

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Génétique Moléculaire*

Intitulé :

Etude bactériologique et résistance aux antibiotiques de *Klebsiella pneumoniae*

Présenté et soutenu par : NOURI Manel

Le : 01/07/2015

ZIADI CHIBANE Fatma

Jury d'évaluation :

Président du jury : SATTA. D (Professeur - Université Constantine I).

Rapporteur : BENTCHOUALA. C (Professeur - CHU Constantine).

Examineur : MEHASNI. S (Grade- Université Constantine I).

Année universitaire
2014 - 2015

REMERCIEMENTS

*Nous voudrions présenter nos remerciements et notre gratitude en premier lieu au chef de service du laboratoire de Microbiologie de l'hôpital du CHU de Constantine **Monsieur Benlabed.K** pour son acceptation afin de réaliser ce travail.*

*Nous tenons particulièrement à remercier notre promotrice et directrice de **Mémoire Madame « Bentchouala Chafia » Pr en microbiologie***

pour avoir accepté la charge d'être rapporteur de ce mémoire, nous la remercions pour sa disponibilité, ses pertinents conseils et pour les efforts qu'elle a consenti durant la réalisation de ce mémoire. Ce travail témoigne de sa confiance et de son soutien dans les moments les plus difficiles. Qu'elle trouve ici l'expression de notre reconnaissance et de notre respect.

nous remercions également :

***Madame Dr. Satta Dalila** Professeur-Université de Constantine I, pour l'honneur qu'elle nous a fait en présidant le jury. Qu'elle trouve ici l'expression de notre profond respect.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à **Mme. Mehasni Samiha** pour avoir accepté d'examiner ce travail et de l'attribuer des remarques et des corrections très intéressantes, et c'est un honneur pour nous qu'elle juge ce travail.*

*Nous aimerons également exprimer notre gratitude à tous nos professeurs de graduation et de post-graduation de l'université de Constantine I, un grand merci pour vos **enseignements de génétique** que dieu vous bénisse et vous donne la santé.*

*Un merci particulier à **Mme. Mehasni Samiha** pour son aide.*

Nous remercier également tout le personnel de laboratoire de microbiologie du CHU de Constantine pour leur accueil et leur contribution dans ce travail.

Merci

À ceux et celles qui nous ont aidé d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin dans notre travail, nous les remercions du fond du cœur.

Merci à tous.....



Dédicaces



Je dédie cet humble travail à... ✍

♥ *A ma très chère mère YAMINA* ♥

*qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien,
tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils,
pour toute son assistance et sa présence dans ma vie,
reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il,
l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.*

*Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et
t'accorder santé, longue vie et bonheur.*

♥ *A mon très cher père MOHAMED* ♥

*qui peut être fier et trouver ici le résultat
de longues années de sacrifices et de privations
pour m'aider à avancer dans la vie.*

*Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien
permanent venu de toi.*

*Dieu tout puissant te garde et te procure santé,
bonheur et longue vie.*

♥ *A ma chère grand-mère SAIDA* ♥

Je te dédie ce travail avec tous mes voeux de bonheur et de santé.

♥ *A mes très chers frères* ♥

NOUREDINNE AMMAR ABDELHAKIM

*Sont présent dans tous mes moments d'examens
par son soutien moral et ses belles surprises sucrées.
Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de
réussite et de sérénité.*

Je t'exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour.

♥ *À mes très chères sœurs* ♥

TELIDJA SOUMIA FATIHA

*En témoignage de l'attachement,
de l'amour et de l'affection que je porte pour toi.
Que Je te dédicace travail avec tous mes voeux de bonheur et de santé.*

♥ *À toute ma famille: oncles, tantes, cousins et cousines* ♥

*À toute la famille ZIADI CHIBANE et la famille KHEMISSI
petits et grands*

♥ *À mes chères ami(e)s* ♥

♥ *À mes chers collègues* ♥

*qui m'ont aidé durant toute ma vie estudiantine,
et à ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.*

Fatma

Sommaire

Introduction.....	1
-------------------	---

Synthèse Bibliographique

1. Généralités sur <i>Klebsiella pneumoniae</i>	2
1.1. position taxonomique.....	2
1.1.1. Dénomination.....	2
1.1.2. Classification.....	2
1.2. Caractères bactériologiques.....	2
1.2.1. Caractères morphologiques.....	2
1.2.2. Caractères cultureux.....	2
1.2.3. Caractères biochimiques.....	3
1.2.4. Caractères antigéniques.....	4
1.3. Habitat.....	4
1.4. Génétique.....	5
1.5. Pouvoir pathogène.....	5
1.6. Facteurs de pathogénicité.....	6
1.6.1. Antigènes de surface.....	7
1.6.2. Adhésines.....	7
1.6.3. Sidérophores.....	8
1.6.4. Ilot de pathogénicité.....	8
1.6.5. Pili (<i>fimbriae</i>).....	8
2. Les antibiotiques.....	9
2.1. Définition.....	9
2.2. Classification.....	9
2.3. Mode d'action.....	9
2.4. Les différentes familles d'antibiotiques.....	10
2.4.1. Les β -lactamines.....	10
2.4.1.1. Définition.....	10
2.4.1.2. Structure et classification.....	10

2.4.1.2.1. Les pénicillines.....	11
2.4.1.2.2. Les carbapénèmes.....	12
2.4.1.2.3. Les céphalosporines.....	12
2.4.1.2.4. Les monobactames.....	13
2.4.1.3. Mode d'action des β -lactamines.....	13
2.4.2. Les aminosides.....	13
2.4.2.1. Définition.....	13
2.4.2.2. Classification.....	13
2.4.2.3. Mode d'action.....	14
2.4.3. Les quinolones.....	14
2.4.3.1. Définition.....	14
2.4.3.2. Mode d'action.....	15
3. Résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux antibiotiques.....	15
3.1. Notion de la résistance bactérienne.....	15
3.2. Types de résistance aux antibiotiques.....	16
3.2.1. Résistance naturelle.....	16
3.2.2. Résistance acquise.....	16
3.3. Bêta-lactamines et <i>K. pneumoniae</i>	17
3.3.1. Mécanismes de résistance.....	17
3.3.1.1. Enzymatique.....	17
3.3.1.1.1. Pénicillinase.....	17
3.3.1.1.2. Céphalosporinase de haut niveau.....	17
3.3.1.1.3. Carbapénémases.....	17
3.3.1.1.4. β -lactamase à spectre élargi.....	18
3.3.1.2. Non enzymatique.....	19
3.3.1.2.1. Diminution de la perméabilité.....	19
3.3.1.2.2. Excrétion par des systèmes d'efflux.....	19
3.3.1.2.3. Modification de la cible.....	20
3.4. Aminosides et <i>K. pneumoniae</i>	20
3.4.1. Mécanismes de résistance.....	20
3.4.1.1. Altération de la cible.....	20
3.4.1.2. Modification enzymatique de l'antibiotique.....	21
3.4.1.3. Piégeage de l'antibiotique.....	22

3.4.1.4. Imperméabilité ou exportation de l'antibiotique.....	22
3.5. Quinolones et <i>K. pneumoniae</i>	22
3.5.1. Mécanismes de résistance.....	23

Matériels et Méthodes

1. Lieu et durée de l'étude.....	24
2. Matériels.....	24
2.1. Souches étudiées.....	24
2.2. Matériels utilisés.....	24
2.3. Milieux de culture.....	24
2.3.1. Milieux de culture solides.....	24
2.3.2. Milieux d'identification biochimiques et métaboliques.....	24
2.4. Antibiotiques.....	25
3. Méthodes.....	25
3.1. Prélèvements.....	25
3.2. Ensemencement.....	25
3.3. Isolement et purification.....	25
3.4. Techniques utilisées pour l'identification des bactéries.....	25
3.4.1. Tests préliminaires.....	25
3.4.1.1. Examen macroscopique.....	25
3.4.1.2. Examen microscopique.....	26
3.4.2. Galeries classiques.....	26
3.4.3. Galeries API 20 ^E	29
3.5. Antibiogramme.....	29
3.6. Tests complémentaires.....	30
3.6.1. Tests de détection de carbapénèmase.....	30
3.6.1.1. Test de Hodge.....	30
3.6.2. Tests de détection de BLSE.....	31
3.6.2.1. Test de synergie.....	31
3.6.2.2. Test du double disque.....	31
3.6.2.3. Test à la cloxacilline.....	32

Résultats et Discussion

1. Prélèvements.....	34
1.1. Distribution des souches <i>K. pneumoniae</i> selon l'origine du prélèvement	34
1.2. Distribution des souches de <i>K. pneumoniae</i> dans les différents produits pathologiques.....	34
1.3. Distribution globale selon le sexe	35
2. Identification des souches.....	36
2.1. Galeries classiques.....	36
2.2. Galeries API 20 ^E	37
3. Résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux antibiotiques.....	37
3.1. β -lactamines.....	38
3.2. Aminosides	39
3.3. Quinolones	39
3.4. Autres.....	39
4. Phénotypes de résistance.....	40
4.1. Phénotypes de résistance aux β -lactamines	40
4.2. Phénotypes de résistance aux aminosides.....	41
4.3. Phénotypes de résistance aux quinolones	42
Conclusion.....	44
Références bibliographiques.....	45
Résumé	
Annexe	

Liste des abréviations

ADH: Arginine dihydrolase

AMC: Amoxicilline + acide clavulanique.

AMX: Amoxicilline

Ak: Amikacine

API20^E: Analytical profile index 20^E (E= Entérobacéries)

ATB: Antibiotique

ATCC: American Type Culture Collection

ATM: Aztréonam

BLSE: Bêta- lactamase à spectre Elargi ou Etendu

BMR : Bactéries multi résistantes

C: Chloramphenicol

C+G%: Pourcentage en guanine + cytosine du génome (anciennement coefficient de Chagaff)

C1G: Céphalosporine de 1^{ère} génération

C2G: Céphalosporine de 2^{ème} génération

C3G: Céphalosporine de 3^{ème} génération

C4G: Céphalosporine de 4^{ème} génération

CAZ: Céftazidime

CHN: Céphalosporinase de haut niveau

CHUC: Centre hospitalo-universitaire de Constantine

CIP: Ciprofloxacine

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CS: Colistine

CTX: Céfoxitime

EMB: Eosine bleu de méthylène

FEP: céfepime

FOX: Céfoxitime

FQ: Fluoroquinolones

GEL: Gélatine

G: Gentamicine

H: heure

H₂O₂ : Eau oxygénée

H₂S: Sulfure d'hydrogène
I: Intermédiaire
IMP: Imipénèm
IND: Indole
INO: Inositol
IPP: Institut Pasteur de Paris
IU: Infection Urinaire
K: Antigène capsulaire
Kb: kilo bases
KES: *Klebsiella- Enterobacter- Serratia*
KPC : *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase
K.p: *Klebsiella pneumoniae*
LART: L'Antibio-Résistance en Tunisie
LCR: Liquide céphalorachidien
LDC: Lysine décarboxylase
LPS: lipopolysaccharide
NA: Acide nalidixique
NHSN: National Healthcare Safety Network
O: Antigène capsulaire
ODC: Ornithine
OMS: Organisation Mondiale de Santé
ONPG: Orthonitrophényl-β-D-galactopyranoside
PBN: Pénicillinase de bas niveau
PHN: Pénicillinase de haut niveau
PLP: Protéine liant les pénicillines
R: Résistance
RM: Rouge de Méthyle
S: Sensible
SHV: SulfHydrylVariable
Sub sp: sous espèce
SXT: Sulfamethoxazole + Trimétoprim
TDA: Tryptophane désaminase
TEM: D'après Temoniera : nom du malade chez qui la première souche a été isolée
TIC: Ticarciline

TSI: Triple Sucre à Identifié

USI: Unités de soins intensifs

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VP: Vosges-proskauer

Liste des figures

Figure 1 : Aspect des colonies de <i>K pneumoniae</i> sur milieu gélosé (13).....	3
Figure 2 : Représentation schématique des facteurs de pathogénicité de <i>K. pneumoniae</i> (21).....	9
Figure 3 : Mécanisme d'action des antibiotiques (33).....	10
Figure 4 : Cycle β -lactame (35).....	11
Figure 5 : Structure des différentes classes de β -lactamines (31).....	11
Figure 6 : Activité antibactérienne des Quinolones (31).....	14
Figure 7 : Mécanisme d'action des Quinolones (42).....	15
Figure 8 : Site-A : la région qui porte les ARNr16S méthyltransférase (59).....	21
Figure 9 : Les enzymes modificatrices des aminosides (46).....	22
Figure 10 : Galerie biochimique de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (Témoin).....	27
Figure 11 : Galerie API20 E.....	29
Figure 12 : Antibiogramme de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	30
Figure 13 : Test de Hodge.....	30
Figure 14 : Test du double disque pour la détection des BLSE.....	32
Figure 15 : Test à la cloxacilline.....	33
Figure 16 : Répartition des souches <i>K. pneumoniae</i> selon l'origine du prélèvement.....	34
Figure 17 : Répartition de <i>K. pneumoniae</i> parmi les prélèvements cliniques.....	35
Figure 18 : Distribution globale des souches de <i>K. pneumoniae</i> selon le sexe.....	36
Figure 19 : Résultats de galerie biochimique de <i>K. pneumoniae</i>	37
Figure 20 : Résultats de l'identification d'une souche de <i>K.p</i> par galerie API 20E.....	37
Figure 21 : Résultats d'antibiogramme d'une souche <i>Klebsiella pneumoniae</i>	37
Figure 22 : Taux de résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux β -lactamines.....	38
Figure 23 : Taux de résistance de <i>K.p</i> aux d'autres classes d'antibiotiques.....	40
Figure 24 : Représentation graphique des phénotypes de résistance de <i>K.p</i> aux β -lactamines.....	41
Figure 25 : Représentation graphique des phénotypes de résistance de <i>K.p</i> aux Aminosite.....	42
Figure 26 : Représentation graphique des phénotypes de résistance de <i>K.p</i> aux Quinolones.....	43

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractères biochimiques de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (12).....	4
Tableau 2 : Indentification biochimique à l'aide de la galerie classique.....	28
Tableau 3: Distribution des souches <i>K. pneumoniae</i> selon l'origine du prélèvement.....	34
Tableau 4 : Répartition des souches de <i>K. pneumoniae</i> parmi les prélèvements cliniques.....	35
Tableau 5 : Distribution globale des souches de <i>K. pneumoniae</i> selon le sexe.....	36
Tableau 6 : Répartition des principaux phénotypes de résistance aux β -lactamines.....	40
Tableau 7 : Répartition des principaux phénotypes de résistance aux Aminosides.....	41
Tableau 8 : Répartition des principaux phénotypes de résistance aux quinolones.....	42

Introduction

L'infection microbienne occupe actuellement la première place dans les pathologies médicales. Elle est connue depuis longtemps, et depuis l'utilisation des antibiotiques, elle a progressivement changé de visage et les cliniciens ont été confrontés à des infections à germes autrefois réputés non pathogènes ou saprophytes. Un des exemples le plus frappant pour illustrer ce propos est *Klebsiella pneumoniae* (1).

Klebsiella pneumoniae est un pathogène opportuniste fréquemment impliqué dans des infections sévères notamment des infections urinaires (IU), des pneumonies et des bactériémies (2). Elle est responsable de plus de 10% des infections nosocomiales (3). Elle est impliquée surtout dans les unités de soins intensifs (USI) (4).

De nombreuses épidémies nosocomiales causées par cette bactérie ont été décrites, notamment chez les personnes ayant un système immunitaire affaibli, comme les diabétiques et les alcooliques. Elle peut se propager rapidement entre les patients hospitalisés surtout dans des unités de soins intensifs adultes ou pédiatriques (5).

Les *Klebsiella* sont des bactéries très répandues dans la nature (l'eau, le sol, les végétaux, la flore fécale des animaux), sur la peau, les muqueuses et surtout les voies respiratoires supérieures de l'homme provoquant ainsi des pneumonies mortelles c'est pourquoi Friedlander les a appelé pneumobacilles (6).

Elle résiste à la majorité des antibiotiques utilisés et rend ainsi difficile le traitement. Ceci pose un problème de santé publique car la population touchée est fragile (cancéreux, cirrhotiques, diabétiques, vieillards et nourrissons), surtout avec la problématique du VIH. L'augmentation à l'échelle mondiale de la résistance aux antibiotiques médiée par cette bactérie constitue une menace importante pour la santé publique. Au niveau national, et selon le réseau de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques (AARN, 2011), sur 5922 bactéries multi résistantes (toutes espèces confondues) isolées en milieu hospitalier, 57% des souches de *Klebsiella pneumoniae* sont résistantes aux β -lactamines par production de β -lactamases à spectre élargi (7).

C'est dans ce contexte général que nous avons été amenés à entreprendre ce présent travail qui a pour objectifs:

- L'isolement et l'identification des souches de *Klebsiella pneumoniae* au niveau de service de microbiologie du CHUC;
- L'étude du profil de résistance de *Klebsiella pneumoniae*;
- Détermination des phénotypes de résistance aux antibiotiques.

Synthèse

Bibliographique

1. Généralités sur *Klebsiella pneumoniae*

1.1. position taxonomique

1.1.1. Dénomination

Le genre *Klebsiella* a été nommé par Trevisan en 1887 pour honorer Klebs Edwin, un microbiologiste Allemand du 19^{ème} siècle. L'espèce type est *Klebsiella pneumoniae*, connue autre fois sous le nom de pneumobacille de Friedlander. Ce dernier avait décrit cette bactérie dans les poumons d'un patient décédé d'une pneumonie (8).

1.1.2. Classification

Règne : Bactéria

Embranchement : Protéobactéria

Classe : Gamma Proteobacteria

Ordre : Enterobacteriales

Famille : Enterobacteriaceae

Genre : *Klebsiella*

Espèce : *Klebsiella pneumoniae*

Le genre *Klebsiella* (*Klebsielles*) comporte cinq espèces dont l'espèce type est *K.p* (9).

L'espèce *K.p* est subdivisée en 3 sous espèces : *K. pneumoniae* subsp *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp *ozaenae* et *K. pneumoniae* subsp *Rhinoscleromatis* (10).

1.2. Caractères bactériologiques

1.2.1. Caractères morphologiques

Les bactéries appartenant à l'espèce *Klebsiella pneumoniae* sont des bacilles à Gram négatif, immobiles, diplobacilles généralement capsulées, non sporulées, anaérobies facultatifs (11).

1.2.2. Caractères culturels

K. pneumoniae se développe en aéro-anaérobiose. Sur les milieux classiques d'isolement pour entérobactérie (Drigalski, Hektoen, Mac Conkey, EMB) après une incubation de 18 à 24 h à 30 ou à 37 °C, les colonies sont d'un diamètre de 3 à 4 mm, ronde, lisses, lactose positives, bombées, brillantes, muqueuses, parfois filantes à l'anse de platine (Figure 1) (12,8).

En milieu liquide (bouillon nutritif, eau peptonée), la culture est rapide (quelques heures) à 30° et 37 °C pour *K. p* avec parfois dépôt muqueux et collerette visqueuse en surface. A la différence des autres espèces de *Klebsiella*, plus de 90% des souches de *K. pneumoniae* croissent

à 44 °C en bouillon lactose bilié vert brillant et plus de 80% en fermentant le lactose avec production de gaz (12).

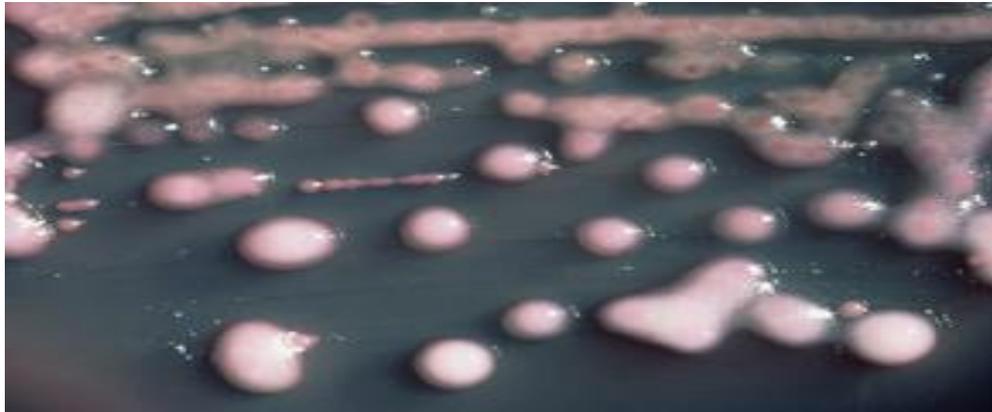


Figure 1 : Aspect des colonies de *K. pneumoniae* sur milieu gélosé (13).

1.2.3. Caractères biochimiques

K. pneumoniae présente les caractères généraux des entérobactéries : c'est une bactérie aéro-anaérobie facultative, fermentant le glucose avec production de gaz, oxydase négative, catalase positive, possède une nitrate-réductase.

K. pneumoniae est : VP⁺, LDC⁺, ODC⁻, IND⁻, Citrate⁺, Urée⁺, ONPG⁺, H₂S⁻, TDA⁻, réduction des nitrates en nitrites (NO₃⁺). Les caractères biochimiques sont illustrés dans le tableau 1.

Tableau 1: Caractères biochimiques de *Klebsiella pneumoniae* (12).

Caractères biochimiques	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
ONPG, KCN	+
H ₂ S, désaminase, IND	-
VP	+
RM	-
Uréase	+, ₋
Citrate de Simmons	+
LDC	+
ODC	-
ADH	-
Rhamnose	+
Arabinose	+
Raffinose	+
Gélatinase	-
Lipase, DNase	-

1.2.4. Caractères antigéniques

K. pneumoniae possède des antigènes communs avec ceux portés par les autres entérobactéries excepté l'antigène flagellaire du fait de son immobilité :

- Antigènes « O » somatiques : la recherche des antigènes « O » présente peu d'intérêt pratique, en raison de la difficulté de leur détermination par suite du caractère thermostable des antigènes capsulaires
- Antigènes « K » capsulaires : au moi 77 antigènes K ont été décrites chez *K. pneumoniae*, K1 à K72, K74, K79 à K82. Les souches les plus souvent pathogènes pour l'homme et les animaux appartiennent aux types capsulaires 1 et 2, plus rarement 3 et 4.
- Antigène d'adhérence : appelé fimbriae, de nature protéique, porté par des pili communs (12,8).

1.3. Habitat

K. pneumoniae est une espèce ubiquitaire, et fréquemment isolée dans l'environnement à partir d'échantillons de sol, d'eaux de surface, d'eaux usées, de végétaux, et de muqueuses des mammifères, en particulier de la flore fécale. Chez l'homme, cette espèce végète sur la peau, les muqueuses, les voies respiratoires supérieures et elle est isolée des selles chez 30 % des

individus. Pour ce qui est des infections nosocomiales, le tube digestif des patients hospitalisés et les mains du personnel sont les deux sources principales. Les deux sous-espèces *K. pneumoniae subsp. ozaenae* et *K. pneumoniae subsp. rhinoscleromatis* n'ont été isolées qu'en situation pathogène de l'arbre respiratoire de l'homme (14).

1.4. Génétique

K. pneumoniae se compose de sept réplicons circulaires, y compris un chromosome (ADN bicaténaire) et six plasmides.

Le chromosome (5332752 pb, 57,5% teneur en G + C) code pour 5316 protéines putatives et réalise 87 ARNt, 1 ARNm, et 8 copies de 16S-23S-5S ARNr (15).

Six plasmides se produisent naturellement dans la souche K.P: pKPHS1 (122 799 pb, 49,5% teneur en G + C), pKPHS2 (111 195 pb, 53,3% teneur en G + C), pKPHS3 (105 974 pb, 52,5% teneur en G + C), pKPHS4 (3751 pb, 52,2% G + C contenu), pKPHS5 (3353 pb, 42,8% G + C contenu), et pKPHS6 (1308 pb, 47,9% teneur en G + C). Codes pKPHS1 pour un spectre étendu de bêta-lactamase CTX-M-14. Pkphs2 porte le *bla*_{TEM-1} et le *bla* du gène carbapénème KPC-2 et a une épine dorsale similaire avec le récemment rapporté *K. pneumoniae* plasmide pKP048 (16). PKPHS3 possède 13 déterminants de résistance importants, tels que *tetG*, *chat*, *sull*, *dfra12*, *aac (3) -Ia* et *aph*, et est le plus semblable à un plasmide *Yersinia pestis*, pIP1202 (17). Remarquablement, les gènes de transfert de conjugaison tels que *tra* dans pKPHS2 et pKPHS3 peuvent conduire à la propagation de la multirésistance entre les différents genres. Les trois petits plasmides codent pKPHS4, pKPHS5 et pKPHS6 pour les protéines inconnues. A notre connaissance, la 1-kb pKPHS6 est la plus petite *K. pneumoniae* plasmide jamais identifié.

Certaines souches de *Klebsiella pneumoniae* et *Klebsiella oxytoca* hébergent des plasmides qui possèdent des gènes (*nif*) qui leur permettent de fixer l'azote atmosphérique. Ces plasmides peuvent être transférés à *Escherichia coli* K12 (18).

1.5. Pouvoir pathogène

Klebsiella pneumoniae est un agent classique et majeur d'infections nosocomiales chez l'enfant soit de 19,6% en Chine et de 22,7% d'infections nosocomiales en service de néonatalogie et de réanimation pédiatrique en général et néonatales particulièrement en Europe (4).

Elle est l'une des principales espèces bactériennes impliquées dans les IU soit de 6 à 17% d'infection (19). Selon le NHSN, *K. pneumoniae* est responsable de 7,9 % de l'ensemble des infections urinaires aux Etats-Unis, classée ainsi en cinquième position parmi tous les agents pathogènes incriminés. Cependant, en Tunisie, d'après le réseau de l'Anti bio-Résistance en

Tunisie (LART), *K. pneumoniae* est essentiellement isolée d'infections urinaires en milieu hospitalier avec un taux de 60,4% (20).

K. pneumoniae fait partie du groupe KES qui est d'une grande importance en clinique hospitalière (21).

K. pneumoniae subsp. pneumoniae est surtout actuellement un agent d'infections nosocomiales, responsable d'infections urinaires sur sonde, de bactériémies de pneumonies, d'infections de sites opératoires et d'infections néonatales (22).

K. pneumoniae subsp. ozaenae est responsable d'une rhinite chronique atrophique décrite sous le nom d'ozène. Cette infection se manifeste par une ulcération chronique de la muqueuse nasale pouvant aboutir à une perforation du cartilage nasal, accompagnée de décharges nasales purulentes (21).

K. pneumoniae subsp. ozaenae a été également isolée à partir de surinfections de bronchite chronique, de bactériémies, de méningites, d'abcès cérébraux, d'otites, de mastoïdites, d'infections urinaires, de surinfections de plaies et d'ulcères de la cornée.

K. pneumoniae subsp. rhinoscleromatis est responsable du rhinosclérome, infection granulomateuse chronique des voies aériennes supérieures, dont quelques cas ont été rapportés chez des patients infectés par le VIH. Un cas de septicémie a été rapporté (23).

K. pneumoniae occupe une place importante dans la pathologie infectieuse du nouveau-né. En effet, les infections nosocomiales à *K. pneumoniae* dans les services de néonatalogie sont fréquentes, notamment dans les unités de soins intensifs et chez les prématurés (24).

Enfin, depuis les années 1980, *K. pneumoniae* a émergé comme agent d'abcès hépatiques primitifs survenant dans la communauté chez des patients sans antécédents de pathologie hépatobiliaire. Ce syndrome, associé à une bactériémie et éventuellement des complications métastatiques (endophtalmie, méningite ...), a été essentiellement décrit en Asie. Plus récemment, des cas ont été rapportés en Amérique du Nord et en Europe souvent chez patients d'origine asiatique, suggérant une susceptibilité génétique à cette infection. Dans la majorité des cas, les souches à l'origine de ce syndrome appartiennent au sérotype capsulaire K1 et au complexe clonal ST23 (25).

1.6. Facteurs de pathogénicité de *K. pneumoniae*

Les termes facteurs de pathogénicité et facteurs de virulence sont souvent utilisés comme synonymes. Mais certains auteurs font une distinction claire entre les deux : le terme

pathogénicité définit la capacité de la bactérie à causer une maladie alors que la virulence est la mesure ou le degré de pathogénicité (21).

1.6.1. Antigènes de surface

Deux types d'antigènes sont exprimés à la surface de *K. pneumoniae*. Ces deux antigènes contribuent à la pathogénie de cette bactérie. Le premier est l'antigène "O" qui est le composant du lipopolysaccharide et dont 9 types ont été identifiés. Le second est l'antigène capsulaire (K), un polysaccharide capsulaire dont 82 ont été décrits et 77 caractérisés.

1.6.1.1. Le lipopolysaccharide

Le LPS, est formé de plusieurs composés : le lipide A de structure oligosaccharidique, et l'antigène "O". L'antigène "O", composé le plus externe du LPS, est formé d'unités répétées de polymères d'oligosaccharides. Le lipide A correspond à l'endotoxine des bactéries à Gram négatif et participe au pouvoir pathogène. Sa libération massive dans la circulation au cours des bactériémies conduit au choc endotoxinique. Le rôle principal du LPS *in vivo* est de protéger *K. pneumoniae* du pouvoir bactéricide du sérum (26).

1.6.1.2. La capsule

La majorité des souches de *K. pneumoniae* produit une capsule de nature polysaccharidique, elle donne aux colonies sur gélose une apparence plus ou moins muqueuse caractéristique et apparaissant à la coloration de Gram, sous la forme d'un halo clair. Sur les 82 antigènes capsulaires, 77 constituent une base de reconnaissance internationale. La capsule est essentielle à la virulence des Klebsielles. Elle forme d'épais faisceaux de structure fibrillaire couvrant la surface bactérienne en couche épaisse et dense qui protège la bactérie de la phagocytose par les polynucléaires neutrophiles, d'une part de l'effet bactéricide de facteurs sériques d'autre part. Les souches exprimant les antigènes capsulaires K1 et K2 sont particulièrement virulentes dans un modèle murin de péritonite comparées à d'autres sérotypes qui sont peu ou pas virulents. En pathologie humaine, même si les données sont parcellaires, les souches de sérotype K1 et K2, sont actuellement, considérées comme les plus virulentes (27).

1.6.2. Adhésines

Différentes adhésines ont été mises en évidence chez *K. pneumoniae*. Ces molécules jouent un rôle essentiel dans la première étape du processus infectieux. Les propriétés d'adhésion des entérobactéries sont généralement médiées par différents types de pili ou fimbriae. Ce sont des structures protéiques non flagellaires et filamenteuses formant des appendices à la surface des bactéries qui ont la capacité d'agglutiner les érythrocytes. Ils sont formés de différentes sous-unités. Les deux types de fimbriae les plus rencontrés chez *K. pneumoniae* sont le type 1 et le type 3.

- Les fimbriae de type 1 sont les mieux connus et sont présents chez la majorité des entérobactéries. Ils ont la plus grande capacité d'adhésion. Ils sont impliqués dans la colonisation des tractus respiratoire et urinaire (28).
- Les propriétés des fimbriae de type 3 sont moins bien connues. Ils sont impliqués dans l'adhésion de *K. pneumoniae* à différents types cellulaires, par exemple aux épithéliums urinaire et respiratoire. Leur rôle comme facteur de virulence reste hypothétique dans plusieurs modèles d'infections (urinaire, pulmonaire). Néanmoins, du fait que ces structures semblent faciliter l'adhésion à des supports inertes et avoir un rôle dans la formation de biofilm, elles pourraient participer à la physiopathologie des infections urinaires sur sonde (29).

1.6.3. Sidérophores

C'est la possibilité des bactéries à capter le fer environnant grâce à des structures particulières, les sidérophores. Dans l'organisme de l'hôte, le fer n'est pas à l'état libre mais associé à des glycoprotéines telles que la transferrine et la lactoferrine. En effet la captation du fer est essentielle à la croissance et à la réplication *in vivo* des bactéries et joue un rôle dans l'installation et la progression de l'infection (21).

1.6.4. Ilot de pathogénicité

C'est un grand fragment chromosomique d'ADN (35-45kb), il porte les gènes de virulence, en particulier le locus de la yersiniabactine indispensable à l'expression du phénotype hyper-virulent de *Yersinia sp*, il s'insère au niveau de la terminaison 3' du gène de l'ARNt, (iii) le taux de G+C% est différent de celui du reste du chromosome et il est flanqué de séquences répétées. Sa fonction essentielle est de capter des molécules de fer essentielles à la croissance et à la dissémination de la bactérie (30).

1.6.5. Pili (*fimbriae*)

Les pili sont des projections filamenteuses situées à la surface de la bactérie qui permettent un rapprochement étroit puis une fixation aux cellules hôtes. Différents types de pili sont décrits dont deux prédominent chez *klebiella sp.klebiella pneumoniae* peut produire des *fimbriae* de type 1 qui semblent impliqués dans l'attachement aux cellules citiées de l'appareil respiratoire et aux cellules vésicales. Elle peut également produit des *fimbriae* de type 3 dont l'importance *in vivo* est mal connue mais qui pourraient permettre un attachement sur des surface inertes comme du matériel médical (11),comme le montre à la figure 2.

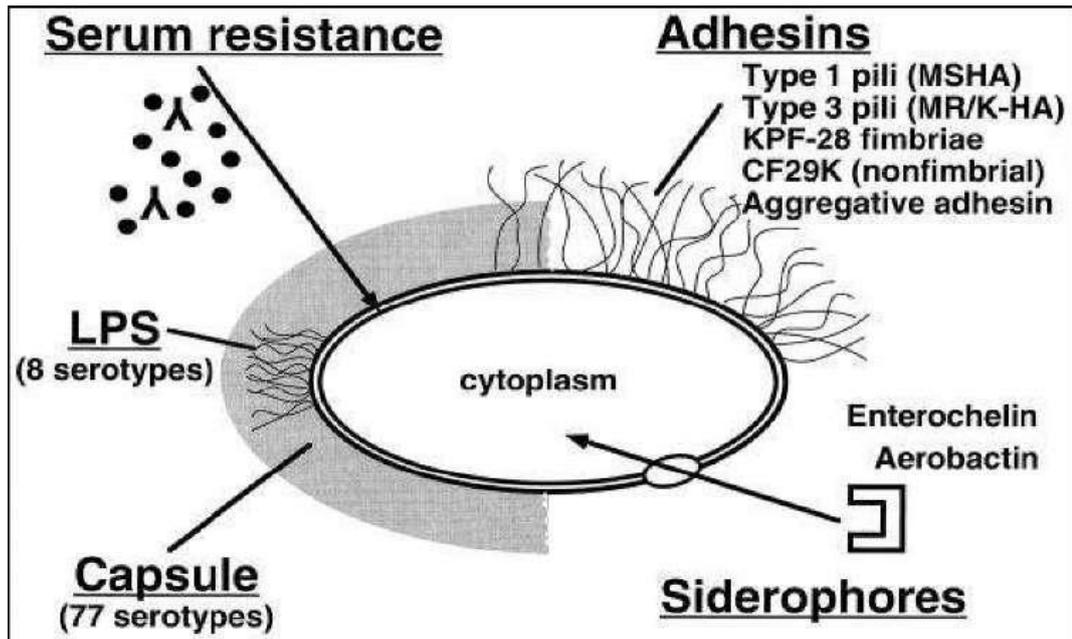


Figure 2: Représentation schématique des facteurs de pathogénicité de *K. pneumoniae* (21).

2. Les antibiotiques

2.1. Définition

Agents antibactériens synthétiques et/ou semi-synthétiques. Le mot antibiotique fut créé en 1889 par Paul Vuillemin. Un antibiotique est un dérivé produit par le métabolisme de micro-organismes possédant une activité antibactérienne à faible concentration et n'ayant pas de toxicité pour l'hôte. Cette notion a été étendue aux molécules obtenues par héli synthèse (31).

2.2. Classification

La classification des antibiotiques repose sur leur structure chimique et leurs mécanismes d'action, lesquels conditionnent leur spectre d'activité(32).

2.3. Mode d'action

Les antibiotiques agissent à l'échelon moléculaire au niveau d'une ou de plusieurs étapes métaboliques indispensables à la vie de la bactérie. (Figure 3)

- Action sur la paroi bactérienne (peptidoglycane) ;
- Action sur la structure de la membrane cytoplasmique bactérienne ;
- Action sur la synthèse protéique bactérienne ;
- Action sur la synthèse de l'ADN de la bactérie ;

- Action sur la synthèse des folates (32).

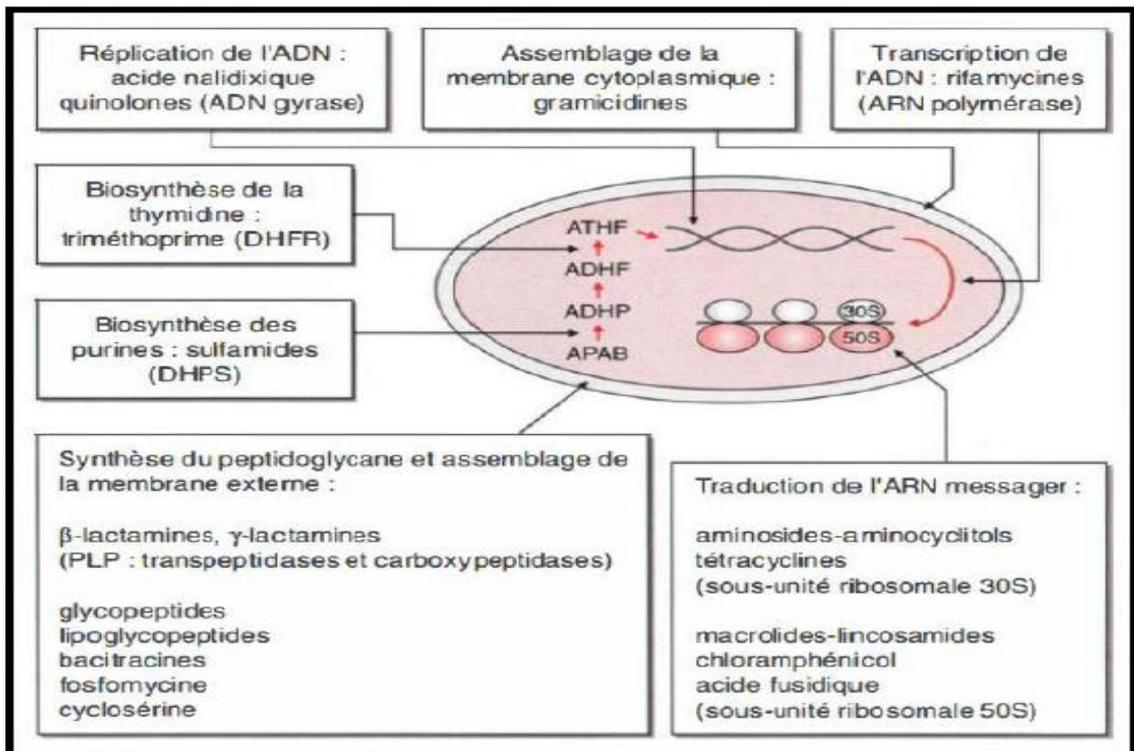


Figure 3 : Mécanisme d'action des antibiotiques (33).

2.4. Les différentes familles d'antibiotiques

2.4.1. Les β-lactamines

2.4.1.1. Définition

Les β-lactamines sont les antibiotiques de première ligne dans le traitement des infections causées par les entérobactéries. Cependant, dès le début de leur utilisation de masse dans les années 1940, leur efficacité a été confrontée à la production d'enzymes les inactivant : les β-lactamases (34).

2.4.1.2. Structure et classification

La structure de base des β-lactamines est le noyau azétidinone qui contient la structure carbonyle lactame indispensable à l'activité des molécules (31). (Figure 4)

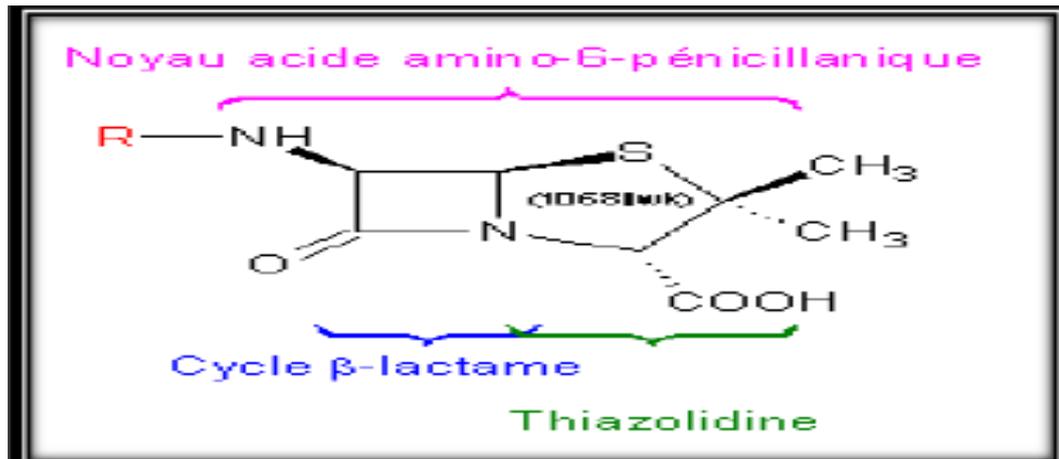


Figure 4 : Cycle β -lactame (35).

Sur cette structure est fixée un cycle penta-atomique saturé (pénème), insaturé (pénème) ou hexa-atomique (céphèmes). Le noyau azétidinone seul (β -lactamine monocyclique) peut être substitué, et en fonction des substituants de l'atome d'azote, il est possible de distinguer les monobactames (aztréonam), les monocarbames et les monophosphatames (31). (Figure 5)

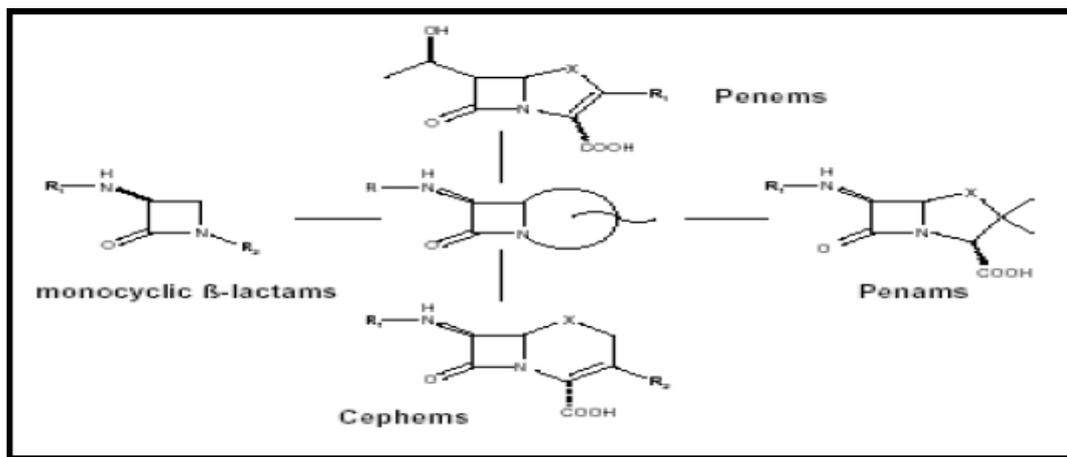


Figure 5 : Structure des différentes classes de β -lactamine (31).

2.4.1.2.1. Les pénicillines (pénème)

La structure des pénicillines est constituée de trois parties : un noyau thiazolidine fixé sur un cycle azétidinone et d'une chaîne latérale en C-6 qui permet de les différencier. Elles sont regroupées au sein de la classe des pénèmes qui comprend les pénicillines, les oxa-1-pénème (ex acide clavulanique) et les carbapénèmes (31).

- **Pénicilline G et V (naturelles)**

Actives sur les bactéries Gram positif et les coques à Gram négatif.

- **Groupe A (aminopénicillines)**

Ampicilline et Amoxicilline spectre élargi, orienté sur certains bacilles à Gram négatif mais inactivées par les pénicillinases y compris celle du staphylocoque, inactives sur les bacilles à Gram négatif naturellement producteurs de céphalosporinases comme certaines entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*.

- **Carboxypénicillines**

(Ticarcilline, carbénicilline) spectre élargie sur les bacilles Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa* (36).

- **Urédopénicillines**

leur spectre d'activité regroupe la plupart des souches d'entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa* (37).

- **Oxapénames ou clavames**

l'amoxicilline+l'acide clavulanique : utilisés comme inhibiteur de β -lactamases en association avec une autre β -lactamine (amoxicilline ou ticarcilline+acide clavulanique) et l'acide clavulanique+ticarcilline (36).

2.4.1.2.2. Les carbapénèmes (pénèmes)

Quatre molécules sont actuellement commercialisées : L'imipénème depuis 1986, le méropénème depuis 1997, l'ertapénème depuis 2002 et le doripénème commercialisé en France en mars 2009 (38). Ce sont des antibiotiques bactéricides. Possèdent un large spectre antibactérien incluant les bactéries à Gram négatif (entérobactéries) ; Gram positif, sauf les staphylocoques et les entérocoques. Les carbapénèmes se distinguent des pénicillines (pénams) par la présence d'un atome de carbone au lieu d'un soufre en position 1 et d'une liaison insaturée en C2-C3 (39).

2.4.1.2.3. Les céphalosporines

- **Les céphalosporines de première génération(C1G)**

Céfalotine, céfazoline et la céfapirine. Elles sont hydrolysées facilement par les β -lactamases acquises. Leur spectre d'activité regroupe les cocci à Gram positif, essentiellement les streptocoques et les staphylocoques sensibles à la méthicilline et à quelques entérobactéries ne produisant pas de céphalosporinase inductible comme *E.coli*, les salmonelles ou *Klebsiella spp* (36).

- **Les céphalosporines de deuxième génération (C2G)**

Elles comprennent céfamandole et céfuroxime (40), sont plus stables à l'hydrolyse de plusieurs types de β -lactamases, leur spectre d'activité regroupe les bactéries à Gram positif, à Gram négatif et les souches productrices de β -lactamases (31).

- **Les céphalosporines de troisième génération (C3G)**

Comprennent céfotaxime et céftriaxone (40). Les C3G se caractérisent par leur stabilité à la plupart des β -lactamases comme les pénicillinases de type TEM ou les céphalosporinases chromosomiques des entérobactéries comme *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* (36).

- **Les céphalosporines de quatrième génération (C4G) (céfépime, céfpirome)**

Présentent une meilleure résistance à l'hydrolyse par les céphalosporines hyperproduites (36).

2.4.1.2.4. Les monobactames

L'aztréonam et le carumonam, constituent le groupe le plus récent des β -lactamines, ces antibiotiques se caractérisent par une structure monocyclique (hétérocycle azétidinone) (31).

2.4.1.3. Mode d'action des β -lactamines

Les β -lactamines inhibent la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane (polymère majeur spécifique de la paroi des bactéries à Gram négatif et positif).

Les cibles des β -lactamines sont des enzymes situées dans la partie externe de la membrane cytoplasmique bactérienne et appelées PLP. Ces enzymes correspondent aux transpeptidases impliquées dans la synthèse du peptidoglycane. La fixation des β -lactamines sur ces PLP est responsable de l'arrêt de la synthèse du peptidoglycane (36).

Les carbapénèmes se fixent principalement aux PLP 1 et PLP 2 contrairement aux céphalosporines et aux aminopénicillines qui se fixent à la PLP 3 (39).

2.4.2. Les aminosides

2.4.2.1. Définition

Sont des antibiotiques bactéricides de la famille des aminoglycosides, ils comprennent la kanamycine, l'amikacine, la gentamycine, la nétilmycine, la tobramycine (31).

Ce sont des hétérosides naturels formés par un ou plusieurs glycosides liés à un aminocyclitol (32).

2.4.2.2. Classification

Il existe plusieurs centaines de molécules naturelles et hémi synthétiques. Elles sont classées par UMEZAWA en 1979 en fonction de la structure chimique centrale en trois classes :

- Streptamine
- 2 désoxystreptamine
- Streptidine (31).

2.4.2.3. Mode d'action

Le spectre d'action des aminosides est large, agissant sur les bacilles Gram négatifs aérobies notamment les entérobactéries et sur les bacilles à Gram positif (*Listeria*). Ils sont actifs sur les *staphylococcus aureus* sécréteurs de pénicillinase, sur les cocci à Gram négatif. Ces antibiotiques sont inactifs sur les streptocoques, pneumocoques, les entérocoques et les anaérobies. Les aminosides perturbent la synthèse des protéines au niveau de la sous-unité 30S des ribosomes des bactéries entraînant la destruction bactérienne (32).

2.4.3. Les Quinolones

2.4.3.1. Définition

Les quinolones sont des antibiotiques synthétiques, découvertes en 1962 par Leshner qui a isolé l'acide nalidixique à partir d'une préparation de chloroquine destinée au traitement du paludisme, la fluoration de ces molécules en position 6 a permis d'étendre leur spectre d'activité selon la génération de la molécule à *Pseudomonas aeruginosa*, aux coques à Gram positif, aux bactéries intracellulaires et aux anaérobies (Figure 6) (41), ces fluoroquinolones, qui sont des quinolones de deuxième génération (norfloxacin, péfloxacin, ciprofloxacine) (32), sont largement utilisés en médecine humaine et vétérinaire, notamment dans le cas d'infections urinaires et respiratoires (41).

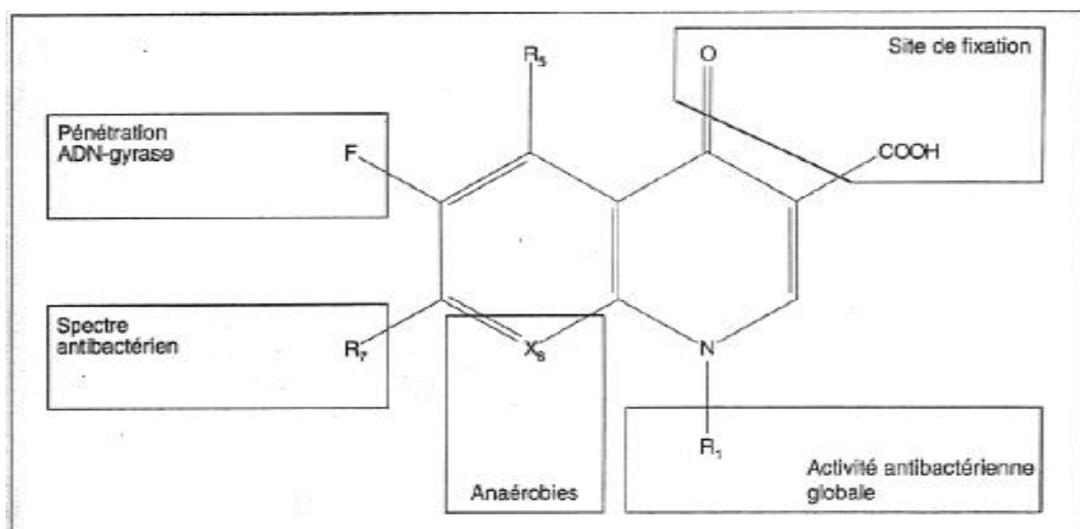


Figure 6 : Activité antibactérienne des Quinolones (31).

2.4.3.2. Mode d'action

Les fluoroquinolones ne sont pas actives sur les entérocoques, malgré leur efficacité sur les bactéries à gram négatif, leur utilisation doit être raisonnée afin de contrôler l'émergence de résistance (37).

Les fluoroquinolones ont un spectre d'activité élargi, qui recouvre les bactéries à Gram négatif, les cocci à Gram positif dont l'activité est 100 à 1000 fois plus élevée que celles des quinolones de 1ère génération (sauf streptocoques et pneumocoques).

L'ofloxacin et la Ciprofloxacin ont une activité sur *Mycobacterium tuberculosis* (32).

Les Quinolones inhibent spécifiquement la synthèse d'ADN bactérien en agissant sur les topoisomérases de type II ainsi que la topoisomérase IV. Elles se fixent sur la sous-unité A de la gyrase (cible préférentielle des bactéries à Gram négatif) (41). Comme la montre à la figure 7.

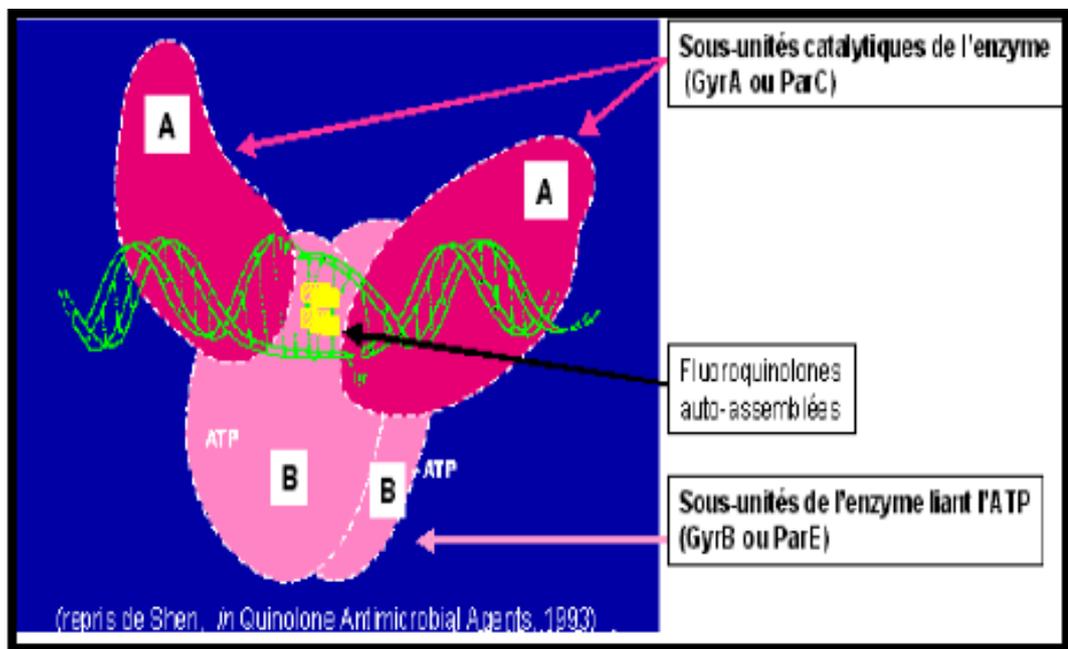


Figure 7 : Mécanisme d'action des Quinolones (42).

3. Résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux antibiotiques

3.1. Notion de la résistance bactérienne

Un micro-organisme est considéré résistant lorsque sa concentration minimale inhibitrice est plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce (43).

3.2. Types de résistance aux antibiotiques

L'efficacité de l'antibiotique dépend d'au moins trois facteurs : la quantité d'antibiotique au contact de la cible, l'affinité de l'antibiotique pour la cible et la production d'enzymes inactivant l'antibiotique. Ces facteurs sont responsables soit d'une résistance naturelle, et donc présents chez toutes les souches de l'espèce, soit d'une résistance acquise par certaines souches, suite à l'apparition de mutations chromosomiques ou à l'acquisition de matériel génétique tels que des plasmides, des transposons ou des intégrons (44).

3.2.1. Résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque est un caractère d'espèce qui touche toutes les souches. Elle est stable, transmise à la descendance mais pas ou peu transmissible sur un mode horizontal. Elle est programmée sur le génome bactérienne. Les bactéries naturellement sensible définissent le « spectre d'activité » de l'antibiotique (45).

K. pneumoniae possède naturellement un gène codant pour une pénicillinase chromosomique qui lui confère une résistance à bas niveau aux pénicillines (amino-, carboxy- et uréido- pénicillines). Cette pénicillinase est sensible à l'action des inhibiteurs (acide clavulanique, tazobactam). Ainsi, le phénotype sauvage de *K. pneumoniae* est sensible aux associations amoxicilline (ou ticarcilline) + acide clavulanique et pipéracilline + tazobactam ainsi qu'à l'ensemble des céphalosporines. Elle est également sensible aux céfamycines, à l'aztréonam et aux carbapénèmes (46).

Concernant les autres antibiotiques, *K. pneumoniae* est sensible aux aminosides, aux fluoroquinolones, à la fosfomycine et au cotrimoxazole.

3.2.2. Résistance acquise

La résistance acquise est un caractère qui ne concerne que quelques souches d'une espèce donnée. Elle est moins stable, mais elle se propage souvent de façon importante dans le monde bactérienne, par l'acquisition des nouveaux gènes capables de rendre la bactérie insensible à un antibiotique ou à un groupe d'antibiotique. Ce nouveau gène peut être obtenu soit par mutation au niveau du chromosome, soit par transfert d'ADN de plasmide conjugatif ou de transposons (32).

K. pneumoniae a toujours joué un rôle majeur dans l'apparition et/ou la dissémination des mécanismes de résistance, en particulier vis-à-vis des β -lactamines. Ainsi, dans les années 1970, ces bactéries ont été pionnières pour les résistances aux aminosides (47). A partir des années 1980, *K. pneumoniae* a largement contribué à la dissémination hospitalière des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) qui leur confèrent une résistance aux céphalosporines de 3ème génération (C3G) (48,49). Plus récemment, cette espèce occupe une position importante dans l'émergence et

la dissémination de certaines enzymes conférant la résistance aux carbapénèmes (KPC, OXA-48). Lorsque l'on fait un bilan des nouvelles β -lactamases décrites depuis 1983, *K. pneumoniae* est dans 80% des cas l'hôte chez qui ont été découvertes ces nouvelles enzymes (de type TEM, SHV, CTX-M ou de la classe C) (49).

3.3. Bêta-lactamines et *K. pneumoniae*

Les bêta-lactamines sont les antibiotiques les plus utilisés dans le traitement des infections causées par les *K. pneumoniae* vue leur diversité, faible toxicité, activité bactéricide et large spectre d'action. Elles comprennent les dérivés de la pénicilline, les céphalosporines, les monobactames et les carbapénèmes, et ont toutes en commun le cycle β -lactame (50).

3.3.1. Mécanismes de résistance

La résistance naturelle ou acquise aux β -lactamines est caractérisée par au moins deux mécanismes qui peuvent par ailleurs être combinés : Enzymatique et non enzymatique.

3.3.1.1. Enzymatique

3.3.1.1.1. Pénicillinase

- **Phénotype pénicillinase à bas niveau**

Klebsiella pneumoniae est naturellement résistante aux pénicillines des groupes G et A et à la carbénicilline sous l'effet d'une pénicillinase chromosomique appelée SHV1. Elle est sensible aux autres antibiotiques actifs sur les bacilles à Gram négatif (51).

- **Phénotype pénicillinase à haut niveau**

Chez *Klebsiella pneumoniae* le phénotype pénicillinase à haut niveau se caractérise par la résistance à très haut niveau aux amino et carboxypénicillines, et par une réduction de l'activité des urédopénicillines et des céphalosporines de première et de deuxième génération ainsi par une réduction de l'activité des pénicillines (ampicilline, ticarcilline, pipéracilline et amoxicilline) associées aux inhibiteurs de β -lactamases (40).

3.3.1.1.2. Céphalosporinase de haut niveau

Se sont des β -lactamases plasmidique de classe C d'Ambler qui présentent une résistance à l'ensemble des β -lactamines excepté les carbapénèmes et notamment aux C3G par acquisition d'un gène plasmidique (AmpC) (52).

3.3.1.1.3. Carbapénémases

Les carbapénémases de classe A, les plus fréquentes, sont les carbapénémases de type KPC (KPC-2 à KPC-8). La première souche exprimant KPC-2 fut identifiée dans une souche de *K. pneumoniae* en 1996, aux Etats-Unis. KPC-2 hydrolyse toutes les β -lactamines sauf les céfamycines et la ceftazidime (53). Son activité est partiellement inhibée par l'acide clavulanique ou le tazobactam. Parmi les céphalosporines de troisième génération, les KPC hydrolysent le

plus efficacement le céfotaxime (38). Les souches qui produisent KPC expriment également d'autres β -lactamases dont de nombreux types de BLSE (TEM, SHV, CTX-M). Les souches KPC apparaissent donc le plus souvent multirésistantes aux β -lactamines, l'ertapénème étant la carbapénème dont le niveau de résistance est le plus élevé (53).

Les enzymes de type GES sont initialement des BLSE dont seuls quelques variant touchent les carbapénèmes. Ces carbapénémases de type GES (GES-2, 4, 5 et 6) ont été identifiées dans le monde entier de façon sporadique ou lors de petites épidémies chez *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli* et *E. cloacae* (38).

Les carbapénémases de classe B : les enzymes de type VIM (Verona Integron encoded Metallo- β -lactamase) et IMP(Imipénémase) qui représentent la majorité des carbapénémases de classe B ont été rejointes en 2008 par une nouvelle enzyme appelée NDM-1 (New Delhi metallo- β -lactamase 1) (54). En Algérie, le gène VIM a été déjà détecté chez deux souches de *K. pneumoniae* à l'hôpital militaire d'Alger en 2008. Par contre, aucune souche de *K. pneumoniae* exprimant le gène IMP n'était rapportée.

NDM-1 (*New Delhi metallo- β -lactamase 1*), identifiée en 2008, est une nouvelle zinc-metallo- β -lactamase identifiée dans une souche de *K. pneumoniae* et dans une souche d'*E. coli* provenant respectivement d'un prélèvement urinaire et rectal chez un patient suédois rapatrié après un séjour dans un hôpital de New Delhi (55). Cette enzyme a déjà une diffusion internationale avec des cas rapportés dans le monde entier. Des données récentes suggèrent que les Balkans et le Moyen Orient constitueraient un réservoir secondaire dans la dissémination de NDM-1 dont le rapport avec l'Inde n'est pas établi. En Algérie aucun cas de *K. pneumoniae* exprimant le gène NDM-1 n'était rapporté contrairement à nos voisins le Maroc et la Tunisie (56).

La carbapénémase de classe D, OXA-48, décrite chez *K. pneumoniae*, hydrolyse fortement les carbapénèmes et n'hydrolyse pas les céphalosporines de 3ème génération. Son activité n'est pas inhibée par l'acide clavulanique (53). La première souche de *K. pneumoniae* productrice d'OXA-48 à été isolée en Turquie en 2003 (54).

3.3.1.1.4. β -lactamase à spectre élargi

Depuis le milieu des années 1980, notamment chez *Klebsiella pneumoniae*, et presque exclusivement en milieu hospitalier, des phénotypes de résistance acquise caractérisés par une forte diminution de l'activité des pénicillines, des céphalosporines de première, deuxième et troisième générations et de l'aztréonam. Ces phénotypes se caractérisent de plus par une très forte synergie entre les β -lactamines inactivées et les inhibiteurs de β -lactamases de type acide clavulanique. Ces phénotypes sont la conséquence de la production de β -lactamases

plasmidiques appelées «à spectre élargi » en raison du nombre plus élevé de substrats qu'elles sont capables d'inactiver par référence aux β -lactamases «à spectre élargi» classiques de type TEM-1 ou 2 ou SHV-1, dont elles dérivent par mutations ponctuelles (40).

La production de β -lactamase à spectre élargi confère à *Klebsiella pneumoniae* une large résistance aux β -lactamines. Parmi ces dernières et selon la variété de l'enzyme, seuls l'imipénème et encore souvent les céphamycines demeurent stables vis-à-vis des β -lactamase à spectre élargi (4).

Les premières observations de BLSE sont décrites en Europe et rapidement après, aux Etats-unis à partir de 1988 ou une nouvelle résistance à la ceftazidime et à l'aztréonam a permis de retrouver une nouvelle β -lactamase à transmission plasmidique chez *K. pneumoniae*. Dans des études européennes précédentes il a été démontré que *K. pneumoniae* et *E. coli* étaient les espèces les plus fréquemment responsables de la sécrétion de BLSE (19).

Résistance aux céfotaxime : *Klebsiella pneumoniae* est une souche clinique hautement résistante au céfotaxime par production d'enzyme β -lactamase de type CTX-M (57).

3.3.1.2. Non enzymatique

3.3.1.2.1. Diminution de la perméabilité

Des mécanismes de résistance aux carbapénèmes, ont été décrits combinant une céphalosporinase plasmidique (DHA-1, cmY-2...) ou une BLSE (TEM, SHV, CTX-M...) à une imperméabilité dans des espèces d'entérobactéries qui n'expriment pas naturellement de céphalosporinases comme *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* et *Salmonella spp.* L'analyse des propriétés biochimiques de plusieurs céphalosporinas plasmidiques montre que certaines d'entre elles ont une très faible activité de carbapénémase qui pourrait entraîner un certain degré de résistance aux carbapénèmes en association avec une imperméabilité (53).

Les souches de *K pneumoniae* possèdent un certain degré de résistance aux céfépime et au ceftiprome par imperméabilité ainsi que les souches qui produisent KPC (53).

Une résistance à l'ertapénème par perte de porine chez des souches de *K pneumoniae* ou d'*E.coli* productrices de CTX-M et exposées à des concentrations croissantes d'ertapénème (38).

3.3.1.2.2. Excrétion par des systèmes d'efflux

Les systèmes d'efflux sont constitués chez *K. pneumoniae* de trois protéines :

- Une insérée dans la membrane cytoplasmique jouant le rôle de pompe,
- Une seconde, insérée dans la membrane externe assurant le passage au travers de la membrane externe,

- Une troisième, péri plasmique, qui formerait un lien entre la pompe et la protéine de membrane externe.

Ces systèmes sont en fait des pompes métaboliques assurant l'expulsion active des produits du métabolisme ou de toxiques, comme les antibiotiques, en utilisant une force protomotrice. La résistance par efflux est souvent couplée à une diminution de la perméabilité. L'association de ces deux mécanismes peut entraîner une résistance à haut niveau et simultanée vis-à-vis d'antibiotiques structuralement non reliés, constituant ainsi de véritables systèmes de multirésistance.

3.3.1.2.3. Modification de la cible

Plusieurs facteurs peuvent concourir à la résistance par modification de la cible : perte d'affinité des PLP pour les β -lactamines par mutation, acquisition de gènes ou fragments de gènes codant pour des PLP d'affinité diminuée ou hyperproduction de PLP normales. Ce type de mécanisme de résistance reste très rare chez *K. pneumoniae* (58).

3.4. Aminosides et *K. pneumoniae*

Les aminosides ont un large spectre antibactérien qui comprend les bactéries à Gram négatif et positif. Le traitement des infections nosocomiales graves à bacilles à Gram négatif nécessite leur utilisation le plus souvent en association avec une β -lactamine ou une fluoroquinolone (59).

3.4.1. Mécanismes de résistance

Les mécanismes généraux de résistance aux aminosides sont :

3.4.1.1. Altération de la cible

Le mode d'action des aminosides laisse présager la mutation de l'ARN 16S comme moyen de résistance. Trois activités de méthylation de l'ARN 16S modifient le site A aux positions G1405 (N7), A1408 et C1407 (N5) (60) (figure 8).

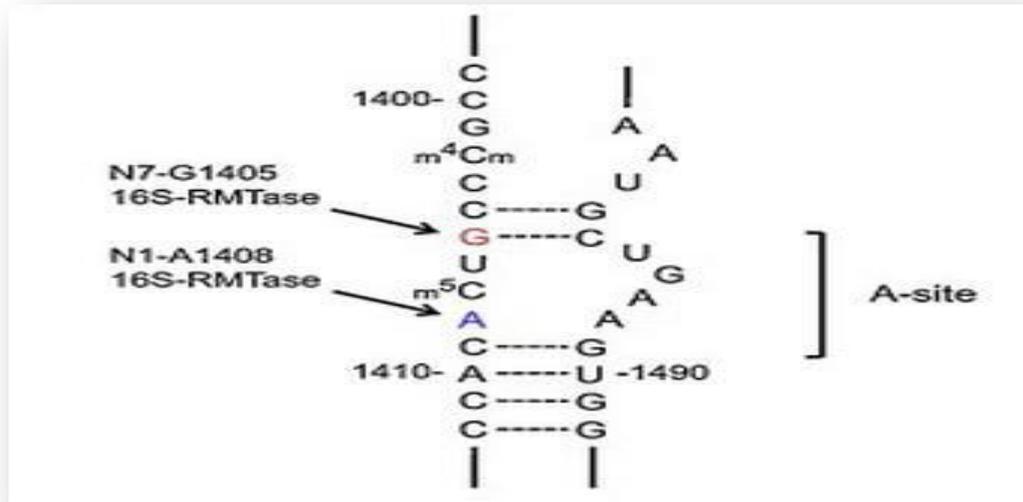


Figure 8 : Site-A : la région qui porte les ARNr16S méthyltransphérase (59).

3.4.1.2. Modification enzymatique de l'antibiotique

Lorsqu'un aminoside est modifié par des enzymes bactériennes sa fixation sur 1' ARN 16S peut être affectée et se traduire par la perte de son activité. Les enzymes modificatrices des aminosides sont le mécanisme de résistance le plus courant chez les bactéries Gram négatif et positif. Elles ont été regroupées en fonction de la réaction qu'elles catalysent (61) (figure 9):

- Acétylation d'un groupement aminé [N- acétyltransférase (AAC)].
- Phosphorylation d'un groupement hydroxyle [O- phosphotransférase (APH)].
- Nucléotidylation d'un groupement hydroxyle [O-nucléotidyltransférase (ANT)].

Les bactéries pathogènes ont acquis ces enzymes *via* des plasmides transférables portés par des bactéries qui ont un système spécifique de recombinaison d'ADN comme les transposons et les intégrons(62,63).

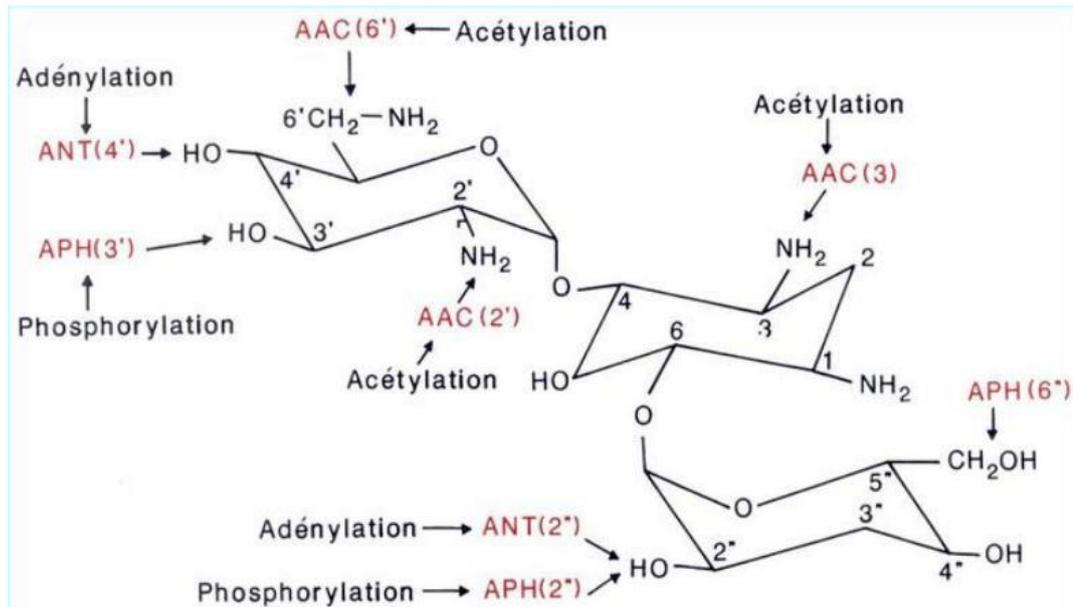


Figure 9 : Les enzymes modificateuses des aminosides (46).

3.4.1.3. Piégeage de l'antibiotique

Une enzyme modificateuse peut parfois neutraliser l'action d'un aminoside par une liaison affine sans pour autant modifier sa structure. Le piégeage de l'antibiotique a été proposé comme mécanisme responsable du phénotype de résistance à la kanamycine et à la tobramycine alors que la gentamicine et la nétilmicine restent actives. Lorsque la bactérie produit une grande quantité de la phosphotransférase qui reconnaît la tobramycine sans la modifier celle-ci peut être piégée dans un complexe enzyme-substrat fonctionnellement inactif (64).

3.4.1.4. Imperméabilité ou exportation de l'antibiotique

L'accès de l'aminoside à sa cible met enjeu différentes étapes. Compte tenu de leur caractère hydrophile les aminosides pénètrent la membrane externe des bactéries à Gram négatif par les porines (65). Le passage par la voie lipophile est associé à leur caractéristique polycationique par substitution avec le calcium ou le magnésium de la membrane externe. La deuxième étape consiste en la traversée de la membrane cytoplasmique hydrophobe et requiert l'énergie de la force proton motrice produite par la chaîne respiratoire (66).

3.5. Quinolones et *K. pneumoniae*

Les quinolones sont des composés antibactériens de synthèse dont le chef de file, l'acide nalidixique, a été décrit en 1962 par Leshner et coll (67). Toutes ces molécules possèdent un cycle pyridine dont l'azote peut être diversement substitué et présentent une fonction cétone en 4 et un groupement carboxylique en 3. Ce cycle est accolé à un autre cycle aromatique variable : benzène, pyridine, pyrimidine.

Les fluoroquinolones se caractérisent par la présence d'un atome de fluor en position 6 et d'un cycle azoté, le plus souvent une pipérazine, en position 7 (46).

3.5.1. Mécanismes de résistance

Deux principaux mécanismes de résistance aux quinolones chez *K. pneumoniae* s'exercent séparément ou en combinaison et confèrent des niveaux de résistance variables.

- la résistance par mutation chromosomique qui est due, soit à la diminution d'affinité des cibles intracellulaires qui sont les complexes ADN-ADN gyrase et ADN-ADN topoisomérase IV, soit à la diminution d'accumulation intracellulaire de l'antibiotique, par défaut de pénétration passive et/ou excréation active (68). La perte d'affinité pour la cible provient de modification structurale dans une région appelée la QRDR (*Quinolone Resistance Determining Region*), où sont trouvées la majorité des mutations responsables de la résistance aux fluoroquinolones.
- la résistance plasmidique est due à la protection de l'ADN gyrase de la fixation des quinolones. Cette résistance est décrite pour la première fois en 1998 aux USA chez une souche de *K. pneumoniae* hébergeant un plasmide portant le gène *qnrA* qui code pour une protéine Qnr A (69). Un second gène *qnrB*, présentant 49,5 % d'identité avec *qnrA*, a été individualisé récemment et la protéine QnrB présente 39.5 % d'identité avec Qnr A (70). Dernièrement, un autre mécanisme de résistance plasmidique s'effectue par l'inactivation des quinolones par l'acétyltransférase *aac (6')-Ib-cr* (71), ce variant confère la résistance simultanée aux fluoroquinolones et aux aminosides.

Il n'existe pas de critères phénotypiques sur un antibiogramme permettant de distinguer les mécanismes de résistance chromosomiques et plasmidiques aux quinolones. La détection de ces mécanismes repose sur des techniques de Biologie Moléculaire.

*Matériels et
Méthodes*

1. Lieu et durée de l'étude

Cette étude a été réalisée au laboratoire de bactériologie du Centre Hospitalo-Universitaire Ben Badis de Constantine. Ce travail a duré du 2 mois (du 22 mars au 22 mai 2015).

2. Matériels

2.1. Souches étudiées

Dans notre travail nous avons d'étudier 30 souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées à partir des prélèvements pathologiques des services du CHU de Constantine.

2.1.1. Souches des références

- ATCC 25922: *Escherichia coli*.

2.2. Matériels utilisés

- Microscope optique;
- Bec bunsen;
- Pipettes pasteur;
- Anse de platine;
- Boites de pétri;
- Lames et lamelles ;
- Etuve;
- Distributeurs d'antibiotiques;
- Ecouvillon .

2.3. Milieux de culture

2.3.1. Milieux de culture solides

- Gélose nutritive;
- Milieu Hektoen;
- Mueller Hinton.

2.3.2. Milieux d'identification biochimiques et métaboliques

- Milieu TSI;
- Milieu Mannitol mobilité;
- Milieu Clark et Lubs;
- Milieu Citrate de Simmons;
- Milieu Liquide Urée_Indole.

2.4. Antibiotiques

2.4.1. Disque

- **β -lactamines**

Amoxicilline(AMX)(25 μ g),Amoxicilline-acide–clavulanique(AMC)(30 μ g),Cefoxitine(FOX)(30 μ g),Cefazoline(CZ)(30 μ g),Céfotaxime(CTX)(30 μ g),Imipinèm(IPM)(10 μ g),Ticarcline(TIC)(75 μ g).

- **Aminosides**

Amikacine(AK)(30 μ g),Gentamicine(G)(15 μ g).

- **Quinolones**

Acide nalidixique(NA)(30 μ g),Ciprofloxacine(CIP)(5 μ g).

- **Autres**

Colistine(CS)(50 μ g),Sulfaméthoxazole–Triméthoprim(SXT)(25 μ g) , chloramphenicol (C) (30 μ g).

3. Méthodes

3.1. Prélèvements

Les prélèvements correspondaient aux différents sites (urines, LCR, pus, sang,.....), isolés essentiellement dans différents services du CHUC.

3.2. Ensemencement

On procède directement à une recherche de germes et cela en déchargeant en stries condensées l'écouvillon de prélèvement sur toute la surface de la boîte gélosée par la gélose de Hektoen pour l'isolement des entérobactéries.

3.3. Isolement et purification

Après une lecture morphologique, les différentes colonies obtenues sont ré-isolées sur le même milieu afin d'obtenir de souches pures.

3.4. Techniques utilisées pour l'identification des bactéries

L'identification des souches a porté sur une série de tests préliminaires (examen macroscopique et examen microscopique), tests biochimiques et un antibiogramme.

3.4.1. Tests préliminaires

3.4.1.1. Examen macroscopique

L'aspect des colonies sur le milieu solide permet une orientation sur les colonies, leur couleur, la taille, la forme et la fermentation du lactose.

3.4.1.2. Examen microscopique

- **Coloration de Gram**

C'est la coloration de base en bactériologie et permet de rechercher l'affinité tinctoriale des bactéries leurs morphologies et leurs modes de regroupement. Elle permet une classification des bactéries selon leur structure.

Les étapes de coloration de Gram sont détaillées dans **l'Annexe 1**.

2.4.2. Galeries classiques

L'identification des souches est réalisée par l'étude de plusieurs tests biochimiques et métaboliques, qui regroupent dans le tableau 2.

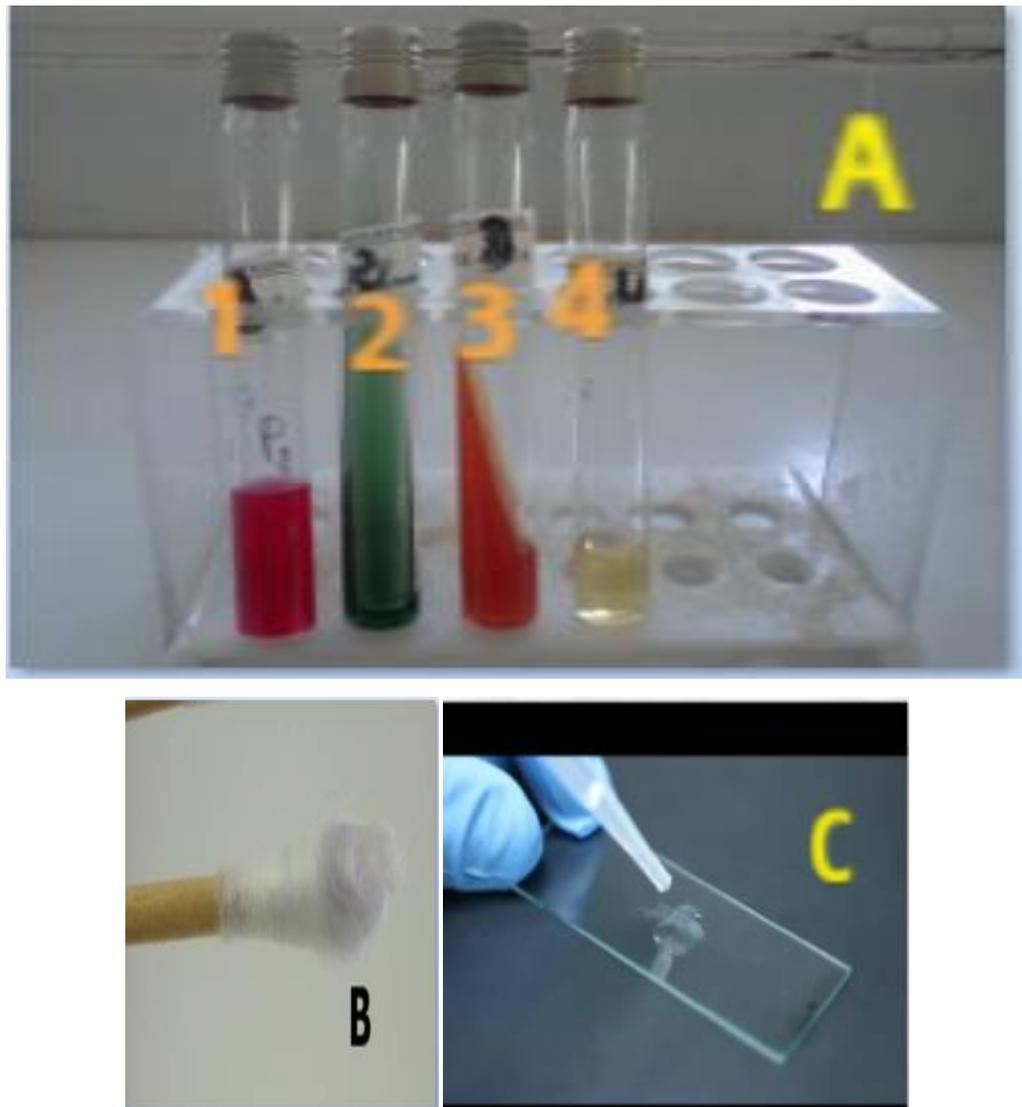
- **Préparation de l'inoculum**

Une colonie bactérienne est prélevée, à partir d'une culture jeune de 18-24 h.

- **Inoculation de la galerie**

A l'aide d'une pipette pasteur, les tubes sont remplis par la suspension bactérienne déjà préparés en évitant d'introduire les bulles d'air.

La série des milieux utilisés est mentionnée dans le tableau avec leurs modes d'ensemencement. L'incubation se fait à 37° C pendant 24 h.



A : 1 : Manitol 2 : Citrate de Simmons 3 : TSI 4 : Urée-Indole
B : Test d'oxydase C : Test de catalase

Figure 10 : Galerie biochimique de *Klebsiella pneumoniae* (Témoin)

Tableau 2 : Indentification biochimique à l'aide de la galerie classique.

Tests	Milieux de culture	Ensemencement
Recherche de l'oxydase		Avec un écouvillon stérile prendre une à deux colonies de bactérie bien isolées, nous l'avons ajouté une à 2 gouttes de réactif d'oxydase. la lecture est immédiate.
Recherche de la catalase		Sur une lame et à l'aide d'une pipette Pasteur, on dépose une colonie bactérienne à laquelle on ajoute de l' H ₂ O ₂ (à 10 volumes) .la lecture est immédiate.
Test TSI	Le milieu TSI	Ensemencement de culot par piquer centrale et la pente par des stries serrées à l'aide de la pipette pasteur ,incubation à 37°c pendant 24 h.
Utilisation de citrate	Le milieu citrate de Simmons	Ensemencement par des stries le long de la pente à l'aide de la pipette pasteur, incubation à 37°c pendant 24 h.
Utilisation de mannitol et test de mobilité	Le milieu mannitol mobilité	Ensemencement par pique centrale à l'aide d'une pipette pasteur, incubation à 37°c pendant 24 h.
Recherche de l'uréase et l'indole.	Le milieu urée indole	Ce milieu est inoculé avec quelques gouttes de la suspension bactérienne, incubation à 37°c pendant 24 h. après incubation nous l'avons ajouté 2à 3 gouttes de réactifs de kovacs. la lecture est immédiate.
Test RM et PV	Le milieu Clark et Lubs	Ensemence par l'ajout de quelques gouttes de la suspension bactérienne, incubation à 37°c pendant 24 h. après incuba nous l'avons ajouté 2 à 3 gouttes de réactifs de rouge de méthyle. la lecture est immédiate.

2.4.3. Galerie API 20^E

L'identification a été faite par la galerie rapide API système .API 20E est un système pour l'identification des entérobactéries et autres bacilles à Gram négatifs non fastidieux, utilisant 20 tests biochimiques standardisés et miniaturisés, ainsi qu'une base de données. Ces galeries API 20E sont fournies par l'IPP, il s'agit de galerie qui se présente sous forme de produits desséchés que l'on réhydrate par inoculation de la suspension du germe à tester.

Les étapes de la technique et les tableaux utilisés pour la lecture sont détaillées dans l'Annexe 2, 3, 4.



Figure 11 : Galerie API20 E.

2.5. Antibiogramme

L'antibiogramme est l'examen biologique destiné à mesurer l'interaction entre chacune des molécules antibactériennes utilisables et une souche bactérienne susceptible d'être pathogène, isolée d'un patient. Le résultat contribue à évaluer la sensibilité de la souche bactérienne examinée ou sa résistance, ce qui signifie que la molécule sera probablement active au sens thérapeutique ou le traitement sera un échec. Le résultat numérique brut est accompagné d'une interprétation ou remplacé par elle: résistante, sensible, intermédiaire, ou (indéterminée) (72).

Pour chaque souche de *Klebsiella pneumoniae* isolée un antibiogramme est réalisé par la méthode de diffusion en milieu gélosé Mueller Hinton contrôlé par le fabricant pour sa teneur en Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ et thymidine . selon la technique de l'écouvillonnage, recommandée par le CLSI.

Les étapes de la technique et le tableau des valeurs critiques utilisé pour la lecture sont détaillées dans l'Annexe 5, 6.

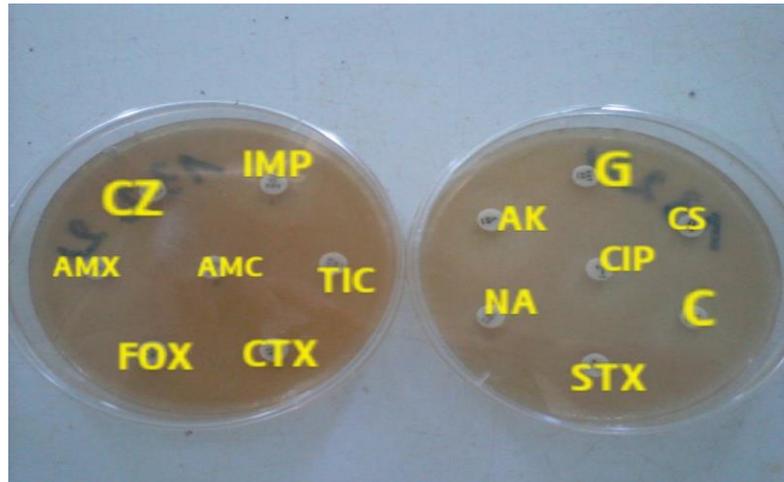


Figure 12 : Antibiogramme de *Klebsiella pneumoniae*.

2.6. Tests complémentaires

2.6.1. Tests de détection de carbapénémase

La recherche d'enzymes ayant une activité carbapénémases a été systématique chez les souches résistantes et/ou de sensibilité réduite à l'imipénème.

2.6.1.1. Test de Hodge

Le test de Hodge a permis de mettre en évidence l'enzyme à activité carbapénémase pour une souche de *Klebsiella pneumoniae*.

Un témoin positif correspondant à une souche de *Pseudomonas aeruginosa* productrice de métallob β -lactamase VIM-1 a été utilisé.

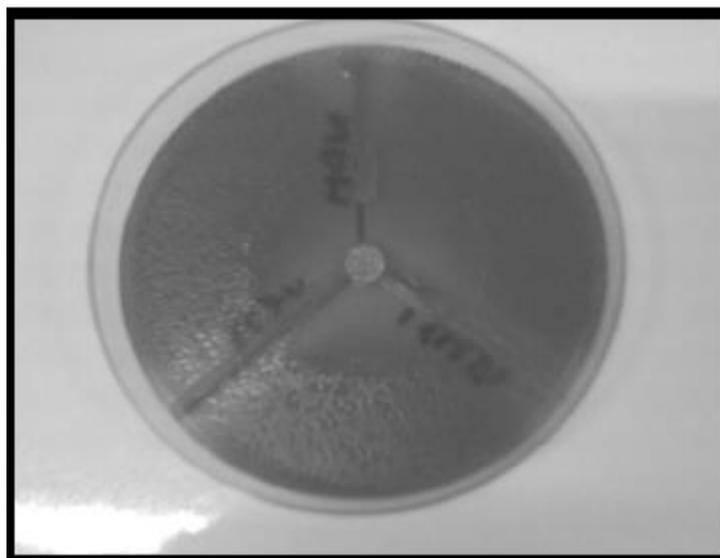


Figure 13 : Test de Hodge.

2.6.2. Tests de détection de BLSE

Après l'antibiogramme. En cas de réduction de la sensibilité aux céphalosporines de troisième génération, les BLSE ont été mises en évidence par la recherche d'une synergie entre l'acide-clavulanique et les céphalosporines de troisième génération selon les techniques suivantes:

2.6.2.1. Test de synergie

- **Principe**

Le teste de synergie permet la détection de BLSE chez une souche donnée. Ces enzymes peuvent être mises en évidence par la méthode des disques, qui consiste à rechercher une image de synergie entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de β -lactamase et les disques de céphalosporines de troisième génération (CTX, CAZ et FEP) et ATM. Cette image dite en "bouchon de champagne".

- **Technique**

La recherche de BLSE est fait dans les conditions standard de l'antibiogramme, puis en disposant les disques d'ATB: un disque d'AMC et les disques de C3G (CTX, FEP, CAZ) et l'ATM à une distance de 20 à 30 mm sur les boîtes de Pétri. Incubation pendant 18 heures à 37°C \pm 1°C.

- **Lecture**

La production des enzymes BLSE se traduire par l'apparition d'une image de synergie ou bouchon de champagne entre les disques d'AMC et les C3G.

2.6.2.2. Test du double disque (appelé aussi test espagnol)

- **Principe**

Ce test consiste à rechercher une augmentation de la zone d'inhibition d'un disque de C3G, précédé par l'application d'un disque contenant l'AMC, comparé à un autre disque portant la même céphalosporine et placé côte à côte sur la gélose de Mueller-Hinton.

- **Technique**

On procède de la même manière que la technique d'antibiogramme dans la préparation de l'inoculum et l'ensemencement, puis on place deux disques d'antibiotiques : un disque d'AMC et un disque de CTX (C3G) à une distance de 25 mm.

On laisse diffuser à la température ambiante du laboratoire pendant une heure de temps et on remplace le disque d'AMC par un disque de CTX (C3G). On incube pendant 18 h à 37°C \pm 1°C.

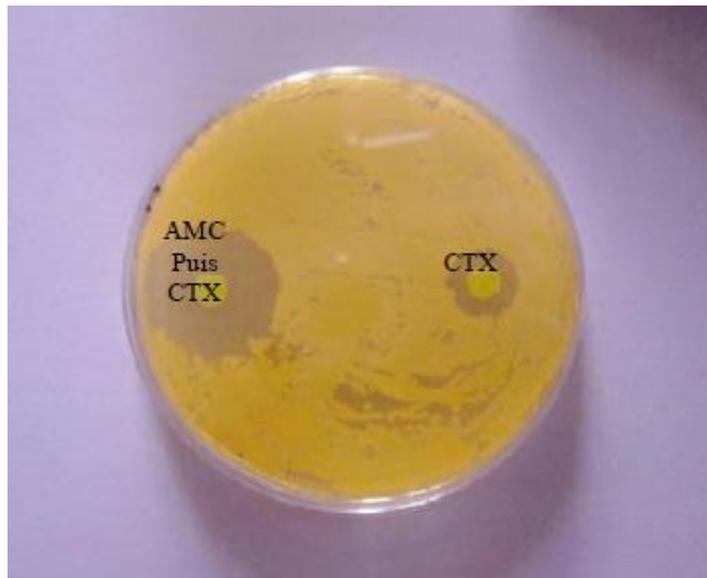


Figure 14 : Test du double disque pour la détection des BLSE.

- **Lecture**

Le test du double disque est considéré positif quand le diamètre d'inhibition du disque de C3G appliqué après pré-diffusion du disque de l'AMC est supérieur ou égale de 4 à 5 mm par rapport au diamètre d'inhibition du disque de C3G.

2.6.2.3. Test à la cloxacilline

- **Principe**

Le test cloxacilline est effectué pour identifier une BLSE associée à une céphalosporinase déréprimée. La cloxacilline ajoutée au milieu pour antibiogramme Mueller-Hinton inhibe très fortement toutes les céphalosporinases hyperproduite.

Si un tel mécanisme de résistance est présent on constate en comparant les boîtes de Pétri contenant le milieu Mueller-Hinton à la cloxacilline une restauration de l'activité de β -lactamase et apparition de l'image de synergie en bouchon de champagne recherchée.

- **Technique**

On procède de la même manière que la technique de l'antibiogramme sauf le milieu gélosé de Muller Hinton utilisé dans cette technique est mélangé avec une concentration de cloxacilline 0,25 mg/ml, pour cela il faut dissoudre 25 mg de cloxacilline dans 10ml d'eau distillée ; puis 2 ml de cette concentration est mélangé avec 18 ml du milieu Mueller-Hinton.

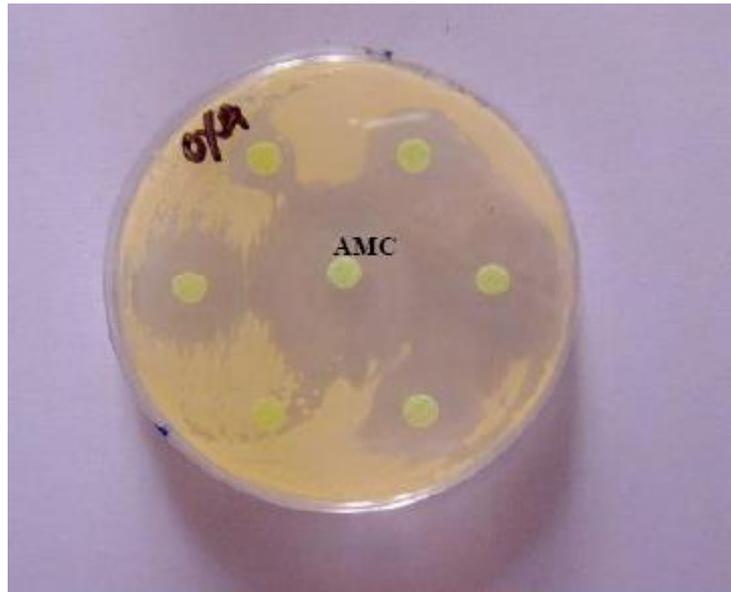


Figure 15 : Test à la cloxacilline.

Résultats

Et

Discussion

1. Prélèvements

Durant la période d'étude allant du 22 mars au 22 mai 2015, 30 souches de *Klebsiella pneumoniae* ont été colligés : 23 hospitalières et 7 communautaires (externes).

1.1. Distribution des souches *K. pneumoniae* selon l'origine du prélèvement

Les résultats illustrés ci-dessous montrent une prédominance des souches hospitalières par rapport aux souches communautaires. Conformément aux données de la littérature, l'espèce *K. pneumoniae* est plus fréquemment isolée à l'hôpital qu'en communauté, 85% contre 15% pour Decré et al en 2000 (73).

Tableau 3: Distribution des souches *K. pneumoniae* selon l'origine du prélèvement.

Origine	Effectif	Pourcentage (%)
Souches hospitalières	23	66,67
Souches externes	7	33,33
Total	30	100

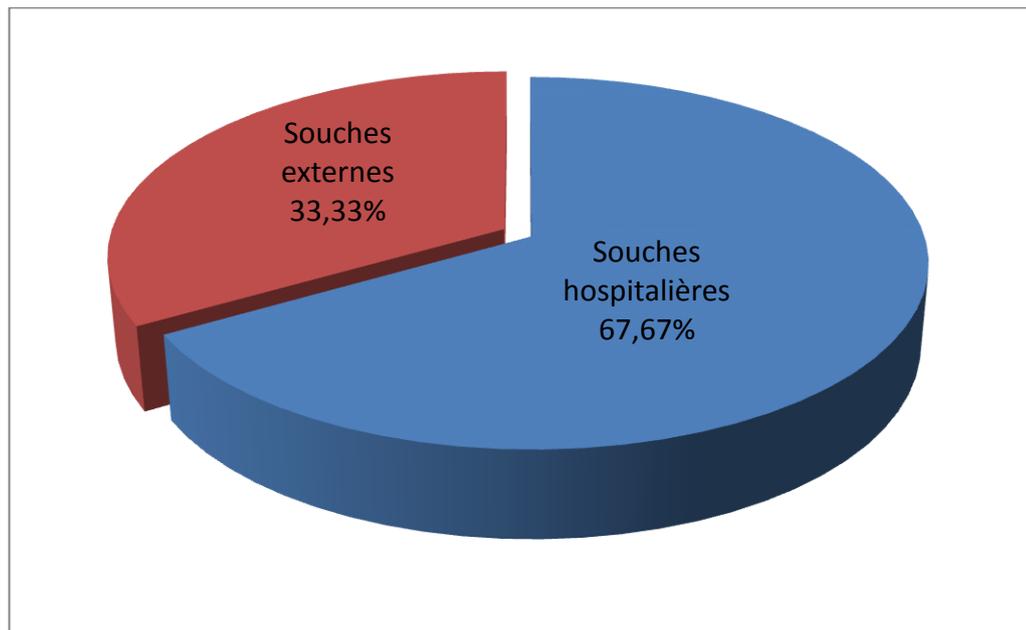


Figure 16 : Répartition des souches *K. pneumoniae* selon l'origine du prélèvement.

1.2. Distribution des souches de *K. pneumoniae* dans les différents produits pathologiques

Parmi des souches de *K. pneumoniae* étudiés dans les différents produits pathologiques, 40% proviennent des prélèvements de pus et sérosités purulentes, de LCR, et autres, 50% ont été diagnostiquées dans les urines, et 10% dans les hémocultures.

Donc l'espèce de *K. pneumoniae* est isolée essentiellement à partir des urines soit 50% des cas, elle est suivie par les prélèvements de pus avec 26,26% des cas. Les autres types de prélèvements viennent après. Cette valeur correspond aux rapports de la littérature, où les prélèvements urinaires sont toujours dominants.

Tableau 4 : Répartition des souches de *K. pneumoniae* parmi les prélèvements cliniques.

Prélèvement	Nombre de <i>K.p</i> isolée	Pourcentage (%)
Urines	15	50
Pus et sérosité	8	26,67
LCR	4	13,33
Hémoculture	3	10
Total	30	100

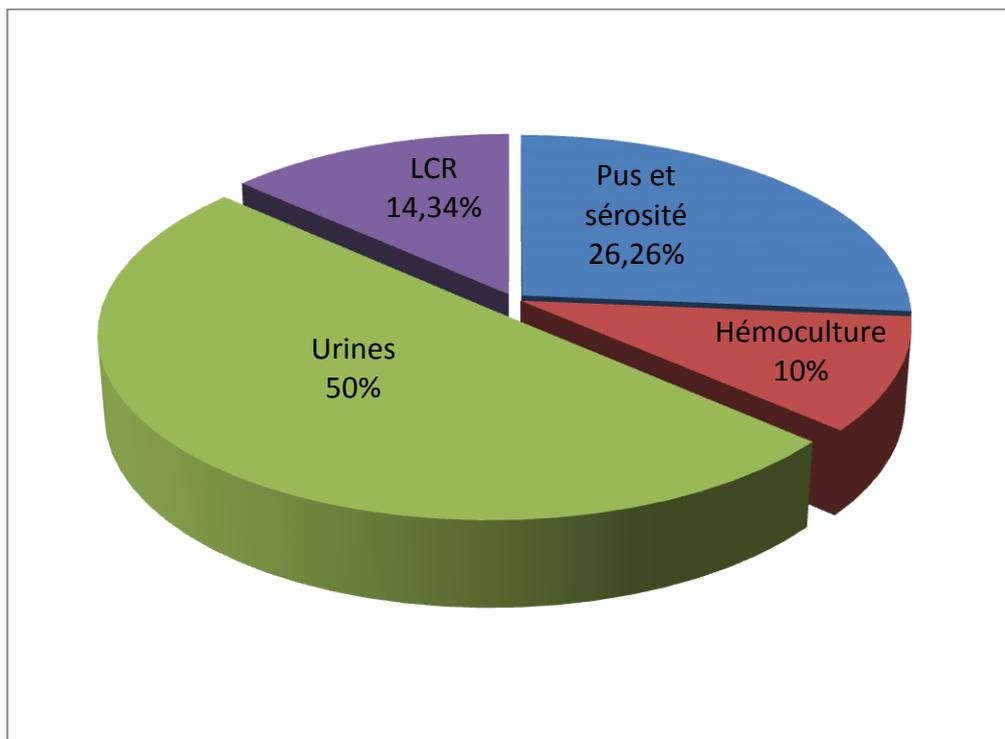


Figure 17 : Répartition de *K. pneumoniae* parmi les prélèvements cliniques.

1.3. Distribution globale selon le sexe

Parmi les 30 souches isolées, 23 de sexe féminin présentaient un pourcentage de 66,67% et 7 de sexe masculin présentaient un pourcentage de 33,33%. Le sexe ratio est de 0,30. On peut remarquer une nette prédominance des souches isolées chez les femmes par rapport à celle des

hommes. Ces résultats sont différents de l'étude de Sekhri A en 2011(74), avec une prédominance masculin et un sexe ratio est 1,17.

Tableau 5 : Distribution globale des souches de *K. pneumoniae* selon le sexe.

Sexe	Effectif	Pourcentage (%)
Femme	23	66,67
Homme	7	33,33
Total	30	100

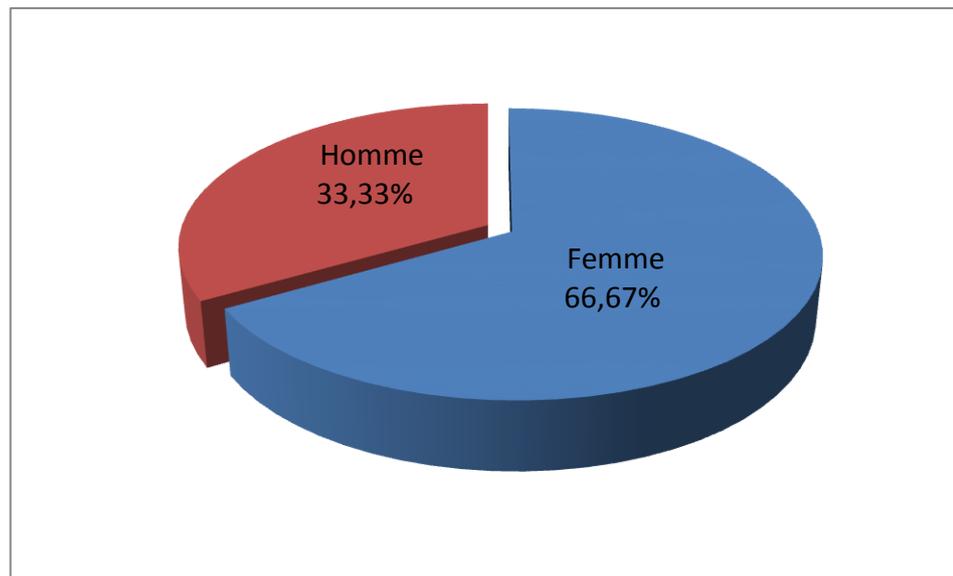


Figure 18 : Distribution globale des souches de *K. pneumoniae* selon le sexe.

2. Identification des souches

2.1. Galeries classiques

Il est possible de connaître certaines caractéristiques du métabolisme de la bactérie analysée grâce aux galeries biochimiques classiques. Les figures montrent les résultats de la galerie biochimique de *K. pneumoniae*.

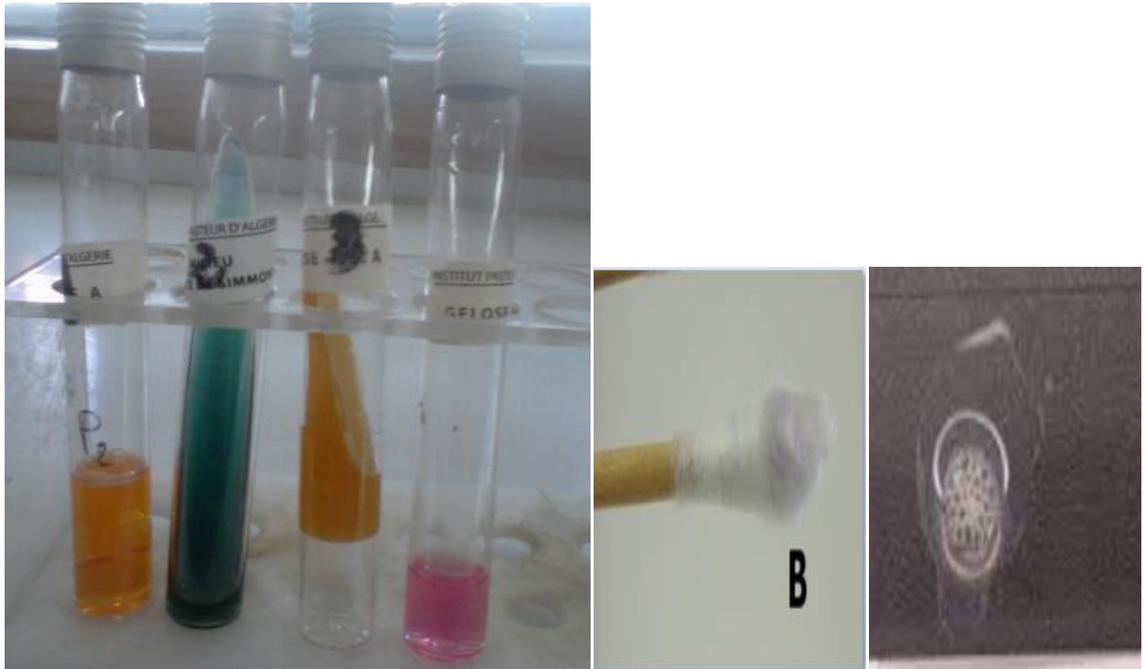


Figure 19 : Résultats de galerie biochimique de *K. pneumoniae*.

2.2. Galeries API 20^E

L'identification par galerie API 20E permet de mettre en évidence tous les caractères biochimiques.



Figure 20 : Résultats de l'identification d'une souche de *K.p* par galerie API 20E.

3. Résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux antibiotiques

Toutes les souches de *Klebsiella pneumoniae* ont été testées vis-à-vis des 14 molécules d'antibiotiques appartenant à des familles différentes dont les β -lactamines, les aminosides, les quinolones, les phénicoles, le bactrim et la colistine.

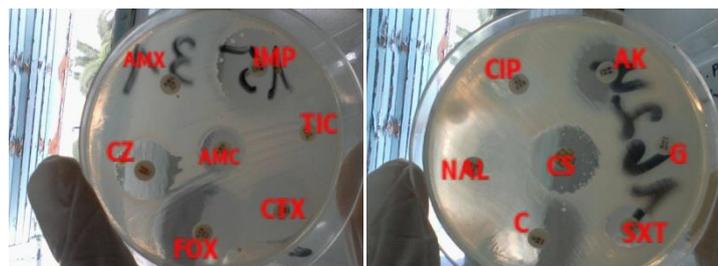


Figure 21 : Résultats d'antibiogramme d'une souche *Klebsiella pneumoniae*.

Les résultats d'antibiogramme des souches étudiés sont notés dans **Annexe 7**.

3.1. β -lactamines

Les β -lactamines sont les antibiotiques de premier choix pour le traitement des infections à *K. pneumoniae* (75).

A partir des résultats obtenus, toutes les souches étudiées sont résistantes à l'amoxiciline et la ticarcilline avec une taux de résistance de 100%(résistance naturelle). L'association amoxicilline-acide clavulanique présente un taux de résistance de 60% .Concernant la céfazoline et le céfotaxime présentent des taux de résistance respectivement de 50% et de 36,66% .Mais l'imipinèm et la cefoxitine présentent une bonne activité sur les souches de *Klebsiella pneumoniae*.

Ces résultats sont différents de ceux Sekhri A en 2011 (74), qui rapportent des taux de résistance respectivement de 43,35% pour l'AMC, de 73,07% pour la cefazoline, et de 61,76% pour le céfotaxime .

Par contre nous observons les même résultats pour l'imipinèm et la céfoxitine : aucune résistance observée.

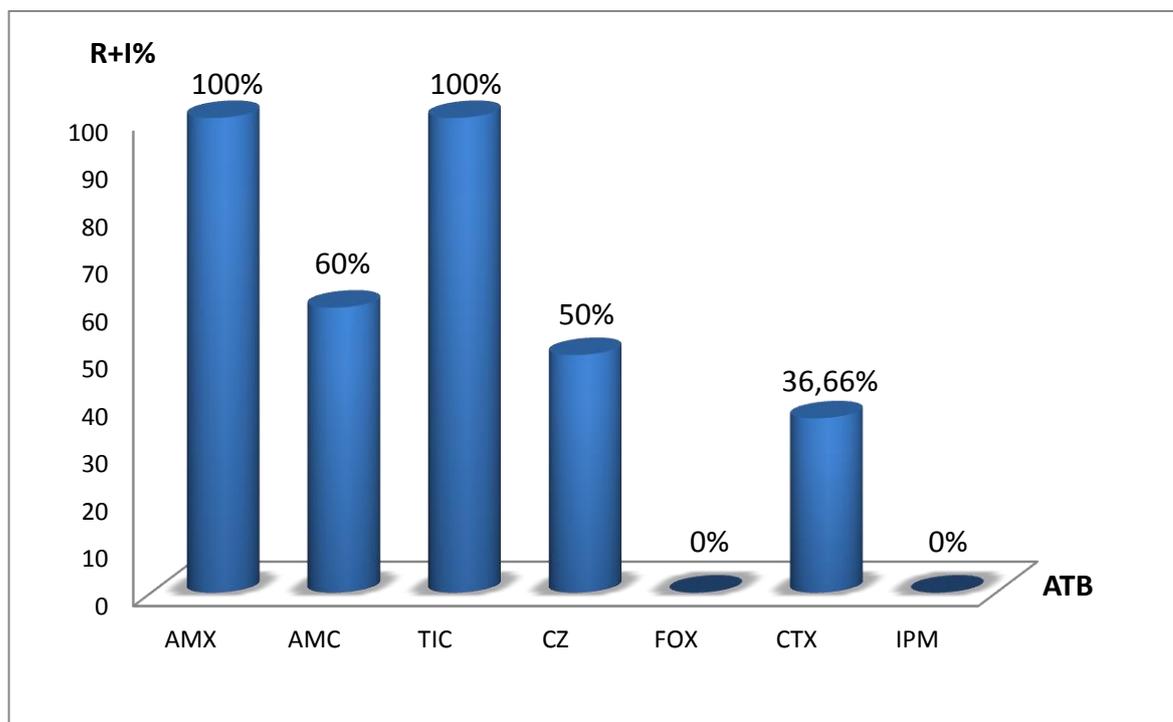


Figure 22 : Taux de résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux β -lactamines.

3.2. Aminosides

Pour les aminosides un taux de résistance a été observé pour la gentamycine de 33,33%, mais beaucoup faible pour l'amikacine de 3,33%, donc une excellente activité est enregistrée pour ce dernier.

Ces résultats sont différents de ceux de Sekhri A en 2011(74), qui rapportent des taux de résistance respectivement de 69,23% pour gentamycine et de 48,07% pour l'amikacine. Mais ce taux de résistance à l'amikacine est d'autant plus inquiétant, que cet aminoside est de premier choix dans le traitement des infections nosocomiales à *K.p* et surtout à *K.p* BLSE+.

Donc le taux de résistance diminuée vis-à-vis les aminosides, ceux rapportés par de nombreux auteurs indiquent que la surveillance de la résistance aux aminosides nous donne des chiffres plus faibles que les nôtres 23,5% à la gentamicine en Angleterre par exemple (76).

3.3. Quinolones

les quinolones et les fluoroquinolones conservent une bonne activité vis-à-vis de *K.p* dans notre étude.

Pour l'acide nalidixique on note un taux de résistance de 23,33% et de 20% à la ciprofloxacine.

Ces résultats sont différents de ceux de Sekhri A en 2011(74), qui rapportent des taux de résistance respectivement de 28,84% pour l'acide nalidixique et de 0% pour la ciprofloxacine.

Selon Ben Haj Khalifa et Khedher (2010) (19), *K. p* est naturellement sensible aux quinolones. Donc se sont des résistances acquises.

3.4. Autres

Un taux de résistance de 43,33% est observé pour l'association sulfamethaxazole+triméthoprim (Bactrim), suivi par un taux de résistance plus faible de 13,33% pour le chloramphénicol. Mais la colistine présente une bonne sensibilité à les souches de *Klebsiella pneumoniae*.

Ces résultats sont différents de ceux de Sekhri A en 2011(74), qui rapportent des taux de résistance respectivement de 65,38% pour le Bactrim et de 20% pour le chloramphénicol.

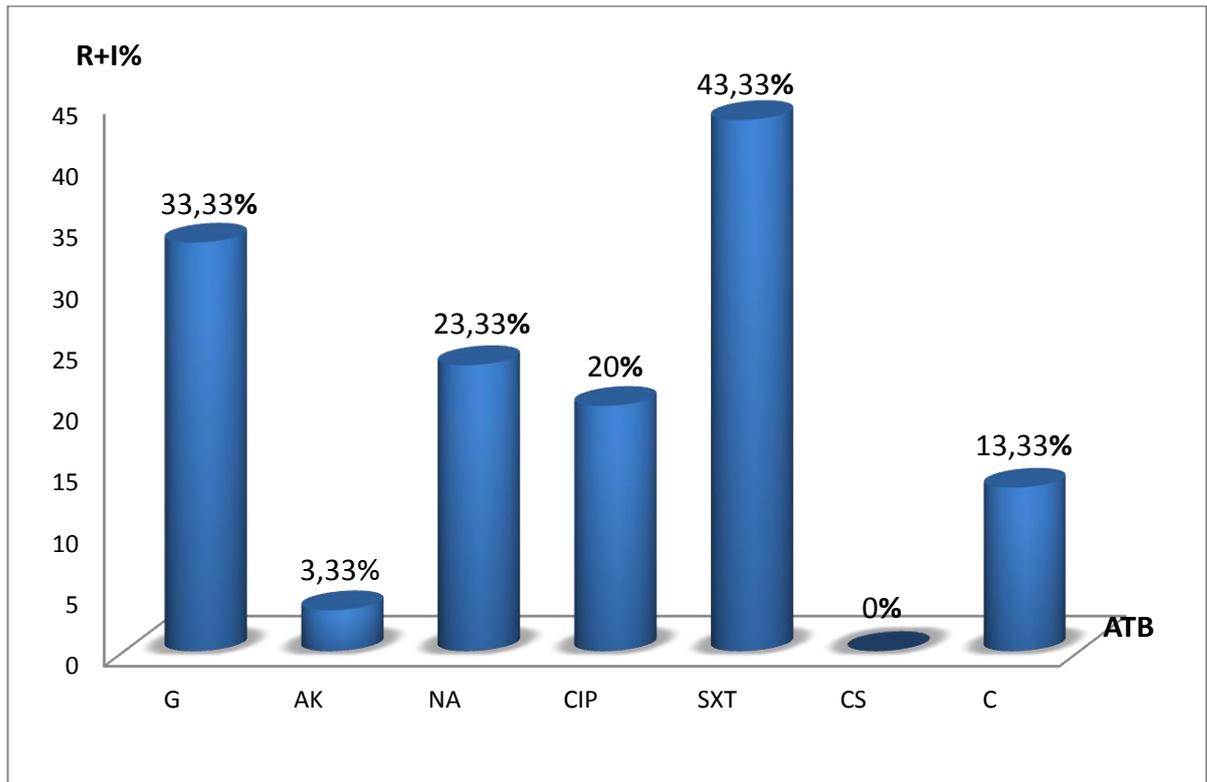


Figure 23 : Taux de résistance de *K.p* aux d'autres classes d'antibiotiques.

4. Les phénotypes de résistance de *K.pneumoniae* aux antibiotiques

A fin d'obtenir une meilleure interprétation des résistances bactériennes vis-à-vis des molécules testées, les résultats de l'antibiogramme sont traduits en phénotypes de résistance.

4.1. Phénotypes de résistance aux β -lactamines

Les phénotypes de résistance vis-à-vis des β -lactamines sont illustrés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Répartition des principaux phénotypes de résistance aux β -lactamines.

Phénotype de résistance	Effectifs	Fréquence %
PHN	14	46,66
BLSE	12	40
PBN	4	13,33
Carbapenemase	0	0

Quatre phénotypes de résistance aux β -lactamines, dont un sauvage est représenté dans notre étude. Celui du type PHN domine dans 46,66% des cas, suivi par des BLSE dans 40% des

cas, enfin du type sauvage dans 13,33% des cas, mais le type carbapénémase ne plus pas observé.

Les résultats de notre étude sont différents de ceux de Sekhri A en 2011(74), qui rapporte une dominance des BLSE dans 62% des cas, suivi du type sauvage dans 27% des cas, et du type PHN dans 8% des cas.

La Fréquence des BLSE de notre étude est nettement inférieure à celle retrouvée au niveau du C.H.U de Sidi Bel Abbes qui est de 80% (77), et supérieur à celle obtenue en Espagne (20.8%) , et en Europe (23 %) (78).

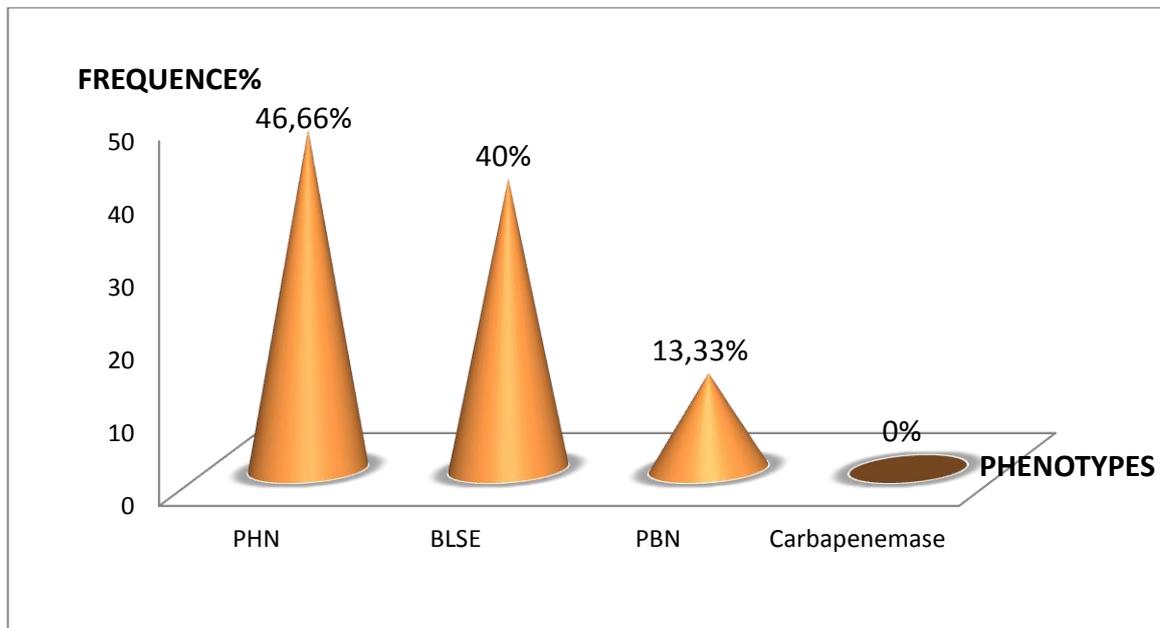


Figure 24 : Représentation graphique des phénotypes de résistance de *K.p* aux β -lactamines

4.2. Phénotypes de résistance aux aminosides

Trois phénotypes de résistance aux aminosides sont illustrés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Répartition des principaux phénotypes de résistance aux Aminosides.

Phénotypes de résistance	Antibiotiques		Effectifs	Fréquence %
	G	AK		
I (sauvage)	S	S	20	66,66
II	R	S	9	30
III	R	R	1	3,33

Les trois phénotypes sont le type I ou sauvage sensible est le plus fréquent 66,66% des cas, suivi du type II confère une résistance à la gentamicine dans 30% des cas et du type III confère une association du résistance dans 3% des cas.

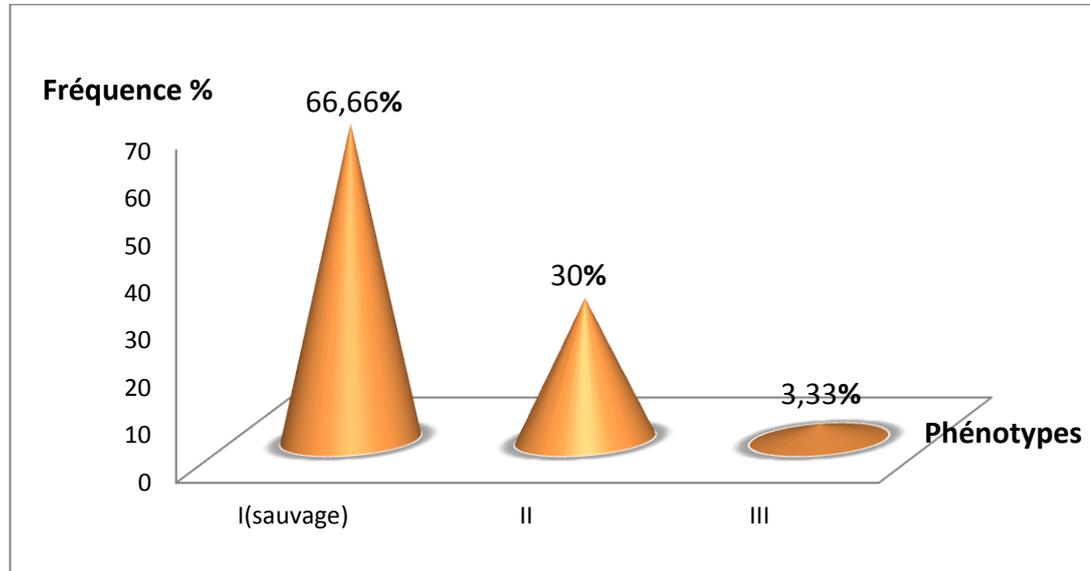


Figure 25 : Représentation graphique des phénotypes de résistance de *K.p* aux Aminoside.

Notre résultats sont différents du Sekhri A en 2011(74), qui obtenu plusieurs phénotypes, qui montre une nette prédominance du phénotype II avec une fréquence de 41%, suivi du phénotype I sauvage avec une fréquence de 27%, et le type III enregistre un taux de 10%.

4.3. Phénotypes de résistance aux quinolones

Les phénotypes de résistance aux quinolones sont illustrés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Répartition des principaux phénotypes de résistance aux quinolones.

Phénotypes de résistance	Antibiotiques		Effectifs	Fréquence %
	NA	Cip		
I (sauvage)	S	S	22	73,33
II	R	R	5	16,66
III	R	S	3	10

Trois phénotypes de résistance aux quinolones, le phénotype I ou sauvage sensible est le plus fréquent (73,33%), le phénotype II de la résistance associée entre l'ac-nalidixique et la ciprofloxacine est représenté dans 16,66% des cas, et le phénotype III confère une résistance à l'ac-nalidixique est retrouvé dans 10% des cas.

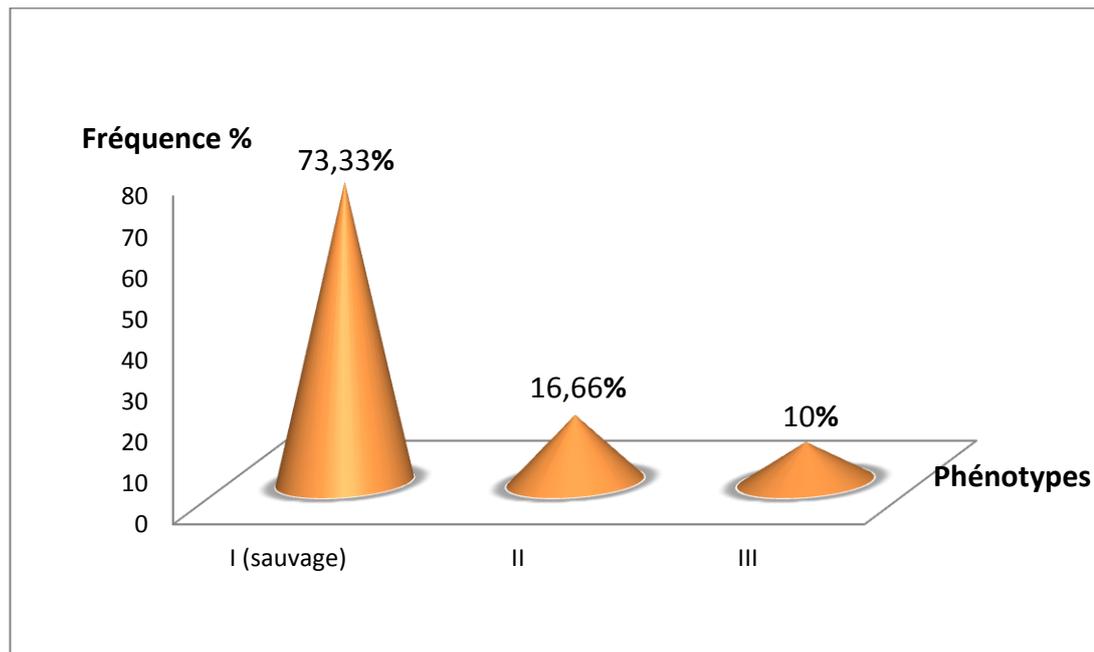


Figure 26 : Représentation graphique des phénotypes de résistance de *K.p* aux Quinolones.

Ces résultats sont similaires de ceux de Sekhri A en 2011(74), le phénotype I sauvage sensible est le plus fréquent (65,38%) dans les deux études.

Conclusion

Klebsiella pneumoniae est un pathogène opportuniste. Aujourd'hui elle est le chef de file des germes responsable d'infections nosocomiales sévères et difficiles à traiter, des épidémies sont causées par des souches résistantes à une large variété d'antibiotiques.

Le présent travail est effectué sur 30 souches du *Klebsiella pneumoniae* isolées à partir de différents produits pathologiques au CHU de Constantine entre le 22 mars et le 22 mai 2015. Le pourcentage d'isolement de l'espèce à partir des prélèvements urinaires est plus importante soit 50% de l'effectif.

Après isolement et identification, *Klebsiella pneumoniae* a montré les caractères biochimiques suivants : oxydase⁻, catalase⁺, H₂S⁻, VP⁺, RM⁻, Citrate⁺, Lactose⁺, Indole⁻ et Uréase⁺.

A partir de l'antibiogramme de *Klebsiella pneumoniae*, un grand nombre de ces souches ont présenté un fort taux de résistance à une ou plusieurs familles d'antibiotiques en particulier les β-lactamines, les aminosides, et les quinolones. Par ailleurs l'imipénème, le ceftazidime et la colistine restent les molécules les plus actives.

L'analyse phénotypique des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées est en faveur d'une production de β-lactamase à spectre étendu (BLSE) soit 40 %, qui a exprimé également des résistances notamment aux aminosides et aux fluoroquinolones, mais le phénotype carbapénémase n'a pas été retrouvé dans notre série.

En ce qui concerne les *K.pneumoniae* du CHU de Constantine, elles sont multi-résistantes et hyperproductrices de BLSE, elles représentent une cause importante de morbidité et de mortalité.

Enfin, cette étude attire l'attention sur le risque de l'augmentation et la dissémination de *K.pneumoniae* résistance aux antibiotiques. Le problème mondial est inquiétant souligne la nécessité d'une surveillance adéquate des souches BMR dans l'hôpitaux algériens en particulier dans les unités de soins intensifs et pédiatriques. Pour limiter l'émergence et la diffusion des souches multirésistantes et préserver les molécules les plus actives. Des stratégies thérapeutiques efficaces doivent être définies.

Références Bibliographiques

1. **Kariuki S, Corkill J.E, Revathi G, Musoke R, Hart A, Keynan Y, Rubinstein E.** 2007. The changing face of *Klebsiella pneumoniae* infections in the community. International journal of Antimicrobiol Agents **6**: 2474-2479
2. **Berrazeg, M., S. M. Diene, M. Drissi, M. Kempf, H. Richet, L. Landraud, and J. M. Rolain.** 2013. Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. PLoS.One. **8**:e61428.
3. **Hennequin C., Forestier C.** 2007. Influence of capsule and extended-spectrum beta-lactamases encoding plasmids upon *Klebsiella pneumoniae* adhesion. Research in Microbiology **158**(2007) 339-347.
4. **Boukadida J., Salem N., Hannachi N., Monastiri K., Snoussi N.** 2002. Exploration génotypique d'une bouffée épidémique nosocomiale néonatale à *Klebsiella pneumoniae* productrice de bêtalactamase à spectre étendu. Arch Pédiatr **2002** ; **9** :463-8.
5. **Maltezou, H. C., E. Papacharalambous, K. Tryfinopoulou, L. Ftika, A. Maragos, G. Kyriakeli, P. Katerelos, C. Trakateli, M. Polemis, E. Roilides, A. Vatopoulos, and N. Nikolaidis.** 2013. Outbreak of pan-susceptible *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. Scand.J.Infect.Dis. **45**:872-877.
6. **Leon Le Minor, Michel Veron,** Bactériologie Médicale 2^{ème} Edition Paris, 1989, 396- 795p.
7. **13^{ème} rapport d'évaluation de l'institut Pasteur d'Alger, 2011.** Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques.
8. **Freney J, R. F., Hansen W, and Bollet TC.** 2000. Précis de bactériologie clinique.
9. **Bergogne-Berézin E, Dellamonica P.** 1995. Antibiothérapie en pratique clinique. Masson, Paris. P 486
10. **Avril, J.L., Dabernat, H., Denis, F., and Monteil, H.** 2000. Bactériologie clinique, Ellipses, Paris. 2^{ème} édition : 171-211.
11. **El Fertas-Aissani R., Messai Y., Alouache S., Bakour R.** 2012. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. PATBIO-3048; No. of Pages 8.
12. **Le Minor L and Véron M.** 1989. Bactériologie médicale, 2^{ème} édition , Flammarion Médecine-Sciences, Paris.**2**:428-432.
13. **Gueye O.**2007. Utilisation des méthodes biométrique dans l'identification de quelques bacilles à Gram négatif .P 22,24-28

14. **Baerwolf S, Geffers C, Behnke M.** 2002. Correlation between transmissions and the nosocomial infection rate in five different intensive care units in a German university hospital. SHEA 216.
15. **Y Shao, et al ...** 2010. Genome Subtractor: un outil basé sur le Web pour parallèle *in silico* soustractive analyse d'hybridation de plusieurs génomes bactériens Nucleic Acids Res. **38**: W194 - W200.
16. **Jiang Y, et al.** 2010. Séquence de nucléotides complète de *Klebsiella pneumoniae* multirésistance pKP048 plasmide, portant *blaKPC-2*, *blaDHA-1*, *qnrB4*, et *armA*. Antimicrob. . Agents Chemother **54**: 3967-3969.
17. **Galimand M, et al.,** 1997. Résistance Multidrug dans *Yersinia pestis* médiée par un plasmide transférable. N. Engl. J. Med **337**:. 677-681.
18. **Kone Koumba Diallo.2010.** Frequence D'isolement Des *Klebsiella* Au Laboratoire De Bacteriologie Cvd Du Chu Gabriel Toure De 2002 A 2007.Thèse Pour obtenir le Grade de Docteur en Pharmacie(Diplome D'etat).
19. **Ben Haj Khalifa.A et Khedher. M. 2010.** Epidémiologie des souches de *Klebsiella* spp.uropathogènes productrices de B-lactamases à spectre élargi dans un hopital universitaire Tunisien.pathologie Biologie 60(2012) e1-e5.
20. **Nedjai S., Barguigua A., Djahmi N., Jamali L., Zerouali K., Dekhil M., Timinouni M.2011.**Prevalence and characterization of extended spectrum -lactamases in *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group bacteria, in Algeria. Médecine et maladies infectieuses 42 (2012) 20–29.
21. **Podschun, R. and U. Ullmann.** 1998. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin.Microbiol.Rev. **11**:589-603.
22. **Carpenter, J. L.** 1990. *Klebsiella* pulmonary infections: occurrence at one medical center and review. Rev.Infect.Dis. **12**:672-682.
23. **Strampfer, M. J., P. E. Schoch, and B. A. Cunha.** 1987. Cerebral abscess caused by *Klebsiella ozaenae*. J.Clin.Microbiol. **25**:1553-1554.
24. **Bennet, R., M. Eriksson, B. Melen, and R. Zetterstrom.** 1985. Changes in the incidence and spectrum of neonatal septicemia during a fifteen-year period. Acta Paediatr.Scand. **74**:687-690.
25. **Highsmith, A. K. and W. R. Jarvis.** 1985. *Klebsiella pneumoniae*: selected virulence factors that contribute to pathogenicity. Infect.Control **6**:75-77.

26. **Dabernat, H., O. Petitjean, and S. J. P. W. P. Schlemmer.** 1997. Infectiologie de A à Z.354-355.
27. **Arafa N., Smati F., Scheffel JM., Meunier O.** 2009. Caractérisation Phénotypique Et Génotypique De Souches De *Klebsiellapneumoniae Subsp Pneumoniae* Isolées A L'hôpital Universitaire De Constantine, Algérie. Sciences & Technologie C – N°30 Décembre (2009), Pp.44-45-46.
28. **Struve, C., M. Bojer, and K. A. Krogfelt.** 2008. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. Infect.Immun. **76**:4055-4065.
29. **Sebghati, T. A., T. K. Korhonen, D. B. Hornick, and S. Clegg.** 1998. Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains. Infect.Immun. **66**:2887-2894.
30. **Carniel, E.** 1999. The Yersinia high-pathogenicity island. Int.Microbiol. **2**:161-167.
31. **Bryskier A.** 1999. Antibiotiques. Agent antibactériens et antifongiques. Ellipses ; Paris.p : 54- 436-445.
32. **Yala D., Merad A.S., Mohamedi D et Ouar Korich M.N.** 2001. Classification et mode d'action des antibiotiques. Médecine du Maghreb n°91.
33. **Paul H. Roy.** 1997. Dissémination de la résistance aux antibiotiques : le génie génétique à l'oeuvre chez les bactéries. Médecine/ sciences n° 8-9, vol. 13.
34. **Ruppé E.** 2010. Épidémiologie des β -lactamases à spectre élargi : l'avènement des CTX-M. Doi : 10.1016/j.antib.2010.01.003. Vol 12 - N° 1. P. 3-16.
35. **Bessard G.** 2004. Pharmacologie des antibiotiques. Faculté de médecine de Grenoble. Université Joseph Fourier. DCEM I. Sur le lien: www-sante.ujfgrenoble.fr/SANTE/pharma/site.fac/diaporama/antibio2.ppt.
36. **Cavallo J-D., R. Fabre R., Jehl F., Rapp C., Garrab E.** 2004. Bêtalactamines. EMC- Maladies Infectieuses 1 (2004) 129-202.
37. **Botto H.** 2003. Infections urinaires nosocomiales de l'adulte : conférence de consensus 2002 >, texte court. Médecine et maladies infectieuses 33 (2003) 370–375.
38. **Grall N., Andremont A., Armand-Lefèvre L.** 2011. Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse ? ANTINF-16 ; No. of Pages 16.
39. **Wolff M., Joly-Guillou M-L et Pajot O.** 2008. Le point sur les carbapénèmes. Réanimation (2008) 17,242-250.
40. **Jarlier V et Nordmann P.** 2000. Entérobactéries et β -lactamines. ESKA 2000-Précis de bactériologie clinique.

41. **Meradi L., Djahoudi A., Abdi A., Bouchakour M., Perrier Gros Claude J-D., Timinouni M. 2009.** Résistance aux quinolones de types qnr, aac (60)-Ib-cr chez les entérobactéries isolées à Annaba en Algérie. *Pathologie Biologie* 59(2011) e73-e78.
42. **Claire W. 2013.** Fluoroquinolones. Interne-Service Maladies Infectieuses, Pr Stahl, Grenoble. www.infectiologie.com/...grenoble/2013-DUATB-Grenoble-Fluoroquino.
43. **Carl S. 2009.** La Résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important. le parrainage des antimicrobiennes .p47 .
44. **Comité de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie. 1997.**
45. **Messai A. 2006.** Analyse critique des pratiques de l'antibiothérapie en élevages avicoles.p21.
46. **Courvalin, P., R. Leclercq, and E. Bingen. 2006.** *Antibiogramme*.2:142-162, 227-246, 263-277.
47. **Christensen, S. C. and B. Korner. 1972.** An endemic caused by multiresistant *Klebsiella* in an urological unit. *Scand.J.Urol.Nephrol.* 6:232-238.
48. **Paterson, D. L. and R. A. Bonomo. 2005.** Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin.Microbiol.Rev.* 18:657-686.
49. **Sirot, D. 1995.** Extended-spectrum plasmid-mediated beta-lactamases. *J.Antimicrob.Chemother.* 36 Suppl A:19-34.
50. **Bryskier, A. 1984.** [Classification of beta-lactams]. *Pathol.Biol.(Paris)* 32:658-667.
51. **Joly B et Reynaud A. 2002.** Entérobactéries. *Systématique et méthodes de diagnostic*. P : 79-80-83.
52. **Gueudet T., Richter S., Szulc M et Jehl F. 2009.** Les nouvelles formes de résistance des bactéries aux antibiotiques : deux cas de *Klebsiella pneumoniae* produisant une céphalosporinase plasmidique. *MEDMAL-2927* ; No. Of Pages3.
53. **Nordmann P et Carrer A. 2010.** Les carbapénèmes des entérobactéries. *Archives de pédiatrie* 2010 ; 17 :S154-162.
54. **Boutet-Dubois A., Pantel A., Sotto A., Philippe Lavigne J. 2012.** Les entérobactéries productrices de carbapénèmes. Lettre d'information du Cclin Sud-Est destinée aux Acteurs de la Lutte contre les Infections Nosocomiales & Associées aux Soins. Avril 2012.
55. **Yong, D., M. A. Toleman, C. G. Giske, H. S. Cho, K. Sundman, K. Lee, and T. R. Walsh. 2009.** Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob.Agents Chemother.* 53:5046-5054.

- 56. Ben, N. A., B. Bercot, L. Poirel, P. Nordmann, D. Decre, F. Compain, N. Genel, F. Barguellig, and G. Arlet.** 2013. Emergence of NDM-1 in Association with OXA-48 in *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia Plasmid-mediated 16S rRNA methylases among extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates. *Antimicrob.Agents Chemother.* **57**:4089-4090.
- 57. Ben Achour N., Mercuri P.S., Power P., Belhadj C., Ben moussa M., Galleni M et Belhadj O.** 2008. First detection of CTX-M-28 in a Tunisian hospital from a cefotaxime-résistant *Klebsiella pneumoniae* strain. *Pathologie Biologie* **57** (2009) 343-348.
- 58. Nikaido, H.** 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* **264**:382-388.
- 59. Wachino, J. and Y. Arakawa.** 2012. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resist.Updat.* **15**:133-148.
- 60. Beauclerk, A. A. and E. Cundliffe.** 1987. Sites of action of two ribosomal RNA methylases responsible for resistance to aminoglycosides. *J.Mol.Biol.* **193**:661-671.
- 61. Ramirez, M. S. and M. E. Tolmasky.** 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist.Updat.* **13**:151-171.
- 62. Partridge, S. R., G. Tsafnat, E. Coiera, and J. R. Iredell.** 2009. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol.Rev.* **33**:757-784.
- 63. Tolmasky, M. E. and J. H. Crosa.** 1987. Tn1331, a novel multiresistance transposon encoding resistance to amikacin and ampicillin in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **31**:1955-1960.
- 64. Menard, R., C. Molinas, M. Arthur, J. Duval, P. Courvalin, and R. Leclercq.** 1993. Overproduction of 3'-aminoglycoside phosphotransferase type I confers resistance to tobramycin in *Escherichia coli*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **37**:78-83.
- 65. Hancock, R. E., S. W. Farmer, Z. S. Li, and K. Poole.** 1991. Interaction of aminoglycosides with the outer membranes and purified lipopolysaccharide and OmpF porin of *Escherichia coli*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **35**:1309-1314.
- 66. Davis, B. D.** 1987. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiol.Rev.* **51**:341-350.
- 67. Leshner, G. Y., E. J. Froelich, M. D. Gruett, J. H. Bailey, and R. P. Brundage.** 1962. 1,8-naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *J.Med.Pharm.Chem.* **91**:1063-1065.

68. **Lewin, C. S., B. M. Howard, and J. T. Smith.** 1991. Protein- and RNA-synthesis independent bactericidal activity of ciprofloxacin that involves the A subunit of DNA gyrase. *J.Med.Microbiol.* **34**:19-22.
69. **Jacoby, G. A., N. Chow, and K. B. Waites.** 2003. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrob.Agents Chemother.* **47**:559-562.
70. **Jacoby, G. A., K. E. Walsh, D. M. Mills, V. J. Walker, H. Oh, A. Robicsek, and D. C. Hooper.** 2006. qnrB, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:1178-1182.
71. **Robicsek, A., J. Strahilevitz, G. A. Jacoby, M. Macielag, D. Abbanat, C. H. Park, K. Bush, and D. C. Hooper.** 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat.Med.* **12**:83-88.
72. **Scavizzi M, Labia R, Petitjean O, Elbhar A.** 2000. L'antibiogramme de l'analyse des populations bactériennes à la thérapeutique. *J Antibiotiques* **2**: 122-134.
73. **Decré D, Gachot B, Lucet J.C, Arlet G, Régnier B.** 2000. Surveillance épidémique des souches de *Klebsiella pneumoniae* productrices de β -lactamases à spectre étendu (K.p BLSE) dans un service de réanimation. *Rev Française des laboratoires* **320**: 31-38.
74. **Sekhri Arafa N.** 2011. Fréquence et marqueurs épidémiologiques de *Klebsiella pneumoniae* dans les services à haut risque infectieux au niveau du CHU Ben Badis de Constantine. Thèse Pour l'obtention du Grade de Docteur en Sciences. Année universitaire: 2010-2011.
75. **Ilanson ND.** 2003. AmpC 3-lactamases: what do we need to know for the future? *J Antimicrob Chemother*; **52**:2-4.
76. **Schelenz, S., K. Bramham, and D. Goldsmith.** 2007. Septic arthritis due to extended spectrum beta lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*. *Joint Bone Spine* **74**:275-278.
77. **Souna D.**2011.Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries au niveau du C.H.U de Sidi Bel Abbes.Thèse de magister.
78. **Berrazeg M, Diene SM, Drissi M, Kempf M, Richert H, Landaud L, Rolain JM** (2013A).Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS.*PLOS. One.***8** :e61428.
44. <http://bacterioweb.univ-fcomte.fr/bibliotheque/remic/24-Antib.pdf>.

Résumé

Klebsiella pneumoniae est une entérobactérie qui fait partie des espèces commensales, c'est-à-dire des flores normales du sujet sain. Elle est actuellement impliquée dans les infections nosocomiales et dans les pathologies infectieuses opportunistes. C'est la bactérie multirésistance par excellence par l'acquisition des nouvelles résistances.

Cette étude a pour objectifs l'identification des souches de *Klebsiella pneumoniae* par les tests de caractérisation biochimiques, par l'étude des tests de sensibilité aux antibiotiques (Antibiogramme : méthode de diffusion de disques sur gélose et interprétation selon les critères du CLSI), et par la détermination de leur phénotypes de résistance aux antibiotiques.

Nous avons colligé 30 souches de *Klebsiella pneumoniae* dont 50% au niveau des urines avec un taux élevé de résistance. Elles sont résistantes à la majorité des antibiotiques utilisés, 12 souches de *Klebsiella pneumoniae* sont productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) soit 40% sont identifiées.

Il convient donc de souligner l'émergence de telles bactéries multirésistantes (BLSE) pouvant être à l'origine d'épidémie, pouvant limiter les options du traitement de ce type d'infections.

Enfin, la surveillance régulière des mécanismes de résistance est indispensable pour définir des stratégies préventives et l'usage plus rationnel des antibiotiques.

Mots clés : *Klebsiella pneumoniae*, isolée, identification, caractères biochimiques, résistance, antibiotiques, phénotypes, BLSE.

Abstract

Klebsiella pneumoniae is a commensal species enterobacterium hand, that 'is to say, normal flora of healthy subjects. Currently she is involved in nosocomial infections and opportunistic infectious diseases. This is the quintessential multiresistant bacteria by Acquiring new resistances.

This study aims to identify *Klebsiella pneumoniae* strains by characterizing biochemical tests, the study of antibiotic susceptibility testing (antibiogram: disk diffusion method on agar and interpretation criteria CLSI) and by antibiotic resistance determining their phenotypes. We Collected 30 kp strains for 50% in urine with a high rate of resistance. They are resistant to the antibiotics used majorité of 12 *Klebsiella pneumoniae* strains producing β -lactamases of extended spectrum (ESBL) or 40% are approbation. The therefore it is emphasize Appropriate to the emergence of multidrug Such being able bacterie to the original outbreak, that Could limit the options for the treatment of Such infections.

Finally, regular monitoring of resistance Mechanisms is essential to define preventive strategies and the rational use of antibiotics.

Keywords : *Klebsiella pneumoniae*, isolated, identification, biochemical characteristics, resistance, phenotype , antibiotics, ESBL.

ملخص

الكلبسييلة الرئوية هي جزء من الأنواع المتعايشة *enterobacterium* ، وذلك لتواجدها عند الأصحاء. وهي تشارك حاليا في عدوى المستشفيات والأمراض المعدية الانتهازية. فهي بكتيريا متعددة المقاومة من خلال حصولها على مقاومة جديدة. تهدف هذه الدراسة إلى تحديد سلالات الكلبسييلة الرئوية من خلال الاختبارات البيوكيميائية، ودراسة اختبار الحساسية للمضادات الحيوية (المضادات: طريقة انتشار الأقراص على أجار و تفسيرها وفق معايير CLSI) و كذلك تحديد مظاهر المقاومة للمضادات الحيوية الخاصة بهم.

جمعنا 30 سلالة من الكلبسييلة الرئوية بنسبة 50% في البول مع نسبة عالية من المقاومة. فهي مقاومة لمعظم المضادات الحيوية المستخدمة، مع تحديد 12 سلالة منها منتجة للبيتا لكتماز ذو النطاق الواسع (ESBL) بنسبة 40%. ولذلك فمن المناسب أن نؤكد على ظهور هذه البكتيريا متعددة المقاومة التمكن ، والتي قد تحد من الخيارات لعلاج هذه العدوى. أخيرا، الرصد المنتظم لآليات المقاومة أمر ضروري لتحديد استراتيجيات وقائية والاستخدام المناسب للمضادات الحيوية.

الكلمات المفتاحية : الكلبسييلة الرئوية، معزولة، وتحديد، والخصائص الكيميائية الحيوية، والمقاومة، والمضادات الحيوية،

ESBL