

**Prévalence, diversité, résistome et virulome des souches de *Klebsiella pneumoniae* hypervirulent responsables de bactériémies dans le sud de la France**

Prevalence, diversity, resistome and virulome of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strains responsible for bacteremia in the south of France

**Coordonnées co-encadrants / Laboratoires / Services d'accueil :**

**Encadrant principal :**

NOM: RUIMY

E-mail : [ruimy.r@chu-nice.fr](mailto:ruimy.r@chu-nice.fr)

Unité n°/ service : U1065 C3M Equipe 6 (Dr Boyer L)

Prénom : Raymond

Tel : 0492036214

Pays : France

**Encadrant secondaire :**

NOM: BARON

E-mail : [sophie.baron.2@univ-amu.fr](mailto:sophie.baron.2@univ-amu.fr)

Unité n°/ service : MEPHI, Equipe 5

Prénom : Sophie

Tel : 0491384970

Pays : France

**Résumé du projet :**

Les souches d'un nouveau pathotype de *Klebsiella pneumoniae* (Kp) hypervirulent (HvKp) ont émergé en Asie du Sud-Est fin des années 1980 et sont devenues endémiques dans ces pays. Elles sont responsables d'infections communautaires très variées et disséminent rapidement via une bactériémie. En France, peu d'étude ont été réalisées pour déterminer la prévalence de ces souches. Par ailleurs, le rôle de la réponse de l'immunité innée notamment via les macrophages est très peu exploré. Le projet vise à déterminer la prévalence, la diversité, le virulome et le résistome des souches de HvKp responsables de bactériémie au sein de la région Sud de la France. Les souches des patients ayant une bactériémie à HvKp de 4 hôpitaux (CHU Marseille et Nice et CH de Toulon et Cannes) seront dépistées par PCR multiplex. Les souches seront séquencées par short et long-read. Nous pourrions ainsi connaître la diffusion de ces souches dans notre région, caractériser les patients qui en sont infectés et évaluer le niveau de résistance aux antibiotiques de ces souches. De plus, nous allons pouvoir rechercher si de nouvelles toxines sécrétées sont impliquées dans l'activation des inflammasomes.

*Strains of a new hypervirulent Klebsiella pneumoniae pathotype (HvKp) emerged in Southeast Asia in the late 1980s and have become endemic in these countries. They are responsible for a wide variety of community-acquired infections and spread rapidly via bacteremia. In France, few studies have been conducted to determine the prevalence of these strains. Furthermore, the role of the innate immune response, particularly via macrophages, is very little explored. The project aims to determine the prevalence, diversity, virulome, and resistome of HvKp strains*

*responsible for bacteremia in the southern region of France. Strains from patients with HvKp bacteremia from 4 hospitals (Marseille and Nice University Hospitals and Toulon and Cannes Hospitals) will be screened by multiplex PCR. The strains will be sequenced by short and long read. We will thus be able to understand the spread of these strains in our region, characterize the patients who are infected with them and evaluate the antibiotic resistance rate in these strains. In addition, we will investigate whether new secreted toxins are involved in the activation of inflammasomes.*

## **Description détaillée du projet**

### **1. Introduction et état de l'art :**

*Klebsiella pneumoniae* (Kp) est un pathogène opportuniste fréquemment rencontré en médecine humaine, dont il existe deux pathotypes : Kp classique (cKp) et Kp hypervirulent (hvKp). Le premier pathotype cKp est majoritairement responsable d'infections nosocomiales chez les patients ayant des comorbidités ou immunodéprimés. D'autre part, il est capable de résister à de nombreuses classes d'antibiotiques dont les bêtalactamines par acquisition de gènes encodant les bêtalactamases à spectre élargi (BLSE) et de carbapénémases.

Le pathotype HvKp a émergé en 1986 dans les pays d'Asie du Sud-est et a été considéré comme hypervirulent car responsable d'infections communautaires chez des sujets jeunes non immunodéprimés et sans comorbidités. Il est par ailleurs capable de donner rapidement des infections métastatiques via une bactériémie.

Bien que présentant souvent un phénotype hypermuqueux, il n'existe pas de caractéristiques phénotypiques simples permettant de les différencier des cKp. Il est donc nécessaire de recourir soit à des PCR multiplex ciblant plusieurs gènes de virulence (*iucA*, *iroB*, *peg344*, *rmpA* et *rmpA2*), soit de réaliser un séquençage génomique complet pour les rechercher. En effet, les souches de HvKp possèdent de grands plasmides caractéristiques et/ou des éléments chromosomiques intégrés portant les gènes virulences sus-cités.

Plusieurs études récentes décrivent la présence de bactéries HvKp multirésistantes. Cette convergence entre l'hypervirulence et la multirésistance, notamment aux carbapénèmes, rend la prise en charge de ces patients très compliquée avec un risque d'échec thérapeutique important et une évolution très défavorable pour les patients. Cette observation a d'ailleurs fait l'objet d'une alerte de l'OMS en juillet 2024 sur la nécessité de surveiller l'émergence de ce type de souches dites « convergentes ».

En Europe, plusieurs pays font état d'infections à HvKp avec une grande hétérogénéité concernant les phénotypes de résistances qui varient selon les antibiotiques considérés et les pays étudiés. En France, peu d'étude d'épidémiologie clinique et moléculaire ont été réalisées pour déterminer les souches qui circulent et la prévalence de ces infections. Par ailleurs, le rôle de la réponse de l'immunité innée notamment via les macrophages est très peu exploré. La comparaison de la réponse de l'immunité innée entre les souches cKp et HvKp n'a que peu été investiguées.

### **2. Matériels et méthodes :**

Le projet portera sur deux collections de souches de *K. pneumoniae* : une collection rétrospective de souches de *K. pneumoniae* isolées d'hémoculture et/ ou d'abcès hépatique aux CHU de Nice et de Marseille et une collection de souches recueillie dans le cadre d'une étude prospective, observationnelle et multicentrique sur une période d'un an. Les données cliniques des patients ayant une bactériémie à HvKp seront récupérées et anonymisées après avoir obtenu un avis favorable auprès d'un CPP.

Le criblage des souches de Kp isolées d'hémocultures de patients hospitalisés (1/patient) dans les 4 sites hospitaliers participants (Marseille, Cannes, Toulon et Nice) sera réalisé par PCR multiplex pour identifier les souches d'intérêt (N=604 en 2024). Les gènes cibles utilisés, *peg344*, *rmpA* et *entB* (contrôle interne d'extraction Kp) présentent une sensibilité d'environ 97% pour la détection de HvKp.

Les souches d'HvKp identifiées par criblage seront séquencées en short et long-read pour obtenir une reconstitution la plus complète et fidèle des génomes et des plasmides. Les analyses de la diversité, du virulome et du résistome des génomes seront réalisées.

Enfin la réponse de l'immunité innée mise en place lors des infections à HvKp par rapport à celles à cKp sera explorée sur des modèles cellulaires et un modèle de bactériémie chez la souris, développé au sein de l'équipe 6 dirigée par le Dr L. Boyer (C3M). Les mécanismes d'activation des inflammasomes, responsables de la maturation de l'IL-1 bêta, seront particulièrement explorés en utilisant des modèles de souris KO pour les différents constituants des inflammasomes. L'implication de la pyroptose, une mort cellulaire contrôlée par les inflammasomes, sera également étudiée en analysant le clivage de la Gasdermine dans les cellules immunitaires et chez la souris KO pour la Gasdermine D.

### 3. Objectifs primaires et secondaires :

#### **Objectif primaire :**

Déterminer la prévalence, la diversité, le virulome et le résistome des souches de HvKp responsables de bactériémie au sein de la région Sud de la France

#### **Objectifs secondaires :**

- 1- Constituer un réseau de surveillance structuré de la région Sud de la France pour suivre l'évolution de l'émergence de ce type de souches conformément à l'alerte de l'OMS.
- 2- Réaliser une étude d'épidémiologie clinique pour déterminer les caractéristiques cliniques de ces patients ayant une bactériémie à HvKp : caractéristiques des patients, comorbidité (score de Charlson), sepsis ou choc septique (score de SOFA ou quick SOFA), motif hospitalisation, caractère nosocomiale ou communautaire, gravité, évolution clinique...
- 3- Détecter et caractériser les souches HvKp multirésistantes aux antibiotiques voire XDR en déterminant le support génomique de ces résistances
- 4- Rechercher des toxines sécrétées par les HvKp ayant un rôle dans l'inflammasome et tester sur un modèle de bactériémies chez la souris
- 5- Utiliser ces résultats pour déposer une demande à un PHRC Inter-régional ou National

### 4. Résultats envisagés :

D'un point **de vue épidémiologique**, nous allons pouvoir : (i) déterminer la prévalence des souches de HvKp responsables de bactériémies chez les patients hospitalisés dans 4 hôpitaux de la Région Sud de la France et en apprécier l'impact en terme de gravité et d'évolution clinique des patients, (ii) répondre à des questions épidémiologiques sur l'acquisition de ces souches (iii) apprécier la circulation de ces souches dans le temps (sur une période d'1 an) et dans l'espace, (iv) étudier les variations saisonnières.

**Concernant la résistance aux antibiotiques**, nous allons pouvoir connaître la part des souches convergentes (hypervirulentes et multirésistantes) parmi les hvKp isolées dans la région, évaluer leur diffusion dans la région sud et caractériser les supports génétiques de la résistance à plusieurs classes d'antibiotiques.

**A propos des toxines sécrétées**, nous allons pouvoir détecter des toxines inconnues ou peu étudiées qui ont un rôle dans l'inflammasome grâce aux compétences et aux outils moléculaires, cellulaires et aux modèles animaux développés au sein de l'équipe U1065 du C3M équipe 6 de Nice.