FOX, Cefoxitine ; CFM, Cefamandole ; CMC, Cefamandole + Acide Clavulanique ; CTX, Cefotaxime ; CTC, Cefotaxime + Acide Clavulanique ; CAZ, Ceftazidime ; CZC, Ceftazidime +Acide clavulanique ; LXF, Latamoxef ; IPM, Imipénème.

### **I.7.2. Les métallo-β-lactamases**

L'augmentation de la résistance aux antibiotiques des bactéries à Gram négatif est illustrative de la façon dont les bactéries acquièrent, maintiennent et expriment de nouvelles informations génétiques qui leur confèrent une résistance à une ou plusieurs classes d'antibiotiques, sans barrière d'espèces et de genre. Le report de la résistance bactérienne varie, mais un consensus fait état d'une augmentation de la résistance particulièrement à l'encontre des quinolones et des β-lactamines à spectre élargi au sein de la famille des *Enterobacteriaceae* et des bacilles à Gram négatif non fermentaires (*Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*) rendant leur éradication aléatoire au cours d'infections dans lesquelles elles sont impliquées [48 ; 49]. Par exemple, une étude longitudinale sur 5 ans menée en Amérique Latine, indique que année après année, la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* a atteint un point culminant de 40% à l'encontre des antibiotiques « anti-Pseudomonas » y compris les carbapénèmes [50]. L'introduction des carbapénèmes en thérapeutique infectieuse a offert une alternative de traitement des infections bactériennes sévères, coïncidant au même moment à l'apparition de nouvelles espèces bactériennes résistantes au sein des bacilles à Gram négatif, et particulièrement les non fermentaires.

Les bactéries à Gram négatif disposent d'une multitude de mécanismes de résistance allant de la séquestration des antibiotiques, à leur dégradation (hydrolyse enzymatique ; β-lactamase type AmpC, β-lactamase à spectre élargi, carbapénémase), en passant par l'élution (pompes d'efflux ; OMP, OPr D) et les défauts de pénétration (pertes et modification de porines).

Sur une base moléculaire, deux types d'enzymes ont été décrites : Les enzymes à Sérine possédant une Sérine au sein du site actif, et les métallo-β-lactamases (MBLs), nécessitant un cation divalent ( $Zn^{2+}$ , le plus souvent) comme co-facteur. [51-53].

Comme toutes les β-lactamases, on retrouve des MBLs résidents (chromosomiques) et celles qui sont portés par des éléments mobiles transférables. Les premières études sur les MBLs chromosomiques ont été portées sur *Bacillus cereus* (BC II) [54] et *Stenotrophomonas maltophilia* (L1) [55].

#### **I.7.2.1. Classifications des MBLs**

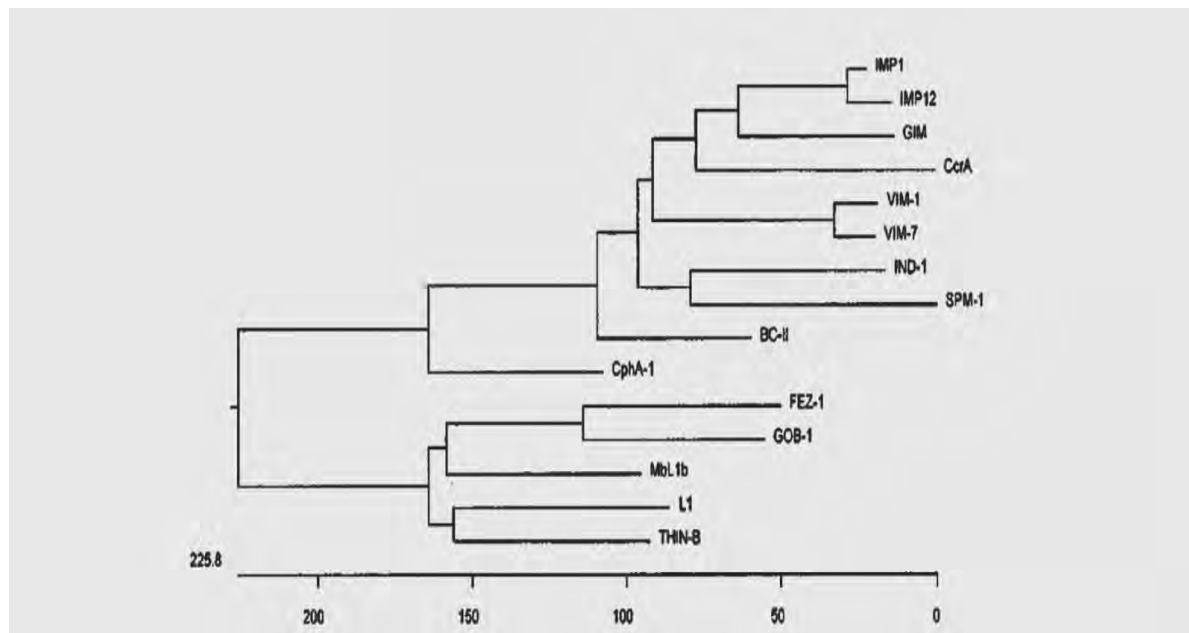
Les MBLs ont été catégorisés vers les années 1980, à partir des sérine- β-lactamases dans la classification d'Ambler [56]. A ce jour, seulement quelques MBLs étudiés méritent une inclusion à cette classification, exception faite de la MBL L1 de *S. maltophilia* et de BC II provenant de *B. cereus*. En 1989, Bush et coll., ont rassemblé à travers une classification les MBLs dans un groupe séparé (groupe 3) suivant leurs propriétés fonctionnelles, et qui semble



être la classification la plus utilisée des  $\beta$ -lactamases [57]. Le Schéma initial était basé le profil du substrat (en particulier l'hydrolyse de l'imipénème), leur sensibilité à l'EDTA, et l'absence d'activité des inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases à sérine. Ce Schéma a été mise à jour en 1995, et d'autres modifications apportées en 1997 ont permis de prendre en compte l'augmentation significative des enzymes du groupe 3 [58].

Toutes les MBLs dégradent l'imipénème, mais leur capacité à l'hydrolyse complète varie considérablement, et le pourcentage d'hydrolyse peut, ou peut ne pas être corrélé au niveau de résistance la bactérie aux carbapénèmes [59]. En effet, cette hydrolyse partielle de l'imipénème et de certain  $\beta$ -lactamines a permis de classer les enzymes en sous-groupes. Essentiellement, le sous-groupe 3a regroupe les enzymes possédant une activité hydrolytique à large spectre ; le sous-groupe 3b regroupe les enzymes possédant une affinité préférentielle aux carbapénèmes et le sous-groupe 3c, les enzymes ayant une activité hydrolytique faible vis-à-vis de l'imipénème comparé avec les autres  $\beta$ -lactamines. Cependant, toutes ces enzymes possèdent la caractéristique d'être inhibée par l'EDTA, aussi bien par d'autres chélateurs de cations divalents [58].

D'un point de vue moléculaire, les MBLs sont un groupe hétérogène de protéines rendant leur classification et la standardisation de leur structure impossible (**Figure 8**).



**Figure 8:** Arbre phylogénétique des MBLs Chromosomiques, représentant les différentes séquences de MBLs disponible dans la GenBank. L'alignement est réalisé sans le peptide signal des séquences d'acides aminés des MBLs, en utilisant le logiciel Clustal W (PAM250 matrix ; DNA star), basé sur la méthode du maximum de vraisemblance [58].



L'arbre phylogénétique de la figure 8, indique les relations des MBLs entre elles sur la base de leurs séquences d'acides aminés. La classe B1 est caractérisée par le fait que l'enzyme possède un atome de Zinc interagissant avec trois Histidine, et une cystéine comme les MBLs transférable IMP, VIM, GIM, SPM-1 et NDM. La classe B2 inclut les enzymes possédant un résidu d'Asparagine à l'instar de l'Histidine à la première position du motif liant le Zn, NXHxD et dérivant de *Aeromonas spp.* et *Serratia fonticola* (SFH-1). La MBL L1 est la seule enzyme appartenant à la classe B3, dont le site fonctionnel est caractérisé par une structure en tétramère [60].

### I.7.2.2. Les MBLs Chromosomiques

Certaines bactéries ayant l'environnement comme habitat naturel, hébergent souvent des MBLs dont l'origine reste encore à élucider malgré les tentatives d'explication. Un argument suggère, qu'à travers le temps les bactéries ont développé et maintenu par transmission verticale des mécanismes de résistance liée à une pression antibiotique de  $\beta$ -lactamines. L'autre argument suggère que la résistance fait partie des fonctions cellulaires dont l'expression reste encore à élucider. Cependant, il est unanime que la plupart de ces MBLs sont inductibles et la majorité des bactéries les hébergeant développent une multi-résistance aux  $\beta$ -lactamines. Heureusement, que ces bactéries sont des pathogènes opportunistes à l'exception de certaines espèces comme *S. maltophilia*, *Bacillus anthracis*. Parmi les MBLs décrits à ce jour, on retrouve le BC II (*B. cereus*) [61], BA (*B. anthracis*) [62], L1 (*S. maltophilia*) [63], CphA (*A. hydrophila*) [64], BlaB et GOB-1 de *E.* (anciennement *Chryseobacterium*) *meningoseptica*, IND-1 et dérivés de *C. indologenes* [65], CGB-1 de *C. gleum* [66], FEZ-1 de *Legionella gormannii* [67], Mbl1B de *Caulobacter crescentus* [68], TUS-1 et MUS-1 de *Myroides spp.* [68], THIN-B de *Janthinobacterium lividium* [70], SFH-1 de *Serratia fonticola* [71], (Tableau XI).

**Tableau XI:** MBLs Chromosomiques [71].

Sous-groupe	Organismes	Enzyme
<b>B1</b>	<i>Bacillus cereus</i>	<b>BCII-5/B/6</b> <b>BCII-569/H</b>
	<i>Bacillus anthracis</i>	<b>Bla2</b>
	<i>Alkalophilic Bacillus spp.</i>	<b>Bce 170</b>
	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	<b>IND-1 à IND-16</b>
	<i>E meningoseptica</i>	<b>BlaB</b> <b>BlaB2, BlaB3/BlaB4</b>
	<i>Chryseobacterium gleum</i>	<b>CGB-1</b>
	<i>Myroides odoratus</i>	<b>TUS-1</b>
	<i>Chryseobacterium johnsoniae</i>	<b>JOHN-1</b>
	<i>Aeromonas hydrophilia</i>	<b>CphA</b>
	<i>Aeromonas veronii</i>	<b>ImiS</b>
<b>B2</b>	<i>Serratia fonticola</i>	<b>SFH-1</b>
<b>B3</b>	<i>Caulobacter crescentus</i>	<b>Mb11B</b>
	<i>Janthinobacterium lividium</i>	<b>THIN-B</b>
	<i>Legionella gormanii</i>	<b>FEZ-1</b>
	<i>E meningoseptica</i>	<b>GOB-1-7</b>
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<b>L1a</b> <b>L1-BlaS</b> <b>L1c, L1d, L1e</b>

### I.7.2.3. Détection des MBLs

Tout comme l'intérêt épidémiologique de détection précoce des BLSE ( $\beta$ -lactamase à spectre élargi), il est judicieux de détecter les MBLs pour les mêmes raisons. Malheureusement, il n'existe aucune méthode de détection phénotypique des MBLs, et les critères de tests dépendent de l'espèce bactérienne, du fait du niveau d'expression de la résistance aux carbapénèmes variable. Par exemple, la plupart des entérobactéries, certaines espèces de *Acinetobacter*, *C. gleum*, et même certaines espèces de *C. indologenes* sont sensibles à l'imipénème avec des CMI entre 1 à 4  $\mu\text{g/mL}$  malgré la présence de gènes codant pour une MBL dans leur patrimoine génétique [72 ; 73]. Il est possible de rechercher une

MBL chez les entérobactéries en utilisant des tests combinant la Cefotazidime avec de l'EDTA, à condition que la bactérie ne produise pas simultanément une BLSE.

L'identification de certaines  $\beta$ -lactamases peut être réalisée par focalisation isoélectrique en incorporant un substrat chromogénique, la nitrocéfine pour déterminer le point isoélectrique des enzymes. Cette technique est basée sur les propriétés de surface de charge des enzymes à un certain pH. Pour des enzymes proches comme les TEM, SHV, la détermination du point isoélectrique est un excellent outil d'identification. Cependant pour les MBLs qui diffèrent les unes des autres, cette technique d'isoélectrofocalisation n'est pas recommandée. Néanmoins, elle reste un excellent outil pour la détection de nouvelles MBLs en la combinant avec un test d'inhibition avec de l'EDTA (**Figure 9A** et **Figure 9B**) [74].

En partant du fait que l'activité de toutes les MBLs est affectée, par l'absence des atomes Zn dans le site actif, leur détection peut être facilitée en utilisant des chélateurs spécifiques du métal. Cependant, les MBLs varient en fonction de leur niveau d'inhibition et de leur capacité à conférer une résistance à la Cefotazidime et à l'imipénème, deux substrats fréquemment utilisés pour la recherche des MBLs.



**Figure 9:** Recherche de production d'une MBL. A, Mise en évidence d'une MBL par la méthode de synergie utilisant le double disque (IPM + EDTA). *C. indologenes* isolé au laboratoire de bactériologie-virologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec. (Photo, Ce présent travail). B, Mise en évidence d'une MBL utilisant une Bandelette E-test. Image d'un *Acinetobacter spp.* exprimant un VIM-2. Du côté droit, la bandelette est imprégnée l'imipénème, avec une CMI à 64  $\mu\text{g/mL}$ . Côté gauche de la bandelette, Bandelette imprégnée d'IPM+ Inhibiteur (EDTA).  $< \text{à } 1 \mu\text{g/mL}$ .

La technique de référence non moléculaire, bien implémentée dans les laboratoires de recherche, consiste à mesurer d'une part l'activité hydrolytique d'un extrait de culture bactérienne, en présence l'imipénème et d'autre part l'inhibition de cette activité par l'EDTA. Ces données permettent de mettre en évidence la production de l'enzyme par la bactérie hébergeant le gène de résistance. Cependant, cette technique utilisant des méthodes spectrophotométriques nécessite des équipements de haute technologie limitant leur utilisation en routine.

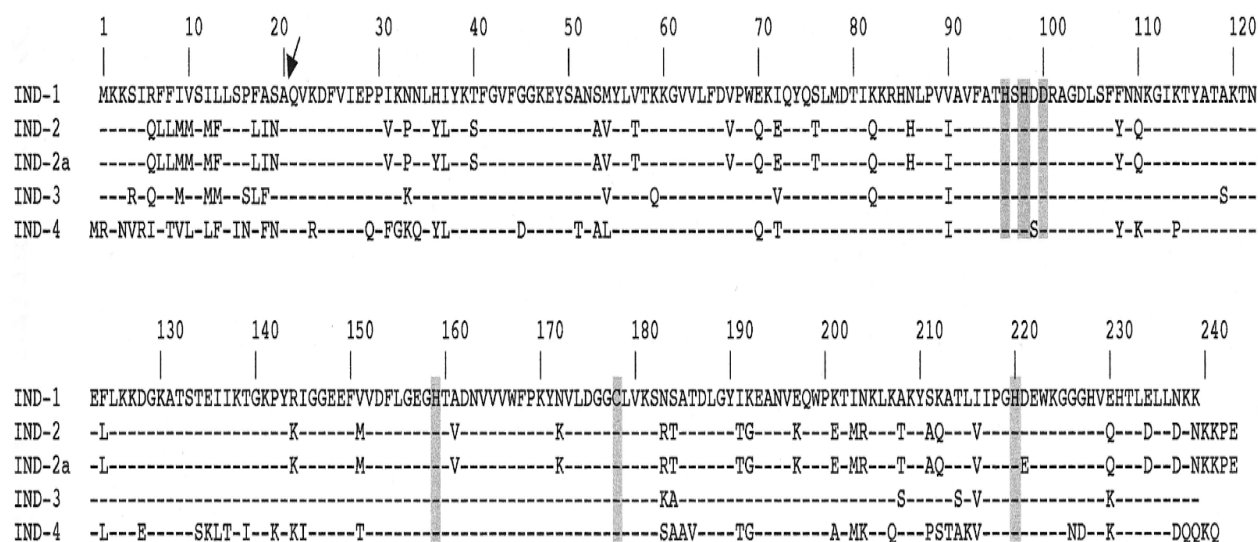
Le technique de référence reste moléculaire qui nécessite l'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) des gènes de résistance. Cette technique de détection, qui ne permet d'identifier la MBL, est suivie d'un séquençage nucléotidique.

#### **I.7.2.4. Les métallo- $\beta$ -lactamases IND et CGB**

Ces dernières années (2000), nous assistons à un regain d'intérêt aux bactéries du genre *Chryseobacterium*, résistants aux carbapénèmes par production de MBL. Ces MBLs, codés par des gènes chromosomiques ont été décrits auparavant chez *C. indologenes* et *C. gleum*. Elles sont caractérisées par une diversité génétique très importante, et divergentes d'environ 20 % les unes des autres en séquences d'acides aminés. A ce jour 16 variantes de MBLs chromosomiques, de IND-1 à IND-16 ont été décrites et nommées par ordre chronologique d'identification.

## IND-1 à IND-4

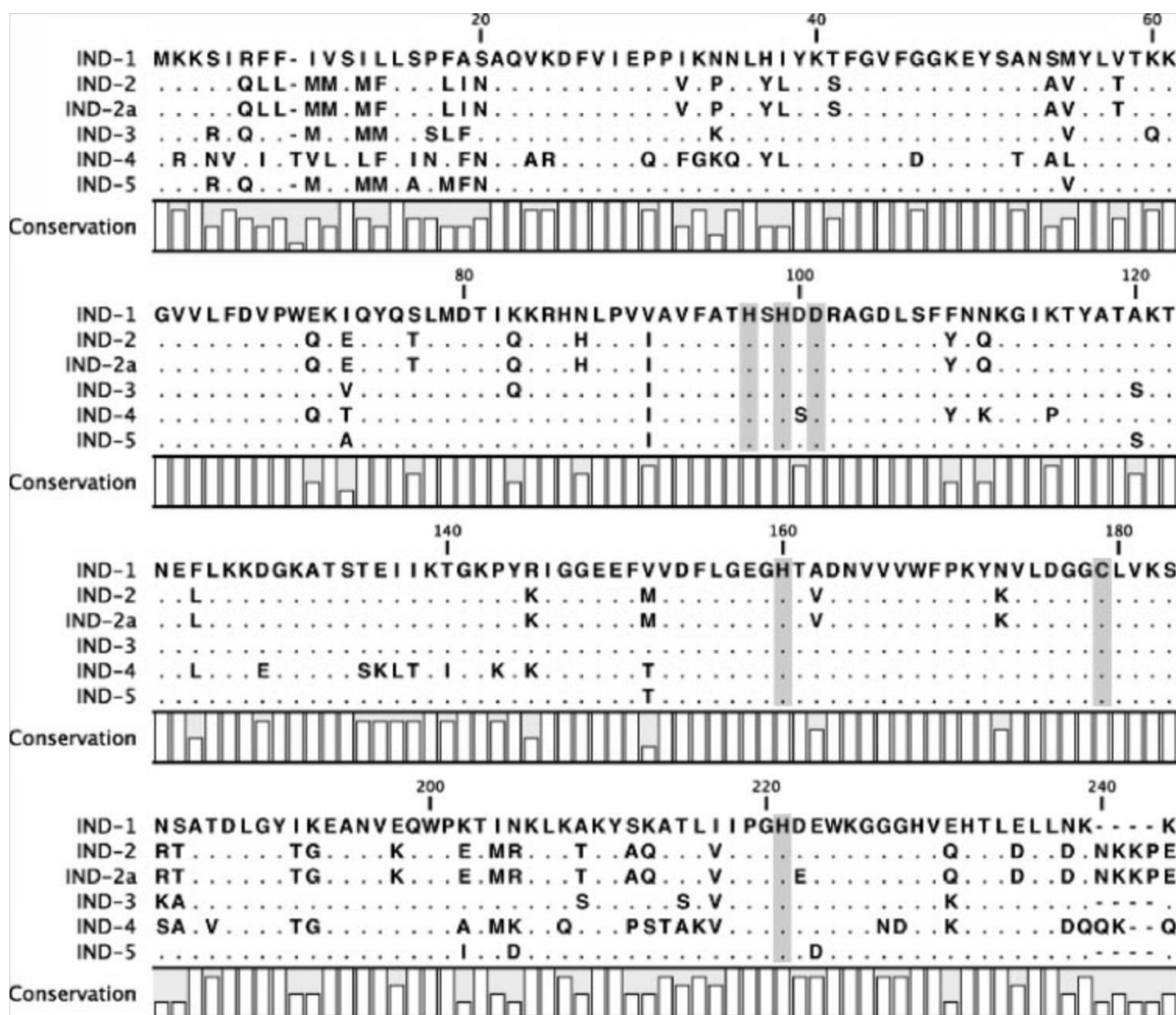
Les premières variantes, IND-1 à IND-4, ont été isolées de *C. indologenes* en France avec 77 à 99% d'homologie en séquence d'acides aminés [65] (**Figure 10**).



**Figure 10:** Alignement de séquences d'acides aminés des IND-types enzymes de 10 *C. indologenes*. Les traits d'union désignent des acides aminés similaires. Les bandes surlignées verticales correspondent aux acides aminés conservés du site actif. La flèche désigne le site de clivage du peptide signal, déterminé pour le IND-2 par analyse de la séquence de l'extrémité N-terminal d'une culture de *E. coli* DH10B (pSO-2) [65].

## IND-5

La MBL, IND-5 identifiée à partir d'une souche de *C. indologenes* isolée en Italie partage 92,8 % et 92,4 % de séquences d'acides aminés respectivement de IND-1 et IND-3 (**Figure 11**). L'enzyme purifiée (pI = 8,8 ; Mr = 25 000) est capable d'hydrolyser les pénicillines, les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, les carbapénèmes, mais aucune activité sur les monobactames [75].



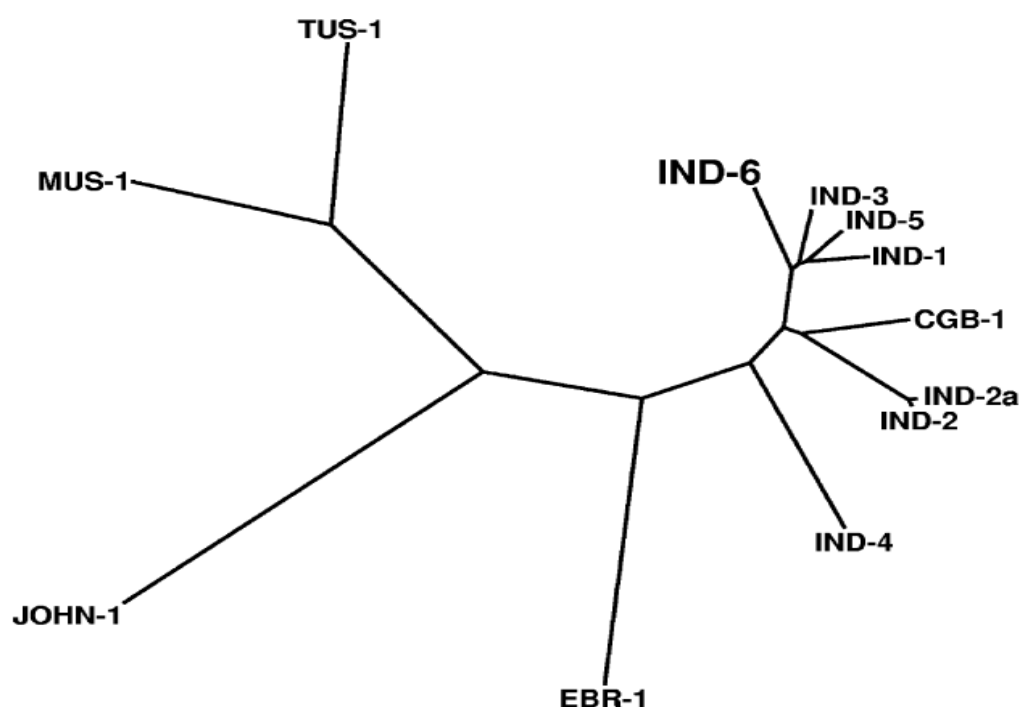
**Figure 11:** Comparaison des séquences d'acides aminés de IND-5 (Numéro d'accension AY504627), avec celles de IND-1, IND-2, IND-2a, IND-3 et IND-4. Les points représentent les acides aminés similaires [75].

## IND-6

Identifiée à partir d'une souche de *C. indologenes* isolée au Burkina Faso, IND-6 est une MBL hautement divergente ayant 72% et 90 % d'homologie en séquences d'acides aminés de IND-4 et IND-5 respectivement (Figure 12). La MBL IND-6 est isolée de *C. indologenes* 597, est plus proche de IND-5 à 89,5% et le plus éloigné de IND-4 à 71,5% (**Figure 13**). L'enzyme purifiée exhibe une hétérogénéité et une modification post-traductionnelle consistant à la présence d'un résidu pyroglutamate à l'extrémité N-terminale. IND-6 montre un spectre élargi avec un taux élevé de turnover par rapport à IND-5 avec une capacité d'hydrolyse étendue à la Ceftazidime et au Céfépime. [15].

	17					63						109
IND-1	.MKKSIRFFI	VSILLSPFAS	AQVKDFVIEP	PIKNNLHIYK	TFGVFGGKEY	SANSMYLVTK	KGVVLFDPWP	EKIQYQSLMD	TIKKRHNLPV			
IND-2	.MKKSIQLLM	MSMFLSPLIN	AQVKDFVIEP	PVKPNLYLYK	SFGVFGGKEY	SANAVYLTTK	KGVVLFDPWP	QKEQYQTLMD	TIQKRHHLPV			
IND-2a	.MKKSIQLLM	MSMFLSPLIN	AQVKDFVIEP	PVKPNLYLYK	SFGVFGGKEY	SANAVYLTTK	KGVVLFDPWP	QKEQYQTLMD	TIQKRHHLPV			
IND-3	.MKKRIOFFM	VSMMLSSLFS	AQVKDFVIEP	PIKNNLHIYK	TFGVFGGKEY	SANSVYLVTQ	KGVVLFDPWP	EKVQYQSLMD	TIQKRHNLPV			
IND-4	MRKNVRIFTV	LSLFLINFFN	AQARDFVIEQ	PFGKQLYLYK	TFGVFDGKEY	STNALYLVTK	KGVVLFDPWP	QKTQYQSLMD	TIKKRHNLPV			
IND-5	.MKKRIOFFM	VSMMLAPMFN	AQVKDFVIEP	PIKNNLHIYK	TFGVFGGKEY	SANSVYLVTK	KGVVLFDPWP	EKAQYQSLMD	TIKKRHNLPV			
IND-6	.MKRRIQFFM	VSMMLTPLFS	AQVKDFVIEP	PIKKNLYIYK	TFGVFGGKEY	SANSVYLVTK	KGVVLFDPWP	EKAQYQSLMD	TIKKRHNLPV			
	116	120			150			196				221
IND-1	VAVFATHSHD	DRAGDLSFFN	NKGIKTYATA	KTNEFLKKDG	KATSTEIIKT	GKPYRIGGEE	FVVDLFGEGH	TADNVVWVFP	KYNVLDGCGCL			
IND-2	IAVFATHSHD	DRAGDLSFYN	QKGIKTYATA	KTNELLLKDG	KATSTEIIKT	GKPYKIGGEE	FMVDLFGEGH	TVDNVVWVFP	KYKVLDDGCGCL			
IND-2a	IAVFATHSHD	DRAGDLSFYN	QKGIKTYATA	KTNELLLKDG	KATSTEIIKT	GKPYKIGGEE	FMVDLFGEGH	TVDNVVWVFP	KYKVLDDGCGCL			
IND-3	IAVFATHSHD	DRAGDLSFFN	NKGIKTYATS	KTNEFLKKDG	KATSTEIIKT	GKPYRIGGEE	FVVDLFGEGH	TADNVVWVFP	KYNVLDGCGCL			
IND-4	IAVFATHSHS	DRAGDLSFYN	KKGIPTYATA	KTNELLLKEG	KATSSKLTKI	GKKYKIGGEE	FTVDLFGEGH	TADNVVWVFP	KYNVLDGCGCL			
IND-5	IAVFATHSHD	DRAGDLSFFN	NKGIKTYATS	KTNEFLKKDG	KATSTEIIKT	GKPYRIGGEE	FTVDLFGEGH	TADNVVWVFP	KYNVLDGCGCL			
IND-6	VAVFATHSHD	DRAGDLSFFN	NKGIKTYATD	KTNEFLKKDG	KATSTELIKP	GKPYRIGGEE	FVVDLFGEGH	TADNVVWVFP	KYKVLDDGCGCL			
	223				263			298				
IND-1	VKSNSATDLG	YIKEANVEQW	PKTINKLKAK	YSKATLIIPG	HDEWKGGGHV	EHTLELLNKK	....					
IND-2	VKSRTATDLG	YTGEANVKQW	PETMRKLKTK	YAQATLVIPG	HDEWKGGGHV	QHTLDLLDKN	KKPE					
IND-2a	VKSRTATDLG	YTGEANVKQW	PETMRKLKTK	YAQATLVIPG	HEEWKGGGHV	QHTLDLLDKN	KKPE					
IND-3	VKSKAATDLG	YIKEANVEQW	PKTINKLKSK	YSKASLVIPG	HDEWKGGGHV	KHTLELLNKK	....					
IND-4	VKSSAAVDLG	YTGEANVEQW	PATMKKLQAK	YPSTAKVIPG	HDEWKGNHNV	KHTLELLDQK	KQ..					
IND-5	VKSNSATDLG	YIKEANVEQW	PITIDKLKAK	YSKATLIIPG	HDEWKGGGHV	EHTLELLNKK	....					
IND-6	VKSNSATDLG	YIKEANVEQW	PKTMHKLKTK	YSAVLIIPG	HDEWKGGGHV	EHTLELLDKN	....					

**Figure 12:** Alignement des séquences d'acides aminés des IND-types enzymes de IND-1 à IND-6. Les résidus d'acides aminés composant le site actif est surligné en noir et les résidus uniques de IND-6 sont encadrés [15].

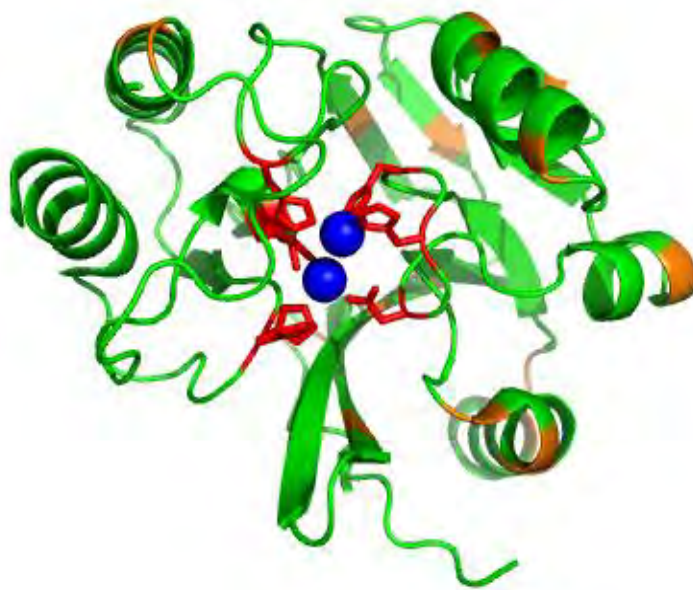


**Figure 13:** Arbre phylogénétique montrant les relations de IND-6 avec les autres MBLs identifiées de bactéries de la famille des *Flavobacteriaceae* [15].

### IND-7

Elle représente la septième MBL à être décrite, et présente 100% d'homologie en séquences d'acides aminés avec le IND-1. Le IND-7 est la seule MBL à disposer d'une structure cristallisée réalisée par cristallographie aux rayons X à 1,65 Å. La structure globale est faite de 4 couches de chaînes peptidiques  $\alpha\beta/\beta\alpha$  prenant en sandwich deux atomes de Zinc, Zn1 et Zn2, représentant le site actif. La structure globale du IND-7 est similaire aux autres enzymes de la sous classe B-1 des MBL avec cependant une différence fondamentale observée au sein du site actif; la coordination géométrique autour du Zn1 change d'une conformation tétraédrique observée dans les MBLs de la sous classe B1 à une conformation trigonale pyramidale, alors que le Zn2 change d'une conformation trigonale pyramidale à une conformation tétraédrique. L'Arg121 (101), localisée aux environs de site actif contenant le complexe binucléé Zn, affecte l'affinité du Zn2 du fait de la répulsion électrique des cations Zn et la charge positive du groupe guanidyl de l'Arg121 (101). De plus, les interactions des liaisons à hydrogène entre l'Arg121 et la Ser71 qui sont conservés chez les IND-1, IND-3, IND-5 et IND-7 semble avoir d'importantes conséquences sur l'affinité avec le Zn2 en conjonction avec les effets électrostatiques (**Figure 14**) [76].



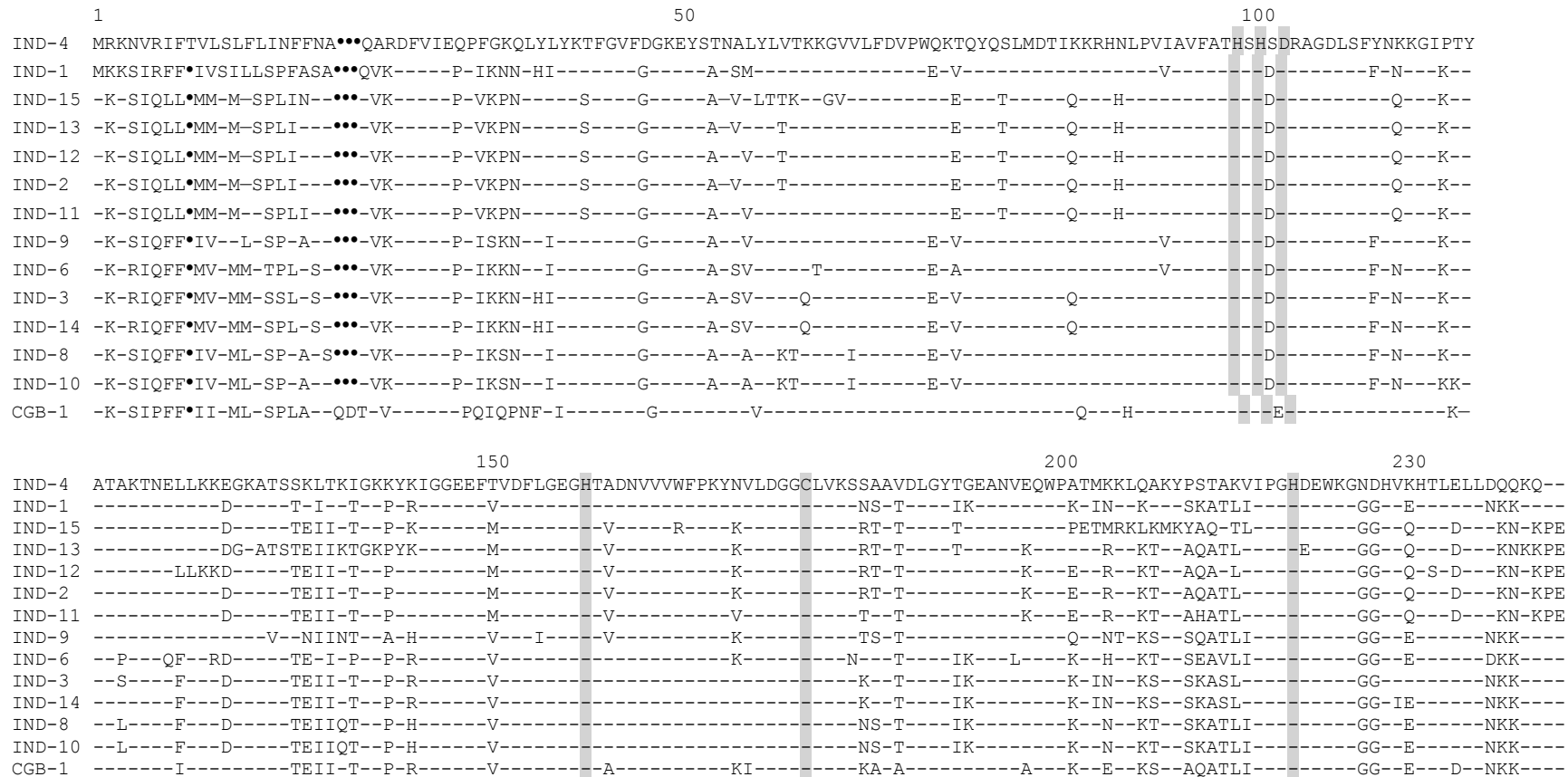


**Figure 14:** Structure cristalline du IND-7, obtenue par cristallographie aux rayons-X. Le site actif est coloré en rouge, au centre duquel se trouve les deux atomes de Zn. (Image PyMol).

#### **Les autres MBL : IND-8 à IND-15 et CGB-1**

Les IND-1 à IND-6 sont les seules MBLs ayant bénéficié d'une production et d'une identification moléculaire et biochimique de l'enzyme. Les séquences d'acides aminés déposés dans la GenBank ont néanmoins permis d'étudier les relations phylogénétiques entre elles, et les proportions de similitude (**Figure 15**).

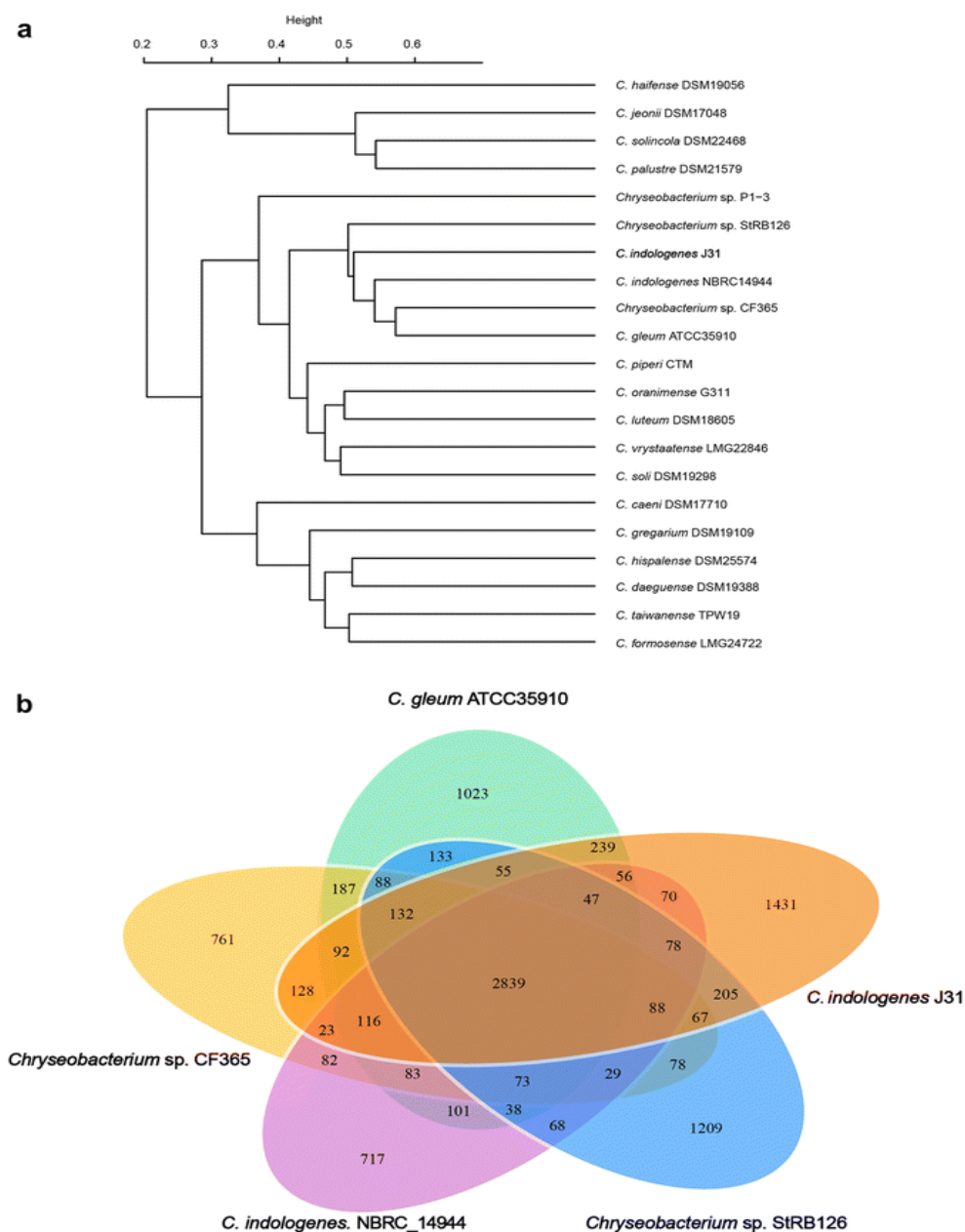
Pour *C. gleum*, seulement une seule MBL, a été caractérisée à ce jour, le CGB-1.



**Figure 15:** Comparaison des séquences d'acides aminés des IND-type-β-lactamases de *Chryseobacterium indologenes* (IND-1 à IND-15) et *Chryseobacterium gleum* (CGB-1). Les pointillés indiquent les acides aminés identiques et les délétions respectivement. La flèche verticale, indique le site de clivage du peptide signal. Les bandes soulignées indiquent les acides aminés constituant le site actif contenant les deux atomes de Zn.

## IND-16

La dernière MBL caractérisée, le IND-16 a été isolée d'une souche de *C. indologenes* (Souche J31) provenant de la Chine. Elle partage 99% d'homologie en séquences d'acides aminés avec IND-8 et IND-10 caractérisées en Corée du Sud [77].



**Figure 16:** Arbre Phylogénétique génomique et diagramme de Venn avec 5 génomes complets de *Chryseobacterium*. a) Analyse phylogénétique montrant les relations entre *C. indologenes* J31 avec 20 génomes complets de *Chryseobacterium spp.* de la GenBank. b) diagramme de Venn montrant les groupes orthologues entre les 05 génomes de *Chryseobacterium*. Les nombres à l'intérieur désignent le nombre de gène commun entre les génomes [77].

Les MBL décrites chez les bactéries du genre *Chryseobacterium* sont caractérisés par des CMI élevés par rapport aux  $\beta$ -lactamines (**Tableau XII**).

**Tableau XII:** CIM de  $\beta$ -lactamines pour quelques MBLs.

	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ ) pour :								
	IND1/IND7	IND2	IND3	IND4	IND5	IND6	IND8-15*	IND16	CGB1
<b>Amoxicilline</b>	<b>256</b>	<b>256</b>	<b>256</b>	<b>256</b>	<b>&gt;64</b>	<b>&gt;64</b>	<b>ND</b>	<b>&gt;32</b>	<b>ND</b>
<b>Ticarcilline</b>	<b>256</b>	<b>512</b>	<b>512</b>	<b>512</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>256</b>
<b>Pipéracilline</b>	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>4</b>	<b>ND</b>	<b>&gt;128</b>	<b>2</b>
<b>Céfalogtine</b>	<b>256</b>	<b>256</b>	<b>128</b>	<b>128</b>	<b>ND</b>	<b>&gt;64</b>	<b>ND</b>	<b>-</b>	<b>ND</b>
<b>Céfépime</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>ND</b>	<b>&gt;64</b>	<b>1</b>
<b>Céfoxitine</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>ND</b>	<b>16</b>	<b>ND</b>	<b>-</b>	<b>ND</b>
<b>Ceftazidime</b>	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>ND</b>	<b>-</b>	<b>4</b>
<b>Céfotaxime</b>	<b>64</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>ND</b>	<b>&gt;64</b>	<b>32</b>
<b>Aztréonam</b>	<b>&gt;128</b>	<b>&gt;128</b>	<b>&gt;128</b>	<b>&gt;128</b>	<b>32</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>-</b>	<b>&gt;512</b>
<b>Imipénème</b>	<b>32</b>	<b>64</b>	<b>32</b>	<b>4</b>	<b>32</b>	<b>&gt;64</b>	<b>ND</b>	<b>&gt;16</b>	<b>2</b>

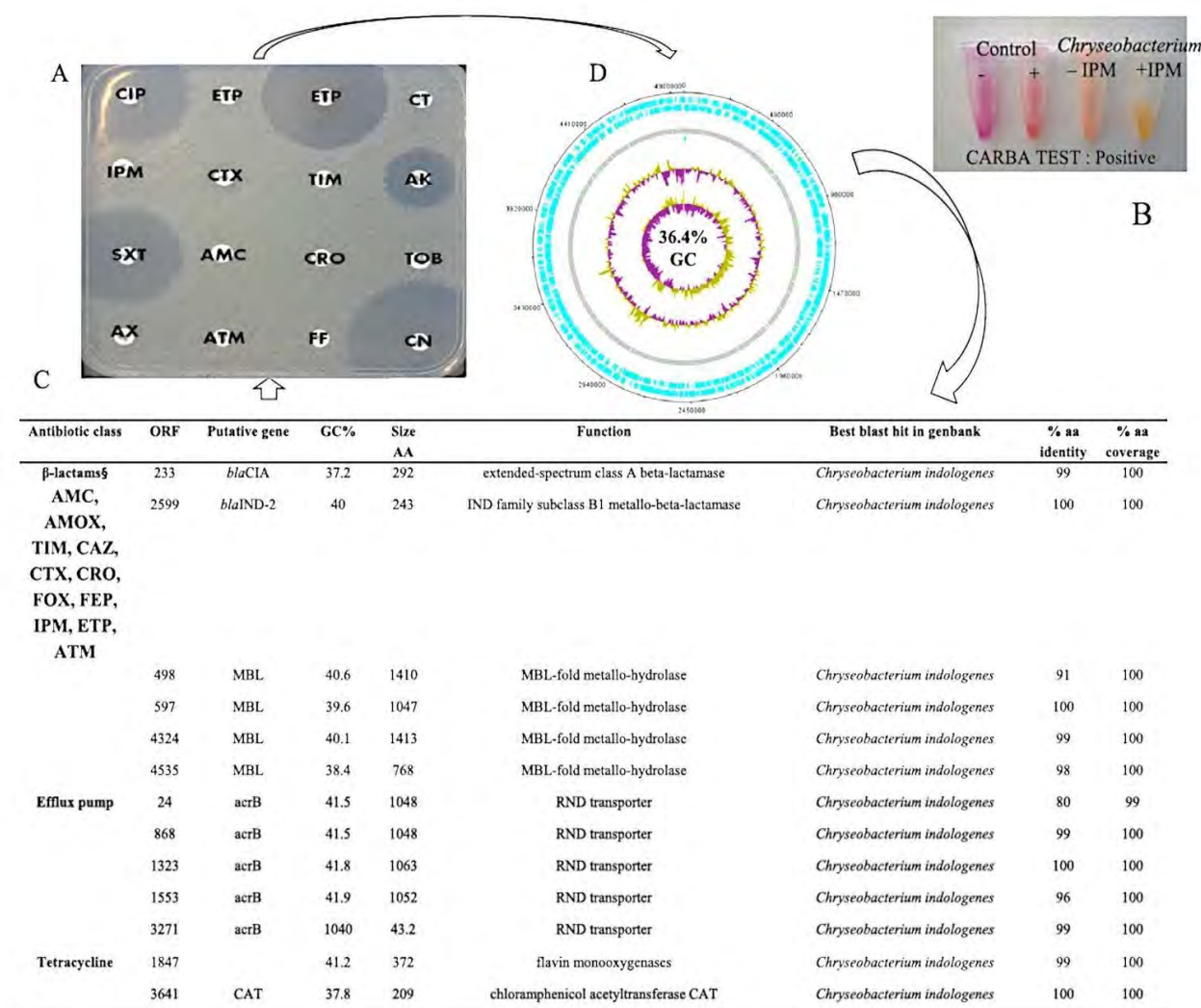
\*Absence de données de l'antibiogramme pour ces MBLs (juste séquence d'acides aminés disponibles dans la Genbank). ND, Non déterminé.

### I.7.3. Le résistome des bactéries du genre *Chryseobacterium*

Les bactéries du genre *Chryseobacterium* sont caractérisées par une résistance croisée à plusieurs classes d'antibiotiques, par l'intermédiaire d'une MBL, IND quand il s'agit de *C. indologenes* et de CGB, pour *C. gleum*. La disposition pour ces bactéries, d'un gène *bla*<sub>IND</sub> ou *bla*<sub>CGB</sub>, à elle seule ne peut justifier ce spectre étendu de résistance aux antibiotiques. Pour comprendre, les mécanismes de résistance de ces bactéries, le séquençage du génome complet d'une souche de *C. indologenes* MARS15, isolée à Marseille a permis de déchiffrer le résistome (partie du génome impliquée dans les mécanismes de résistance) de cette bactérie [78].

Le génome dispose d'une taille de 4 972 580 bp avec 36,4% de GC, et aucun plasmide n'a été détecté. Au total, 4592 cadre de lecture ouverte (ORFs) ont été détectés, incluant 1754 (38%) ORFs annotés comme étant des protéines et 69 ARNs (1 ARN 23S ribosomal, 1 16S ARN

ribosomal et 4 ARN 5S ribosomal). Sur les 4592 cadres de lectures, 3072 sont assignés à une



**Figure 17:** Le Résistome de *C. indologenes* MARS15. Du génotype au phénotype de *Chryseobacterium indologenes* MARS15. A) Antibiogramme testant la sensibilité à AK : Amikacine ; AMC, Amoxicilline + acide clavulanique ; ATM, Aztréonam ; AX, Amoxicilline, CIP, Ciprofloxacine ; CN, Gentamycine, CRO, ceftriaxone, CT, Colistine ; CTX, Céfotaxime ; FOX, Céfoxitine, IPM, Imipénème ; SXT, triméthoprime-sulfaméthoxazole ; TIC, Ticarcilline ; TIM, Ticarcilline + acide clavulanique ; TOB, Tobramycine. B) Résultats du test Carba NP modifié, le changement de couleur note la présence de  $\beta$ -lactamase. C) Liste des gènes codant pour une résistance. D) Cartographie circulaire du chromosome [78].

## **Deuxième partie : Analyse des travaux**

## I. PROBLEMATIQUE

### I.1. Le problème global de la résistance aux antibiotiques

Après plusieurs années d'utilisation anarchique des antibiotiques, nous rentrons dans une période de risque d'impasse thérapeutique et de pénurie, avec l'apparition de bactéries résistantes aux dernières classes d'antibiotiques disponibles dans l'arsenal thérapeutique que sont les carbapénèmes et les glycopeptides [79 ; 80]. Les scientifiques s'associent à l'initiative de l'OMS qui appelle à la mise en place d'actions urgentes et vigoureuses : développement de nouvelles molécules, protection des antibiotiques et lutte contre la diffusion de la résistance en passant par la surveillance.

La surveillance de la résistance aux antibiotiques fait partie intégrante de la politique de lutte contre la résistance et du bon usage des antibiotiques. Elle est récemment devenue réglementaire et est fortement conseillée pour tous les établissements de santé en France.

L'acquisition des gènes de résistances se fait le plus souvent par des transferts, d'une bactérie à une autre, par l'intermédiaire d'éléments mobiles (plasmides, transposons), sans barrière d'espèces ou de genre. La dissémination de ces bactéries résistantes aux antibiotiques, dont la sélection est favorisée par la **pression antibiotique**, se fait dans le milieu hospitalier mais aussi communautaire. En milieu hospitalier, cette transmission est appelée **nosocomiale** et est secondaire au manu-portage des bactéries par le personnel soignant et au manque d'hygiène en général, notamment dans les hôpitaux des pays en voie de développement (PVD). Les infections nosocomiales (IN) touchent environ 5 à 10% des patients dans les pays industrialisés (2 millions de patients par an aux USA et cela a représenté 88 000 morts en 1995, pour un coût allant de 4,5 à 11 milliards de dollars) [81]. Leur impact est important, sur le plan sanitaire (contribution à l'augmentation de la morbidité et de la mortalité) comme sur le plan économique (les IN consomment à elles seules 15 à 20% des dépenses hospitalières) [82]. En Afrique subsaharienne, de nombreuses contraintes techniques, écologiques, économiques et politiques perturbent l'exercice médical et majorent le risque nosocomial pour les patients comme pour le personnel soignant. [83]. Enfants et adultes subissent ce préjudice qui aggrave la mortalité et la morbidité de l'affection initiale et, de fait paupérise leur foyer familial (surcoût des dépenses de santé, perte de revenue, funérailles). Le poids humain et économique de ce drame quotidien, n'est pas évalué et est sous-estimé. L'approche de la situation des IN des patients en Afrique, passe nécessairement par l'étude des rares données de la littérature. L'émergence et la diffusion des infections nosocomiales résultent de l'interaction morbide d'agents pathogènes, d'actions de soins et de patients vulnérables. L'exercice médical en région africaine intertropicale comporte plus de situations à risque que

dans les pays développés [83]. L'extension de la multirésistance aux antibiotiques est un élément indissociable de la problématique des IN que l'on ne peut plus négliger en Afrique. [84 ; 85].

Au Sénégal, la situation reste toute aussi inquiétante. En effet, à l'initiative du CLIN (Comité de Lutte contre les infections nosocomiales) du centre hospitalier de Fann, une enquête de prévalence "un jour donné" ayant porté sur 175 patients, soit une occupation de 54,9 % des lits disponibles a permis d'apprécier l'ampleur de la situation. Les infections nosocomiales retrouvées ont concerné surtout la tranche d'âge 20 à 44 ans, avec une prédominance féminine. Cinquante-huit pour cent de ces infections nosocomiales ont été recensées dans le service de neurologie. Elles étaient surtout d'origines urinaires (40 %) et pulmonaire (25 %). Les germes responsables étaient des bactéries multirésistantes notamment *Enterobacter cloacae* (sécrétrice de bêta lactamase à spectre élargi), *Staphylococcus aureus* méticillino résistant et *Pseudomonas aeruginosa*. Les patients, porteurs d'infections nosocomiales, étaient généralement sous traitement antibiotique (80 %) avec des protocoles variés, la majorité étant sous monothérapie. Les antibiotiques utilisés étaient les bêtalactamines, les fluoroquinolones et les nitro-imidazolés [86].

## **I.2. *Chryseobacterium*, un pathogène émergeant naturellement résistant aux carbapénèmes**

Les bactéries du genre *Chryseobacterium* sont des bacilles à Gram négatif immobiles, non fermentaires, aérobies strictes, oxydase et indole positifs. *C. indologenes* a été isolé la première fois en 1993 d'aspiration trachéale chez un patient ayant une ventilation pulmonaire assistée [1]. Depuis leur implication, au cours d'épidémie d'infections nosocomiales en Taiwan, Les bactéries du genre *Chryseobacterium*, rarement retrouvées en pathologie humaine, ont commencé à susciter un intérêt épidémiologique du fait, d'une part de leur isolement de plus en plus croissant en milieu hospitalier, et d'autre part de leur résistance à plusieurs classes d'antibiotiques. [11]. En milieu hospitalier, *C. indologenes* est une bactérie ubiquitaire que l'on peut isoler dans les systèmes de conduit d'eau, les systèmes de récolte des effluents hospitaliers, des systèmes de ventilation et de climatisation, ainsi que sur les surfaces des équipements médicaux [5 ; 10]. Les bactéries du genre *Chryseobacterium* sont généralement résistantes à plusieurs classes d'antibiotiques, y compris les carbapénèmes (comme par exemple l'imipénème) considérés comme les antibiotiques les plus puissants disponible dans l'arsenal thérapeutique utilisés pour le traitement des infections hospitalières à bactéries multirésistantes (BMR). Cette résistance est liée à la production d'une enzyme de



classe B, de la classification de Ambler (Métallo-b-lactamse), codée par un gène résident *bla*<sub>IND</sub> ou *bla*<sub>CGB</sub>, caractérisé par une diversité génétique très importante. A ce jour 16 types de MBL ont été caractérisés et déposés dans la GenBank, dont le dernier en Chine. Les conséquences de cette diversité génétique de la MBL, chez ces bactéries combinant d'autres mécanismes de résistances (b-lactamase de classe A, Pompe d'efflux, CAT...), encore méconnues et la hantise de leur transfert à d'autres bactéries virulentes et sensibles font de ces bactéries un pathogène émergent d'importance croissante suscitant un intérêt de la communauté scientifique.

## **II. CADRE DE L'ETUDE**

### **II.1. Laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec**

Le présent travail a démarré avec la découverte fortuite de la première souche de *Chryseobacterium indologenes* en 2013, au laboratoire de bactériologie-virologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec, centre hospitalier national universitaire (CHNU). Après l'isolement, de cette souche rare, le monitoring mis en place, a permis d'isoler 08 souches du même genre, identifiées en utilisant les techniques classiques de bactériologie (culture, identification par galerie API).

Les confirmations d'identification ont été réalisées par spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS de Biomérieux) à l'Hôpital Principal de Dakar (HPD).

### **II.2. Dipartimento di Biotechnologie Mediche. Policlinico Le Scotte. Università di Siena**

La caractérisation des gènes de résistance codant pour les MBLs des souches, a nécessité la mise en place d'une collaboration scientifique avec le laboratoire de Biotechnologie médicale de l'Hôpital Le Scotte de l'université de Sienne en Italie. C'est un laboratoire reconnu sur le plan international, pour ses compétences dans le domaine de la résistance des bactéries aux antibiotiques et a publié les MBLs IND-5 et IND-6, cette dernière caractérisée à partir d'une souche de *C. indologenes* isolé au Burkina Faso. Le IND-6, représente ainsi la première MBL publié en Afrique.

### **II.3. Centre d'Ingénierie des protéines de l'Université de Liège (Belgique)**

Le Centre d'Ingénierie des Protéines de l'Université de Liège est un laboratoire internationalement reconnu pour son expertise et ses compétences dans le domaine de la résistance aux antibiotiques, et a contribué à de nombreuses et importantes études relatives à la caractérisation fonctionnelle et structurale de bêta-lactamases. En particulier, ce laboratoire a décrit la première souche de *C. indologenes*, isolée en Afrique, qui a conduit à la caractérisation d'une nouvelle MBL résidente. Ce laboratoire dispose en particulier de toutes les compétences microbiologiques, moléculaires et enzymologiques nécessaires à la réalisation de ce projet, et s'inscrit dans le cadre d'une collaboration internationale.

## **III. OBJECTIFS**

### **III.1. Objectif principal**

L'objectif principal du projet, était la caractérisation moléculaire des souches de *Chryseobacterium* isolées (8 souches) au laboratoire de bactériologie-virologie du centre Hospitalier universitaire plus précisément l'identification et le séquençage des MBLs responsable de la résistance aux carbapénèmes, et ensuite leur caractérisation fonctionnelle s'il s'agit d'un nouvel variant.

### **III.2. Objectifs spécifiques**

Les objectifs spécifiques sont les suivants :

#### **Objectif spécifique N°1 : Etudier l'épidémiologie des infections à *Chryseobacterium* au Sénégal**

- Identification phénotypique (api 20 NE, MALDI-TOF MS) de tous les cas suspects d'infection à *Chryseobacterium*
- Recherche de clonalité entre les souches par électrophorèse en champ pulsé.
- Etude de la sensibilité aux antibiotiques par mesure des concentrations minimales inhibitrices (CMI).

#### **Objectif spécifique N°2 : Déterminer le génome complet par PCR inverse et séquençage**

- Amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) inverse par la méthode décrite par Bellais et coll :
- Digestion des amplicons par des enzymes de restriction,
- Circularisation par une ligase puis PCR utilisant des amorces IND-INV/+ et IND-INV/- .
- Analyse et annotation des séquences obtenues

**Objectif spécifique N°3 : Effectuer le clonage et la production de la MBL responsable de la résistance aux carbapénèmes :**

- les fragments circulaires amplifiés obtenus seront clonés utilisant un plasmide pMOSBlue
- Séquençage des produits de clonage
- Production à partir d'une suspension de culture de *E. coli* BL21, incubé à 37°C pendant 24 h, dans un 1 L tampon ZYP-5052 supplémenté avec la kanamycine.

**Objectif spécifique N°4 : Réaliser la purification et la caractérisation fonctionnelle de la MBL responsable de la résistance aux carbapénèmes :**

- Centrifugation de la suspension de culture
- Concentration par ultrafiltration
- Séparation par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et iso-électrofocalisation.
- Estimation de la masse moléculaire de l'enzyme par chromatographie
- Analyse par MALDI-TOF de l'enzyme (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization).

## **IV. METHODOLOGIE**

### **IV.1. Informations démographiques et cliniques des patients/Bactéries**

Huit souches de *Chryseobacterium spp.* ont été isolées à partir d'urine (6/8), de crachats (1/8) de liquides d'ascite (1/8) entre Janvier 2013 et Décembre 2015 au laboratoire de bactériologie-virologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec. Les caractéristiques cliniques et démographiques des patients sont consignées dans le **Tableau XII**.

### **IV.2. Identification taxonomique par API 20NE, spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS) et par séquençage de l'ARN 16S ribosomal**

L'identification initiale a été faite par galerie API 20NE et la spectrométrie de masse (Vitek MS matrix-assisted laser desorption/ionization) utilisant le système Microflex LT system [87]. Les limites de l'identification par spectrométrie de masse (base de données de spectres de masse incomplète), a nécessité la confirmation des identifications par séquençage de l'ARN 16S ribosomal utilisant les couples d'amorces Eubb (Reverse) and Euba (Forward). Après purification, les amplicons sont séquencés par l'ABI prism<sup>®</sup> 3730 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA) utilisant la méthode Sanger.

### IV.3. Amplification et séquençage des gènes codant pour les MBL

Pour caractériser les gènes *bla<sub>IND</sub>* et *bla<sub>CGB</sub>*, codant respectivement pour les MBLs IND et CGB, la technique de PCR a été mise au point utilisant 2 couples d'amorces, après extraction de l'ADN génomique par gradient de phase (Phénol/Chloroforme) [65] (Tableau XIII). Les produits de PCR sont séquencés par l'ABI prism<sup>®</sup> 3730 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA) utilisant la méthode Sanger.

Pour étudier les relations phylogénétiques entre les MBLs IND et CGB, 49 séquences d'acides aminés de MBL de la GenBank ont été alignées avec les 8 séquences d'acides aminés des MBLs de notre travail utilisant l'algorithme MUSCLE du logiciel Geneious. Cet alignement a été corrigé manuellement. Au total, ce sont 58 séquences d'acides aminés de MBLs qui ont été alignées, incluant la séquence d'une bactérie non cultivable (AMP55553), utilisée comme séquence extra-groupe. L'analyse phylogénétique a été réalisée en se basant sur la méthode de maximum de vraisemblance « Likelihood », suivant le modèle de Le et Gascuel, avec une discrète gamma-distribution [88], après construction de la protéine ML, comme modèle test implémenté dans le MEGA 6.06. Le meilleur modèle a été choisi sur la base des meilleurs critères d'information Akaike's (AIC) et Bayésien (BIC). L'analyse statistique de l'arbre phylogénétique, a été réalisée en utilisant l'analyse bootstrap avec 1000 répliques.

**Tableau XIII:** Amorces utilisées pour l'amplification de polymérisation en chaîne PCR des gènes codant pour les MBLs IND et CGB.

Primer	Sequence (5'-3')	Amplicon (bp)	Annealing (°C)
IND/fwd	<b>TGCCCAGGTWAAAGATTTTG</b>	720	48
IND/rev	<b>CCTTTCATTTCRTCRTGTCC</b>		
CGB1_exp/fw	<b>GGGAATTCCATATGAAAAAAGCATTCCGTTTT TTA</b>	729	49
CGB1_exp/rv	<b>CGCGGATCCTTATTTTTTTATTATAAAAGATCAAG</b>		

#### IV.4. Analyse clonale

L'électrophorèse en champ pulsé, « Genotyping by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) » de l'ADN génomique après restriction enzymatique par le XbaI, a été faite utilisant l'appareil CHEF-DRIII (Bio-Rad Laboratories), décrit précédemment [87]. Le Bio-rad CHEF DNA Size Standard (Bio-RAD) a été utilisé comme marqueur moléculaire. L'interprétation des résultats après conception des dendrogrammes a été réalisée en utilisant le logiciel GelComparII (GelCompar II; Applied Maths NV, St-Martens-Latem, Belgium).

#### **IV.5. Antibiogramme et détection phénotypiques des MBLs**

L'antibiogramme a été réalisé par la méthode de diffusion en milieu gélosé, complétée d'une mesure des CMI (Concentration minimale inhibitrice) utilisant les E-tests (bioMérieux, France) avec *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 25922 comme contrôle de qualité interne.

Pour mettre en évidence la production de  $\beta$ -lactamase (MBL), les tests d'Hydrolyse ont été réalisés utilisant l'imipénème comme substrat et l'extrait d'une culture liquide. La capacité d'hydrolyse enzymatique est évaluée en mesurant la variation d'absorbance avec le spectrophotomètre Cary 100 UV-visible (Varian, Walnut Creek, CA, USA). L'inhibition de l'activité hydrolytique de l'extrait liquide (contenant la MBL) sur l'imipénème à plus de 90%, après incubation avec 5 mM d'EDTA (Acide éthylène-diamine-tétra-acétique) révèle la présence de la MBL.

L'évidence de production d'une métallo- $\beta$ -lactamase (MBL), est faite aussi par la technique de synergie avec un disque ou pastille imprégné d'EDTA et l'imipénème.

## V. RESULTATS

### V.1. Résultats article n°1 : *Chryseobacterium indologenes* chez une femme ayant une Leucémie aiguë au Sénégal

**Omar A**, Camara M, Fall S, Ngom-Cisse S, Fall B, Ba-Diallo A, Diop-Ndiaye H, Toure-Kane C, Mboup S, Gaye-Diallo A. *Chryseobacterium indologenes* in a woman with acute leukemia in Senegal: a case report. J Med Case Reports 2014; 8:138.

#### Présentation du Cas clinique :

Cet article fait état d'une femme d'ethnie Wolof, de 42 ans ayant eu 08 gestité dont 1 avortement, avec une Leucémie Myéloïde chronique (LMC), admise à l'unité de soins intensif une année avant la publication du case report, c'est à dire en 2012, et 11 jours après l'accouchement par voie basse du 6ème enfant. L'examen clinique d'entrée, révèle une pression sanguine de 130/70 mmHg, une fièvre de 37,6°C et une tachycardie de 125 battements par minute. Elle faisait un coma de score 13/15 (E4M5V4) de la classification de Galsgow (GCS), avec des pupilles réactives signes de localisation. Ses réflexes sont présents et normaux. La chimie urinaire ne révèle aucune trace d'albumine et de sucre. L'ionogramme sanguin révèle une hypernatrémie à 148 mEq/L. La numération formule sanguine révèle une anémie à 11,6 g/dL, une thrombocytose à 729 000/mm<sup>3</sup> et une hyperleucocytose à 123 000 leucocytes/mL. Le traitement symptomatique a consisté à une réhydratation qui a ramené le GCS à 15/15 (normal) et une normalisation de l'ionogramme sanguin. L'hyperleucocytose à 123 000/mL a suscité son orientation au service d'Hématologie clinique pour d'amples investigations.

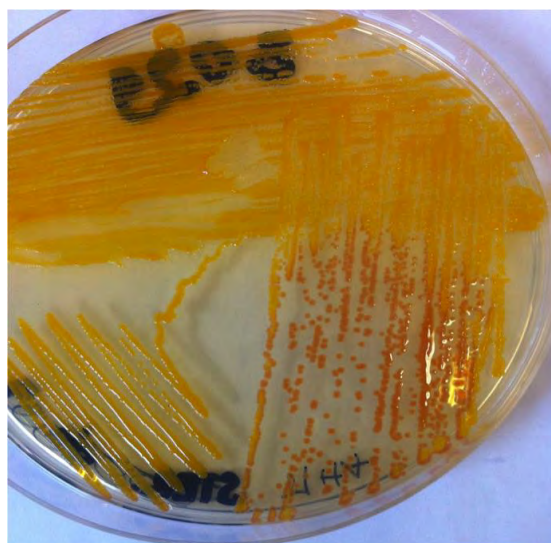
Le diagnostic de LMC a été posé suite à la réalisation d'un myélogramme, et la détection du transcrit de fusion bcr-abl, une année après son admission au service de soins intensifs. Elle était alors traitée par l'imatinib (mesylate) 100 mg (Glivec®) suivant le protocole standard de 2 comprimés deux fois par jour, avec une recommandation de contraception. La septième grossesse a entraîné l'arrêt de prise du traitement à une date inconnue.

La patiente a été hospitalisée à nouveau deux mois après son accouchement (8<sup>ème</sup> gestité, et 7<sup>ème</sup> parité) (J0) avec une hépatomégalie, une splénomégalie de type IV suivant la classification de Hackett's, une anémie et un syndrome infectieux avec une température de 38,8°C. La numération formule sanguine a révélé une forte leucocytose à 275 000 leucocytes/mL avec 40% de blastes circulant, laissant suspecter une acutisation de la LMC. L'échographie abdominale a permis de visionner une hépato-splénomégalie homogène

sans signe d'hypertension portale. Le syndrome infectieux a motivé la prescription d'une hémoculture et d'un examen cyto bactériologique des urines. La prise en charge thérapeutique a consisté à l'administration de Glivec à une dose de 600 mg par jour avec une antibiothérapie probabiliste à base de 2 G de Ceftriaxone par jour. Ce n'est que 07 jours (J7) après l'hospitalisation qu'un échantillon d'urine a été déposé au laboratoire pour un examen cyto bactériologique. Son état s'est continuellement dégradé et à J8, elle avait fait un choc septique avant de décéder à J10 dans un tableau de sepsis sévère.

### Examen Bactériologique des Urines

L'échantillon d'urine reçu la veille de son décès, présentait un aspect clair, à l'examen macroscopique et quelques leucocytes à l'examen cytologique. L'examen microscopique après coloration de Gram a montré des bacilles à Gram négatif. L'urine ensemencée sur gélose CLED (Cystéine, Lactose, Electrolyte déficient) avait donné des colonies uniformes, circulaires, lisses, jaune-orangée de 1-2 mm de diamètre à un DGU >  $10^7$  UFC/mL. des colonies similaires ont été observées sur gélose MH (**Figure 18**).

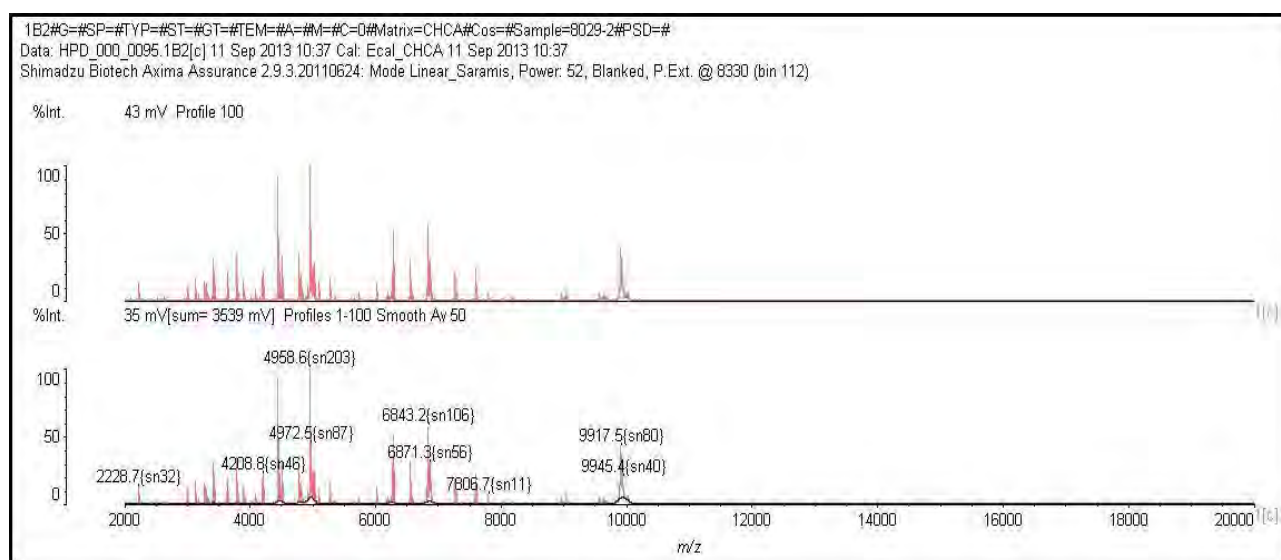


**Figure 18:** Caractères cultureux de la souche 8029. Colonies jaunâtres de *C. indologenes* sur milieu MH. Les colonies virent au rouge par ajout d'une goutte de soude à 10%.



La production de Flexirubine, pigment spécifique du genre est confirmée par ajout d'une goutte d'hydroxyde de sodium, provoquant la coloration rouge des colonies (**Figure 18**).

L'espèce *C. indologenes* est suspectée, par l'étude des caractères biochimiques et bactériologiques (bacilles à Gram négatif immobiles, oxydase, catalase, uréase et indole positifs). L'identification par api 20NE a proposé L'espèce *C. indologenes* ( Id = 99,9v%, et T = 0,82). L'identification par spectrométrie de masse a confirmé le genre *Chryseobacterium* avec des pics de spectre homogènes (**Figure 19**).



**Figure 19:** Spectre de masse d'identification par MALDI TOF MS d'une souche de *C. indologenes*. (Image HPD).

### Antibiogramme et test d'hydrolyse

L'antibiogramme a été réalisé par technique de diffusion en milieu solide suivi d'une mesure des concentrations minimales inhibitrices (CMI) utilisant des souches de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et de *Escherichia coli* ATCC 25922, comme contrôle de qualité interne. L'antibiogramme interprété suivant les recommandations du CA-SFM (Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie). La souche de *C. indologenes* est sensible à la pipéracilline, à la ceftazidime, au cotrimoxazole et aux quinolones. Elle est résistante au céfotaxime (son équivalent utilisé comme antibiotique probabiliste pour le traitement de la patiente), à l'aztreonam, aux aminosides, et à l'imipénème, et à la colistine (**Tableau XIV**).

**Tableau XIV:** Profil de sensibilité aux antibiotiques de la souche 8029. Interprétation suivant les recommandations du CA-SFM.

<b>Antibiotiques</b>	<b>CMI (µg/mL)</b>	<b>Diam (mm)</b>	<b>Seuil (S)</b>		<b>Interprétation</b>
			<b>(µg/mL)</b>	<b>(mm)</b>	
<b>Ampicilline</b>	≥256	0	≤16	≥22	Résistant
<b>Pipéracilline</b>	16	20	≤16	≥18	Sensible
<b>Ticarcilline</b>	≥256	0	≤16	≥22	Résistant
<b>Témocilline</b>	≥256	0	≤16	≥22	Résistant
<b>Céfalotine</b>	≥256	0	≤16	≥22	Résistant
<b>Céfuroxime</b>	≥256	0	≤16	≥22	Résistant
<b>Céfotaxime</b>	32	8	≤16	≥22	Résistant
<b>Ceftazidime</b>	4	25	≤08	≥19	Sensible
<b>Ceftriaxone</b>	32	08	≤16	≥22	Résistant
<b>Céfépime</b>	4	28	≤08	≥19	Sensible
<b>Céfotetan</b>	≥32	6	≤16	≥22	Résistant
<b>Imipénème</b>	≥32	6	≤04	≥22	Résistant
<b>Méropénème</b>	32	6	≤02	≥22	Résistant
<b>Ertapénème</b>	≥32	6	≤02	≥22	Résistant
<b>Aztréoname</b>	≥32	8	≤01	≥27	Résistant
<b>Cotrimoxazole</b>	≤0,25	22	≤02	≥16	Sensible
<b>Ac Nalidixique</b>	≤2	28	≤08	≥20	Sensible
<b>Gentamycine</b>	ND	4	ND	≥16	Sensible
<b>Amikacine</b>	ND	0	ND	≥17	Résistant
<b>Tobramycine</b>	ND	0	ND	≥16	Résistant
<b>Colistine</b>	ND	0	ND	-	Résistant

Abréviations : CMI, Concentration minimale inhibitrice ; Diam, Diamètre d'inhibition ; ND, Non déterminé.

La production de MBL, a été mise en évidence par un test de synergie utilisant un disque combinant l'Imipénème et de l'EDTA (**Figure 20**).



**Figure 20:** Mise en évidence d'une MBL par la méthode de synergie utilisant le double disque (IPM + EDTA).

Cette production de MBL a été mise en évidence aussi par les tests d'hydrolyse enzymatique, basés par la mesure de la variation de l'absorbance par spectrophotométrie d'un extrait de culture en milieu liquide de la bactérie, suivi de son inhibition par de l'EDTA à 90%. Pour caractériser le gène codant cette MBL, une technique de polymérisation en chaîne a été faite utilisant un couple d'amorces IND-INV/+ (5'-TTGGCAGAATATTCTTTACC) et IND-INV/- (5'-GAAAAAAGACGGAAAAGCAAC).

## **V.2. Résultats article n°2 : *Chryseobacterium gleum* chez un homme ayant subi une prostatectomie au Sénégal : Rapport de cas et revue de la littérature**

**Arouna O**, Deluca F, Camara M, Fall B, Fall B, Ba Diallo A, Docquier JD and Mboup S. *Chryseobacterium gleum* in a man with prostatectomy in senegal: a case report and review of the literature. J Med Case Report 2017; 11:118.

### **Présentation du cas clinique**

Cet article fait état d'un patient de 68 ans, d'ethnie Wolof qui avait été interné au département d'Urologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec avec un tableau de déshydratation sévère et une altération de l'état général après une prostatectomie par voie transurétrale un mois plutôt dans un Hôpital régional. L'examen clinique d'entrée avait révélé une hypertension artérielle (180 mmHg/90 mmHg), une fièvre à 38,5°C. Les analyses sanguines avaient permis d'objectiver une leucocytose à 17 100 Leucocytes/mL, une anémie à 10g/dL, une créatinémie à 513,3 µmol/L, une hyponatrémie à 111 mEq/L, une hypokaliémie à 3,3 mEq/L, une hypochlorémie à 77 mEq/L. A l'admission, il portait une sonde à demeure drainant une urine trouble ayant objectivé un examen cytbactériologique des urines, et une plaie opératoire sceptique.

La prise en charge thérapeutique a consisté à un remplacement électrolytique tous les jours, une désinfection de l'infection du site opératoire, et une antibiothérapie probabiliste à base d'amikacine remplaçant les fluoroquinolones reçues juste après l'opération. Sept jours après l'hospitalisation, l'évolution a été favorable avec une urine claire, et une normalisation de l'équilibre hydrominéral, exception faite d'une persistance de l'hyponatrémie. La créatinine urinaire est revenue a baissé de moitié à 150,45 µmol/L.

### **Examen Cytobactériologique des urines**

L'urine trouble, collectée à l'admission et envoyée au laboratoire de Bactériologie pour un Examen cytbactériologique avait été ensemencée sur une gélose CLED, suivant les techniques usuelles de Bactériologie médicale. L'examen direct avait révélé une flore bactérienne riche, une leucocyturie abondante, et des bacilles à Gram négatif après coloration de Gram. Après 48 h, d'incubation, la culture sur CLED avait donné des colonies circulaires jaunâtres de 1 à 2 mm, à un DGU > à 10<sup>6</sup> CFU/mL. Une bactérie du genre *Chryseobacterium* a été suspectée, du fait de colonies jaunâtres liées à la production de flexirubine spécifique à ce genre de bactérie.

L'identification par api 20 NE (bioMérieux, France), a identifié le genre *Myroides* à 24 heures d'incubation, et *C. indologenes* à 48 heures d'incubation (**Tableau XV**).

**Tableau XV:** Identification d'une souche de *Chryseobacterium gleum* utilisant les systèmes API 20NE Version 7.0.

	%ID		T	
	24 h	48 h	24 h	48 h
<b>Taxa significatifs</b>				
<i>Myroides spp.</i>	61,2	-	0,67	-
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	34,2	99,9	0,84	0,42
<b>Suivant Taxon</b>				
<i>Bergeyella zoohelcum</i>	4,4	-	0,5	-
<i>Shewanella putrefaciens</i>		0,1		0,0

Abréviations : %ID (pourcentage d'identification), Proximité relative avec les différents taxa dans la base de données. Il détermine si le profil identifié est proche d'un taxon particulier. T (Typicité). 24 h, 24 heures d'incubation. 48 h, 48 heures d'incubation.

L'identification par spectrométrie de masse (Vitek MS matrix-assisted laser desorption/ionization, time-of-flight, bioMérieux), a permis d'identifier avec précision l'espèce *C. gleum*. Cette identification a été confirmée par le séquençage ARN 16S ribosomal. L'antibiogramme réalisé par mesure des CMI (Concentration minimale inhibitrice) utilisant les bandelettes E-tests de bioMérieux a été réalisé et interprété suivant les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie. La souche est sensible à la pipéracilline, la ceftazidime, le céfépime, la ciprofloxacine, l'imipénème, et résistante au méropénème, l'aztreonam, la ticarcilline, et le céfotaxime (**Tableau XVI**).

**Tableau XVI:** Profil de sensibilité aux antibiotiques de la souche 6515. Interprétation suivant les recommandations du CA-SFM.

Antibiotiques	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )	Diam (mm)	Seuil (S)		Interprétations
			( $\mu\text{g/mL}$ )	(mm)	
<b>Tic + AC</b>	64	8	$\leq 16$	$\geq 18$	Résistant
<b>Pipéracilline</b>	6	26	$\leq 16$	$\geq 18$	Sensible
<b>Ticarcilline</b>	$\geq 256$	0	$\leq 16$	$\geq 18$	Résistant
<b>Céfotaxime</b>	$\geq 32$	8	-	-	Résistant
<b>Ceftazidime</b>	0,75	22	$\leq 08$	$\geq 16$	Sensible
<b>Imipénème</b>	2	25	$\leq 04$	$\geq 20$	Sensible
<b>Méropénème</b>	8	15	$\leq 02$	$\geq 18$	Sensible
<b>Aztréoname</b>	$\geq 256$	0	$\leq 01$	$\geq 50$	Résistant
<b>Cotrimoxazole</b>	$\leq 0,094$	28	-	-	Sensible
<b>Ciprofloxacine</b>	0,25	30	$\leq 0,5$	$\geq 25$	Sensible

La diminution de la sensibilité aux carbapénèmes a objectivé la recherche d'un gène codant pour une MBL, par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) après extraction du génome de la bactérie, par gradient de phase Phénol-Chloroforme et utilisant un couple d'amorce ; CGB1\_exp/fw (5'-GGGAATCCATATGAAAAAAGCATTCCGTTTTTA-3') et CGB1\_exp/rv (5'-CGCGGATCCTTATTTTTTATTTAAAAGATCAAG-3'). Le séquençage des produits de PCR, des fragments de 729 paires de bases codant pour des peptides de 242 acides aminés correspondant à une MBL partageant 99% d'acides aminés avec le CGB-1 (**Figure 21**).

		1		↓		50	
CGB-1	(1)	MKKSIPFFIISMLLSPLANAQDTQVRDFVIEPQIQPNFYIYKTFGVFGGK					
Our strain	(1)	-----					
		51					*100
CGB-1	(51)	EYSTNAVYLVTKKGVVLFDPWQKTQYQSLMDTIQKRHHLPVIAVFATHS					
Our strain	(51)	-----					
		* *					150
CGB-1	(101)	HEDRAGDLSFYNNKKGIKTYATAKTNEILKKEGKATSTEIIKTGKPYRIGG					
Our Strain	(101)	-----					
		151		*		*	200
CGB-1	(151)	EEFVVDFLGEHTADNVVWFPPKYKILDGGCLVKSKAAADLGYTGEANVA					
Our Strain	(151)	-----T-----					
		201		*			242
CGB-1	(201)	QWPKTMEKLKSKYAQATLIIPGHDEWKGGGHVEHTLDLLNKK-					
Our Strain	(201)	-----					

**Figure 21:** Comparaison des séquences d'acides aminés de la MBL amplifiée et séquencées de la souche 6515, avec le CGB-1. Les traits d'unions, représentent des acides aminés similaires. La Flèche verticale indique le site de clivage du peptide signal. Les étoiles représentent les acides aminés constituant le site actif de l'enzyme.

### V.3. Résultats article N°3 : Diversité Génétique des Métallo- $\beta$ -lactamases des bactéries du genre *Chryseobacterium*.

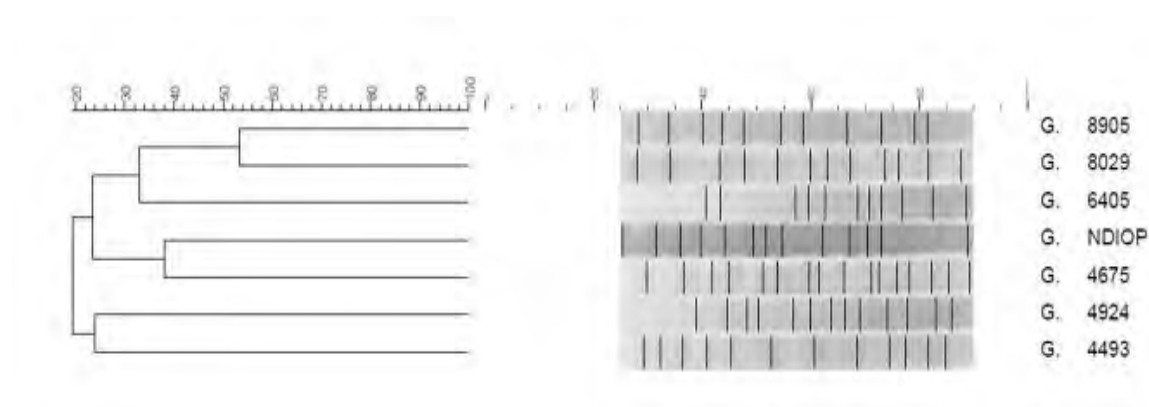
**Arouna O**, De luca F, Lara Y, Camara M, Amisano F, Galleni M, Docquier JD, and Mboup S. Genetic diversity of *Chryseobacterium* Metallo- $\beta$ -lactamases. In press "International Journal of antimicrobial Agents".

#### V.3.1. Informations sur les patients et Epidémiologie moléculaire par Electrophorèse en champ pulsé

Après l'isolement de la 1ere souche appartenant au genre *Chryseobacterium* et ayant fait l'objet d'un case report (Article N°1), un monitoring mis en place a permis d'isoler 08 souches du genre *Chryseobacterium* (**Tableau XVII**) dont une est identifiée comme étant *C. gleum*. Le séquençage de l'ARN 16S ribosomal, méthode de référence d'identification bactérienne a permis d'identifier 2 souches (8029, 4924) pour lesquelles l'identification par le

MALDI-TOF a proposé *C. gleum* et pour lesquelles la caractérisation des gènes de résistance codant pour les MBL est contradictoire.

L'électrophorèse en champ pulsé réalisée n'a pas permis d'identifier un clone par les 07 souches de *C. indologenes* ayant bénéficié de cette étude (**Figure 22**).



**Figure 22:** Dendrogrammes d'électrophorèse en champ pulsé des 07 souches de *C. indologenes*. Les isolats sont groupés en fonction du profil de restriction XbaI utilisant le logiciel « GelComparII »



**Tableau XVII:** Caractéristiques démographiques et cliniques des 08 souches, et leur identification suivant les critères du MALDI-TOF (Vitek 2), en comparaison avec l'identification par séquençage de l'ARN 16S ribosomal complétée par le séquençage du gène de résistance.

No	Age/Sexe	Hôpital/service	Ech	Ev	MALDI-TOF MS (Vitek 2)	16S RNA	Id			
					Résultats	Score (%)				
4675	F/48	HALD/Cardiologie	Ascite	Décédé	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	99	ND	IND-14	<i>C. indologenes</i>	
6405	M/52	HALD/Urologie	Urine	Guéri	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	99	ND	IND-7	<i>C. indologenes</i>	
4493	M/62	FANN/MI	Crachat	Guéri	<i>Chryseobacterium indologenes</i>		ND	IND-14	<i>C. indologenes</i>	
NDIOP	M/69	Ext/Urologie	Urine	Guéri	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	99	ND	96,3% variant	IND-6	<i>C. indologenes</i>
6515	M/68	HALD/Urologie	Urine	Guéri	<i>Chryseobacterium gleum</i>	99	ND	99% variant	CGB-1	<i>C. gleum</i>
8905	M/73	HALD/Cardiologie	Urine	Guéri	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	99	<i>C. indologenes</i>	IND-7	<i>C. indologenes</i>	
8029	F/47	HALD/Pachon	Urine	Décédé Décédé	<i>Chryseobacterium gleum</i> <i>Chryseobacterium indologenes</i>	49,8 50,1	<i>C. indologenes</i>	IND-7	<i>C. indologenes</i>	
4924	M/58	HALD/Urologie	Urine	Guéri	<i>Chryseobacterium gleum</i>	99,2	<i>C. indologenes</i>	87% variant	IND-11	<i>C. indologenes</i>

Ech, Echantillon ; Ev, Evolution ; Id, Identification.

### V.3.2. Sensibilité aux antibiotiques et type de MBL

L'antibiogramme par mesure des CMI et des diamètres d'inhibition a permis de noter que les 08 souches sont résistantes aux TCC et à l'ATM. Une seule souche, le 8905 est sensible au CTX (n = 1, 87,5%). Six souches (4675, 6405, 4493, N-DIOP, 8029, 4924) sont résistantes à l'IPM et au MEM avec des CMI  $\geq 32\mu\text{g/mL}$  (n = 6,75%). Les souches 6515 et le 8905 sont considérées comme étant sensibles aux carbapénèmes avec des CMI bas, respectivement 4  $\mu\text{g/mL}$  et 2  $\mu\text{g/mL}$  ne permettant pas de les catégoriser "Sensible". Toutes les 08 souches sont sensibles aux Quinolones (100%) et au Cotrimoxazole (100%) (**Tableau XVIII**).

Les réactions de polymérisation en chaîne, suivies de séquençage des produits de PCR, ont permis de montrer que toutes les souches hébergeant des gènes codant pour des MBL. Les 07 *C. indologenes* hébergent des gènes *bla*<sub>IND</sub> dont 03 (6405, 8905, 8029) hébergent le *bla*<sub>IND-7</sub> et 02 (4675, 4493) hébergent le *bla*<sub>IND-14</sub> (**Tableau XVIII**).

**Tableau XVIII:** Concentration minimale inhibitrice des antibiotiques pour *Chryseobacterium spp* et les metallo-β-lactamase (MBL) correspondant.

No	Souche	MBL	CMI (mg/L)									
			TCC	PIP	CAZ	FEP	CTX	IPM	MEM	ATM	CIP	SXT
4675	<i>C. indologenes</i>	IND-14	>256	2	0,75	1.0	>32	>32	>32	>32	0,75	0,032
6405	<i>C. indologenes</i>	IND-1	256	3	0,75	0,19	>32	>32	32	>32	0,25	0,064
4493	<i>C. indologenes</i>	IND-14	>256	2	1,5	1.0	>32	>32	>32	>32	0,38	0,016
NDIOP	<i>C. indologenes</i>	IND-6 variant	64	2	0,38	0,19	>32	>32	3	>32	0,19	0,047
6515	<i>C. gleum</i>	CGB-1	64	6	0,75	0,125	>32	2	8	>32	0,25	0,094
8905	<i>C. indologenes</i>	IND-1	16	> 0,125	0,50	0,125	2	4	4	16	0,25	0,032
8029	<i>C. indologenes</i>	IND-1	>256	16	4	4	32	>32	32	>32	0,25	0,032
4429	<i>C. indologenes</i>	Nouveau variant	256	2	1.0	0,25	>32	>32	>32	>32	0,125	0,047

### **V.3.3. Alignement des séquences des acides aminés des MBL des 08 souches et analyse phylogénétique des MBLs avec 49 MBLs disponible dans la GenBank**

Les séquences d'acides aminés des MBL des 08 souches ont été alignées avec tous les types séquences de MBL publiés à ce jour (15 IND et 1 CGB) (**Figure 23**), suivies d'une étude phylogénétique incluant 46 autres séquences de MBL disponible dans la genbank (**Figure 24**).

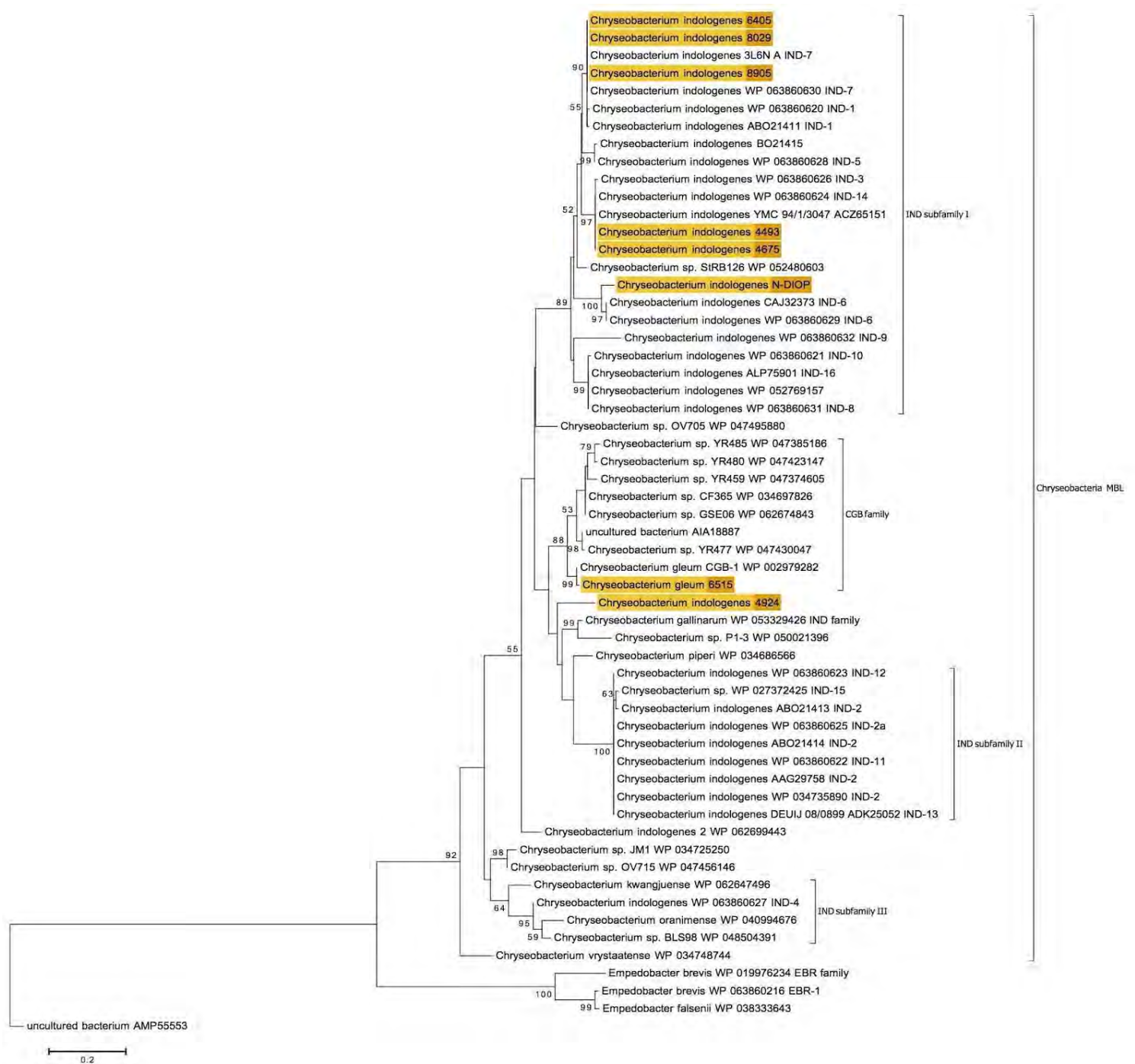
```

1                                50                                100
IND-4  MRKNVRIFTVLSLFLINFFNA●●●QARDFVIEQPFQKQLYLYKTFGVFDGKEYSTNALYLVTKKGVLFDVPWQKTQYQSLMDTIKKRHNLPVIAVFATHSHSDRAGDLSFYNNKKGIPTY
IND-1  MKKSIRFF●IVSILLSPFASA●●●QVK-----P-IKNN-HI-----G-----A-SM-----E-V-----V-----D-----F-N--K--
IND-15 -K-SIQLL●MM-M-SPLIN--●●●-VK-----P-VKPN-----S---G-----A-V-LTTK--GV-----E---T---Q---H-----D-----Q---K--
IND-13 -K-SIQLL●MM-M-SPLI--●●●-VK-----P-VKPN-----S---G-----A-V--T-----E---T---Q---H-----D-----Q---K--
IND-12 -K-SIQLL●MM-M-SPLI--●●●-VK-----P-VKPN-----S---G-----A-V--T-----E---T---Q---H-----D-----Q---K--
IND-2  -K-SIQLL●MM-M-SPLI--●●●-VK-----P-VKPN-----S---G-----A-V--T-----E---T---Q---H-----D-----Q---K--
IND-11 -K-SIQLL●MM-M-SPLI--●●●-VK-----P-VKPN-----S---G-----A-V-----E---T---Q---H-----D-----Q---K--
IND-9  -K-SIQFF●IV--L-SP-A--●●●-VK-----P-ISKN--I-----G-----A-V-----E-V-----V-----D-----F---K--
IND-6  -K-RIQFF●MV-MM-TPL-S-●●●-VK-----P-IKKN--I-----G-----A-SV---T-----E-A-----V-----D-----F-N--K--
IND-3  -K-RIQFF●MV-MM-SSL-S-●●●-VK-----P-IKKN-HI-----G-----A-SV---Q-----E-V-----Q-----D-----F-N--K--
IND-14 -K-RIQFF●MV-MM-SPL-S-●●●-VK-----P-IKKN-HI-----G-----A-SV---Q-----E-V-----Q-----D-----F-N--K--
IND-8  -K-SIQFF●IV-ML-SP-A-S●●●-VK-----P-IKSN--I-----G-----A-A-KT---I-----E-V-----D-----F-N--K--
IND-10 -K-SIQFF●IV-ML-SP-A--●●●-VK-----P-IKSN--I-----G-----A-A-KT---I-----E-V-----D-----F-N--KK-
CGB-1  -K-SIPFF●II-ML-SPLA--QDT-V-----PQIQPNF-I-----G-----V-----Q---H-----E-----K--

                                150                                200                                230
IND-4  ATAKTNELLKKEGKATSSKLTGIGKKYKIGGEEFTVDFLGEHTADNVVVWFPKYNVLDGGCLVKSSAAVDLGYTGEANVEQWPATMKKLQAKYPSTAKVIPGHDEWKGNDHVKHTLELLDQQKQ--
IND-1  -----D---T-I--T--P-R-----V-----NS-T---IK-----K-IN--K---SKATLI-----GG-E-----NKK---
IND-15 -----D---TEII-T--P-K-----M-----V---R---K-----RT-T---T-----PETMRKLMKYAQ-TL-----GG-Q---D---KN-KPE
IND-13 -----DG-ATSTEIIKTGKPYK-----M-----V-----K-----RT-T---T---K---R---KT--AQATL---E---GG-Q---D---KNKKPE
IND-12 -----LLKKD---TEII-T--P-----M-----V-----K-----RT-T-----K---E--R--KT--AQA-L-----GG-Q-S-D---KN-KPE
IND-2  -----D---TEII-T--P-----M-----V-----K-----RT-T-----K---E--R--KT--AQATL-----GG-Q---D---KN-KPE
IND-11 -----D---TEII-T--P-----M-----V-----V-----T---T-----K---E--R--KT--AHATL-----GG-Q---D---KN-KPE
IND-9  -----V--NIINT--A-H-----V---I---V-----K-----TS-T-----Q--NT-KS--SQATLI-----GG-E-----NKK---
IND-6  --P---QF--RD---TE-I-P--P-R-----V-----K-----N---T---IK---L---K--H--KT--SEAVLI-----GG-E-----DKK---
IND-3  --S---F---D---TEII-T--P-R-----V-----K---T---IK-----K-IN--KS--SKASL-----GG-----NKK---
IND-14 -----F---D---TEII-T--P-R-----V-----K---T---IK-----K-IN--KS--SKASL-----GG-IE-----NKK---
IND-8  --L---F---D---TEIIQT--P-H-----V-----NS-T---IK-----K--N--KT--SKATLI-----GG-E-----NKK---
IND-10 --L---F---D---TEIIQT--P-H-----V-----NS-T---IK-----K--N--KT--SKATLI-----GG-E-----NKK---
CGB-1  -----I-----TEII-T--P-R-----V-----A-----KI-----KA-A-----A--K--E--KS--AQATLI-----GG-E---D---NKK---

```

**Figure 23:** Alignement des séquences d'acides aminés des MBLs des 08 souches de notre étude avec les 15 MBLs IND et le CGB-1.



**Figure 24:** Arbre d'analyse phylogénétique des 08 MBLs de nos souches avec 48 MBLs disponible dans la GenBank.

L'analyse phylogénétique montre que La plupart des MBL IND, se regroupent au sein de trois familles polyphylétiques. Six séquences de nos souches (IND-6405, IND-8029, IND-8905, IND-4493, IND-4675, IND\_N-DIOP), appartiennent à la première famille, la plus importante ; la superfamille I. Cette superfamille est composée de 23 séquences IND, incluant le IND-1, IND-3, IND-5, IND-6, IND-7, IND-8, IND-9, IND-10, IND-14 et IND-16. Les séquences provenant des isolats 6405, 8029, 8905 sont 100% identiques à l'IND-7, et 99,5% identique au IND-1 (ABO21411, WP\_063860620). Les séquences provenant des isolats 4493 et 4675 sont 100% identiques au IND-14 (WP\_063860626). La séquence provenant de l'isolat N-DIOP se regroupe avec le IND-6 (CAJ32373, WP\_063860629), avec 96,3% d'homologie en séquences d'acides aminés. La plupart des séquences IND appartenant à cette superfamille I, montre une activité hydrolytique importante vis à vis des carbapénèmes avec des CMI élevés (IND-1, 32 µg/mL; IND-3, 32 µg/mL; IND-5, 32 µg/mL; IND-6, > 64 µg/mL; IND-6405, > 32 µg/mL; IND-8029, > 32 µg/mL).

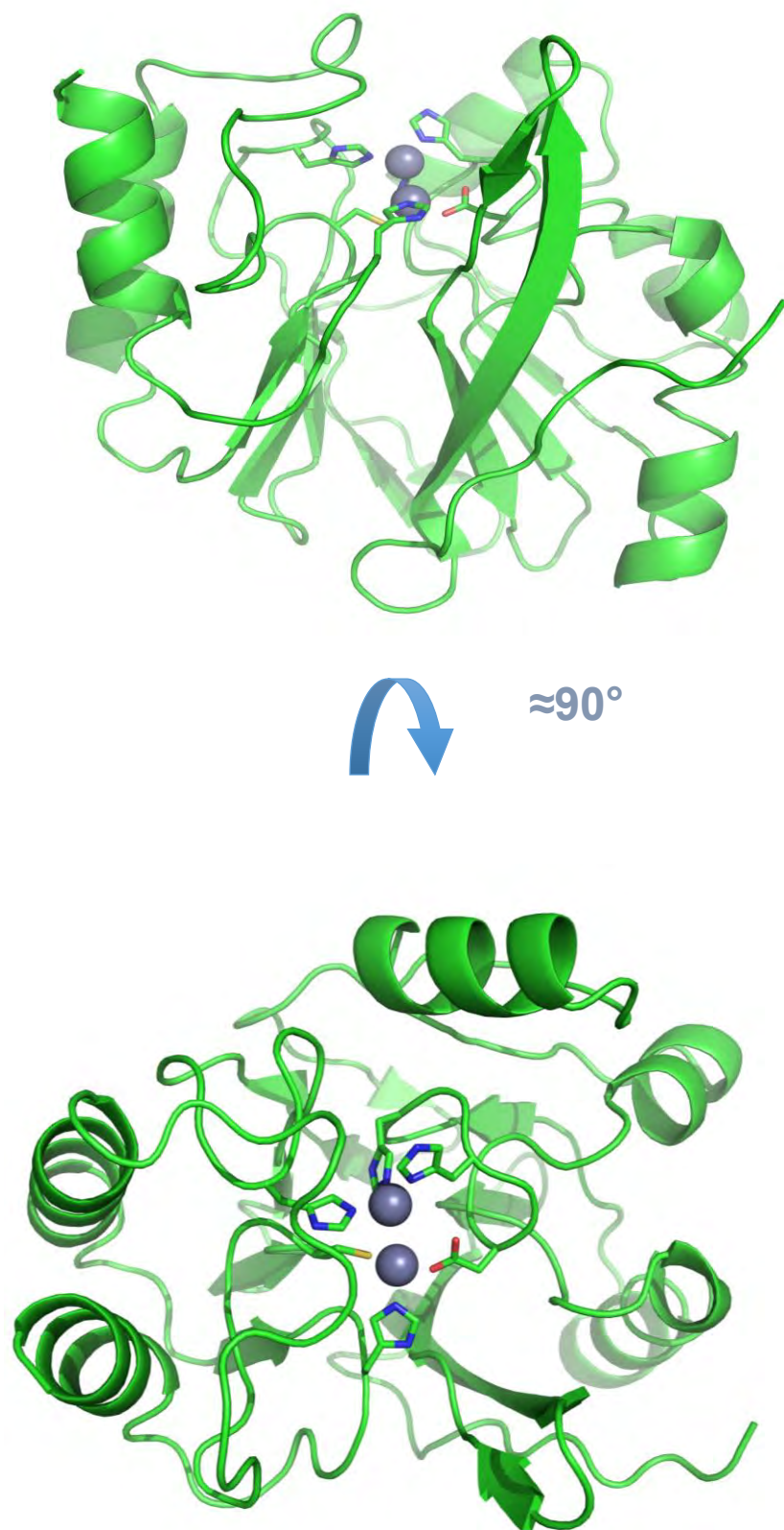
De façon surprenante, la souche 8905 produisant une MBL proche de IND-7, est sensible à l'IPM avec une CMI de 4 µg/mL. La seconde lignée, la superfamille II, ayant pour séquence type le IND-2 est composée des séquences IND-2a, IND-11, IND-12, IND-13 et IND-15. Cette famille, présente 80% de similitude en séquence d'acides aminés avec le IND-1, avec un spectre d'action hydrolytique similaire sur l'IPM. Contrairement à la 1<sup>ère</sup> lignée, la superfamille II ne dispose pas de groupes en son sein, avec une moindre diversité génétique. La troisième lignée, la superfamille III ayant pour séquence type le IND-4, présente 72% d'homologie en séquences d'acides aminés avec le IND-1, produite par *C. indologenes* sensible à l'IPM est composée de quelques souches environnementales de *Chryseobacterium*. La dernière lignée, la superfamille IV est composée de la séquence de l'isolat 4924, partageant 87% d'acides aminés avec le IND-11 de la superfamille II. Cette MBL, est considérée comme un nouvel variant de IND non encore publié (**Figure 25**).

Dans cette étude, une souche (6515) identifiée comme étant *C. gleum* produit une MBL, partageant 99% d'acides aminés avec le CGB-1 et 83% avec le IND-1. L'analyse phylogénétique réalisée, montre que les MBL CGB-1 et apparentés, appartiennent à la même lignée Phylogénétique avec les MBL IND (**Figure 24**).

Le site actif des enzymes IND et CGB, contenant 2 atomes de Zinc, comme les métallo-β-lactamases appartenant à la classe B, de la classification de Ambler, semble être très conservé à l'exception du IND-4, pour laquelle on note une mutation ponctuelle (Asp99Ser) (**Figure 23**). Les six acides aminés conservés, impliqués dans les liaisons avec les 2 atomes de Zn, ou l'eau (His96, His98, Asp100, His159, Cys168, et His220) sont retrouvés dans le site actif du

CGB-1 (**Figure 23**). Cependant une insertion de trois acides aminés (Asp, Thr, et la Gln) est détectée à la seconde, troisième, et quatrième position de la séquence de la protéine mature du CGB-1 (positions 22, 23, et 24) en comparaison avec les enzymes de type IND. Le site actif des MBL est organisé de la façon suivante : HSHDD H C H. Ces sites sont aussi présents dans toutes les séquences des MBL appartenant aux superfamilles I, II, III. Cependant, les sites actifs de la superfamille IV, et des CGB-1 types enzymes conférant une sensibilité à l'IPM aux bactéries les produisant ont une configuration différente : HSHSD H C H et HSHED H C H, respectivement.





**Figure 25:** Structure Tridimensionnelle du IND-7, réalisée par cristallographie aux rayons X à 1,65 Å. La structure globale est faite de 4 couches de chaînes peptidiques  $\alpha\beta/\beta\alpha$  prenant en sandwich deux atomes de Zinc, Zn1 et Zn2 (Gris) autour du site actif.

## VI. DISCUSSION GENERALE

Au sein de la famille des *Flavobacteriaceae*, les espèces les plus souvent isolées en infectiologie sont par ordre de fréquence et de gravité, *E* (anciennement *Chryseobacterium*) *meningosepticum*, suivie de *Chryseobacterium indologenes* puis *Chryseobacterium gleum*.

Ce sont des bactéries rares à l'échelle mondiale. En effet, seulement 0,03 % (50 sur 155 811) de toutes les bactéries isolées et collectées durant 5 ans de 1997 à 2001, au cours du Programme SENTRY, appartiennent au genre *Chryseobacterium* et *Elizabethkingia* (anciennement *Chryseobacterium*). Toutes les 50 bactéries ont été isolées de patients hospitalisés à partir de prélèvements respiratoires (52,0%) et d'hémocultures (46,0%). Typiquement, comme les bactéries à faible virulence, les bactéries du genre *Chryseobacterium* sont des pathogènes opportunistes, particulièrement virulents pour les patients immunodéprimés, en milieu hospitalier avec les facteurs favorisant comme, le long séjour hospitalier (>14 jours), un traitement antibiotique au long cours, un cancer, et les dispositifs médicaux (sondes, tubes de réanimation) [18 ; 43].

Les espèces *C.indologenes* étaient impliqués dans une épidémie d'infections nosocomiales en Taiwan, et depuis plusieurs cas ont été publiés en Europe, en Australie, en Inde, et aux USA [5 ; 6 ; 11 ; 13]. En Afrique, le 1<sup>er</sup> cas d'infection à *C. indologenes* a été rapporté en 2009, suivie du Sénégal en 2014, et de la Tunisie en 2015 [15 ; 18 ; 19]. Les infections à *C. gleum* étant plus rares, le 1<sup>er</sup> cas en Afrique a été publié au Sénégal en 2017 [89]. Toutes les bactéries rapportées en Afrique, ont été isolées à partir d'urines au cours d'infections urinaires. Par ailleurs, 2 cas d'infection à *F. meningosepticum* ont été publiés dans les années 1970 au cours de méningites néonatales [17].

La pathogénicité des bactéries du genre *Chryseobacterium* n'est pas encore totalement élucidée. Cependant, la production de Biofilm bactérien et de protéases joue un rôle important dans le mécanisme de virulence de la bactérie [43]. La production de Biofilm bactérien chez *C. indologenes* isolée au cours d'une septicémie à point de départ d'un cathéter veineux central a été rapporté récemment [90]. Une étude a révélé que 100% des souches *E. meningosepticum*, isolées au cours de méningites produisent des films bactériens en culture sur le milieu LB (Luria-Bertani), et en corrélation avec le taux de mortalité des infections [10]. Une étude transversale de production de Biofilm bactérien par 14 souches de *C. gleum* isolées d'urines et de crachats sans lien épidémiologique a été conduite par Lo et Chang [87]. L'étude a montré que 40% des souches de *C. gleum* produisent du biofilm bactérien à niveau

moindre que les souches de *E. meningosepticum*. De ce fait, il apparaît que les souches de *C. gleum* et *indologenes* sont moins virulentes que celles de *E. meningosepticum*.

L'identification phénotypique au niveau espèce des souches de *Chryseobacterium* n'est pas aisée, liée au fait que les bactéries du genre *Chryseobacterium* partagent un grand nombre de gènes. L'identification par api 20 NE donne souvent des résultats discordants (**Tableau XII**), un *C. gleum* identifié formellement comme étant un *C. indologenes*. La spectrométrie de masse, bien qu'étant une technique robuste n'est fiable que quand le spectre de masse de la bactérie est compris dans la base de données. En effet, la souche 8029 identifiée comme étant *C. indologenes* par séquençage de l'ARN 16S ribosomal avec amplification d'une MBL IND-1/IND-7, a été identifiée au niveau genre avec proposition de *C. gleum* au niveau espèce par le Maldi TOF MS (**Figure 18**).

Il existe très peu de données sur la résistance aux antibiotiques des bactéries du genre *Chryseobacterium* et aucune recommandation de comité de l'antibiogramme n'a été faite pour une interprétation des seuils critiques de sensibilité et de résistance, du fait certainement du nombre réduit de souches isolées. De ce fait, le choix d'antibiotiques pour la réalisation des antibiogrammes est difficile de même que les décisions thérapeutiques sont aléatoires et peuvent s'avérer fatales comme le cas d'infection urinaire du 1<sup>er</sup> cas publié au Sénégal avec une antibiothérapie probabiliste non adaptée [18]. En effet, les bactéries du genre *Chryseobacterium* hébergent des gènes de résistances qui leur confèrent une résistance à plusieurs classes d'antibiotiques, y compris les carbapénèmes qui sont considérés comme les antibiotiques les plus puissants disponibles dans l'arsenal thérapeutique. Néanmoins, le programme de surveillance de la résistance bactérienne, SENTRY a révélé que les quinolones et l'association sulfaméthoxazole-triméthoprine (> 95% de sensibilité) sont les antibiotiques les plus actifs sur les *Chryseobacterium* suivies de l'association pipéracilline-tazobactam (>90% de sensibilité) [2]. En effet, dans notre étude, 100% des souches sont sensibles à la Ciprofloxacine et l'association sulfaméthoxazole-triméthoprine et résistantes à l'aztreonam et l'association Ticarcilline-acide clavulanique. Une seule souche (8905) est sensible au Céfotaxime (n=1, 87,5%). Six souches (4675, 6405, 4493, N-DIOP, 8029, 4924) sont résistantes à l'imipénème et le méropénème à des CMI  $\geq 32$  µg/mL (n = 6, 75%). Les souches 6515 et 8905 sont considérées comme étant sensibles à l'imipénème, du fait de valeurs de CMI bas, 4 µg/mL et 2 µg/mL respectivement. Nos isolats montrent une résistance moindre par rapport à la souche de *C. indologenes* 597 provenant du Burkina Faso, eu égard à la CMI qui est deux fois plus importante ( $\geq 32$  µg/mL versus  $\geq 64$  µg/mL).

Les gènes codant pour les MBLs, de toutes les 08 souches ont été amplifiés et séquencés. Les 07 souches de *C. indologenes* hébergent des gènes IND (*bla*<sub>IND</sub>), et la souche de *C. gleum* héberge un gène CGB (*bla*<sub>CGB</sub>). Trois souches (6405, 8905, 8029) hébergent le *bla*<sub>IND-7</sub> et deux (4675, 4493) hébergent *bla*<sub>IND-14</sub> (**Tableau XV**). Une souche, le N-DIOP héberge un *bla*<sub>IND</sub> partageant 96% d'homologie en séquences d'acides aminés avec le *bla*<sub>IND-6</sub> de Burkina Faso [15]. Une souche (4924) héberge un gène IND, partageant 87% d'homologie en séquences d'acides aminés avec le *bla*<sub>IND-11</sub>.

Malgré cette diversité apparente des MBLs IND, aucune étude phylogénétique exhaustive n'a été faite, et la seule analyse phylogénétique date de 2009 et ne concernait que 08 MBLs [15]. Dans notre étude, nous avons aligné près de 49 MBLs disponible dans la GenBank avec les MBLs de nos 08 souches, 03 séquences provenant de *Empedobacter spp* et une séquence provenant d'une bactérie non cultivable (AMP55553). Toutes les séquences d'acides aminés des MBLs de *Chryseobacterium* peuvent être groupés en lignée, avec des valeurs de bootstrap élevées (**Figure 21**). La plupart des MBLs IND se regroupent dans trois lignées phylogénétiques. Six séquences de nos souches (IND-6405, IND-8029, IND-8905, IND-4493, IND-4675, IND\_N-DIOP) appartiennent à la superfamille I. Cette lignée, est composée de 23 séquences d'acides aminés incluant IND-1, IND-3, IND-5, IND-6, IND-7, IND-8, IND-9, IND-10, IND-14 et IND-16. Les séquences provenant des souches 6405, 8029, 8905 sont totalement (100%) identiques au IND-7 et à 99,5% du IND-1 (ABO21411, WP\_063860624). Les séquences provenant des isolats 4493 et 4675 sont 100% identiques au IND-14 (WP\_063860624) et de la séquence de l'isolat YMC 94/1/3047 (ACZ65151) et 99,7% identique au IND-3 (WP\_063860626). La séquence provenant de l'isolat N-DIOP se regroupe avec le IND-6 (CAJ32373, WP\_063860629) avec une homologie en séquence d'acides aminés à 96,3%, et une valeur de bootstrap significative de 100%. La plupart des MBLs appartenant à la famille à la superfamille I (Enzyme type IND-1) montre une activité hydrolytique élevée sur les carbapénèmes eu égard aux valeurs des CMI de l'IPM (IND-1, 32 µg/mL; IND-3, 32 µg/mL; IND-5, 32 µg/mL; IND-6, > 64 µg/mL; IND-6405, > 32 µg/mL; IND-8029, >32 µg/mL). De façon surprenante, la souche 8905 hébergeant une MBL ayant une séquence identique au IND-7 est sensible à l'IPM (MIC= 4 µg/mL) avec des résultats négatifs aux différents tests d'hydrolyse enzymatique. Pour cette souche, nous émettons l'hypothèse selon laquelle, l'enzyme n'est pas produite la souche du fait d'une mutation au sein du gène promoteur. Ces dernières années, des séquences provenant de l'Afrique, de l'Europe et de la Chine se retrouvent dans cette superfamille I [2 ; 15]. La seconde lignée, la superfamille II, avec pour séquence type le IND-2, est composée des séquences IND-2a, IND-

11, IND-12, IND-13 et IND-15. Cette famille partage 80 % de séquences d'acides aminés identiques avec le IND-1, avec un profil de spectre d'action similaire par rapport à l'activité hydrolytique sur l'IPM. Contrairement à la superfamille I, aucune sous famille n'y est identifiée du fait d'une homologie élevée des séquences d'acides aminés. La troisième lignée, la superfamille III, représentée par le IND-4 partage 72% d'acides aminés identiques avec le IND-1. Ces MBLs sont produites par des souches de *C. indologenes* sensibles à l'IPM. La dernière lignée, la superfamille IV, avec enzyme Type le IND du nouvel variant provenant de la souche 4924, partageant 87% d'acides aminés identiques avec le IND-11 de la superfamille III.

Dans cette étude, la seule souche identifiée *C. gleum* (6515) produit une MBL partageant 99% d'acides aminés identiques avec le CGB-1 hébergé par le *C. gleum* CIP 103039 [66] et 83% d'acides aminés identiques avec le IND-1. L'analyse phylogénétique du CGB-1 avec les enzymes IND de *C. indologenes* montre qu'elles appartiennent à la même lignée phylogénétique (**Figure 21**).

Le site actif des MBLs IND et CGB contenant deux atomes de Zinc, comme toutes les enzymes types métallo- $\beta$ -lactamase appartenant à la Classe B de la classification de Ambler, semble être très conservé à l'exclusion du IND-4 pour laquelle, une mutation est notée à l'intérieur du site actif (Asp99Ser) (Figure 20). Les six acides aminés conservés impliqués dans la liaison avec le  $Zn^{2+}$  ou l'eau, est retrouvé au niveau du CGB-1 (**Figure 21**). Cependant, une insertion de trois acides aminés (Asp, Thr, et la Gln) est retrouvée à la seconde, troisième, et quatrième position de l'extrémité N-terminale de la séquence de la protéine mature du CGB-1 (positions 22, 23 et 24) en comparaison avec les enzymes IND-types. Les sites actifs sont organisés de la façon suivante: HSHDD H C H. Ces sites sont aussi présents dans toutes les séquences des MBLs des superfamilles I, II et III. Cependant, le site actif de la superfamille IV et le CGB, pour lesquels les bactéries sont sensibles à l'IPM ont différentes configurations: HSHSD H C H et HSHED H C H, respectivement. La comparaison des sites actifs des enzymes types CGB-1 et celles IND type de la superfamille IV met en évidence le fait qu'une mutation s'opérant dans le site actif de l'enzyme explique une faible affinité à l'imipénème. En effet, l'intégrité des liaisons du Zn, modifié par des mutations du site actif est essentiel à l'activité optimale des MBLs [91]. Cependant, une mutation dans le site actif à elle seule, ne saurait expliquer la sensibilité des souches à l'IPM, comme montré par la souche 8905, appartenant à la superfamille I, et sensible à l'IPM.

## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

De nos souvenirs lointains, ces infections représentent les premiers cas publiés au Sénégal, et dans une moindre mesure en Afrique, surtout pour l'infection à *Chryseobacterium gleum*. Les bactéries du genre *Chryseobacterium* sont des pathogènes émergents, qui posent un réel problème de santé publique, d'une part du fait des évolutions fatales dans certains cas surtout chez les patients immunodéprimés et d'autre part, du fait de leur résistance à plusieurs classes d'antibiotiques y compris les carbapénèmes (derniers antibiotiques disponible dans l'arsenal thérapeutique) par combinaison de plusieurs mécanismes de résistances, exprimés par des gènes chromosomiques. La diffusion de ces éléments génétiques de résistance représente la principale hantise de la communauté scientifique. En effet, l'acquisition des gènes de résistances se fait le plus souvent par des transferts, d'une bactérie à une autre, par l'intermédiaire d'éléments mobiles (plasmides, transposons), sans barrière d'espèces ou de genre. La dissémination de ces bactéries résistantes aux antibiotiques, dont la sélection est favorisée par la **pression antibiotique**, se fait dans le milieu hospitalier mais aussi communautaire. En milieu hospitalier, cette transmission est appelée **nosocomiale** et est secondaire au manu-portage du personnel soignant et au manque d'hygiène en général, notamment dans les hôpitaux des PVD. Les bactéries multi-résistantes aux antibiotiques acquises durant l'hospitalisation peuvent persister durant des années chez le patient. Le traitement des infections est évidemment important mais la mise en œuvre de mesures de prévention efficaces est essentielle (mesures d'hygiène, maîtrise de la consommation des antibiotiques, identification des facteurs de risque, organisation optimale des hôpitaux au plan humain comme au plan architectural).

Enfin, puisque la maîtrise des résistances bactériennes passe non seulement par la lutte contre la dissémination des souches résistantes et des supports moléculaires de résistance (lutte contre la transmission croisée des souches), mais aussi par la diminution de la pression de sélection (bon usage des antibiotiques), les données sur la résistance aux antibiotiques doivent être confrontées aux données de consommation des antibiotiques.

Les *Chryseobacterium* hébergent des gènes de résistance codant pour une MBL. Ces gènes sont caractérisés par une diversité génétique très importante. Pour la première fois une étude exhaustive de la diversité génétique a été faite en alignant les 08 MBLs caractérisés au cours de notre travail avec 46 MBLs disponible dans la GenBank. L'analyse phylogénétique a permis de distinguer 04 superfamilles des enzymes type IND, parmi lesquelles, une représentée par le nouvel variant de MBL produit par la souche 4924 et caractérisé au cours de notre travail. Ces 04 superfamilles révisent légèrement la classification en 04 groupes

proposée par Bellais et ses collaborateurs, confirmant si besoin la grande hétérogénéité des  $\beta$ -lactamases de Classe B (classification de Ambler) portés par des gènes chromosomiques.

Les conséquences de cette diversité sur la résistance bactérienne sont encore mal connues, surtout en Afrique où l'hygiène hospitalière demeure encore un défi à relever. Ce travail interpelle les comités de lutte contre les infections nosocomiales (CLIN), pour la mise en place d'outils de surveillance des infections associées aux soins, par des études d'épidémiologie moléculaire pour i) investiguer les épidémies hospitalières, ii) contrôler la diffusion des éléments de résistance aux bactéries sensibles et hautement virulentes.

En perspectives de ce travail, la production et la caractérisation des deux nouvelles variantes de MBL produites par le N-DIOP et le 4924 avec respectivement 96 et 87 % d'acides aminés identiques avec le IND-6 et le IND-11, permettront de publier les nouvelles variantes IND-17 et IND-18.

Le séquençage complet des génomes des souches 4924 et du 8905 permettra de décrypter le résistome de ces deux bactéries. L'analyse bio-informatique avec l'annotation des cadres de lecture, a permis d'ores et déjà de savoir que le 4924 héberge un nouvel variant de  $\beta$ -lactamase de classe A non encore décrit en dehors du nouvel variant de MBL IND. Aussi, plusieurs études ont fait état de bactéries hébergeant des gènes résidents codant pour des MBL et qui sont sensibles aux  $\beta$ -lactamines comme c'est le cas pour la souche 8905, hébergeant un *bla*<sub>IND-7</sub>. Le séquençage complet a été réalisé dans le but de décrire le résistome, et de rechercher éventuellement une mutation au sein du promoteur du gène pouvant expliquer cette sensibilité paradoxale.

En dehors du contexte hospitalier où les espèces du genre *Chryseobacterium* sont impliquées en infectiologie humaine, plusieurs études ont fait état d'infections de la faune aquatique en Europe et aux Etats unis par d'autres espèces de genre *Chryseobacterium*, créant un véritable problème de santé maritime avec ses implications de crise économique du secteur de la pêche. La nouvelle espèce bactérienne découverte au Sénégal en 2016 isolée de la bouche d'un poisson (*Protopterus annectens*), le *Chryseobacterium senegalense*, indique la nécessité d'envisager une démarche scientifique multidisciplinaire en ligne droite du concept One-Health intégrant dans un même projet structurant, les questions de santé humaine et vétérinaire (faune aquatique Sénégalaise).



**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Vandamme P, Bernardet JF, Segers P, Kersters K, Holmes B. New perspectives in the classification of the flavobacteria: description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* nom. rev. Int J Syst Evol Microb **1994**; 44 (4):827-831.
2. Kirby JT, Sader HS, Walsh TR, Jones RN. Antimicrobial susceptibility and epidemiology of a worldwide collection of *Chryseobacterium* spp.: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). J Clin Microbiol **2004**; 42 (1):445-448.
3. Du Moulin GC. Airway colonization by *Flavobacterium* in an intensive care unit. J. Clin. Microbiol **1979**; 10(2):155-160.
4. Hoque, SN, Graham J, Kaufmann ME, Tabaqchali S. *Chryseobacterium* (*Flavobacterium*) *meningosepticum* outbreak associated with colonization of water taps in a neonatal intensive care unit. J Hosp Infect **2001**; 47(3):188-192.
5. Calderon G, Garcia E, Rojas P, Garcia E, Rosso M, Losada A: *Chryseobacterium indologenes* infection in a newborn. A case report. J Med Case Rep **2010**; 5:10-15.
6. Douvoyiannis M, Kalyoussef S, Philip G, Mayers MM. *Chryseobacterium indologenes* bacteremia in an infant. Int J Infect Dis. Int J Infect Dis **2010**; 14(6):531-532.
7. Acosta-Ochoa MI, Rodrigo-Parra A, Rodríguez-Martín F, Molina-Miguel A: Urinary Infection due to *Chryseobacterium indologenes*. Nefrologia **2013**; 33(4):19-33.
8. Winn W. Jr, Allen S, Janda W. Organisms that are non motile and oxidase-positive, In Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 6<sup>th</sup> ed. (Koneman E., Schreckenberger P.C., Procop G., Woods G. Eds) **2006**; 345-353. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia
9. Schreckenberger PC, Daneshvar MI, Hollis DG. Non-fermentative Gram-negative rods, In Manual of Clinical Microbiology 9th ed. (Murray P.R., Tenover FC, Tenover MC, Tenover MC, Landry M.L., Jorgensen J.H., Baron E.J. Eds) **2007**; 791-794. ASM Press, Washington DC.
10. Lin PY, Chen HL, Huang CT, Su LH, Chiu CH. Biofilm production use of intravascular indwelling catheters and inappropriate antimicrobial therapy as predictors of fatality in *Chryseobacterium meningosepticum* bacteremia. Int J Antimicrob Agents **2010**; 36(5):436-40.
11. Hsueh PR, Teng LJ, Yang PC, Ho SW, Hsieh WC, Luh KT. Increasing incidence of nosocomial *Chryseobacterium indologenes* infections in Taiwan. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **1997**; 16(8):508-574.

12. Seema Y, Greg G, Tammy S, Rebecca S. *Chryseobacterium indologenes* in a woman with metastatic breast cancer in the United States of America: a case report. J Med Case Reports **2013**; 7:190-195.
13. Bhuyar G, Jain S, Shah H, Mehta VK. Urinary tract infection by *Chryseobacterium indologenes*. Indian J Med Microbiol **2012**; 30(3):370-372.
14. Tingting W, Xiawei J, Chunyan F, Ang L, Huihui D, Shaoqiang W, Beiwen Z. Whole genome sequencing uncover a novel IND-16 metallo- $\beta$ -lactamase from an extensively drug-resistant *Chryseobacterium indologenes* strain J31. Gut Pathog **2016**; 8:47-51.
15. Zeba B, De Luca F, Dubus A, Delmarcelle M, Simpore J, Nacoulma JO, Rossolini GM, Frere JM, Docquier JD: IND-6, a highly divergent IND-type metallo-beta-lactamase from *Chryseobacterium indologenes* strain 597 isolated in Burkina Faso. Antimicrob Agents Chemother **2009**; 53: 4320–4326.
16. Acosta-Ochoa MI, Rodrigo-Parra A, Rodríguez-Martín F, Molina-Miguel A: Urinary infection due to *Chryseobacterium indologenes*. Nefrologia **2013**; 33(4): 620-621.
17. Samb A, Chiron JP, Denis F, Sow A, Diop Mar I. *Flavobacterium meningosepticum* meningitis. Clinical and bacteriological study of 2 cases treated in Senegal. Bull Soc Med A **1977**; 22(1):84-91.
18. Arouna O, Camara M, Fall S, Ngom-Cisse S, Fall B, Ba-Diallo A, Diop-Ndiaye H, Toure-Kane C, Mboup S, Gaye-Diallo A. *Chryseobacterium indologenes* in a woman with acute leukemia in Senegal: a case report. Journal of Medical Case Reports **2014**; 8: 138-142.
19. Ben Salah I, Fekih HM, Ben Haj Khalifa A, Ben Sik Ali H, Tilouche N, Kheder M, Elatrous S. *Chryseobacterium indologenes* in ventilator-associated pneumonia: First reported case in Tunisia. Rev Pneumol Clin **2015**; 71(6): 374-5.
20. Holmes B, Owen RJ. Proposal that *Flavobacterium breve* be substituted as the type species of the genus in place of *Flavobacterium aquatile* and emended description of the genus *Flavobacterium*: status of the named species of *Flavobacterium*. Int. J. Syst. Bacteriol **1979**; 29:416-426.
21. Holmes B, Owen RJ, McMeekin TA. Genus *Flavobacterium* Bergey, Harrison, Breed, Hammer, and Huntoon 1923, 97AL, p. 353-361. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1. **1984**. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

22. Frankland GC, Frankland PF. About some typical microorganisms in water and in the ground. *Z. Hyg. Infection* **1889**; 6:373-400.
23. Wasser und im Boden ZH, Wayne LG. Actions of the Judicial Commission of the International Committee on Systematic Bacteriology on requests for opinions published between July 1979 and April 1981. *Int J Syst Bacteriol* **1982**; 32:464-465.
24. Holmes B, Balows HG, Triiper M, Dworkin W, Schleifer RH. The genera *Flavobacterium*, *Sphingobacterium*, and *Weeksella*. In A. (ed.), Springer-Verlag, Berlin, The prokaryotes, 2nd ed. **1992**; 4:3620-3630.
25. Takeuchi M, Yokota A. Proposals of *Sphingobacterium faecium* sp. nov., *Sphingobacterium piscium* sp. nov., *Sphingobacterium heparinum* comb. nov., *Sphingobacterium thalpophilum* comb. nov. and two genospecies of the genus *Sphingobacterium*, and synonymy of *Flavobacterium yabuchiae* and *Sphingobacterium spiritivorum*. *J Gen Appl Microbiol* **1992**; 38:465-482.
26. Holmes B, Steigerwalt AG, Weaver RE, Brenner DJ. *Weeksella virosa* gen. nov., sp. nov. (formerly Group IIf), found in human clinical specimens. *Syst Appl Microbiol* **1986**; 8:185-190.
27. Holmes B, Steigerwalt AG, Weaver RE, Brenner DJ. *Weeksella zoohelcum* sp. nov. (formerly Group IIj), from human clinical specimens. *Syst Appl Microbiol* **1986**; 8:191-196.
28. Gherna R, Woese CR. A partial phylogenetic analysis of the “Flavobacter-bacteroides” phylum: basis for taxonomic restructuring. *Syst Appl Microbiol* **1992**; 15(4):513-521.
29. Nakagawa Y, Yamasato K. Phylogenetic diversity of the genus *Cytophaga* revealed by 16s rRNA sequencing and menaquinone analysis. *J Gen Microbiol* **1993**; 139(6):1155-1161.
30. King EO. Studies on a group of previously unclassified bacteria associated with meningitis in infants. *Am J Clin Pathol* **1959**; 31(3):241-247.
31. Harrison FC. The discoloration of halibut. *Can J Res* **1929**; 1:214-23.
32. Campbell LL, Williams B. A study of chitin decomposing microorganisms of marine origin. *J Gen Microbiol* **1951**; 5:894-905.
33. Woese CR, Yang D, Mandelco L, Stetter KO. The *Flexibacter-Flavobacterium* connection, *Syst Appl Microbiol* **1990**; 13(2):161-165.
34. Jooste PJ, Hugo CJ. The taxonomy, ecology and cultivation of bacterial genera belonging to the family *Flavobacteriaceae*. *Int J Food Microbiol* **1999**; 53(2):81-94.

35. Yabuuchi E, Kaneko T, Yano I, Moss CW, Miyoshi N. *Sphingobacterium* gen. nov., *Sphingobacterium spiritivorum* comb. nov., *Sphingobacterium mizutae* sp. nov., and *Flavobacterium indologenes* sp. nov. Glucose-non-fermenting gram-negative rods in CDC groups IIK-2 and IIb. *Int J Syst Bacteriol* **1983**; 33(3):580-598.
36. Pires C, Carvalho F.M, Marco DP, Magan N, Castro P.M.L. *Chryseobacterium palustre* sp. nov. and *Chryseobacterium humi* sp. nov. Isolated from industrially contaminated sediments. *Int J Syst Evol Microbiol* **2010**; 60:402-407.
37. Lo CI, Sankar SA, Mediannikov O, CB Ehounoud, N Labas, N Faye, D Raoult, PE Fournier, F. Fenollar. High-quality genome sequence and description of *Chryseobacterium senegalense* sp. nov. *New Microbes New Infect* **2016**; 10:93-100.
38. Yarza P, Richter M, Peplies JR, Euzéby J, Amann R, Schleifer, KH, Ludwig W, Glöckner FO, Rosselló-Móra R. "The All-Species Living Tree project: A 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains". *Syst Appl Microbiol* **2008**; 31(4): 241-250.
39. Tamaoka J, Komagata K. Determination of DNA base composition by reversed Phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol Lett* **1984**; 25(1):125-128.
40. Ezaki T, Hashimoto Y, Yabuuchi E. Fluorometric DNA-DNA hybridization in microdilution wells as an alternative of membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int J Syst. Bacteriol* **1989**; 39(3):224-229.
41. Bruun B. Antimicrobial susceptibility of *Flavobacterium meningosepticum* strains identified by DNA-DNA hybridization. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* **1987**; 95(6):95-101.
42. Jan U, Bruun B. Genotypic heterogeneity of *Flavobacterium* group IIb and *Flavobacterium breve* demonstrated by DNA-DNA hybridization. *APMIS* **1991**; 99(7): 780-786.
43. Hsueh PR, Teng LJ, Ho SW, Hsieh WC, Luh KT. Clinical and microbiological characteristics of *Flavobacterium indologenes* infections associated with indwelling devices. *J Clin Microbiol* **1996**; 34(8):1908-1913.
44. Lo HH, Chang SM. Identification, characterization, and biofilm formation of clinical *Chryseobacterium gleum* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2014**; 79(3):298-302.
45. Moulin V, Freney J, Hansen W, Lagrange Ph, Philippon A. Comportement phénotypique de 121 souches de *Flavobacterium* dont *F. meningosepticum* vis-à-vis de 39 antibiotiques. *Med Mal Inf* **1992**; 22(11):902-908.

46. Moulin V, Freney J, Hansen W, Lagrange Ph, Philipon A. Susceptibility pattern of *Flavobacterium meningosepticum* to antimicrobial agents including 10  $\beta$ -lactams. 32nd Intersci. Conf Antimicrob Agents Chemother Anaheim CA **1992**; 10:11-14.
47. Fraser SL, Jorgensen JH. Reappraisal of antimicrobial susceptibilities of *Chryseobacterium* and *Flavobacterium* species and method for reliable susceptibility testing. Antimicrob Agents Chemother **1997**; 41(12):2738-2741.
48. Maniatis AN, Pournaras S, Orkopoulou S, Tassios PT, Negakis NJ. Multiresistant *Acinetobacter baumannii* isolates in intensive care units in Greece. Clin Microbiol Infect **2003**; 9(6):547-553.
49. Neuhauser MM, Weinstein RA, Rydman R, Danziger LH, Karam G, and Quinn JP (2003) Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units implications for fluoroquinolone use. JAMA **2003**; 289 (7):885-888.
50. Andrade SS, Jones RN, Gales AC, Sader HS. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centres: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2001). J Antimicrob Chemother **2003**; 52(1):140-141.
51. Bush K. New- $\beta$ -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. Clin Infect Dis **2001**; 32(7):1085-1089.
52. Bush K.  $\beta$ -Lactamases of increasing clinical importance. Curr. Pharm. Des. **1999**; 5(11): 839-845.
53. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother **1995**; 39(6):1211-1233.
54. Lim HM, Pene JJ, Shaw RW. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus cereus* 5/B/6  $\beta$ -lactamase II structural gene. J Bacteriol **1988**; 170(6):2873-2878.
55. Walsh TR, Hall L, Assinder SJ, Nichols WW, Cartwright SJ, MacGowan AP, Bennett PM. Sequence analysis of the L1 metallo--lactamase from *Xanthomonas maltophilia*. Biochim Biophys Acta **1994**;1218(2):199-201.
56. Ambler RP. The structure of  $\beta$ -Lactamases. Phil. Trans. R. Soc.Lond B Biol Sci **1980**; 289:321-331.
57. Bush K. Classification of  $\beta$ -Lactamases group-2c, group-2d, group-2e, group-3, and group-4. Antimicrob Agents Chemother **1989**; 33:271-276.
58. Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -Lactamases. Antimicrob Agents Chemother **1997**; 41(2):223-232.

59. Massidda O, Rossolini GM, Satta G. The *Aeromonas hydrophila* cphA gene: molecular heterogeneity among class B metallo- $\beta$ -Lactamases. *J Bacteriol* **1991**; 173(15): 4611-4617.
60. Quiroga MI, Franceschini N, Rossolini GM, Gutkind G, Bonfiglio G, Franchino L, Amicosante G. Interaction of cefotetan and the metallo- $\beta$ -Lactamases produced in *Aeromonas spp.* and in vitro activity. *Chemotherapy* **2000**; 46(3):177-183.
61. Lim HM, Pene JJ, Shaw RW. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus cereus* 5/B/6  $\beta$ -Lactamases II structural gene. *J Bacteriol* **1988**; 170(6): 2873-2878.
62. Chen YH, Succi J, Tenover FC, Koehler TM.  $\beta$ -Lactamases genes of the penicillin-susceptible *Bacillus anthracis* Sterne strain. *J Bacteriol* **2003**; 185(3):823-830.
63. Walsh TR, Hall L, Assinder SJ, Nichols WW, Cartwright SJ, MacGowan AP, Bennett PM. Sequence analysis of the L1 metallo- $\beta$ -Lactamases from *Xanthomonas maltophilia*. *Biochim Biophys* **1994**;1218(2):199-201.
64. Massidda O, Rossolini GM, and Satta G. The *Aeromonas hydrophila* cphA gene: molecular heterogeneity among class B metallo- $\beta$ -Lactamases. *J Bacteriol* **1991**; 173(15): 4611-4617.
65. Bellais S, Poirel L, Leotard S, Naas T, Nordmann P. Genetic diversity of carbapenem-hydrolyzing metallo- $\beta$ -Lactamases from *Chryseobacterium* (*Flavobacterium*) *indologenes*. *Antimicrob Agents Chemother* **2000**; 44(11):3028-3034.
66. Bellais S, Naas T, Nordmann P. Genetic and biochemical characterization of CGB-1, an ambler class B carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -Lactamases from *Chryseobacterium gleum*. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**; 46(9):2791-2796.
67. Boschi L, Mercuri PS, Riccio ML, Amicosante G, Galleni M, Frere JM, Rossolini GM. The *Legionella* (*Fluoribacter*) *gormanii* metallo- $\beta$ -Lactamases: a new member of the highly divergent lineage of molecular-subclass B3 metallo- $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother* **2000**; 44(6):1538-1543.
68. Simm AM, Higgins CS, Pullan SC, Avison MB, Niumsup P, Erdozain O, Bennett PM, Walsh TR. A novel metallo- $\beta$ -Lactamases, Mbl1b, produced by the environmental bacterium *Caulobacter crescentus*. *FEBS Lett* **2001**; 509(3):350-354.
69. Mammeri H, Bellais S, Nordmann P. Chromosome-encoded  $\beta$ -Lactamases TUS-1 and MUS-1 from *Myroides odoratus* and *Myroides odoratimimus* (Formerly *Flavobacterium odoratum*), new members of the lineage of molecular subclass B1 metalloenzymes. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**; 46(11):3561-3567.

70. Rossolini GM, Condemi MA, Pantanella F, Docquier JD, Amicosante G, Thaller MC. metallo- $\beta$ -Lactamase producers in environmental microbiota: new molecular class B enzyme in *Janthinobacterium lividum*. Antimicrob Agents Chemother **2001**; 45(3): 837-844.
71. Saavedra MJ, Peixe L, Sousa JC, Henriques I, Alves A, Correia A. Sfh-1, a subclass B2 metallo- $\beta$ -Lactamase from a *Serratia fonticola* environmental isolate. Antimicrob. Agents Chemother. **2003**; 47(7):2330-2333.
72. Scoulica EV, Neonakis IK, Gikas, Tselentis YJ. Spread of blaVIM-1-producing E. coli in a university hospital in Greece. Genetic analysis of the integron carrying the blaVIM-1 metallo- $\beta$ -Lactamase gene. Diagn. Microbiol. Infect. Dis **2004**; 48(3):167-172.
73. Yan JJ, Ko WC, Tsai SH, Wu HM, Wu JJ. Outbreak of infection with multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying blaIMP-8 in a university medical center in Taiwan. J Clin Microbiol **2001**; 39(12):4433-4439.
74. Payne DJ, Cramp R, Bateson JH, Neale J, Knowles D. Rapid identification of metallo- and serine metallo- $\beta$ -Lactamase. Antimicrob. Agents Chemother **1994**; 38(2):991-996.
75. Perilli MG, Caporale B, Celenza G, Pellegrini C, Docquier JD, Mezzatesta M, Rossolini GM, Stefani S, Amicosante G. Identification and Characterization of a New Metallo- $\beta$  -Lactamase, IND-5, from a Clinical Isolate of *Chryseobacterium indologenes*. Antimicrob agents chemotherapy **2007**; 51(8):2988–2990.
76. Yamaguchi Y, Takashio N, Wachino JI, Yamagata Y, Arakawa Y, Matsuda K, Kurosaki H. Structure of metallo- $\beta$ -lactamase IND-7 from a *Chryseobacterium indologenes* clinical isolate at 1.65-Å resolution. J Biochem **2010**; 147(6):905-915.
77. Wang T, Jiang X, Feng C, Li A, Dong H, Wu S, Zheng B. Whole genome sequencing uncovers a novel IND-16 metallo- $\beta$ -lactamase from an extensively drug-resistant *Chryseobacterium indologenes* strain J31. Gut Pathog **2016**; 8:47-50.
78. Cimmino T, Rolain JM. Whole genome sequencing for deciphering the resistome of *Chryseobacterium indologenes*, an emerging multidrug-resistant bacterium isolated from a cystic fibrosis patient in Marseille, France. New Microbes New Infect **2016**; 12:35-42.
79. Moquet O, Bouchat C, Kinana A, Seck A, Omar A, Bercion R, Breurec S, Garin B. Class D OXA-48 Carbapenemase in Multidrug-Resistant Enterobacteria, Senegal. Lett Emerg Infect Dis **2011**; 17(1):143-144.
80. Rasheed JK, Kitchel B, Zhu W, Anderson KF, Clark NC, Ferraro MJ, Savard P, Humphries RM, Kallen AJ, Limbago BM. New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*, United States. Emerg Infect Dis **2013**; 19(6):870-878



81. [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov). Rapport **2008**.
82. Rapport, PRONALIN. Ministère de la santé et de L'Hygiène publique (Sénégal) **2008**.
83. Simon F, Demortiere E, Chadli M. Le risque nosocomial en Afrique intertropicale, le contexte. *Med Trop* **2006** ; (66) : 91- 6.
84. Okeke IN, Laxminarayan R, Bhutta ZA. Antimicrobial resistance in developing countries. Part I: recent trends and current status. *Lancet Infect Dis* **2005** ;5: 481-93.
85. DELLAMONICA P. Antibiorésistance et maladies transmissibles (Zone Afrique). *Med Trop* **1998** ;58: 73S-7S.
86. Dia NM, Ka R, Dieng C, Diagne R, Dia ML, Fortes L, Diop BM, Sow AI, Sow PS. Résultats de l'enquête de prévalence des infections nosocomiales au CHNU de Fann (Dakar, Sénégal). *Med Mal Infect* **2008**; 38(5):270-274.
87. Chang YC, Lo HH, Hsieh HY, Chang SM. Identification and epidemiological relatedness of clinical *Elizabethkingia meningoseptica* isolates from central Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* **2014**; 47(4):318-23.
88. Le SQ, Gascuel O. An improved General Amino Acid Replacement Matrix. *Mol Biol Evol* **1993**; 25(7):1307-1320.
89. Arouna O, Deluca F, Camara M, Fall B, Fall B, Diallo AB, Docquier JD, Mboup S. *Chryseobacterium gleum* in a man with prostatectomy in Senegal: a case report and review of the literature. *J Med Case Reports* **2017**; 11:118-123.
90. Kodama Y, Nishimura M, Nakashima K, Ito N, Fukano R, Okamura J: Central intravenous catheter-related bacteremia due to *Chryseobacterium indologenes* after cord blood transplantation. *Rinsho Ketsueki* **2013**; 54(3):305-310.
91. Galleni M, Lamotte-Brasseur J, Rossolini GM, Spencer J, Dideberg O, Frere JM. Standard numbering scheme for class  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**; 45(3):660-663.

## **ANNEXES**

**Article 1 : *Chryseobacterium indologenes* chez une femme ayant une Leucémie aiguë au Sénégal.**

**Omar A, Camara M, Fall S, Ngom-Cisse S, Fall B, Ba-Diallo A, Diop-Ndiaye H, Toure-Kane C, Mboup S, Gaye-Diallo A. *Chryseobacterium indologenes* in a woman with acute leukemia in Senegal: a case report. J Med Case Reports 2014; 8:138.**

CASE REPORT

Open Access

## *Chryseobacterium indologenes* in a woman with acute leukemia in Senegal: a case report

Arouna Omar<sup>1\*</sup>, Makhtar Camara<sup>1</sup>, Seynabou Fall<sup>2</sup>, Safirotou Ngom-Cisse<sup>1</sup>, Beye Fall<sup>3</sup>, Awa Ba-Diallo<sup>1</sup>,  
Fatimatou Diop-Ndiaye<sup>1</sup>, Coumba Toure-Kane<sup>1</sup>, Souleymane Mboup<sup>1</sup> and Aissatou Gaye-Diallo<sup>1</sup>

### Abstract

**Introduction:** This report documents a rare case of *Chryseobacterium indologenes* urinary tract infection in Senegal. *Chryseobacterium indologenes* is an uncommon human pathogen reported in hospital outbreaks in Taiwan and there have been some sporadic cases reported in Europe and in the USA mainly from immune suppressed patients.

**Case presentation:** This case report describes a 42-year-old woman of Woloff ethnicity who was hospitalized in our Department of Internal Medicine in a Senegalese university teaching hospital, with acute leukemia who died of severe sepsis 10 days following her hospitalization. A strain of *Chryseobacterium indologenes* isolated from her urine sample was resistant to several beta-lactams including ampicillin (minimum inhibitory concentrations  $\geq 256 \mu\text{g/ml}$ ), cefotaxime (minimum inhibitory concentrations  $32 \mu\text{g/ml}$ ) and imipenem (minimum inhibitory concentrations  $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ ), whereas it was susceptible to ciprofloxacin (minimum inhibitory concentrations  $16 \mu\text{g/ml}$ ), ceftazidime (minimum inhibitory concentrations  $4 \mu\text{g/ml}$ ), trimethoprim-sulfamethoxazole (minimum inhibitory concentrations  $\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$ ) and all tested quinolones including nalidixic acid (minimum inhibitory concentrations  $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ ).

**Conclusions:** *Chryseobacterium indologenes* a though uncommon, is an important pathogen causing infection in hospitalized patients. The management of this infection needs better identification, drug susceptibility testing and monitoring of immunosuppressed patients with long hospitalizations.

**Keywords:** *Chryseobacterium indologenes*, Leukemia, Metallo- $\beta$ -lactamase, Resistance

### Introduction

*Chryseobacteria* are a group of Gram-negative, non-fermenting, non-motile, catalase-, oxidase- and indole-positive aerobic bacilli. *Chryseobacterium indologenes* was first isolated from the tracheal aspirate of a patient with ventilator-associated pneumonia in 1993. *Chryseobacterium* species rarely cause human infections [1], but has been reported in nosocomial infections in Taiwan and rarely elsewhere [2]. In the hospital environment, *C. indologenes* is found in water systems, sink basins, the surfaces of equipment and wet medical devices (such as ventilators, humidifiers, and suction tubes) [3,4]. Despite their low virulence, *Chryseobacteria* are inherently resistant to many antimicrobial agents including imipenem.

*C. indologenes* from urinary tract infection was reported in Burkina Faso, India and Spain [5-7]. In Senegal, two cases of meningitis due to *Flavobacterium meningosepticum* were diagnosed in the late-1970s [8], but *C. indologenes* has not been reported previously.

### Case presentation

A 42-year-old woman of Woloff ethnicity, who underwent eight pregnancies (of which one was aborted), with chronic myeloid leukemia (CML), was admitted to our Intensive Care Unit (ICU) 1 year before this report for a tonic-clonic generalized seizure 11 days after a normal vaginal delivery (sixth child). At this date, a clinical examination showed a blood pressure of 130/70 (mmHg), a fever of  $37.6^\circ\text{C}$  and a tachycardia of 125 beats per minute. Her Glasgow Coma Score (GCS) was 13/15 (E4M5V4) with reactive pupils and without localizing signs; her reflexes were present and normal. For biological parameters, no albumin was found in her urine or at blood

\* Correspondence: [arounaomar@gmail.com](mailto:arounaomar@gmail.com)  
<sup>1</sup> Laboratoire de Bactériologie-Mycologie, Université Cheikh Anta Diop, CHU  
Aristide Le Dantec, BP 7125 Dakar, Senegal  
Full list of author information is available at the end of the article



© 2014 Omar et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

level; hypernatremia of 148mEq/L, hypokalemia 2.4mEq/L, anemia 11.6g/dL, thrombocytosis of 729,000/mm<sup>3</sup> and a leukocytosis of 123,000 white blood cells (WBC)/mL (lineage not given). After symptomatic treatment including rehydration, her GCS returned to 15/15 and her serum electrolytes normalized, she was then referred to hematology for further investigation.

The diagnosis of CML was confirmed by a myelogram and a finding of Bcr-Abl fusion positive genotype (Philadelphia chromosome) a year prior to her ICU hospitalization. She was then treated with imatinib (mesylate) 100mg (Glivec®) under a standard protocol of two tablets two times a day. This treatment continued until the beginning of her subsequent, seventh pregnancy at an unknown time.

Two months after giving birth (eighth pregnancy), she was hospitalized again (day 0), with hepatomegaly, splenomegaly type IV according to Lockett's classification, an anemic syndrome and an infectious syndrome with a temperature of 38.8°C. Her blood count showed leukocytosis of 275,000 WBC/mL, cells with 40% of blast cells, therefore an acute crisis of her CML was suspected. An abdominal ultrasound confirmed a homogeneous hepatosplenomegaly without signs of portal hypertension. Blood culture and urine culture were requested, but not performed due to lack of finance. Glivec® (imatinib) was given at a dose of 600mg per day. Empirical antibiotic therapy of ceftriaxone 2g daily was administered. It is only on day 7 that a urine sample was taken for cytology and bacteriology examination at a laboratory. She did not recover, by day 8 she was in septic shock and she subsequently died on day 10 with severe sepsis.

The urine received from the day before her death was clear with a rich bacterial flora but few cells in cytology. Microscopy showed Gram-negative bacilli. Her urine was inoculated on cysteine lactose electrolyte deficient (CLED) agar in accordance with the usual techniques of medical bacteriology. The CLED agar grew yellow-colored, 1 to 2mm circular colonies (>10<sup>7</sup> CFU/mL) with regular margins. Similar yellow-pigmented colonies were also observed on Müller-Hinton Agar (Figure 1). The flexirubin type of pigment was confirmed by adding 1 drop of 10% sodium hydroxide solution to a bit of cell paste. The color of the colonies changed from yellow to red (Figure 1).

After culture, *C. indologenes* was suspected by microscopy examination and biochemical tests (Gram-negative bacilli that were non-motile, produced oxidase, catalase, and urease and indole). *C. indologenes* was confirmed using the Appareil et Procédés d'Identification 20NE identification system (bioMérieux, France; excellent identification % Id = 99.9 and T = 0.82). The genus *Chryseobacterium* was confirmed by mass spectrometry (Vitek MS matrix-assisted laser desorption/ionization, time-of-flight, bioMérieux)



**Figure 1** Yellow-pigmented colonies changed from yellow to red by adding 1 drop of 10% sodium hydroxide (flexirubin).

in an army teaching hospital (Figure 2). Antimicrobial susceptibility testing by disc diffusion and dilution on microplate for minimal inhibition concentration methods using *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 25922 for internal quality control was done and interpreted according to the Comité d'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie recommendations of 2013. This strain was susceptible to piperacillin, ceftazidime, trimethoprim-sulfamethoxazole, and quinolone including nalidixic acid and resistant to cefotaxime, aztreonam, imipenem, gentamicin, amikacin, tobramycin, and colistin (Table 1). A test for metallo- $\beta$ -lactamase (MBL) was done and the result was positive (Figure 3). Hydrolysis tests performed with imipenem (substrate) and a crude extract of a liquid medium culture of our strain, the objective being the production of  $\beta$ -lactamase, by measuring the absorbance variation with a Cary 100 UV-visible spectrophotometer (Varian, Walnut Creek, CA, USA). Imipenem hydrolysis activity inhibited (>90%) after incubation with 5mM ethylenediaminetetraacetic acid, revealed the presence of an MBL. To characterize the gene encoding MBL of the strain, polymerase chain reaction (PCR) was carried out using genomic deoxyribonucleic acid (DNA) obtained by phenol-chloroform extraction, as the template primers IND-INV/+ (5'-TTGGCAGAATATTCCTTTACC) and IND-INV/- (5'-GAAAAAAGACGGAAAAGCAAC) as described previously by Bellais and coworkers [9].

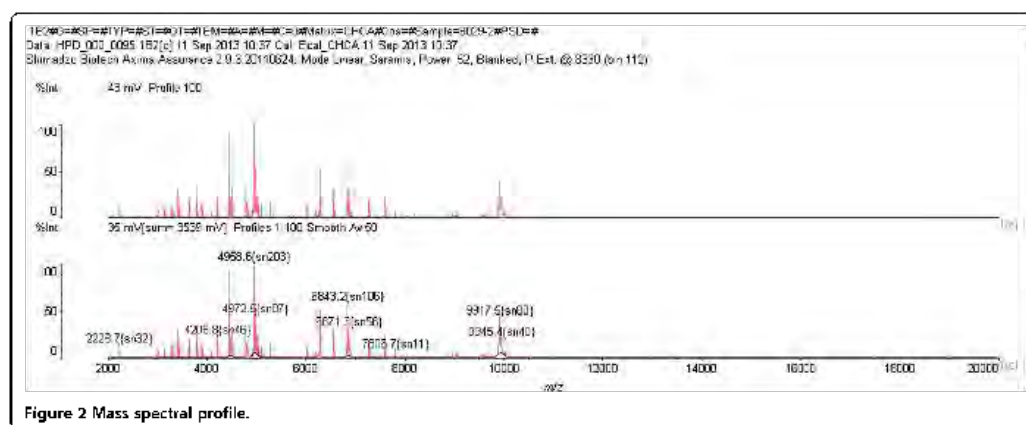


Figure 2 Mass spectral profile.

## Discussion

*Chryseobacterium* is an uncommon pathogen reported to have caused hospital-acquired infection in Taiwan. Six cases have been reported in Europe, two in Australia, two in India and seven in the USA [6]. To the best of our knowledge, this case report of *C. indologenes* infection is the second in Africa, the first was described in Burkina Faso in 2009 [5].

The pathogenicity of *C. indologenes* is not well established, however, it is already known that biofilm and proteases production are important mechanisms involved in its virulence [10]. *Chryseobacterium* is often encountered in water, soil and plants. Resistant to chlorination, it is found in the hospital environment at water systems and on medical equipment. Colonization of patients via contaminated medical devices involving fluids such as respirators, intubation tubes, humidifiers, and incubators for newborns has been reported [10]. The rehabilitation of our Department of Internal Medicine just after the death of our patient, has not allowed us to take environmental samples to investigate the source of infection.

The associated infections involve the blood stream, pneumonia, intra-abdominal and urinary tract [6,7,11] and the main risk factors are oncological disease, long hospital stays and prolonged antibiotic treatment (>14 days) [10-12]. Our patient had CML, which evolved into an acute leukemia and she was hospitalized with infectious syndrome. A blood culture was requested but it was not done due to lack of financial resources. Clinical data allow us to state that she died of septicemia; however, the isolation of the bacterium only in her urine does not allow us to confirm that it is responsible, although urinary tract infection criteria are met. Nevertheless, it is possible that the bacterium was responsible for septicemia due to her immunocompromised state;

**Table 1** *In vitro* antimicrobial susceptibilities of the strain, and interpretation according to Comité d'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie 2013 recommendations, using *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 25922 as quality control

Antibiotics	MIC (µg/mL)	IZD (mm)	Breakpoint (S)		Categorization
			µg/mL	mm	
Ampicillin	≥256	0	≤16	≥22	Resistant
Flucloxacillin	16	20	<6	>18	Susceptible
Carbapenem	≥256	0	≤16	≥22	Resistant
Trimethoprim	≥256	0	≤6	≥22	Resistant
Cephalosporin	≥256	0	<16	>22	Resistant
Cefuroxime	≥256	0	≤6	≥22	Resistant
Cefazolin	32	8	<16	>22	Resistant
Cefazolin	4	25	≤38	≥18	Susceptible
Cefuroxime	32	8	<16	>22	Resistant
Cefepime	4	28	≤38	≥18	Susceptible
Colistin	>32	6	≤6	>22	Resistant
Polymyxin	>32	6	<24	>22	Resistant
Meropenem	32	6	≤32	≥22	Resistant
Imipenem	>32	6	<32	>22	Resistant
Aztreonam	≥32	5	≤31	≥27	Resistant
Trimethoprim-sulfamethoxazole	<0.06	22	<2	>18	Susceptible
Nalidixic acid	≤2	28	≤38	≥20	Susceptible
Gentamicin	N.D.	4	N.D.	>18	Resistant
Amikacin	N.D.	0	N.D.	≥17	Resistant
Tobramycin	N.D.	0	N.D.	>18	Resistant
Colistin	N.D.	0	N.D.	-	Resistant

Abbreviations: IZD, inhibition zone diameter; MIC, minimum inhibitory concentration; 'ND', Not Determined; 'N' Colistin breakpoint not given; S, sensitivity.



**Figure 3** Evidence of metallo- $\beta$ -lactamase producing resistance to imipenem with double-disc synergy test (ethylenediaminetetraacetic acid and imipenem).

several cases of bacteremia due to *C. indologenes* have been published [11]. The majority of the cases reported in the literature with infections caused by *C. indologenes* had critical diseases and, frequently, polymicrobial infections.

Only 0.03% (50 of 155,811) of all bacterial isolates collected by the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program [13], during the 5-year period 1997 to 2001 were members of the genera *Chryseobacterium* or *Elizabethkingia* (formerly *Chryseobacterium*), the most frequent organisms being *Elizabethkingia meningoseptica* (formerly *Chryseobacterium meningosepticum*), *C. indologenes* and *Chryseobacterium gleum* [14]. All 50 isolates were from hospitalized patients, and the vast majority was recovered from either the lower respiratory tract (52.0%) or blood cultures (46.0%). Among the isolates from bloodstream infections, 30.4% were *C. indologenes*.

According to the results of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, the antimicrobials most active against *C. indologenes* are the quinolones and trimethoprim-sulfamethoxazole (>95% susceptibility), followed by piperacillin-tazobactam (90% susceptibility). Ciprofloxacin, cefepime, ceftazidime, piperacillin, and rifampin showed reasonable activity (85% susceptibility), whereas aminoglycosides, other  $\beta$ -lactams, chloramphenicol, linezolid, and glycopeptides are not appropriate for treating infections by this organism [13]. The strain was found to be resistant to imipenem (minimum inhibitory concentrations, MICs, >32  $\mu$ g/mL) due to MBL (class B) production and susceptible to piperacillin (MICs 16  $\mu$ g/mL), cefepime (MICs 4  $\mu$ g/mL), ceftazidime (MICs 4  $\mu$ g/mL) trimethoprim-sulfamethoxazole (MICs  $\leq$ 0.25  $\mu$ g/mL) and all quinolones including nalidixic acid (MICs  $\leq$ 2  $\mu$ g/mL). It is also resistant to ceftioxaone (MICs 32  $\mu$ g/mL), used as empirical antibiotic therapy for our patient. Our strain seemed to be less resistant than *C. indologenes* 597 (IND-6) of Burkina Faso according to MIC of imipenem

(>32  $\mu$ g/mL versus >64  $\mu$ g/mL) and quite more resistant than *C. indologenes* NE 16 (CDC group IIb, IND-5) (>32  $\mu$ g/mL versus 32  $\mu$ g/mL). Several species of *Flavobacteriaceae*, including *C. indologenes*, are naturally resistant to  $\beta$ -lactam antibiotics (including carbapenems) due to production of a resident MBL (class B) IND-1 for indologenes [9]. Seven variants of MBL (class B; IND-1 to IND-6 and IND-2a) have been detected in *C. indologenes*. A new IND-type variant named IND-7 has also been recently reported from Japan (2010) in a *C. indologenes* isolate [15]. Nonspecific bands obtained by PCR-IND for our strain can be explained by the sequence heterogeneity at the 5' and 3' extremities of the MBL gene, which made unsuccessful direct amplification with consensus primers designed to amplify all known IND-like MBL genes. An inverse PCR approach to obtain the complete sequence of the *bla<sub>IND</sub>* of our strain is in progress.

## Conclusions

*C. indologenes* although uncommon, is an important pathogen causing infection in hospitalized patients. The management of this infection needs better identification, susceptibility testing and monitoring of immunocompromised patients with long hospital stays. In addition, this report showed the necessity to survey environmental bacteria that could cause hospital-acquired infection.

## Consent

The signed written consent of the husband of the deceased patient was obtained for publication of this case report and the accompanying images after explaining the interest of this publication. A copy of the written consent is available for review by the Editor-in-Chief of this journal.

## Endnote

<sup>a</sup>An ethnic group in Senegal, West Africa.



2) *Conflicts of interest* that arise from competing interests

AD, CM, FS, NCS, TS, BFA, DHE, TKC, VS and GDA conducted the case review and contributed to the writing of the case report. All authors read and approved the final report.

We thank the members of our Department of Internal Medicine in clinical care and the staff of the Laboratory of Epidemiology of the Airborne Bacterial Pathology Hospital for the technical assistance. We also thank the researchers of the Department of Medical Biotechnology, University of São Paulo, for their work contributions on the sample, and, but not least, his address, thanks to Jean Pierre Leguizans (INRA/AFN) for helpful comments.

<sup>2</sup> Hôpital Firdausi de Daxin, Tawancha Naxi, Nanchang, BP 3308 Daxin, Jiangxi.

Received: 24 September 2013 Accepted: 19 March 2014  
Published: 6 May 2014

1. Delvecchio MG, Goussard S, Pin JP, Meyer PN: *Chryseobacterium indologenes* bacteremia in an infant. *Eur J Clin Microbiol Infect* 2010, 34(10):1481-1482.
2. Hsieh AB, Tseng TL, Yu SD, Ho SC, Chen WS, Luh KT: Increasing incidence of nosocomial *Chryseobacterium indologenes* infections in Taiwan. *Eur J Clin Microbiol Infect* 1987, 16(8):565-574.
3. Cardone T, Garcia E, Rojas P, Garcia D, Tasso M, Losada A: *Chryseobacterium indologenes* Infection In a newborn: a case report. *J Med Case Rep* 2010, 5:10.
4. Fan Y, Jiang YY, Li ML, Yu SW, Wang L, Li CY: Clinical and microbiological characteristics of *Chryseobacterium indologenes* bacteremia. *J Infect Chemother* 2010, 16(4):295-296.
5. Zeller A, De Lencastre A, Tomasz A, De manne A, K. J. Tomasz A, Naciri H, Tossolini GA, Freije JM, Docquier JD: IND-6, a highly divergent IND-type metallo-beta-lactamase from *Chryseobacterium indologenes* strain 597 isolated in Burkina Faso. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, 53(4):1314-1320.
6. Jager G, Jahn A, Meier L, Wenzel HP: Urinary tract infection by *Chryseobacterium indologenes*. *Wien Klin Wochenschr* 2012, 124:370-373.
7. Anoma-Gbenga M, Anagha-Pierre A, Boringue-Henry E, Molina-Viguer A: Urinary infection due to *Chryseobacterium indologenes*. *Antonie van Leeuwenhoek* 2013, 193:334.
8. Sami A, Chirac JP, Drua T, Sow A, Dop N: *Chryseobacterium meningosepticum* meningitis. Clinical and bacteriological study of 2 cases treated in Senegal. *Médecine (Paris)* 1997, 22(18):91.
9. Soltys A, Boinel J, Leclercq A, Kow L, Nedjma Z: Genetic diversity of carapanen-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamases from *Chryseobacterium* (*Flavobacterium*) *indologenes*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000, 44:3028-3034.
10. Isuen FB, Tang JL, Yang PC, Lu SW, Hsieh WC, Luh KT: Clinical and microbiological characteristics of *Flavobacterium indologenes* infections associated with indwelling devices. *J Clin Microbiol* 1995, 33(1):195-197.
11. Christidis CE, Benaventis A, C. G. Benaventis A, Amaravati A, Tsipalakis K: *Chryseobacterium indologenes* non-catheter-related bacteremia in a patient with a solid tumor. *J Clin Microbiol* 2005, 43(4):2021-2023.
12. Chen TL, Wang CC, Tang SC, Tu YU, Li Jee WS: Clinical and microbiological features of *Chryseobacterium indologenes* infections: analysis of 215 cases. *Antonie van Leeuwenhoek* 2013, 185(1):17-23.
13. Klevor SA, Archer G, Archer G, Jones KE: Antimicrobial susceptibility and epidemiology of worldwide collection of *Chryseobacterium* spp. Report from the SENTRY Antimicrobial surveillance Program (1997-2001). *J Clin Microbiol* 2002, 40:444-445.

16. Saitoh M, Ueda C, Ito H. *The Genes of Chrysochromobacter and Related Bacteria*. Tokyo: Kenkyukai, 1978; 1-100.

Cite this article as: Cissé et al.: *Chryseobacterium indologenes* in a woman with acute leukemia in Senegal: a case report. *Journal of Medical Case Reports* 2015 **9**:125.

**Submit your next manuscript to BioMed Central  
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit





**Article N°2 : *Chryseobacterium gleum* chez un homme ayant subi une prostatectomie au Sénégal: Rapport de cas et revue de la littérature.**

**Arouna O**, Deluca F, Camara M, Fall B, Fall B, Ba Diallo A, Docquier JD and Mboup S. *Chryseobacterium gleum* in a man with prostatectomy in senegal: a case report and review of the literature. J Med Case Report 2017; 11:118.

CASE REPORT

Open Access



# *Chryseobacterium gleum* in a man with prostatectomy in Senegal: a case report and review of the literature

O. Arouna<sup>1\*</sup>, F. Deluca<sup>2</sup>, M. Camara<sup>3</sup>, B. Fall<sup>4</sup>, B. Fall<sup>5</sup>, A. Ba Diallo<sup>6</sup>, J. D. Docquier<sup>6</sup> and S. Mboup<sup>7</sup>

## Abstract

**Background:** Here we report a rare case of a urinary tract infection due to *Chryseobacterium gleum*. This widely distributed Gram-negative bacillus is an uncommon human pathogen and is typically associated with health care settings.

**Case presentation:** We describe a case of urinary tract infection caused by *Chryseobacterium gleum* in a 68-year-old man of Wolof ethnicity (an ethnic group in Senegal, West Africa) who presented to our Department of Urology in a university teaching hospital (Hôpital Aristide Le Dantec) in Dakar, Senegal, 1 month after prostatectomy. The strain isolated from a urine sample was identified as *Chryseobacterium gleum* by mass spectrometry (Vitek matrix assisted laser desorption/ionization, time-of-flight, bioMérieux) and confirmed by 16S ribosomal ribonucleic acid sequencing. The organism was resistant to a wide range of antibiotics, including carbapenem, due to a resident metallo  $\beta$ -lactamase gene that shared 99% of amino-acid identity with *Chryseobacterium gleum* class B enzyme.

**Conclusions:** Infection by *Chryseobacterium gleum* is infrequent and no such case has been previously reported in Africa. Despite its low virulence, *Chryseobacterium gleum* should be considered a potential opportunistic and emerging pathogen. Further studies on the epidemiology, pathogenicity, and resistance mechanisms of *Chryseobacterium gleum* are needed for better diagnosis and management.

**Keywords:** *Chryseobacterium gleum* case report, Urinary tract infection, Metallo  $\beta$ -lactamase, CGB<sup>TM</sup>, resistance

## Background

The genus *Chryseobacterium* (formerly *Flavobacterium*) [1], whose type species is *Chryseobacterium gleum* [2] and belongs to the family *Flavobacteriaceae* (phylum Bacteroidetes), represents a group of Gram-negative, non-fermenting, catalase-positive, and indole-positive aerobic bacilli. *Chryseobacterium* species are uncommon human pathogens, and most cases are nosocomial and are often associated with immunosuppression or indwelling devices. *Chryseobacterium* is typically found in soil, water, plants, and food products and can survive in hospital environments, chlorinated water, and wet surfaces, all of which serve as potential reservoirs of infection. A literature search revealed only a few published cases in countries including Hungary, India, Croatia, and

Saudi Arabia [3–6]. In Senegal, two cases of meningitis due to *Flavobacterium meningosepticum* were diagnosed in the late 1970s [7] as well as one case of *Chryseobacterium indologenes* [8]. However, human *C. gleum* infection has not been previously reported in Africa.

Here, we report the first case of *C. gleum* infection occurring in Africa and provide a review of similar cases worldwide (Table 1).

## Case presentation

A 68-year-old man of Wolof ethnicity (an ethnic group in Senegal, West Africa) presented to our Department of Urology with severe dehydration and general deterioration of condition 1 month after prostatectomy via transurethral resection performed at a regional hospital. At hospital admittance, a clinical examination found a high blood pressure (180/90 mmHg) and a fever of 38.5 °C. Blood tests found leukocytosis with a level of 17,100/ml, white blood cells (WBC), anemia with a level

\* Correspondence: [Orouna.ah@univ-dakar.sn](mailto:Orouna.ah@univ-dakar.sn)  
<sup>1</sup>Laboratoire de Bio-Chimie et Microbiologie, Université Cheikh Anta Diop, BP 7225, Dakar, Senegal  
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

**Table 1** Case reports of infection by *Chryseobacterium gleum*

Author	Country	Sex/Y/Age	Site	Outcome	Factors	Antibiotic treatment
Vitek et al. (2014) [7]	Hungary	Newborns	Stomach content	Cured	Respiratory and infection	Gentamicin
Garg et al. (2015) [18]	India	M/13	Urine	Cured	Pyonephrosis	Tetracycline
Djani et al. (2015) [3]	Croatia	F/35	Blood/Tissue aspirate	Cured	Endocarditis/myocarditis	Piperacillin/aztreonam
Ranjay et al. (2015) [4]	India	M/62	Urine	Cured	Renal colic/hydronephrosis	Piperacillin/aztreonam
Isah et al. (2015) [6]	Saudi Arabia	Newborn	Tracheal discharge	Cured	Nephrotic syndrome	Amikacin
Our case (2016)	Senegal	M/69	Urine	Cured	Posttrauma	Gentamicin

M, male; F, female

Y, year

of 10 g/dL, and creatinine with a level of 513.3  $\mu\text{mol/L}$ . Serum electrolytes showed hyponatremia with a level of 111 mEq/L, hypokalemia with a level of 3.3 mEq/L, and hypochloremia with a level of 77 mEq/L. At presentation, he had an indwelling urinary catheter draining urine incorrectly that required a urine bacteriology examination.

Treatment consisted of fluid and electrolyte replacement, daily dressing of the wound, and empiric antibiotic therapy with amikacin. This drug was chosen because of the severity of the infection and because our patient had previously received treatment with fluoroquinolone. Seven days after hospitalization, the outcome was favorable with a clean surgical wound and normalization of serum potassium and chloride levels. However, hyponatremia persisted at 119 mEq/L, and his serum creatinine level was 150.45  $\mu\text{mol/L}$ . Removal of the urinary catheter was performed on day 7 of hospitalization, and he returned home the same day.

The cloudy urine collected for bacteriology examination at hospitalization was inoculated on a cysteine lactose electrolyte deficient (CLEED) agar plate according to the usual techniques for medical bacteriology. Direct examination showed a rich bacterial flora, many white cells, and Gram-negative bacilli by Gram staining. The CLEED agar grew yellow-colored 1 to 2 mm circular colonies ( $>10^6$  CFU/mL) with regular margins.

After culture, *Chryseobacterium* species was suspected because of the yellow-colored colonies due to flexirubin production. Identification using the Appareil et Procédés d'Identification 20 NE identification system (bioMérieux, France) gave *Myroides* species and *C. indologenes* after respectively, 24 hours and 48 hours of incubation (Table 2).

However, mass spectrometry (Vitek MS matrix-assisted laser desorption/ionization, time-of-flight, bioMérieux) successfully identified *C. gleum* and the result was confirmed using 16S ribosomal ribonucleic acid (rRNA) sequencing.

In this case, *C. gleum* was confirmed as the causative agent for our patient's urinary tract infection as evidenced from the culture reports. Confluent growth of the organism in pure form from urine helped to rule out contamination.

Antimicrobial susceptibility testing using disc diffusion and E-tests (bioMérieux) for the minimum inhibitory concentration (MIC) using *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 25922 for internal quality control was completed and interpreted per the Comité d'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) recommendations of 2015. The isolated strain was susceptible to piperacillin (MIC = 6  $\mu\text{g/mL}$ ), ceftazidime (MIC = 0.75  $\mu\text{g/mL}$ ), cefepime (MIC = 0.125  $\mu\text{g/mL}$ ), ciprofloxacin (MIC = 0.25  $\mu\text{g/mL}$ ), imipenem (MIC = 2  $\mu\text{g/mL}$ ), and resistant to meropenem (MIC = 8  $\mu\text{g/mL}$ ), aztreonam (MIC  $>256$   $\mu\text{g/mL}$ ), ticarcillin (MIC  $>256$   $\mu\text{g/mL}$ ), ticarcillin-clavulanic acid (MIC = 64  $\mu\text{g/mL}$ ), and cefotaxime (MIC  $>32$   $\mu\text{g/mL}$ ; Table 3).

Due to the decreased susceptibility to carbapenem, a combined test with imipenem and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was positive, indicating the production of metallo- $\beta$ -lactamase (MBL). To characterize the gene encoding MBL, polymerase chain reaction (PCR) was performed using genomic deoxyribonucleic acid (DNA) obtained by phenol-chloroform extraction, using the template primers CGB1\_exp/1w (5'-GGGAATTCATATGAAAAAAGCATTTCCGTTTTTTTA) and CGB1\_exp/rv (CGCGGATCCTTATTTTTTATTTTAAAGATCAAG) as described previously by Bellais and colleagues [9]. DNA sequence analysis of the 726-base pairs (bp) amplified

**Table 2** Identification of the strain using Appareil et Procédés d'Identification 20 NE (37.2)

	%ID		T	S
	24 h	48 h	24 h	48 h
Significant taxa				
<i>Myroides</i> species	61.2		0.67	
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	34.7	99.9	0.84	0.12
Next taxon				
<i>Stenotrophomonas</i>	7.4		0.5	
<i>Shewanella putrefaciens</i> group		0.1		0.0

24 h 24 hours of incubation, 48 h 48 hours of incubation, %ID identification percentage (proximity relative to the different taxa in the database, it is determined whether the observed profile is closer to a particular taxon; T typically the most typical profile is the one that has no tests against the identification compared with percentages in the database for that taxon)



demonstrated 100% biofilm-forming ability in Luria-Bertani (LB) media, and increasing biofilm production is associated with the mortality rates of infected patients [13]. Lo and Chang performed a focused study on 14 *C. gleum* isolates [14], and the strains were epidemiologically unrelated and originated primarily from urine and sputum. Their study demonstrated that 40% of *C. gleum* isolates could form a biofilm. The biofilm-forming potential of *C. gleum* appeared to be much lower than that of *E. meningoseptica*. Therefore, it was suggested that *C. gleum* might be less virulent than *E. meningoseptica* and *C. indologenes*. In fact, we previously reported a fatal case of urinary tract infection due to *C. indologenes* in a woman with acute leukemia [8]. This outcome is in contrast to the present case, where the patient survived despite an advanced state of malnutrition.

Only 0.27% (50 of 18,569) of all processed non-fermenting Gram-negative bacilli (NTGNBs) and 0.03% (50 of 15,581) of isolates collected by the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program during the 5-year period from 1997 to 2001 were members of the genera *Chryseobacterium* or *Elizabethkingia* (formerly *Chryseobacterium*), with the most frequent organisms being *E. meningoseptica*, *C. indologenes*, and *C. gleum* [15]. All 50 isolates were obtained from hospitalized patients, among which only two isolates (4%) were identified as *C. gleum*. The present case is the first reported case of a urinary tract infection in Africa by *C. gleum*, although *C. indologenes* was previously reported in Burkina Faso in 2007 [16], in Senegal in 2014 [8], and in Tunisia in 2015 [17]. However, in Senegal, two cases of meningitis due to *E. meningosepticum* were diagnosed in the late 1970s [7].

There are few data available on antimicrobial susceptibility and no standardized breakpoints for *Chryseobacterium* species in CA-SFM guidelines due to the small number of clinical isolates. Thus, selecting an antimicrobial agent for the treatment of *Chryseobacterium* species infections remains difficult, especially because of chromosomal resistance to many antibiotics used for Gram-negative bacteria. According to the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, the antimicrobials most active against *Chryseobacterium* species are quinolones and sulfamethoxazole-trimethoprim ( $\geq 95\%$  susceptibility) followed by piperacillin-tazobactam (90% susceptibility). Ciprofloxacin, cefepime, ceftazidime, piperacillin, and rifampicin showed reasonable activity (85% susceptibility), whereas aminoglycosides, other  $\beta$ -lactams, chloramphenicol, linezolid, and glycopeptides are not appropriate for treating infections caused by this organism [15]. This conclusion is in concordance with the drug susceptibility pattern of the strain isolated in Senegal. In fact, most *C. gleum* infections have been preferentially treated by newer generations of quinolones than by the combination of piperacillin-tazobactam (Table 1). However, the strain isolated in Saudi Arabia was resistant to piperacillin-

**Table 4** Minimum inhibitory concentrations of  $\beta$ -lactams for *Chryseobacterium gleum* CIP 103039, in comparison with our strain

MIC ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) test		
Antibiotics	Our strain	<i>Chryseobacterium gleum</i> CIP 103039
Carbapen	$\geq 256$	256
Ticarcillin/AC	64	256
Piperacillin	8	2
Cefotaxime	32	4
Cefotaxime	32	32
Cefepime	0.125	1
Aztreonam	$\geq 256$	64-128
Imipenem	2	2
Meropenem	8	8

AC, clavulanic acid; MIC, minimum inhibitory concentration

tazobactam. In addition, it was previously published that *C. gleum* CIP 103039 carried at least two likely chromosome-encoded  $\beta$ -lactamases, Amber class A CGA-I and Amber class B CGB-I, and was resistant to penicillins, cephalosporins, cefotaxime, and aztreonam, intermediate to carbapenems, and susceptible to piperacillin. Our strain showed the same drug susceptibility pattern as *C. gleum* CIP 103039 (Table 4). In contrast, the focused study of 14 *C. gleum* isolates conducted in Taiwan by Lo and Chang revealed that all isolates were resistant to piperacillin and imipenem [14].

## Conclusions

To the best of our knowledge, this is the first case of a *C. gleum* infection reported in Africa. Despite their low virulence, *Chryseobacterium* species should be considered a potential opportunistic pathogen that can cause infection in hospitalized patients. This report highlights the emergence of *Chryseobacterium* infections in Africa and emphasizes the importance of strengthening hospital hygiene measures as well as the necessity to survey environmental bacteria that could cause hospital-acquired infections.

## Acknowledgements

We thank the physicians of our Department of Biology for clinical data and the staff of the laboratory of bacteriology of the Azienda Policlinica University Hospital for their technical assistance. We also thank the researchers at the Department of Medical Biotechnology, University of Siena (Italy), where work continued on this case.

## Funding

Not applicable.

## Availability of data and materials

Data sharing was not applicable to this article because no datasets were generated or analyzed during the current study.

# Authors' contributions

OA, HJ, M, RH, B, AB, J, JJ, and SM conducted the case review and contributed to the writing on the case report. All authors read and approved the final report.

# Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

# Consent for publication

Written informed consent was obtained from the patient for publication of this case report and any accompanying images. A copy of the written consent is available for review at the bottom of this journal article.

# Ethics approval and consent to participate

The approval of the national ethics committee was sought and has been obtained.

# Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

# Author details

<sup>1</sup>Laboratoire de Bactériologie-Mycologie, HNU, Dakar, Senegal. <sup>2</sup>Unité de Diagnostic, Université Cheikh Anta Diop, BP 7225, Dakar, Senegal. <sup>3</sup>Dipartimento di Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Siena, Policlinico "Le Scotte", Via Sallustiana, 166, 53100 Siena (SI), Italy. <sup>4</sup>Servizio d'Urologia, Clinica Urologica, Università di Dakar, Senegal. <sup>5</sup>Centre de diagnostic et de traitement des maladies infectieuses, Avenue Ibrahim Yansane, Dakar, Senegal.

Received: 15 December 2016 Accepted: 15 March 2017

Published online: 24 April 2017

# References

- Whittam-Tsao H, Schmidt H, Segura-Hernandez C, Thomas B. New perspectives in the classification of the *Acetivibrio* division of the *Chlorobacteriales* genus: new *Acetivibrio* genera and *Acetivibrio* species. *Int J Syst Bacteriol*. 1997;44:877-81.
- Holmer B, Owen R, Szegedy A, Brenner DJ. *Chlorobacterium glum*, a new species found in human clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol*. 1994;34:1-5.
- Wink DP, Alrakhi M, Szegedy A, Maier C, Jahan L, et al. *Chlorobacterium glum* in renal failure: a new species distinct from *Chlorobacterium* infections. *JAMA*. 2014;311:1879-80.
- Alrakhi M, Szegedy A, Maier C, Jahan L, et al. *Chlorobacterium glum* urinary tract infection. *Genes*. 2015;6:111-5.
- Djane VB, Ozren Z, Brancic S, Vranic F. *Chlorobacterium glum* infection in children with extreme malnutrition and hepatic lesion - case report. *Signa Vitae*. 2010;20:150-2.
- Jane A, Navab H, Khedkar A, Rami A. *Chlorobacterium glum* in immunocompetent infant with metabolic syndrome. *Diagn*. 2016;5:94-6.
- Yama A, Choudhury A, Sen S, Das S, Das S. *Chlorobacterium meningosepticum* meningitis: clinical and bacteriological study of 2 cases treated in Senegal. *Bull Soc Med Afr*. 1977;22:184-91.
- Arouna O, Camara M, Fall S, Ngom C, Sarr B, Ba Diouf A, Diou N, et al. *Chlorobacterium meningosepticum* meningitis: a case report. *J Med Case Rep*. 2014;6:58.
- Bellais V, Nave T, Kormann R. Genetic and Biochemical Characterization of CGB-1, an Anti- or Class B Carboxypeptidase from *Chlorobacterium glum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:279-83.
- Wink DP, Douglas SD, et al. *Chlorobacterium glum* infections in children. *N Engl J Med*. 2014;370:222-3.
- Wink DP, Song L, Wang Y, et al. *Chlorobacterium glum* and *Chlorobacterium meningosepticum* infections associated with indwelling devices. *J Clin Microbiol*. 1996;34:906-8.
- Kosama Y, Kishimura M, Nakamura K, et al. *Chlorobacterium meningosepticum* infection after cardiac transplantation. *Heart*. 2003;90:100-2.
- Wink DP, Chen H, Huang C, et al. *Chlorobacterium glum* production of an iron-regulated metallo-beta-lactamase and a putative metallo-beta-lactamase precursor at rate in *Chlorobacterium meningosepticum* genome. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;36:33-40.

- To H-H, Chang H-H. *Chlorobacterium meningosepticum* and *Chlorobacterium glum* infections. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(3):298-302.
- Kirby JT, Saeed S, Walsh TJ, Jones RK. Antimicrobial susceptibility and epidemiology of worldwide collection of *Chlorobacterium glum*. Report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2003). *J Clin Microbiol*. 2004;42:1475-8.
- Zeng X, De Lencastre E, Couto A, Delmoude M, Simoes J, Nauwauw JG, Borsari G, et al. *Chlorobacterium glum*, a highly divergent metallo-beta-lactamase from *Chlorobacterium meningosepticum* strain 567 isolated in Burkina Faso. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:326-30.
- Ben Solani I, Tebib J, Jossan M, Ben Haj Khaled A, Ben Soud A, et al. *Chlorobacterium meningosepticum* meningitis in ventilated neonates: presumable first reported case in Tunisia. *Rev Neurol (Paris)*. 2013;169:27-30.
- Carli S, Aspinwall J, Mohar A, Laroche N. *Chlorobacterium glum*. *Chlorobacterium glum*. A first case report. *Iran J Med Microbiol*. 2015;3:203-5.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selection tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research: submit your manuscript at [www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



**Article 3 :**

Arouna O<sup>1\*</sup>, Deluca F<sup>2</sup>, Lara Y<sup>3</sup>, Camara M<sup>1</sup>, Amisano F<sup>3</sup>, Galleni M<sup>3</sup>, Docquier JD<sup>2</sup>, and Mboup S<sup>1</sup>. **Genetic diversity of Chryseobacterial Metallo- $\beta$ -lactamases. Article soumis “International Journal of antibiotics agents”**

Manuscript Number:

Title: Genetic diversity of Chryseobacterial Metallo- $\beta$ -lactamases

Article Type: Original Article

Keywords: Chryseobacterium, Metallo- $\beta$ -lactamase, resistance, genetic diversity, IND, CGB.

Corresponding Author: Dr. ADAMOU AROUNA OMAR, PhD

Corresponding Author's Institution: SOLABSEN

First Author: ADAMOU AROUNA OMAR, Doctor

Order of Authors: ADAMOU AROUNA OMAR, Doctor; ADAMOU AROUNA OMAR, PhD;  
DELUCA FILOMENA; LARA YANNICK; CAMARA MAKHTAR; AMISANO FRANCESCO;  
GALLEN MORENO; DOCQUIER JEAN-DENIS; MBOUP SOULEYMANE

Abstract: Chryseobacterium species are Gram-negative bacilli that are source of nosocomial infections, carrying an Ambler class B  $\beta$ -lactamase gene blaIND, for Chryseobacterium indologenes and blaCGB for Chryseobacterium gleum. These genes are characterized by a high molecular heterogeneity and to date sixteen genes, blaIND-1 up to blaIND-16 encoding for Metallo- $\beta$ -lactamase (MBL), IND-1 up to IND-16 have been described. This study aims to investigate phenotypic properties and genotypic relationships of 8 clinical isolates of Metallo- $\beta$ -lactamase (MBL)-producing Chryseobacterium spp recovered from a university teaching hospital of Dakar (Senegal), and (ii) investigate phylogenetic relationship between MBL of Chryseobacteria. Seven strains, identified as C. indologenes carried blaIND-type gene, including blaIND-14 (2/7), and blaIND-7 (3/7) as the major genotype. All The seven isolates were resistant to imipenem instead of the strain 8905, despite carrying the blaIND-7 gene. Metallo- $\beta$ -lactamase (MBL) genes of two isolates, NDIOP and 4924 shared 96% and 87 % amino acid identity with IND-6 and IND-11, respectively and seems to be novel variants. Finally, the strain identified as C. gleum produces an Ambler class B  $\beta$ -lactamase, and shares 99 % amino-acid identity with blaCGB-1. On molecular basis, this study show the existence of at least three lineages of IND enzymes; IND subfamily I, II, III with respectively IND-1, IND-2, IND-4 as IND enzyme type and a fourth lineage, represented by the novel variant IND sequence obtained during this study. Within the subfamily I, seven groups were identified, highlighting the extensive heterogeneity of IND-like enzyme, produced by Chryseobacterium species.



## Genetic diversity of Chryseobacterial Metallo- $\beta$ -lactamases

AROUNA O<sup>1\*</sup>, DE LUCA F<sup>2</sup>, LARA Y<sup>3</sup>, CAMARA M<sup>1</sup>, AMISANO F<sup>3</sup>, GALLEN M<sup>3</sup>,  
DOCQUIER JD<sup>2</sup>, and MBOUP S<sup>1</sup>.

AROUNA O<sup>\*</sup>: ADAMOU AROUNA Omar. Oarouna2@gmail.com

DELUCA F: DELUCA Filomena. Filomena.deluca@unisi.it

LARA Y: LARA Yannick. yannicklara@gmail.com

CAMARA M: CAMARA Makhtar. camaramakhtar@yahoo.fr

AMISANO F: AMISANO Francesco. francesco.amisano@student.ulg.ac.be

GALLEN M: GALLEN Moreno. mgallen@ulg.ac.be

DOCQUIER JD: jddocquier@unisi.it

MBOUP S: mboup@rarslbv.org

<sup>1</sup>. Laboratoire de Bactériologie-Virologie. CHNU Aristide Le Dantec. BP 7325-Dakar, Sénégal.  
Tél: +221338225919 Fax: +221338216442. Sénégal

<sup>2</sup>. Università degli Studi di Siena. Dipartimento di Biotecnologie Mediche. Policlinico "Le Scotte",  
V lotto, Il piano. Viale Bracci, 16. 53100 Siena (SI). Italia. Tel: 0577 233 261/262/439. Fax: 0577  
233 325.

<sup>3</sup>. Faculté des Sciences Département des Sciences de la Vie.  
Center for Protein Engineering. Institut de Chimie, Bât. B6, Sart Tilman, B-4000 Liège  
(Belgium) Phone : +32-4-366.3549 FAX : +32-4-366.3364

\*: Corresponding author details: ADAMOU AROUNA Omar; oarouna2@gmail.com  
Université Cheikh Anta Diop. Laboratoire de Bactériologie-Virologie. CHNU Aristide Le  
Dantec. BP 7325-Dakar, Sénégal. Tél: +221338225919 Fax: +221338216442. Sénégal  
Cell: +221777155586

46 **Abstract**

47  
48 *Chryseobacterium* species (belonging family of *Flavobacteriaceae*) are Gram-negative bacilli  
49 that are source of nosocomial infections, carrying an Ambler class B  $\beta$ -lactamase gene *bla*<sub>IND</sub>, for  
50 *Chryseobacterium indologenes* and *bla*<sub>CGB</sub> for *Chryseobacterium gleum*. These genes are  
51 characterized by a high molecular heterogeneity and to date sixteen genes, *bla*<sub>IND-1</sub> up to *bla*<sub>IND-16</sub>  
52 encoding for Metallo- $\beta$ -lactamase (MBL), IND-1 up to IND-16 have been described. Metallo- $\beta$ -  
53 lactamase IND-6 has been described from *C. indologenes* strain 597 from Burkina Faso (West  
54 Africa) isolated in 2009. This study aims to (i) investigate phenotypic properties and genotypic  
55 relationships of 8 clinical isolates of Metallo- $\beta$ -lactamase (MBL)-producing *Chryseobacterium*  
56 *spp* recovered from a university teaching hospital of Dakar (Senegal), and (ii) investigate  
57 phylogenetic relationship between MBL of *Chryseobacterium*. Seven strains, identified as *C.*  
58 *indologenes* carried *bla*<sub>IND</sub>-type gene, including *bla*<sub>IND-14</sub> (2/7), and *bla*<sub>IND-7</sub> (3/7) (encoded for  
59 IND-7 or IND-1) as the major genotype. All The seven isolates were resistant to imipenem  
60 instead of the strain 8905, despite carrying the *bla*<sub>IND-7</sub> gene. Metallo- $\beta$ -lactamase (MBL) genes  
61 of two isolates, NDIOP and 4924 shared 96% and 87 % amino acid identity with IND-6 and  
62 IND-11, respectively and seems to be novel variants. Finally, the strain identified as *C. gleum*  
63 produces an Ambler class B  $\beta$ -lactamase, and shares 99 % amino-acid identity with *bla*<sub>CGB-1</sub>. On  
64 molecular basis, this study show also the existence of at least three lineages of IND enzymes;  
65 IND subfamily I, II, III with respectively IND-1, IND-2, IND-4 as IND enzyme type and a fourth  
66 lineage, represented by the novel variant IND sequence obtained during this study. Within the  
67 subfamily I, seven groups (Ia, Ib, Ic, Id, Ie, If, Ig) were identified, highlighting the extensive  
68 heterogeneity of IND-like enzyme, produced by *Chryseobacterium* species.

69 **Keywords:** *Chryseobacterium*, Metallo- $\beta$ -lactamase, resistance, genetic diversity, IND, CGB.

70 **List of abbreviations**

71 **MBL:** Metallo- $\beta$ -lactamase; **IND:** MBL from *Chryseobacterium indologenes*; **CGB:** MBL from  
72 *Chryseobacterium gleum*; **bla:**  $\beta$ -lactamase;

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94       **1. Introduction**

95       The genus *Chryseobacterium* (Chruseos, “golden”; bacterium, a “small rod”: *Chryseobacterium*,  
96       a yellow rod”) formerly *Flavobacterium*, belongs to the family *Flavobacteriaceae*. This genus  
97       was proposed for the first time in 1994 [1]. It is currently composed by 90 species with valid  
98       names [2], and includes *Chryseobacterium indologenes* and *Chryseobacterium gleum*, which are  
99       the most common flavobacterial species encountered in infectious diseases particularly in  
100       neonates or immune-compromised patients. *Chryseobacterium* species isn’t a common cause of  
101       human infections, but has been reported in nosocomial outbreak in Taiwan and sporadic cases  
102       elsewhere [3]. In Senegal, two cases of UTIs (urinary tract infection) caused by  
103       *Chryseobacterium* spp have been reported: in particular they have been caused by *C. indologenes*  
104       and *C. gleum* [4, 5] and they represented a clinical problem due to their resistance to several  
105       classes of antibiotics. Beside these clinical isolates a novel species, *Chryseobacterium*  
106       *senegalense* have been isolated from the mouth of a Senegalese lungfish (*Protopterus annectens*)  
107       [6].

108       Recently, there has been a growing interest to *Chryseobacterium* species commonly associated  
109       with the production of high levels of metallo- $\beta$ -lactamase (MBL) of Ambler class B. MBLs are a  
110       group of zinc-dependent enzymes that possess the property of hydrolyse a wide range of  $\beta$ -lactam  
111       antibiotics including carbapenems [7]. These MBL genes from *Chryseobacterium* species,  
112       located on chromosomes, have been reported so far in *C. indologenes* and *C. gleum*. These MBL  
113       enzymes, belonging to Ambler subclass B1, exhibits significant allelic diversity and sixteen IND-  
114       types diverging up to 20% at the sequence level have been identified and registered in GenBank.  
115       To date, sixteen variants of resident MBLs (IND-1 to IND-16) have been detected in *C.*  
116       *indologenes*, named by chronological order of identification. The firsts IND-type enzymes, IND-  
117       1, up to IND-4 and IND-2a were identified in clinical *C. indologenes* isolates in France and

118 shared 77 to 99% amino acid homology [8, 9]. IND-5 and IND-6 have been described in clinical  
119 *C. indologenes* isolate in Italian and Burkina Faso hospitals respectively [10, 11]. The last IND-  
120 type enzyme identified is IND-16 [12], isolated in China, and shares 99% identity with IND-8  
121 and IND-10 from South Korea. Biochemical characterization and measurement of MICs only  
122 done for IND-1 up to IND-6, revealed interested functional differences regarding for their  
123 abilities to hydrolyse imipenem. Among these sequences, IND-7 from Japan, sharing 100%  
124 amino acid identity with IND-1, is the only enzyme that was crystallized [13]. For *C. gleum*, only  
125 one MBL-type enzyme have been identified, CGB-1 which shares 83 % amino acid identity with  
126 IND-1 [14].

127 Little is known about the distribution and the heterogeneity of *bla*<sub>IND</sub> and *bla*<sub>CGB</sub> in clinical  
128 isolates of *Chryseobacteria* worldwide. This study aims, (i) to investigate phenotypic properties  
129 and genotypic relationships of 8 clinical isolates of Metallo- $\beta$ -lactamase (MBL)-producing  
130 *Chryseobacterium* spp. recovered from the university teaching hospital of Dakar (Senegal)  
131 between January 2013 and December 2015, (ii) to investigate phylogenetic relationship between  
132 MBL of *Chryseobacteria*.

133

134

## 135 2. Materials and Methods

136

### 137 2.1. Bacterial isolates and patients.

138

139 Eight clinical isolates of *Chryseobacterium* spp. were collected from urine (6/8), sputum (1/8)  
140 and ascite fluid (1/8) between January 2013 and December 2015 at the University of Dakar  
141 (Hôpital Aristide Le Dantec) in Senegal. The baseline demographic and clinical characteristics of  
142 all patients were retrospectively examined using the medical records patients (Table 1).

143

144       **2.2. Taxonomical characterization by MALDI-TOF MS and 16S rRNA gene sequencing.**

145   Mass spectrometry (Vitek MS matrix-assisted laser desorption/ionization) was used for primary  
146   identification, using the Microflex LT system [15]. In order, to elucidate the taxonomy of 3  
147   strains for which mass spectra were enigmatic, the amplification of 16S ribosomal RNA was  
148   performed using specific primer pair Eubb (Reverse) and Euba (Forward). Then resulted  
149   amplicons were purified and sequenced by Sanger method using ABI prism® 3730 Genetic  
150   Analyzer (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA).

151

152       **2.3. Amplification and sequencing of MBL encoding genes**

153   To characterize the *bla<sub>IND</sub>* and *bla<sub>CGB</sub>*, PCRs were carried out using genomic DNA, obtained after  
154   phenol-chloroform extraction, [8]. Two pair of primers that amplify the sequence of *bla<sub>IND</sub>* and  
155   *bla<sub>CGB</sub>* where also used (Table 2). PCR products sequencing was performed with an ABI Prism®  
156   3730 DNA sequencer (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA).

157   To assess IND and CGB phylogenetic relationship, 49 MBL amino acid sequences were  
158   recovered from GenBank database and aligned with the 8 translated sequences acquired during  
159   this study using MUSCLE algorithm implemented in Geneious software. Then alignment was  
160   corrected manually. The final dataset contained 58 amino acids sequences including the sequence  
161   of the uncultured bacterium (AMP55553), which was used as outgroup. Phylogenetic tree was  
162   constructed using the Maximum Likelihood method based on the Le and Gascuel model with a  
163   discrete Gamma distribution [16], after running the ML protein model test implemented in  
164   MEGA 6.06. Best model was chosen according to the best Akaike's Information Criterion (AIC)  
165   and Bayesian Information Criterion (BIC). Statistical analyses of tree topologies were undertaken  
166   by performing bootstrap analysis with 1,000 replicates.

167

168       **2.4. Clonal analysis**

169       Genotyping by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of genomic DNA was performed using  
170       the XbaI restriction enzyme and a CHEF-DRIII apparatus (Bio-Rad Laboratories), as described  
171       previously [15]. Bio-rad CHEF DNA Size Standard (Bio-RAD) was used as the molecular  
172       marker. The interpretation of the results, leading to the creation of the relative dendrogram was  
173       done using the GelComparII Software (GelCompar II; Applied Maths NV, St-Martens-Latem,  
174       Belgium).

175

176       **2.5. Antimicrobial susceptibility testing and Phenotypic detection of MBLs**

177       Antimicrobial susceptibility test was performed by disk diffusion. Minimal inhibition  
178       concentrations (MICs) were evaluated using e-test strips (BioMerieux, France) with  
179       *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 25922 as internal quality  
180       controls. Results were interpreted according to the Comité de l'Antibiogramme de la Société  
181       Française de Microbiologie (CA-SFM) recommendations of 2015.

182       Hydrolysis tests to objective the production of  $\beta$ -lactamase was performed with imipenem  
183       (substrate) and a crude extract of a liquid medium culture of strains by measuring the absorbance  
184       variation with a Cary 100 UV-visible spectrophotometer (Varian, Walnut Creek, CA, USA).  
185       Imipenem hydrolysis activity inhibited (>90%) after incubation with 5mM ethylene-di-amine-  
186       tetra-acetic acid, revealed the presence of MBL.

187       Evidence of metallo- $\beta$ -lactamase producing was done also with double-disc synergy test  
188       (ethylene-di-amine-tetra-acetic acid and imipenem).

189

190

191

### 192 3. Results and discussion

193

194 In this study, we use MALDI-TOF MS method for first identification. Five isolates (4675, 6405,  
195 4493, N-DIOP, 8905) were identified as *C. indologenes*, and one was identified as *C. gleum*  
196 (6515) with acceptable discrimination (99%) (Table1). 16S rRNA was used as gold standard  
197 method to confirm *Chryseobacterium indologenes* species for 2 strains, which were previously  
198 misidentified using MALDI-TOF MS as *Chryseobacterium gleum* (8029, 4924) and for which  
199 identification and MBL are contradictory.

200 No evidence of clonal expansion was observed among *C. indologenes* strains isolated from  
201 Hôpital Aristide Le Dantec of Dakar. Indeed, cluster analysis based on the PFGE pattern of *C.*  
202 *indologenes* isolates demonstrated heterogeneity in genomic sequences (Fig. 1).

203 The antimicrobial susceptibility test showed that the eight strains were resistant to TCC and  
204 ATM. Only one strain (8905) was susceptible to CTX (n=1, 87,5%) (Table 3). Six strains (4675,  
205 6405, 4493, N-DIOP, 8029, 4924) were **resistant to IPM and MEM (minimum**  
206 **inhibitory concentrations, MICs,  $\geq 32\mu\text{g/mL}$ )** (n=6, 75%). The strains 6515 and  
207 8905 were considered to be susceptible to carbapenem, as they have lower MICs for IPM, 4  
208  $\mu\text{g/mL}$  and 2  $\mu\text{g/mL}$  respectively. Our strains seemed to be less resistant than *C. indologenes* 597  
209 from Burkina Faso **as value was two times higher for strain 597 regarding**  
210 **for MIC of IPM ( $\geq 32\mu\text{g/mL}$  versus  $\geq 64\mu\text{g/mL}$ ).** All strains of this study show  
211 susceptibility to ciprofloxacin (100%) and trimethoprim-sulfamethoxazole (100%), according to  
212 the results of the SENTRY antimicrobial surveillance program [16] (Table 3).

213 We were able to amplify and sequence MBL sequences from all of our isolates. The Seven *C.*  
214 *indologenes* isolates were confirmed to carry a *bla<sub>IND</sub>* gene. Three isolates (6405, 8905, 8029)



215 carried *bla*<sub>IND-7</sub>, two (4675, 4493) carried *bla*<sub>IND-14</sub> (Table 1). One strain N-DIOP, harboured  
 216 *bla*<sub>IND</sub> allele shared 96% amino acid identity with *bla*<sub>IND-6</sub> from Burkina Faso [11]. One strain,  
 217 4924 carrying *bla*<sub>IND</sub> allele shared 87 % amino acid identity with *bla*<sub>IND-11</sub>. To date, the  
 218 phylogeny of IND enzymes remains anecdotic in the literature and was restricted to eight  
 219 sequences in [11], certainly due to lack of sequences available at this time. Here, we were able to  
 220 align 46 MBL protein sequences from *Chryseobacterium* spp. deposited on GenBank database  
 221 with 8 sequences from our isolates, 3 sequences from *Empedobacter* spp., and one sequence from  
 222 an uncultured bacterium (AMP55553). All of the *Chryseobacterium* spp. sequences clustered  
 223 together with a well-supported bootstrap value (Fig 2).  
 224 Most of the IND proteins clustered into at least three polyphyletic groups. Six Senegalese  
 225 sequences (IND-6405, IND-8029, IND-8905, IND-4493, IND-4675, IND\_N-DIOP) belonged to  
 226 the first cluster IND subfamily I. This cluster is composed of 23 sequences that include IND-1,  
 227 IND-3, IND-5, IND-6, IND-7, IND-8, IND-9, IND-10, IND-14, and IND-16. Sequences from  
 228 isolates 6405, 8029, and 8905 are 100% identical to IND-7 and 99.5% identical to IND-1  
 229 (ABO21411, WP\_063860620). Sequences from isolates 4493 and 4675 are 100% identical to  
 230 IND-14 (WP\_063860624) and to the sequence of the strain YMC 94/1/3047 (ACZ65151), and  
 231 99.7% identical to IND-3 (WP\_063860626). Eventually, sequence from the isolate N-DIOP  
 232 clustered together with IND-6 (CAJ32373, WP\_063860629) with a significant bootstrap value  
 233 (100%) and an identity of 96.3%. Most of MBL belonging to the subfamily I (IND-1 type  
 234 enzyme) showed high activities for carbapenems regarding to MIC of IPM (IND-1, 32 µg/mL;  
 235 IND-3, 32 µg/mL; IND-5, 32 µg/mL; IND-6, > 64 µg/mL; IND-6405, > 32 µg/mL; IND-8029,  
 236 >32 µg/mL).  
 237 Interestingly, the strain 8905 which carry a sequence that code for an enzyme identical to IND-7  
 238 was susceptible to IPM (MIC= 4 µg/mL) and gave negative result both with double disc synergy

239 and hydrolysis tests. For this result we hypothesize that the enzyme is not produced by the isolate  
 240 8905 because of a mutation occurring in the promoter region. So far, sequences belonging to this  
 241 subfamily were found in Africa, Europe and China **[17, 11]**. The second lineage, the IND  
 242 subfamily II is represented by IND-2 like sequences. It is composed of sequences of IND-2a,  
 243 IND-11, IND-12, IND-13 and IND-15. This family shares a maximum of 80% amino acid  
 244 identity with IND-1 and have a similar broad-spectrum profile regarding to IPM. Unlike the  
 245 subfamily I, no group can be identified due to the high amino acid homology (99%) of all  
 246 members with IND-2. The third lineage, IND subfamily III represented by IND-4, shared 72%  
 247 amino acid identity with IND-1 and produced by *C. indologenes*, which was susceptible to IPM,  
 248 is composed of few enzymes isolated from environmental *Chryseobacterium* species. The last  
 249 lineage is composed by the IND sequence from the isolate 4924, sharing 87% amino-acid identity  
 250 with IND-11 of subfamily II.

251 In this study, one strain identified as *C. gleum* (6515) has a MBL which share 99 % amino-acid  
 252 identity with CGB-1, carrying by *C. gleum* CIP 103039 **[14]**, and 83% amino acid identity with  
 253 IND-1. A phylogenetic analysis of CGB-1 from *C. gleum* and IND variants from *C. indologenes*  
 254 showed that they belong to a same phylogenetic lineage (Fig 2).

255 The active site of IND and CGB type enzyme containing two zinc like metallo- $\beta$ -lactamases  
 256 belonging to Ambler class B, seems to be very conserved except IND-4 for which, one amino-  
 257 acid substitution was located inside the active site (Asp99Ser) (Fig. 3).

258 The six conserved amino acid residues implicated in the  $Zn^{2+}$  or water molecule binding (His96,  
 259 His98, Asp100, His159, Cys168, and His220) **[18]** of metallo- $\beta$ -lactamases was found in the  
 260 CGB-1 sequence (Fig. 4).

261 However, an insertion of three amino acids (Asp, Thr, and Gln) was detected at the second, third  
262 and fourth position of the N-terminal sequence of the mature protein CGB-1 (positions 22, 23,  
263 and 24) compared to IND-like  $\beta$ -Lactamase. The active sites were characterized and are  
264 organized as follow: HSHDD H C H. This sites are also present in all sequences from  
265 subfamily I, II and III. However, the active sites of subfamily IV and CGB-like enzymes, which  
266 are found to be susceptible to IPM, have different configuration; HSHSD H C H and HSHED  
267 H C H, respectively. Comparison of active sites of CGB-1 like enzyme and subfamily IV with  
268 those of subfamily I-II-III, provide evidence that mutations inside active sites may explain a  
269 lower affinity for carbapenems. In fact, the integrity of the Zinc ligand modified by mutations  
270 inside the active site appears to be essential for optimal activity of the MBL [19; 20].  
271 However, a mutation in the active site alone does not explain modification of sensitivity to IPM,  
272 as shown by strain 8905 belonging to subfamily I and susceptible to IPM.  
273  
274

275 **Conclusion**

276 For the first time, a comprehensive study of genetic diversity of 8 MBL amino acid sequences  
277 produced by *Chryseobacterium* strains from Senegal in comparison with 46 MBL sequences  
278 available in GenBank was conducted. Phylogenetic analysis of all these sequences allowed  
279 identifying 4 subfamily of IND like enzyme, one of which is represented by a new variant of IND  
280 enzyme, produced by the strain 4924 of our study. These four main families slightly revised the  
281 four groups proposed by Bellais and coll, confirm if necessary the variability of chromosome-  
282 located class B  $\beta$ -lactamases within *Chryseobacterium* species.

283 The consequences of this genetic diversity in antimicrobial resistance are still unknown in Africa,  
284 especially in hospital settings where hospital hygiene is often lacking. A hospital surveillance of  
285 these IPM-resistant bacteria is necessary for the control of the diffusion of resistance genetic  
286 supports, although no integron has been identified for these bacteria to date. In continuation of  
287 this study, several studies are underway to produce and characterize the enzyme of the new IND  
288 genes variants from strains 4924 and N-DIOP, and to decipher the resistome of *C. indologenes*  
289 strain 8905 susceptible to IPM despite carrying *bla*<sub>IND-7</sub> gene.

290

315     References:

- 316
- 317         [1] Vandamme P, Bernardet JF, Segers P, Kersters K, and B Holmes. New perspectives in the  
318         classification of the flavobacteria: description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen.  
319         nov., and *Empedobacter* nom. rev. *Int. J. Syst Bacteriol* 1994;44:827–831.
- 320         [2] Parte AC. LPSN-List of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids*  
321         *Res* 2014;42:613-6.
- 322         [3] Hsueh PR, Teng LJ, Yang PC, Ho SW, Hsieh WC, Luh KT. Increasing incidence of  
323         nosocomial *Chryseobacterium indologenes* infections in Taiwan. *Eur J Clin Microbiol Infect*  
324         *Dis* 1997;16(8):508–574.
- 325         [4] Omar A, Camara M, Fall S, Ngom-Cisse S, Fall B, Ba-Diallo A, Diop-Ndiaye H, Toure-  
326         kane C, Mboup S, Gaye-Diallo A. *Chryseobacterium indologenes* in a woman with acute  
327         leukemia in Senegal: a case report. *J Med Case Rep* 2014;8:138.
- 328         [5] Arouna O, Deluca F, Camara M, Fall B, Ba-Diallo A, Fall B, Docquier JD, and Mboup S.  
329         *Chryseobacterium gleum* in a man with prostatectomy in Senegal: a case report and Review  
330         of literature. *J Med Case Rep* 2017;11:118-122.
- 331         [6] Lo CI, Sankar SA, Mediannikov O, Ehounoud CB, Labas N, Faye N, Raoult D, Fournier  
332         PE and Fenollar F. High-quality genome sequence and description of *Chryseobacterium*  
333         *senegalense* sp. Nov. *New Microbe and New Infect* 2016;10:93–100.
- 334         [7] Bush, K. Metallo-enzymes: a class a part. *Clin. Infect* 1998;27(1)S48-S53.
- 335         [8] Bellais S, Aubert D, Naas T, and Nordmann P. Molecular and biochemical heterogeneity  
336         of class B carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases in *Chryseobacterium meningosepticum*.  
337         *Antimicrob. Agents Chemother* 2000;44:1878–1886.
- 338         [9] Bellais S, Poirel L, Leotard S, Naas T, Nordmann P. Genetic diversity of carbapenem-  
339         hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamases from *Chryseobacterium (Flavobacterium) indologenes*.  
340         *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:3028–34.
- 341         [10] Perilli MG, Caporale B, Celenza G, Pellegrini C, Docquier JD, Mezzatesta M, Rossolini  
342         GM, Stefani S, and Amicosante G. Identification and Characterization of a New Metallo-  $\beta$  -  
343         Lactamase, IND-5, from a Clinical Isolate of *Chryseobacterium indologenes*. *antimicrobial*  
344         *agents and chemotherapy* 2007;51(8)2988–2990.
- 345         [11] Zeba B, De Luca F, Dubus A, Delmarcelle M, Simpore J, Nacoulma JO,     Rossolini  
346         GM, Frere JM, Docquier JD. IND-6, a highly divergent IND-type metallo-beta-lactamase  
347         from *Chryseobacterium indologenes* strain 597 isolated in Burkina Faso. *Antimicrob Agents*  
348         *Chemother* 2009;(53):4320–4326.
- 349         [12] Wang T, Jiang X, Feng C, Li A, Dong H, Wu S and Zheng B. Whole genome  
350         sequencing uncovers a novel IND- 16 metallo-  $\beta$ - lactamase from an extensively  
351         drug- resistant *Chryseobacterium indologenes* strain J31. *Gut Pathog* 2016;8:47-51.
- 352         [13] Yamaguchi Y, Takashio N, Wachino J, Yamagata Y, Arakawa Y, Matsuda K and  
353         Kurosaki H. Structure of metallo-beta-lactamase IND-7 from a *Chryseobacterium*

354 indologenes clinical isolate at 1.65-Å resolution. J. Biochem. 2010;147(6), 905-915.

355 [14] Bellais S, Naas T, and Nordmann P. Genetic and Biochemical Characterization of CGB-  
356 1, an Ambler Class B Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -lactamases from *Chryseobacterium gleum*.  
357 Antimicrobial agents and chemotherapy 2002;46:2791–2796.

358 [15] Chang YC, Lo HH, Hsieh HY, Chang SM (2014) Identification and epidemiological  
359 relatedness of clinical *Elizabethkingia meningoseptica* isolates from central Taiwan. J  
360 Microbiol Immunol Infect 2014;47(4):318-23.

361 [16] Le SQ, and Gascuel O An improved General Amino Acid Replacement Matrix. Mol  
362 Biol Evol 1993;25(7):1307-1320.

363 [17] Kirby JT, Sader HS, Walsh TR, Jones RN. Antimicrobial susceptibility and  
364 epidemiology of worldwide collection of *Chryseobacterium* spp. Report from the SENTRY  
365 Antimicrobial surveillance Program (1997-2001). J Clin Microbiol 2004;42:445–448.

366 [18] Lin XH, Xu YH, Cheng J, Li T, Wang ZX. Heterogeneity of bla<sub>IND</sub> metallo- $\beta$ -  
367 lactamase-producing *Chryseobacterium indologenes* isolates detected in Hefei, China.  
368 International Journal of Antimicrobial Agents 2008;32:398–400.

369 [19] Galleni M, Lamotte-Brasseur J, Rossolini GM, Spencer J, Dideberg O, and Frère JM.  
370 Standard numbering scheme for class  $\beta$ -lactamases. Antimicrob. Agents Chemother  
371 2001;45:660–663.

372 [20] Seny D, Prosperi-Meys C, Bebrone C, Rossolini GM, Page M., Noël P, Frère JM and  
373 Galleni M (2002) Mutational analysis of the two zinc-binding sites of the *Bacillus cereus*  
374 569/H/9 metallo- $\beta$ -lactamase. Biochem J 2002;363:687-69.

Table

**Table 1**  
**Demographic and clinical characteristics of the eight isolates and their identification criteria by comparison of Vitek 2 and 16S RNA ribosomal sequencing identification completing by MBL gene sequencing**

No	Age/Sex	Hospital/service	Sample	Outcomes	MALDI-TOF MS (Vitek 2)	16S RNA	MBL	Identification
					Results	Score <sup>a</sup> (%)		
4675	M/48	HALD/Cardiologie	Ascite fluid	Died	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	99	ND	IND-14 <i>C. indologenes</i>
6405	M/52	HALD/Urologie	Urine	Cured	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	99	ND	IND-7 <i>C. indologenes</i>
4493	M/62	HFANN/MI	Sputum	Cured	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	99	ND	IND-14 <i>C. indologenes</i>
NDIOP	M/69	Ext/Urologie	Urine	Cured	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	99	ND	96,3% IND-6 variant <i>C. indologenes</i>
	6515	M/68	HALD/Urologie	Urine	Cured	<i>Chryseobacterium gleum</i>	99	ND
8905	M/73	HALD/Cardiologie	Urine	Cured	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	99	<i>C. indologenes</i>	IND-7 <i>C. indologenes</i>
8029	F/47	HALD/Pachon	Urine	Died	<i>Chryseobacterium gleum</i>	49,8	<i>C. indologenes</i>	IND-7 <i>C. indologenes</i>
	4924	M/58	HALD/Urologie	Urine	Died	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	50,1	<i>C. indologenes</i>
Cured					<i>Chryseobacterium gleum</i>	99,2		

<sup>a</sup>: a score > 98% represents a highly probable species identification.

HALD: Hôpital Aristide Le Dantec

HFANN: Hôpital FANN

MI: Maladies infectieuses.

ND: Not Done

**Table**

**Table 2**  
**Polymerase chain reaction (PCR) primers used in analysis of the *bla*<sub>IND</sub> and *bla*<sub>CGB</sub> gene**

Primer	Sequence (5'-3')	Amplicon (bp)	Annealing (°C)
IND/fwd	TGCCCAGGTWAAAGATTTTG	720	48
IND/rev	CCTTTCCATTTCRTCRTGTCC		
CGB1_exp/fw	GGGAATTCCATATGAAAAAAGCATTCCGTTTTTTA	729	49
CGB1_exp/rv	CGCGGATCCTTATTTTTTATTTAAAAAGATCAAG		



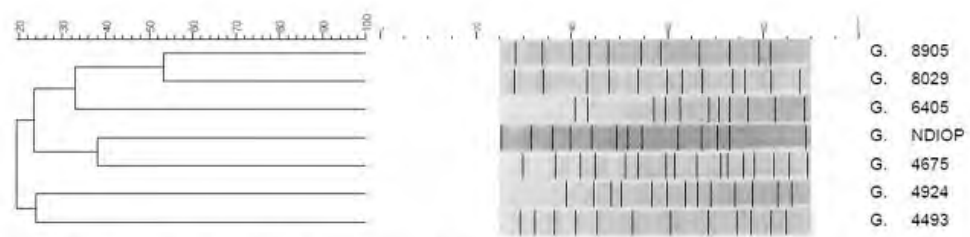
**Table**

**Table 3**  
Minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibiotics for *Chryseobacterium spp* isolates with corresponding metallo- $\beta$ -lactamase (MBL) genes.

No	Strain	MBL	MIC (mg/L)									
			TCC	PIP	CAZ	FEP	CTX	IPM	MEM	ATM	CIP	SXT
4675	<i>C. indologenes</i>	IND-14	>256	2	0.75	1.0	>32	>32	>32	>32	0.75	0.032
6405	<i>C. indologenes</i>	IND-1	256	3	0.75	0.19	>32	>32	32	>32	0.25	0.064
4493	<i>C. indologenes</i>	IND-14	>256	2	1.5	1.0	>32	>32	>32	>32	0.38	0.016
NDIOP	<i>C. indologenes</i>	IND-6 variant	64	2	0.38	0.19	>32	>32	3	>32	0.19	0.047
6515	<i>C. gleum</i>	CGB-1	64	6	0.75	0.125	>32	2	8	>32	0.25	0.094
8905	<i>C. indologenes</i>	IND-1	16	> 0.125	0.50	0.125	2	4	4	16	0.25	0.032
8029	<i>C. indologenes</i>	IND-1	>256	16	4	4	32	>32	32	>32	0.25	0.032
4429	<i>C. indologenes</i>	New variant	256	2	1.0	0.25	>32	>32	>32	>32	0.125	0.047

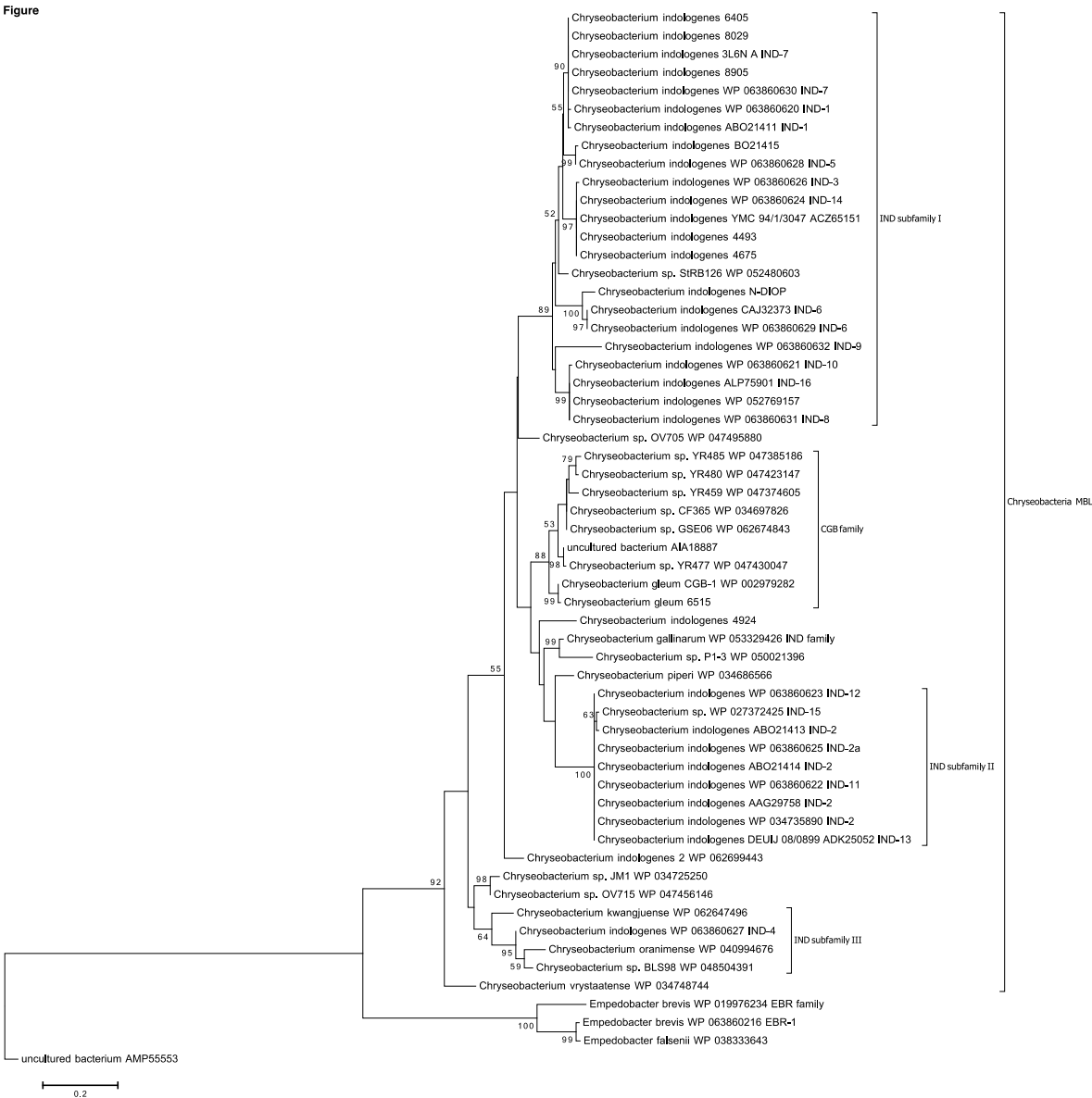
TCC: Ticarcillin + clavulanic acid  
 PIP: Piperacillin  
 CAZ: Ceftazidim  
 FEP: Cefepim  
 CTX: Cefotaxim  
 IPM: Imipenem  
 MEM: Meropenem  
 ATM: Aztreonam  
 CIP: Ciprofloxacin  
 SXT: trimethoprim-sulfamethoxazole

**Figure**



**Fig 1: PFGE dendrogram of 7 *C. indologenes* isolates. Isolates were grouped according to XBaI restriction patterns using GelComparII software.**

Figure



**Auteur: ADAMOU AROUNA Omar.**

---

**Résumé :** Les bactéries du genre *Chryseobacterium* sont des bacilles à Gram négatif, responsables d'infections en milieu hospitalier et caractérisées par une résistance à plusieurs classes d'antibiotiques y compris l'imipénème par l'intermédiaire d'une métallo- $\beta$ -lactamase (MBL) codée par un gène *bla*<sub>IND</sub> (*Chryseobacterium* INDologenes) ou *bla*<sub>CGB</sub> (*Chryseobacterium* Gleum). Ces gènes sont caractérisés par une diversité génétique importante, et à ce jour seize (16) gènes IND nommés par ordre chronologique ont été décrits dont le dernier IND-16 publié en Chine en 2016. Le Monitoring des infections à *Chryseobacterium* mis en place, à partir de l'isolement du 1<sup>er</sup> Cas d'infection à *Chryseobacterium indologenes* au Sénégal, a permis d'isoler Huit (08) autres dont une *Chryseobacterium gleum* représentant le 1<sup>er</sup> Cas publié en Afrique. Les 07 souches de *C. indologenes* hébergent des gènes IND, dont IND-14 (2/7) et IND-7 (3/7). Pour deux souches, les MBLs IND caractérisées sont de nouvelles variantes partageant respectivement 96% et 87% d'acides aminés identiques avec IND-6 (Burkina Faso) et IND-11 (Corée du Sud). La souche de *C. gleum* produit une MBL partageant 99% d'acides aminés identiques avec le CGB-1 (France). L'analyse phylogénétique après alignement des 8 MBLs de notre étude avec les 49 disponibles dans la GenBank a permis de les regrouper en quatre superfamilles I, II, III, IV, avec pour enzyme-types le IND-1, IND-2, IND-4 et notre nouvelle variante IND-4924 respectivement. La possibilité de scinder la superfamille I en 7 groupes, montre si besoin la grande diversité génétique des MBL produites par les bactéries du genre *Chryseobacterium*, dont les conséquences sur la résistance bactérienne sont encore méconnues.

---

**Pathogènes émergents dans les Hôpitaux de Dakar ; *Chryseobacterium* spp : Caractérisation phénotypique et moléculaire.**

---

*Chryseobacterium* species are Gram-negative bacilli that are source of nosocomial infections, carrying an Ambler class B  $\beta$ -lactamase gene *bla*<sub>IND</sub>, for *Chryseobacterium indologenes* and *bla*<sub>CGB</sub> for *Chryseobacterium gleum*. These genes are characterized by a high molecular heterogeneity and to date sixteen genes, *bla*<sub>IND-1</sub> up to *bla*<sub>IND-16</sub> encoding for Metallo- $\beta$ -lactamase (MBL), IND-1 up to IND-16 have been described. Monitoring of *Chryseobacterium* infections, starting from the isolation of the 1st case of *Chryseobacterium* infection in Senegal, allowed us to isolate Eight (08) others of which one *Chryseobacterium gleum* representing the 1st Case published in Africa. Seven strains, identified as *C. indologenes* carried *bla*<sub>IND</sub>-type gene, including *bla*<sub>IND-14</sub> (2/7), and *bla*<sub>IND-7</sub> (3/7) as the major genotype. All The seven isolates were resistant to imipenem instead of the strain 8905, despite carrying the *bla*<sub>IND-7</sub> gene. Metallo- $\beta$ -lactamase (MBL) genes of two isolates, NDIOP and 4924 shared 96% and 87 % amino acid identity with IND-6 and IND-11, respectively and seems to be novel variants. Finally, the strain identified as *C. gleum* produces an Ambler class B  $\beta$ -lactamase, and shares 99 % amino-acid identity with *bla*<sub>CGB-1</sub>. On molecular basis, this study show the existence of at least three lineages of IND enzymes; IND subfamily I, II, III with respectively IND-1, IND-2, IND-4 as IND enzyme type and a fourth lineage, represented by the novel variant IND sequence obtained during this study. Within the subfamily I, seven groups were identified, highlighting the extensive heterogeneity of IND-like enzyme, produced by *Chryseobacterium* species.

**Mots clés :** *Chryseobacterium*, Résistance, IND, CGB, métallo- $\beta$ -lactamase, Imipénème, Diversité génétique.

**Spécialité :** Sciences Pharmaceutiques et Biologiques.