



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي



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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية  
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Moléculaire et Santé

**Intitulé :**

*L'effet du repiquage de *Klebsiella pneumoniae* sur les caractères morphologiques, biochimiques et sensibilités aux antibiotiques.*

Présenté et soutenu par : CHOUGUIAT Meriem

ZAAROUR Halima

Le : 23 /06/2016

Jury d'évaluation :

**Président du jury :** LABBANI Zelikha – Professeur – U. Constantine 1.

**Rapporteur :** Dr. ALLAG Hamoudi / YAOU Arezki – Maitre-assistant A – U. Constantine 1.

**Examineur :** MADACI Brahim – Maitre-assistant A – U. Constantine 1.

*Année universitaire  
2015 – 2016*

## *Remerciement*

C'est avec beaucoup de reconnaissance que nous adressons nos sincères remerciements d'abord à *Allah* de nous avoir donné la patience, la force et le courage d'accomplir ce travail.

Nous souhaitons remercier l'équipe du laboratoire de bactériologie de la clinique d'Urologie – Néphrologie à Daksi – Constantine et à leurs tête le Dr

*ALLAG Hamoudi* pour son aide, sa patience et son dévouement.

On tient aussi à remercier notre encadreur *YAOU Arezki* pour son professionnalisme et ses conseils précieux.

Enfin je remercie chacune des personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de notre mémoire.

*Dédicace :*

Aujourd'hui et après toutes ces années, j'ai l'honneur, mais surtout le plaisir de dédier ce travail de master à toutes les personnes qui m'aiment et m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail.

À mon père *SLIMEN*, merci mon père pour le courage que tu m'as donné durant toutes ces années. J'espère que tu es fière de moi.

À ma mère *MASSOUDA*, à la femme qui a sacrifié sa vie pour la notre, à la bougie qui fond pour nous éclairer la vie, merci ma mère.

À ma très chère sœur: *RANIA*.

À mes frères: *SEIF ADDIN, BILEL*.

À mon fiancé qui m'a toujours encouragé: *AISSA*.

À ma chère coéquipière: *MERIEM*.

À toutes mes amies et surtout mes intimes: *RIMA, ASSIA*.

À toute ma famille *ZAAROUR* ainsi qu'à mes camarades de la promotion 2015-2016 pour lesquels je porte un grand respect.

*HALIMA*

## *Dédicace :*

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, que je dédie mon  
mémoire :

À mes très chers parents *Azzeddine* et *Atika* : vous m'avez donné la vie, la  
tendresse et le courage pour réussir. Tout ce que je peux vous offrir ne pourra  
exprimer l'amour et la reconnaissance que je vous porte ; qu'Allah vous préserve  
et vous procure santé et longue vie.

À mes chers frères : *Djamel Eddine* et *El Mouatez Billeh*, merci d'être toujours  
à mes côtés. Je vous aime.

À l'aimable belle-sœur *Lyna*

À ma confidente coéquipière *Halima*

À mes amies : *Rima, Fatima, Malak et Assia* qui me sont chères

À toute personne qui m'a aidé à franchir un horizon dans ma vie...

**MERTEM**

# **L'effet du repiquage de *Klebsiella pneumoniae* sur les caractères morphologiques, biochimiques et sensibilités aux antibiotiques**

## **Résumé :**

Le repiquage consiste en l'ensemencement successif d'une même bactérie sur des milieux de culture semblables pour avoir un nombre élevé de bactéries à partir d'une seule souche de départ.

*Klebsiella pneumoniae* est une entérobactérie impliquée dans des infections sévères. Elle survient chez des malades immunodéprimés

L'objectif principal de notre travail est de déterminer l'effet des repiquages successifs sur le comportement d'une souche de *Klebsiella pneumoniae* de point de vue morphologique, biochimiques et sensibilité aux antibiotiques.

Les 19 repiquages successifs réalisés sur une souche de *Klebsiella pneumoniae*, dans des conditions de stérilisation et d'hygiène adéquates, n'ont pas d'influence sur certains paramètres étudiés (viabilité, purté, pigmentation, forme du relief, allure du contour, aspect de la surface, la taille, caractères biochimiques, et antibiogramme sauf l'IMP). Contrairement à leurs effets sur d'autres paramètres ; la forme de la bactérie vue au microscope optique après coloration de gram qui a changé suite à une agression mécanique du peptidoglycane ; la compréhension de cet événement ne peut être apportée que par des méthodes de biologie moléculaire et par observation sous microscope électronique, et l'instabilité des résultats pour l'IMP n'est probablement due qu'à la qualité des disques utilisés, à la non standardisation de l'inoculum et/ou au non respect de la chaîne de froid.

**Mots clés :** Repiquage, *Klebsiella pneumoniae*, Pureté, Viabilité, IMP.

# **the effect of subculturing *Klebsiella pneumoniae* ESBL on morphological and biochemical characters and sensitivity to antibiotics.**

## **Abstract :**

Subculturing is the act of seeding successively the same bacteria in similar growth mediums to have a high number of bacteria from just one bacterial strain.

*Klebsiella pneumoniae* is an entrobacteriaceae which is implicated in severe infections occurring in the immunocompromised patients.

The main objective of our work is to point out successive subculturing effect on the bacterial attitude of a *klebsiella pneumoniae* strain from a morphological, biochemical and antibiotic sensitivity perspective.

The 19 successive subculturings realised on a *klebsiella pneumoniae* strain, in correct sterilisation conditions and hygiene, have no influence on some studied parameters (viability, purity, pigmentation, shape, size, biochemical characters and antibiogram excepting the IMP). Unlike their effects on other parameters, the bacteria's shape seen through optic microscope after gram coloration changed owing to peptidoglycan mechanical abrasion ; this event can be understood by molecular biology methods and observation through electronic microscope, and the results instability for the IMP is probably due to the used discs quality, the inoculum non-standardisation and/or the disrespect of the cold chain.

**Keywords :** subculturing, *klebsiella pneumoniae*, purity, viability, IMP

## تأثير عملية إعادة زرع الكلبسيية الرئوية على مميزاتها المورفولوجية، والخصائص الكيميائية الحيوية والحساسيات لبعض المضادات الحيوية.

### ملخص:

الزرع يتوقف على الزراعة المتتالية لنفس البكتيريا في وسط زرع مشابه من اجل عدد كبير من البكتيريا انطلاقا من سلالة واحدة.

الكلبسيية الرئوية هي *entérobactérie* مسؤولة عن العديد من التهابات الحادة. ويحدث ذلك في المرضى الذين يعانون من نقص المناعة.

الهدف الرئيسي لعملانا هو تحديد تأثير الزراعة المتتالية على سلوك سلالة من الكلبسيية الرئوية شكليا، وقابلية البيوكيميائية والمضادات الحيوية.

انجاز 19 عملية إعادة زرع متتالية لنفس البكتيريا الكلبسيية الرئوية في ظروف التعقيم والنظافة الكافية، لم يحدث تأثير على بعض المعايير المدروسة (النقاء، قابلية العيش ، تصبغ، محيط الشكل والمظهر السطح والحجم والخصائص الكيميائية الحيوية والحساسية للمضادات الحيوية إلا IMP).

خلافا لتأثيرها على غيرها من المعايير. شكل بكتيريا عرض بالمجهر الضوئي بعد صبغة جرام التي تغيرت بسبب هدم بيتيدوغليكان.فهم هذا الحدث يمكن أن يتم إلا من خلال الطرق البيولوجية الجزيئية وعن طريق الملاحظة تحت المجهر الإلكتروني، وعدم استقرار النتائج ل IMP وربما يرجع ذلك إلى نوعية الأقراص المستخدمة، وغير توحيد اللقاح و / أو عدم الامتثال لسلسلة التبريد.

**كلمات البحث:** زرع، الكلبسيية الرئوية، النقاء، قابلية العيش ، IMP.

## Liste des abréviations :

**ADN** : d'acide désoxyribonucléique.

**ODC** : ornithine décarboxylase.

**ADH** : Arginine déshydrogénase.

**H<sub>2</sub>S** : Thiosulfate de sodium.

**K.** : Klebsiella.

**KES** : Klebsiella, Enterobacter et Serratia

**E. Coli** : Escherichia coli.

**VP** : Réaction de Voges-Proskauer.

**ONPG** : Ortho nitro-phényle-galactoside.

**BLSE** : Bétalactamase à spectre élargi

**Kp** : Klebsiella pneumoniae

**TSI** : Triple Sugar Iron.

**TDA** : Tryptophane désaminase.

**ONP** : Orthonitrophénol

**API 20 E** : Système d'identification des Enterobacteriaceae.

**Na Cl** : Chlorure de sodium.

**NH<sub>3</sub>** : Ammoniac.

**MH** : Mueller Hinton

**CN** : Gentamycine.

**AMC** : Augmentin.

**FOX** : Cefoxitine.

**CRO** : Ceftriaxone.

**AM** : Ampiciline.



**SXT** : Bactrim.

**AK** : Amikacine.

**CT** : Colistine.

**CIP** : Ciprofloxacine.

**CZ** : Cefazoline.

**F** : Furanes.

**IMP** : Imipenem.

**NA** : Ac. Nalidixique

**Rp** : Repiquage

**R** : résistance.

**S** : Sensible.

**BGN** : Bacilles gram négative.

**Co2** : Dioxyde de carbone.

**H** : Hydrogène

**LDL** : lysine décarboxylase

**ODC** : thine décarboxylase

**CIT** : Citrate

**URE** : Urée

**TDA** : Tryptophane désaminase

**IND** : Indole

**GEL** : Glucose

**GLU** : Glucose

**MAN** : Mannitol

**INO** : Inositol

**SOR** : Sorbitol

**RHA** : Rhamnose

**SAC** : Saccharose

**MEL** : Melibiose

**AMY** : amygdaline

**ARA** : arabinose

## Liste des figures :

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1</b> : mécanisme de résistance à l'antibiotique.....  | 8  |
| <b>Figure 2</b> : schéma représentant un antibiogramme.....  | 9  |
| <b>Figure 3</b> : La gélose Hektoen.....   | 11 |
| <b>Figure 4</b> : La gélose Mueller-Hinton (Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima).....   | 12 |
| <b>Figure 5</b> : La gélose TSI.....   | 12 |
| <b>Figure 6</b> : Citrate de Simmons.....  | 13 |
| <b>Figure 7</b> : L'urée.....  | 13 |
| <b>Figure 8</b> : Disque d'ONPG dans de l'eau distillée.....   | 14 |
| <b>Figure 9</b> : La galerie API 20 E (Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima).....  | 14 |
| <b>Figure 10</b> : Résultat de l'ensemencement de <i>Klebsiella pneumoniae</i> sur Hektoen (Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima)..... | 18 |
| <b>Figure 11</b> : Ampoule d'API 20 E Na Cl 0,85 % Medium (3 ml) (Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima).....                           | 21 |
| <b>Figure 12</b> : Détail d'un tube.....   | 22 |
| <b>Figure 13</b> : La galerie API 20 E après remplissage (Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima).....                                   | 22 |
| <b>Figure 14</b> : La galerie API 20 E après incubation (Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima).....                                    | 22 |
| <b>Figure 15</b> : Les réactifs ajoutés à la galerie API 20 E après incubation (Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima).....             | 23 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 16 :</b> Le résultat après l'ajout des réactifs (Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima).....   | 23 |
| <b>Figure 17 :</b> La méthode d'ensemencement de citrate de Simmons.....  | 25 |
| <b>Figure 18 :</b> Milieu de citrate de Simmons.....  | 26 |
| <b>Figure 19 :</b> Les différents résultats de la gélose TSI.....   | 27 |
| <b>Figure 20 :</b> Résultats urée-indole après incubation.....  | 28 |
| <b>Figure 21 :</b> Résultats après l'ajout du Kovacs pour lire l'Indole.....  | 28 |
| <b>Figure 22 :</b> Milieu ONPG.....   | 29 |
| <b>Figure 23 :</b> Résultats de l'ONPG.....   | 30 |
| <b>Figure 24 :</b> Gélose Mueller-Hinton.....   | 30 |
| <b>Figure 25 :</b> L'ensemencement de l'inoculum sur MH.....  | 31 |
| <b>Figure 26 :</b> Application des disques d'antibiotiques (Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima).....  | 32 |
| <b>Figure 27:</b> les résultats de différents repiquages sur milieu Hektoen. Laboratoire de bactériologie clinique d'Urologie – Néphrologie Daksi – Constantine. (Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima).....                    | 36 |
| <b>Figure 28 :</b> Gram- et forme bacille de <i>Klebsiella pneumoniae</i> sous microscope.....  | 37 |
| <b>Figure 29 :</b> Gram – et forme coccobacille d <i>Klebsiella pneumoniae</i> sous microscope.....   | 37 |
| <b>Figure 30 :</b> Lecture de la galerie miniaturisée API 20 E après incubation à l'étuve 37°C. Laboratoire de bactériologie clinique d'Urologie – Néphrologie Daksi – Constantine. (Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima)..... | 39 |
| <b>Figure 31:</b> milieu au citrate de Simmons ensemencé avec la <i>Klebsiella pneumoniae</i> . Laboratoire de bactériologie clinique d'Urologie–Néphrologie Daksi – Constantine . (Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima).....  | 41 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 32 :</b> milieu TSI ensemencé par <i>Klebsiella pneumoniae</i> . Laboratoire de bactériologie clinique d’Urologie – Néphrologie Daksi – Constantine ... (Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima).....  | 42 |
| <b>Figure 33 :</b> milieu urée ensemencé par <i>Klebsiella pneumoniae</i> . Laboratoire de bactériologie clinique d’Urologie – Néphrologie Daksi – Constantine . (Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima).....   | 42 |
| <b>Figure 34 :</b> Après l’ajout du Kovacs. Laboratoire de bactériologie clinique d’Urologie – Néphrologie Daksi –Constantine . (Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima).....                                    | 43 |
| <b>Figure 35 :</b> milieu ONPG ensemencé avec <i>Klebsiella pneumoniae</i> . Laboratoire de bactériologie clinique d’Urologie – Néphrologie Daksi – Constantine... (Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima)..... | 43 |
| <b>Figure 36 :</b> les résultats de l’antibiogramme. Laboratoire de bactériologie clinique d’Urologie – Néphrologie Daksi – Constantine . (Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima).....                          | 45 |

## Liste des tableaux :

- ❖ **Tableau I** : Systématique de *Klebsiella pneumoniae*.....3
- ❖ **Tableau II** : Caractères différentiels de *Klebsiella pneumoniae*.....6
- ❖ **Tableau III** : Tableau de lecture de la galerie miniaturée API 20 E.....24
- ❖ **Tableau IV** : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CIM pour Entérobactéries.....33
- ❖ **Tableau V** : les caractéristiques macroscopiques de *Klebsiella pneumoniae* cultivée sur milieu Hektoen après incubation 37°C.....34
- ❖ **Tableau VI** : Les paramètres biochimiques de *Klebsiella pneumoniae* lus par la galerie API 20 E après Incubation à 37°C.....38
- ❖ **Tableau VII** : Les paramètres biochimiques de *Klebsiella pneumoniae* lus par la galerie classique après Incubation à 37°C.....40
- ❖ **Tableau VIII** : Le comportement de *Klebsiella pneumoniae* vis-à-vis certains antibiotiques.....44
- ❖ **Tableau IX** : Le diamètre de la zone d'inhibition de l'IMP.....44

## SOMMAIRE:

|                   |   |
|-------------------|---|
| INTRODUCTION..... | 1 |
|-------------------|---|

### **I. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

|   |          |
|---|----------|
| <b>I.1</b> Systématique et classification.....              | <b>3</b> |
| <b>I.2.</b> Habitat et épidémiologie.....                   | <b>3</b> |
| <b>I.3.</b> Pouvoir pathogène.....                          | <b>4</b> |
| I.3.1 Les infections broncho pulmonaires.....               | 4        |
| I.3.2 Les infections urinaires.....                         | 4        |
| I.3.3 Les infections localisées.....                        | 4        |
| I.3.4 Les septicémies.....                                  | 5        |
| <b>I. 4</b> Diagnostique bactériologique.....               | <b>5</b> |
| I.4.1 Prélèvement .....                                     | 5        |
| I.4.2 Caractères bactériologiques .....                     | 5        |
| <b>I.5</b> Les facteurs de virulence.....                   | <b>6</b> |
| <b>I.6</b> Traitement et sensibilité aux antibiotiques..... | <b>7</b> |
| I.6.1 Mécanisme de résistance aux antibiotiques.....        | 7        |
| I.6.2 Traitement.....                                       | 9        |
| I 6.3 Résistance de Klebsiella aux antibiotiques.....       | 9        |

### **II. MATERIELS ET METHODES**

|                                    |           |
|------------------------------------|-----------|
| Type d'étude, date et lieu.....    | 11        |
| <b>II.1</b> Matériels.....         | <b>11</b> |
| <b>II.1.1</b> Souche utilisée..... | <b>11</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>II.1.2 Les milieux de culture .....</b>                                   | <b>11</b> |
| <b>II.1.3 Produits.....</b>  | <b>15</b> |
| <b>II.1.4 Réactifs.....</b>  | <b>15</b> |
| <b>II.1.5 Autres matériels.....</b>  | <b>15</b> |
| <b>II.2 Méthodes.....</b>  | <b>16</b> |
| <b>II.2.1 L'isolement des bactéries de <i>Klebsiella pneumoniae</i>.....</b> | <b>16</b> |
| <b>II.2.2 Repiquage.....</b>   | <b>17</b> |
| <b>II.2.3 Ensemencement.....</b>   | <b>17</b> |
| <b>II.2.4 Incubation.....</b>  | <b>18</b> |
| <b>II.2.5 IDENTIFICATION.....</b>  | <b>18</b> |
| II.2.5.1 Aspect macroscopique (colonies).....                                | 19        |
| II.2.5.2 L'aspect microscopique.....   | 19        |
| a. État frais entre lame et lamelle.....                                     | 19        |
| b. Coloration de gram.....   | 19        |
| II.2.5.3 caractères biochimiques (galerie API 20 NE, gaerie classique).....  | 20        |
| a. Caractères biochimiques de la galerie API 20 NE .....                     | 20        |
| b. Caractères biochimiques (la galerie classique).....                       | 24        |
| II.2.5.4 Antibiogramme .....   | 30        |
| a. Définition .....  | 30        |
| b. Préparation de l'inoculum.....  | 31        |
| c. Ensemencement.....  | 31        |
| d. Application des disques d'antibiotiques.....                              | 31        |
| e. Listes des antibiotiques utilisés.....                                    | 32        |
| f. Incubation.....   | 33        |
| g. Lecture d'antibiogramme.....  | 33        |



### **III. RESULTATS ET INTERPRITATIONS**

#### **III.1 LES CARACTERISTIQUES MACROSCOPIQUES DE LA SOUCHE**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>BACTERIENNE.....</b>                      | <b>34</b> |
| La pureté.....                               | 34        |
| La viabilité.....                            | 35        |
| Pigmentation .....                           | 35        |
| La forme, allure, aspect des colonies :..... | 35        |

#### **III.2 Les caractéristiques microscopiques.....36**

|                         |    |
|-------------------------|----|
| Etat frais.....         | 36 |
| Coloration de Gram..... | 36 |

#### **III.3 Les paramètres biochimiques .....38**

|                            |    |
|----------------------------|----|
| La galerie API 20 E .....  | 38 |
| La galerie classique ..... | 40 |

#### **III.4 Le comportement vis-à-vis certains antibiotiques .....44**

|                        |           |
|------------------------|-----------|
| <b>CONCLUSION.....</b> | <b>46</b> |
|------------------------|-----------|

#### **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....47**

|                      |           |
|----------------------|-----------|
| <b>ANNEXES .....</b> | <b>49</b> |
|----------------------|-----------|

# Introduction

# Introduction

Le repiquage est le prélèvement d'une petite partie d'une culture de bactérie pour la transplanter sur un milieu neuf où elle continuera sa croissance. Il est nécessaire pour obtenir un nombre de bactérie correcte.

Le repiquage se fait par la culture de bactéries dans un milieu nutritif à 37°C pendant 24 heures.

Le repiquage permet de :

- ✓ Isoler les bactéries pour les dénombrer en cas de contrôle sanitaire.
- ✓ Identifier une bactérie en cas d'une souche pure.
- ✓ Réaliser un antibiogramme à partir d'une colonie pure afin de déterminer la sensibilité de la bactérie et de trouver un traitement adapté à une infection.
- ✓ Avoir un nombre important de bactéries à partir d'une colonie pure pour d'éventuelles utilisations.

Le repiquage nécessite des conditions de travail rigoureuses telles que la stérilisation du matériel et l'hygiène du manipulateur pour éviter toute contamination de la souche en question et de l'environnement y compris le manipulateur.

L'espèce *Klebsiella pneumoniae* la plus fréquemment isolée chez l'homme est *Klebsiella pneumoniae*. Ce germe est à l'origine de certaines infections communautaires (comme celles des poumons et plus spécifiquement des bronches ...) et d'infections nosocomiales plus spécifiquement chez les sujets fragilisés comme les diabétiques, les personnes âgées ou encore les alcooliques.

L'usage croissant et massif d'antibiotiques a induit une certaine résistance des bactéries envers ces substances.

Ce phénomène de résistance bactérienne aux antibiotiques est devenu un problème alarmant.

Récemment, *Klebsiella pneumoniae* s'est avérée résistante à différents antibiotiques comme les céphalosporines de troisième génération et les aminosides les plus récents. Cette résistance est due au fait que *Klebsiella* est l'hôte privilégié de certains éléments appelés des plasmides. Les plasmides sont des corps formés d'un fragment d'acide désoxyribonucléique (ADN) sans relation avec le chromosome.

# Introduction

---

Objectif du travail :

L'objectif principal de notre travail est de déterminer l'effet des repiquages successifs sur le comportement d'une souche de *Klebsiella pneumoniae* de point de vue morphologique, biochimiques et sensibilité aux antibiotiques.

# Chapitre I:

## Partie bibliographique

### I.1 Systématique de *Klebsiella* :

Les *Klebsiella* sont des enterobacteriaceae toujours immobiles, possédant généralement une capsule et fermentant de nombreux glucides elles ne possèdent ni ODC ni ADH, ni lipase et ne produisent pas d'H<sub>2</sub>S.

6 espèces sont usuellement reconnues.

Quatre espèces ont un pouvoir pathogène pour l'homme :

1. *K.pneumoniae* (espèce-type)
2. *K. oxytoca*
3. *K. ozaenae*
4. *K. rhinoscleromatis*

Deux espèces sont trouvées dans l'environnement et sont rarement pathogènes, ce sont :

1. *K. terrigena*
2. *K. planticola* [2]

**Tableau I** : Systématique de *Klebsiella pneumoniae*. [13]

|                      |                             |
|----------------------|-----------------------------|
| <b>Règne</b>         | <b>Bacteria</b>             |
| <b>Embranchement</b> | <b>Proteobacteria</b>       |
| <b>Classe</b>        | <b>Gamma Proteobacteria</b> |
| <b>Ordre</b>         | <b>Enterobacteriales</b>    |
| <b>Famille</b>       | <b>Enterobacteriaceae</b>   |
| <b>Genre</b>         | <b><i>Klebsiella</i></b>    |
| <b>Espèce</b>        | <b><i>K.pneumoniae</i></b>  |

### I.2 Habitat et épidémiologie :

*K. pneumoniae* et *K. oxytoca* sont les espèces les plus souvent rencontrées. Elles sont fréquemment isolées des eaux, du sol et des végétaux elles sont présentes dans la flore fécale de l'homme et sont souvent commensales de la peau, des muqueuses et des voies respiratoires.

Les malades s'infectent soit avec leurs propres souches soit avec des souches responsables de petites épidémies hospitalières. Elles sont alors manuportées de malade à malade. [3]

### **I.3 Pouvoir pathogène :**

Klebsiella est responsable de près de 10 à 30% des infections nosocomiales. Leur pathogénicité s'exprime habituellement chez des malades affaiblis, traités par les antibiotiques, chez qui elles sont parfois inoculées directement par un geste à visée diagnostique ou thérapeutique. [10]

#### **I.3.1 Les infections broncho-pulmonaires :**

*K.pneumoniae* est la plus souvent rencontrée lors des infections broncho-pulmonaires, représentant 1 à 5% de toutes les pneumonies bactériennes. Quel que soit le germe en cause, le syndrome clinique est celui d'une pneumonie à début brutal, avec douleur thoracique, fièvre accompagnée de crachats souvent hémoptoïques. Cependant, ces signes sont souvent atténués ou au second plan. L'atteinte pulmonaire peut même être une découverte radiologique, en particulier chez les malades trachéotomisés ou insuffisants respiratoires soumis à une antibiothérapie, le plus souvent, il s'agit d'une pneumonie alvéolaire, plus rarement d'une broncho-pneumonie, avec tendance à l'abcédation multiple. [10]

#### **I.3.2 Les infections urinaires :**

Klebsiella est responsable de près de 20 % des infections urinaires nosocomiales, et peut être retrouvée chez près de 50 % des malades opérés ou sondés, avec une nette prédominance de *K.pneumoniae*. Ces infections sont tenaces, souvent localisées à la vessie (cystite) et en général assez bien tolérées. Cependant, il existe un important risque pyélonéphrite et surtout de dissémination septicémique. [10]

#### **I.3.3 Les infections localisées :**

Klebsiella est responsable d'une série d'infections nosocomiales secondaires à des soins ou des gestes chirurgicaux : infections cutanées, vasculaires (cathéter), péritonéales, oto-rhino-laryngologiques, génitales, ou vasculaires. *K.pneumoniae* a été incriminée comme l'agent responsable de certaines épidémies de gastro-entérite infantile, sur

l'observation d'une forte prédominance de ces bactéries dans les selles d'enfants diarrhéiques. Cependant le rôle de ces bactéries dans le déclenchement de ces diarrhées reste controversé. [10]

#### **I.3.4 Les septicémies :**

Klebsiella peut essaimer par voie sanguine à partir d'un foyer cutané ou muqueux. La septicémie peut parfois être secondaire à une inoculation directe des bactéries dans le sang par du matériel souillé (cathéter). Le pronostic de ces septicémies est souvent sévère car, d'une part, elles surviennent chez des malades immunodéprimés et d'autre part ces bactéries sont souvent résistantes à de nombreux antibiotiques.

De plus ces septicémies peuvent être associées à un choc endotoxinique sévère dans plus de 20 % des cas et s'accompagne de métastases infectieuses (poumons, pancréas, foie, os, cerveau, méninges, articulations ...) retrouvées chez 5 % des malades. La mortalité reste élevée malgré une antibiothérapie adaptée. [10]

#### **I.4 Diagnostique bactériologique :**

Les Klebsiella font partie des bactéries du groupe KES, ce sont des bacilles à gram négatif classées parmi les entérobactéries. Ces micro-organismes sont aéro-anaérobies, à métabolisme fermentatif et se cultivent facilement sur des milieux simples ou sur milieux sélectifs en 24 heures à 37°C. [11]

##### **I.4.1 Prélèvement :**

Les Klebsiella sont isolées en culture à partir des crachats, des lavages alvéolaires ou ponctions transtrachéales, dans le cas des pneumopathies. On peut également facilement les isoler à partir des urines, ou de prélèvement de pus divers. [12]

##### **I.4.2 Caractères bactériologiques :**

###### **Aspects des colonies :**

Sur milieux usuels, les Klebsiella donnent après une incubation de 24 heures à 37°C des colonies généralement lactose (+), rondes, de 3 à 4 mm de diamètre, bombées, muqueuses et ayant une tendance à la confluence.



Cet aspect muqueux, en relation avec la présence habituelle d'une capsule plus ou moins volumineuse, est parfois observée avec d'autres Enterobacteriaceae notamment certaines souches de *E. coli*. [4]

#### Caractères biochimiques :

*Klebsiella pneumoniae* est VP (+), ONPG (+), LDC (+) et attaque le glucose en produisant beaucoup de gaz.

La majorité des souches de *K.pneumoniae* est uréase (+) en milieu urée-indole, les souches uréase (-) de *K.pneumoniae* sont parfois confondues avec *Enterobacter aerogenes* qui s'en distingue par la mobilité et l'ODC.[4]

**Tableau II** : Caractères différentiels de *K.pneumoniae*. [5]

|                       | <i>K.pneumoniae</i> |
|-----------------------|---------------------|
| <b>ONPG</b>           | +                   |
| <b>Indole</b>         | -                   |
| <b>Malonate</b>       | +                   |
| <b>Uréase</b>         | +                   |
| <b>Mobilité</b>       | -                   |
| <b>ODC</b>            | -                   |
| <b>Carbénicilline</b> | <b>R</b>            |

#### I.5 Les facteurs de virulence :

Le pouvoir pathogène et la virulence de *Klebsiella* seraient liés à plusieurs facteurs :

1-Sa capsule de polysaccharides ; Elle confère à *Klebsiella pneumoniae* un fort pouvoir invasif en protégeant les bactéries de la phagocytose et dans une certaine mesure de certains désinfectants. C'est cette capsule volumineuse de nature polysaccharidique explique l'aspect gluant et bombé des colonies sur les milieux usuels. Son rôle est encore mal compris, avec des résultats différents pour les études in vivo et in vitro.

2-une production de sidérophores,

3-une production de lipopolysaccharide (LPS)

4-une production d'un complexe extracellulaire (toxique pour les tissus pulmonaires notamment). On sait que cet effet est lié à la capsule, car il disparaît en présence d'isolats de bactéries vivantes mais non capsulées. De plus la cytotoxicité des souches non capsulées est restaurée par simple ajout de capsules extraites par purification d'un isolat capsulé.

5-une production d'adhésine lui permettant de produire des biofilms.

6-Klebsiella ozaenae n'est pas l'agent de l'ozène mais peut être pathogène dans les voies respiratoires et leurs annexes.

7-Klebsiella rhinoscleromatis est l'agent spécifique du rhinosclérome. [14]

## **I.6 Traitement et sensibilité aux antibiotiques :**

Les antibiotiques antibactériens sont des molécules qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Cette propriété les distingue des antiseptiques. Les antibiotiques, au sens strict, sont des produits élaborés par des micro-organismes, mais on inclut généralement parmi eux les dérivés semisynthétiques et les produits entièrement synthétiques.[1]

### **I.6.1 Mécanisme de résistance aux antibiotiques :**

#### **Définition de la résistance :**

Une espèce bactérienne peut être résistante à un antibiotique, de fait de sa structure cellulaire ou de son métabolisme. On parle alors de résistance naturelle ou constitutionnelle et la souche est qualifiée de sauvage car non modifiée. Les bactéries peuvent également acquérir des moyens nouveaux pour résister à l'action de tel ou tel antibiotique. On parle alors de résistance acquise. [7]

Trois groupes de mécanismes de résistance sont classiquement décrits :

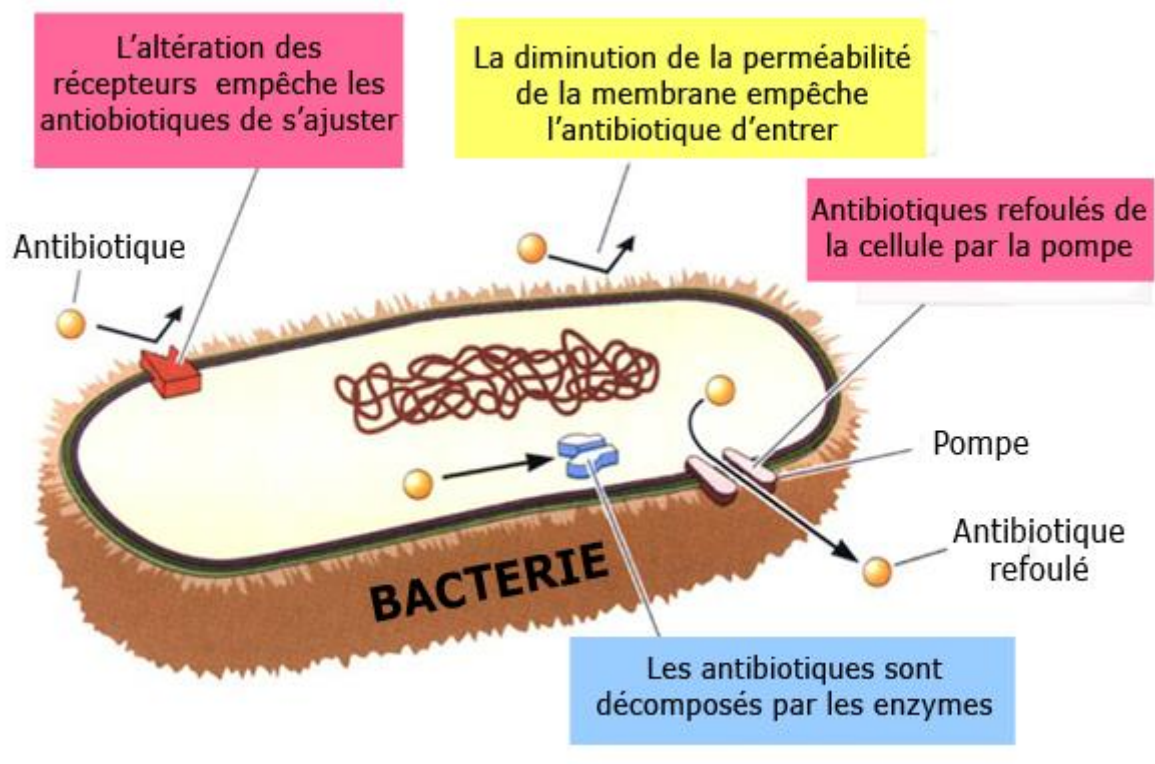
1-La modification de la cible biochimique de l'antibiotique la rendant inapte à fixer l'antibiotique (exemple la résistance aux quinolones).

2-La production d'enzyme détruisant les antibiotiques\_(exemple des bêta lactamases).

3- Une imperméabilité à l'antibiotique qui ne peut plus atteindre sa cible (modification des porines).

Il faut ajouter des mécanismes moins fréquents comme la synthèse par la bactérie de protéines de séquestration qui peuvent fixer de façon irréversible l'antibiotique l'empêchant de gagner sa cible, la surproduction de la cible qui déborde les capacités de fixation de l'antibiotique ou la dérégulation de la synthèse d'une enzyme détruisant l'antibiotique qui augmente de façon importante la quantité d'enzyme produite par les souches sauvages. Des systèmes d'efflux peuvent également assurer le pompage vers l'extérieur des antibiotiques ayant pénétré dans la cellule.

Ces mécanismes peuvent exister dans les souches sauvages, ils confèrent alors une résistance naturelle. Ils peuvent également apparaître chez une souche naturellement sensible grâce à des variations génétiques qui font émerger des gènes de résistance. [8]

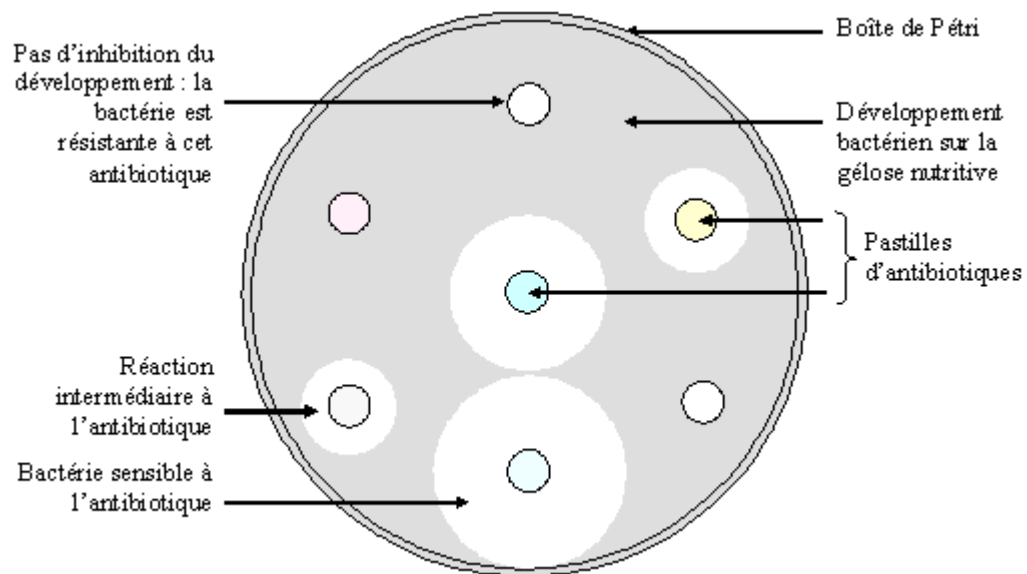


**Figure 1** : mécanisme de résistance à l'antibiotique.

### I.6.2 Traitement :

L'antibiogramme, après prélèvement, permet de déterminer avec précision le ou les antibiotiques actifs contre *Klebsiella*.

L'antibiogramme est le résultat, obtenu au laboratoire d'analyses biologiques, d'un test destiné à montrer la sensibilité d'un germe microbien (bactérie, parasite, champignon) à divers antibiotiques, en vue de sélectionner l'antibiotique le plus efficace pour lutter contre ce germe. [15]



**Figure 2** : schéma représentant un antibiogramme.

### I 6.3 Résistance de *Klebsiella* aux antibiotiques :

Les *Klebsiella* ont une résistance naturelle à l'ampicilline et la carbénicilline. Elles sont normalement sensibles aux céphalosporines. Des mutants de TEM et SHV1, décrits depuis la fin des années 1980, sont capables d'hydrolyser les céphalosporines à large spectre et les monobactames. Ces bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) sont particulièrement rencontrées chez *K.pneumoniae*. Les céphamycines, le moxalactam et les carbapénèmes ne sont pas touchés. Ces nouvelles bêta-lactamase plasmidiques sont inhibées par l'acide clavulanique. Plus récemment ont été décrits des mutants résistants aux inhibiteurs de pénicillinases (TRI pour TEM résistant aux inhibiteurs).

La majorité des souches héberge des plasmides R qui les rendent résistantes à de nombreux antibiotiques. [6]

# Chapitre II :

## Matériel et méthodes

Notre étude a été effectuée au niveau du laboratoire de bactériologie de la clinique d'Urologie – Néphrologie à Daksi – Constantine qui s'est étalé sur une période d'un mois et demi (1 mars – 14 avril) de l'année 2016, pour Déterminer l'effet des repiquages successifs sur le comportement de *Klebsiella pneumoniae* vis-à-vis ces différents paramètres ; morphologiques, biochimiques et sensibilité aux antibiotiques.

## II. Matériel et méthodes :

### II .1 Matériel :

#### II.1.1 Souche utilisée :

La souche incluse est *Klebsiella pneumoniae*, isolée à partir d'un prélèvement urinaire, chez un patient ambulatoire (58ans) le 06 mars 2016.

#### II.1.2 Milieux de culture :

##### La gélose Hektoen :

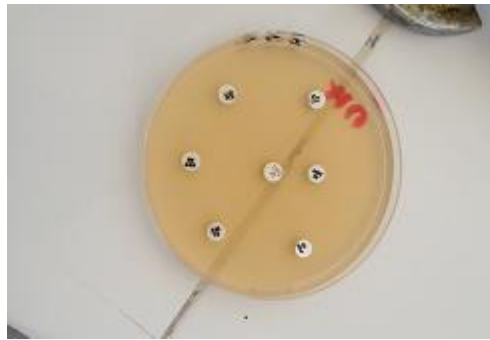
La gélose Hektoen est un milieu sélectif permettant les isolements et différenciation des entérobactéries pathogènes à partir des prélèvements biologiques d'origine animale, des eaux, des produits laitiers et des autres produits alimentaires. [16]



**Figure 3 :** La gélose Hektoen.

**La gélose de MUELLER-HINTON :**

La gélose de Mueller Hinton est reconnue par tous les experts comme étant le milieu de référence pour l'étude de la sensibilité des germes aux antibiotiques. [17]



**Figure 4 :** La gélose Mueller-Hinton. (Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima)

**La gélose TSI :**

La gélose TSI (Triple Sugar Iron) permet l'identification des entérobactéries par la mise en évidence rapide de la fermentation du lactose, du glucose (avec ou sans production de gaz), du saccharose et de la production de sulfure d'hydrogène. [18]



**Figure 5 :** La gélose TSI.



**Citrate de Simmons :**

Le citrate de Simmons est un milieu de culture utilisant le citrate comme seule source de carbone. [19]



**Figure 6 :** Citrate de Simmons.

**Urée-Indole :**

Permet la recherche de 3 activités enzymatiques :

- 1- L'uréase
- 2- La tryptophane désaminase (TDA)
- 3- La production d'indole grâce à une tryptophanase.



**Figure 7 :** L'urée.

**L'ONPG (orthonitrophényl- $\beta$ -galactoside) :**

L'ONPG est incolore. Son hydrolyse par une  $\beta$ -galactosidase libère du galactose et de l'orthonitrophénol (ONP), composé de couleur jaune en milieu alcalin. [20]



**Figure 8 :** Disque d'ONPG dans de l'eau distillée.

**La galerie API 20 E :**

API 20 E est un système pour l'identification des Entérobactériaceae et autres bacilles gram – non fastidieux, utilisant 23 tests biochimiques standardisés et miniaturisés.20



**Figure 9 :** La galerie API 20 E. (Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima)

**II.1.3 Produits :**

- Bouillon nutritif
- Huile à immersion
- Lugol
- Fushin
- Alcool
- Cristal violet
- Eau distillée
- Disques d'antibiotiques

**II.1.4 Réactifs :**

- Kovacs
- VP1 et VP2
- DTA

**II.1.5 Autres matériels :**

- Portoir
- Ecouillons
- Lames et lamelles
- pince
- Bec benzène
- Etuve d'incubation
- Microscope optique
- Pipettes Pasteur

**II.2 Méthodes :****II.2.2 L'isolement des bactéries de *Klebsiella pneumoniae* :****Méthode à l'anse calibrée :**

Une anse calibrée à 10 µl est utilisée pour ensemercer les géloses nutritives et l'hektoen. On prélève verticalement avec l'anse calibrée et par capillarité une goutte d'urine que l'on ensemece par stries sur la boite de gélose : une strie centrale est ensemencée puis perpendiculairement réaliser un isolement de haut en bas de la boite en desserrant légèrement les dernières stries.

**Incubation :**

Les géloses sont incubées à une température de 37°C pendant 24 heures.

**Lecture :**

On observe sur les géloses de différentes colonies de bactéries.

Sur gélose hektoen, on observe les bactéries du groupe Enterobacter, à partir de l'hektoen on réalise des galeries classiques pour identifier les bactéries présentées sur la gélose.

**Incubation :**

Les galeries sont incubées à une température de 37°C pendant 24 heures.

**Lecture :**

Après avoir lu les caractères biochimiques présentés par les galeries classiques, les différentes bactéries sont identifiées.

A partir d'une colonie déjà identifiée de *Klebsiella pneumoniae* poussée sur gélose hektoen, on réalise le 1<sup>er</sup> repiquage.

### II.2.3 Repiquage :

Le repiquage c'est le prélèvement d'une petite partie de bactéries pour la transplanter sur un milieu neuf où elle continuera sa croissance.

Dans notre travail nous avons réalisé les repiquages suivants :

-Le premier a été fait à partir d'une colonie déjà identifiée, poussée sur hektoen et transplantée sur un milieu neuf d'hektoen, afin de bien isoler notre bactérie *Klebsiella pneumoniae*.

- Les autres repiquages jusqu'au 19<sup>ème</sup> ont été fait de la même manière c'est-à-dire d'une colonie sur hektoen à un autre milieu neuf d'hektoen.

### II.2.4 Ensemencement :

L'ensemencement consiste en le dépôt dans un milieu neuf des germes prélevés à partir d'un milieu de culture mère. Il est en général effectué avec une anse en platine ou une pipette pasteur. Que ça soit l'anse ou la pipette pasteur le passage préalable dans la flamme est obligatoire pour éviter toute contamination de notre souche (*Klebsiella pneumoniae*).

Les méthodes d'ensemencement utilisées sont :

- 1- la méthode de l'anse calibrée pour l'ensemencement des urines sur géloses.
- 2- La 2<sup>ème</sup> méthode est pour l'ensemencement des bactéries sur Hektoen :  
Ensemencer la bactérie sur l'hektoen par des stries serrés en terminant par des tries larges.



**Figure 10 :** Résultat de l'ensemencement de *Klebsiella pneumoniae* sur Hektoen.  
(Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima)

### II.2.5 Incubation :

En bactériologie l'incubation correspond au passage d'une culture dans une étuve bactériologique à une température et pendant une durée déterminée, afin de conférer aux bactéries les conditions favorables qui leur permet de pousser sur tel ou tel milieu de culture.

Durant notre travail, les bactéries ensemencées sur gélose Hektoen ont été incubées dans une étuve à 37°C pendant 24 heures. Cependant les bactéries ensemencées sur les galeries API 20 E et la Galerie classique et même les antibiogrammes ont été incubées dans une étuve de 37°C pendant 24 heures.

### II.2.6 Identification :

L'identification des bactéries se fait suivant des caractères les plus vastes aux plus pointus pour aboutir à une espèce bactérienne donnée.

### II.2.6.1 L'aspect macroscopique (colonies) :

C'est l'observation macroscopique des colonies.

Une colonie est l'amas, visible à l'œil nu, constitué par des milliards de descendants d'une seule cellule bactérienne et dont la taille, la forme, la couleur, la consistance sont caractéristiques de chaque espèce.

L'étude de l'aspect des colonies nécessite l'observation à l'œil nu, en lumière naturelle et artificielle, par éclairage direct et par transparence des colonies.

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué à partir de l'isolement après incubation. L'aspect des colonies dépend du milieu utilisé, de la durée et de la température de l'incubation. Il ne pourra être décrit convenablement qu'à partir de colonies bien isolées

Les colonies sont d'autant plus petites qu'elles sont rapprochées.

### II.2.6.2 L'aspect microscopique :

L'observation microscopique permet de faire une étude morphologique des cellules d'une espèce microbienne. Elle comprend :

- L'examen à l'état frais (examen entre lame et lamelle des bactéries vivantes)
- L'examen après coloration (le plus souvent sur frottis séchés et fixés).

#### a. État frais entre lame et lamelle :

C'est une méthode rapide qui consiste à observer entre lame et lamelle une suspension bactérienne à l'objectif 40. Les bactéries sont vivantes, on peut alors déterminer des caractères tels que la morphologie générale, la mobilité et le groupement (bacille ou coque) ainsi que le type de colonies.

#### b. Coloration de Gram :

- Réaliser le frottis ou un étalement
- Fixer la préparation à la flamme, sécher soigneusement puis laisser refroidir la lame.

- Immerger les lames dans la solution de Cristal Violet pendant 1min.
- Lavage à l'eau transvasant les lames.
- Immerger les lames dans du Lugol en les agitant pendant 1min.
- Laver à nouveau à l'eau.
- Décolorer jusqu'à disparition de la couleur violette dans l'alcool en faisant couler goutte à goutte sur la lame inclinée en immergeant les lames pendant 30 secondes
- Laver à l'eau.
- Contre colorer avec la solution de Fushin pendant 1min.
- Laver à l'eau et sécher à l'air.
- Observer à l'objectif 100, en immersion avec de l'huile.

**Lecture :**

Les bactéries gram + sont colorées en violet, les bactéries gram – sont colorées en rose, ceci étant dû à une différence de composition de la paroi.

**II.2.6.3 Caractères biochimiques (galerie API 20 E, galerie classique) :****a. Galerie API 20 E :****Réalisation de l'inoculum :**

Ouvrir une ampoule d'API 20 E Na Cl 0,85 % Medium (3 ml). À l'aide d'une pipette prélever 1 colonie de *Klebsiella pneumoniae* sur gélose Hektoen, réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu.

L'inoculum servira au remplissage des microtubes de la galerie API 20 NE.





**Figure 11** : Ampoule d'API 20 E Na Cl 0,85 % Medium (3 ml).

(Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima)

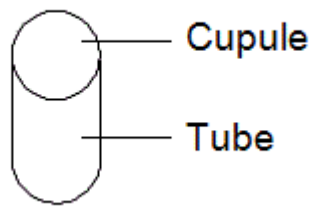
### **Le remplissage de la galerie API 20 E :**

Les alvéoles du support de la galerie doivent être remplis d'eau pour former une chambre humide, dans laquelle notre galerie est déposée, le remplissage des microtubes suit des règles bien précises :

-Pour les substrats dont le sigle est encadré, la cupule doit être totalement remplie de manière à créer un ménisque.

-Pour les substrats dont le sigle est souligné, en remplissant les tubes d'inoculum et leur cupules d'huile de paraffine pour créer l'anaérobiose (absence d'oxygène), pour maintenir en solution les ions volatils produits par la réaction et ainsi assurer le virage de l'indicateur

-Pour les substrats dont le sigle n'est ni souligné ni encadré en remplissant uniquement les tubes et non les cupules.



**Figure 12 :** Détail d'un tube.



**Figure 13 :** La galerie API 20 E après remplissage. (Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima)

#### **L'incubation :**

La galerie est incubée à une température de 37°C pendant 24 heures.

#### **La révélation et la lecture :**



**Figure 14 :** La galerie API 20 E après incubation. (Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima)

Après 24h faire sortir la galerie de l'étuve et ajouter les réactifs nécessaires :

-Indole = le réactif Kovacs

-VP = une goutte du réactif VP1 et une goutte de VP2

-TDA = une goutte du réactif TDA



**Figure 15 :** Les réactifs ajoutés à la galerie API 20 E après incubation. (Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima)























Laisser agir 2min.



**Figure 16 :** Le résultat après l'ajout des réactifs. (Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima)

La galerie est lue conformément aux indications du fabricant.

**Tableau III :** Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 E.

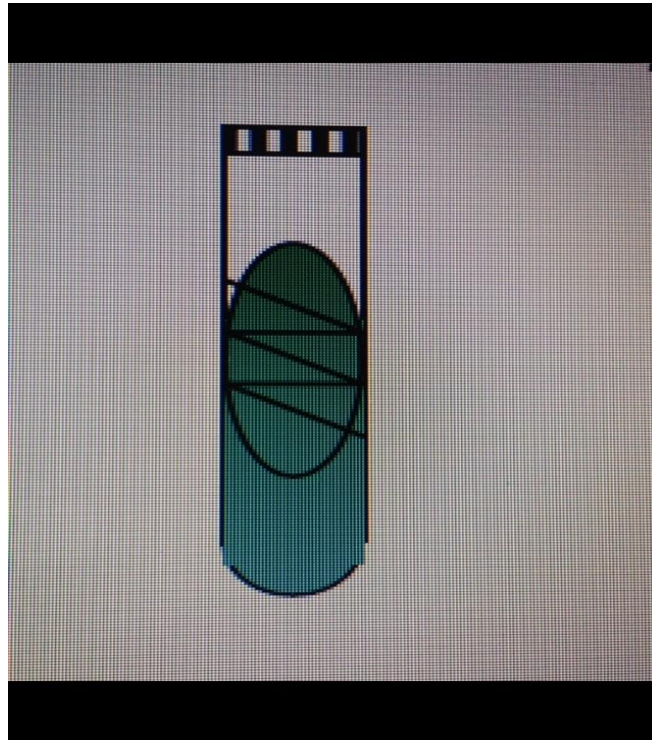
| TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISÉE API 20E |                                       |   |                 |   |   |   |
|---|---------------------------------------|---|-----------------|---|---|---|
| Microtube   | Substrat :                            | Caractère recherché :   | Révélateur      | Lecture directe ou indirecte<br>Test (si nécessaire)                                | Résultat -  | Résultat +  |
| ONPG  | ONPG = Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside | Beta galactosidase  |                 | Lecture directe   |    |    |
| ADH<br>LDC<br>ODC                                     | Arginine<br>Lysine<br>Ornithine       | Arginine Dihydrolase<br>Lysine Décarboxylase<br>Ornithine Décarboxylase | Rouge de Phénol | Lecture directe   |    |    |
| CIT   | Citrate                               | Utilisation du citrate  | BBT             | Lecture directe   |    |    |
| H <sub>2</sub> S                                      | Thiosulfate de sodium                 | Production d'H <sub>2</sub> S   |                 | Lecture directe   |    |    |
| URÉ   | Urée                                  | Uréase  | Rouge de Phénol | Lecture directe   |    |    |
| TDA   | Tryptophane                           | Tryptophane désaminase  |                 | <b>Lecture indirecte</b><br>Ajouter une goutte de réactif chlorure de fer III       |    |    |
| IND   | Tryptophane                           | Tryptophanase ou production d'indole                                    |                 | <b>Lecture indirecte</b><br>Ajouter une goutte de réactif Kovacs                    |    |    |
| VP  | Pyruvate de sodium                    | production d'acétoine (3-hydroxybutanone)                               |                 | <b>Lecture indirecte</b><br>Ajouter 1 goutte de VP1 et VP2 Attendre 10 minutes      |   |   |
| GEL   | Gélatine                              | gélatinase  |                 | Lecture directe   |  |  |
| GLU à ARA = zymogranne                                | Substrat carboné (glucide)            | Utilisation de substrats carbonés (glucides)                            | BBT             | Lecture directe   |  |  |
| NO <sub>2</sub> /N <sub>2</sub>                       | Nitrates (NO <sub>3</sub> )           | Nitrate réductase   |                 | <b>Lecture indirecte</b><br>Ajouter 1 goutte de NIT1 et NIT2 et zinc éventuellement |  |  |

**b. Galerie classique :**

**Milieu Citrate de Simmons :**

On ensemence ce milieu directement à partir d'une colonie prélevée sur milieu gélosé (Hektoen) par stries sur la pente à l'aide d'une pipette Pasteur fermée.

Incuber 24 heures à 37°C, bouchon dévissé.



**Figure 17 :** La méthode d'ensemencement de citrate de Simmons.

**Lecture et interprétation :**

1-Présence de culture bactérienne (Milieu bleu) :

Les bactéries utilisent le citrate comme seule source de carbone avec alcalinisation du milieu.

Conclusion : Les bactéries possèdent une citrate perméase Elles sont dites citrate +

2-Présence de culture bactérienne (Milieu inchangé = vert) :

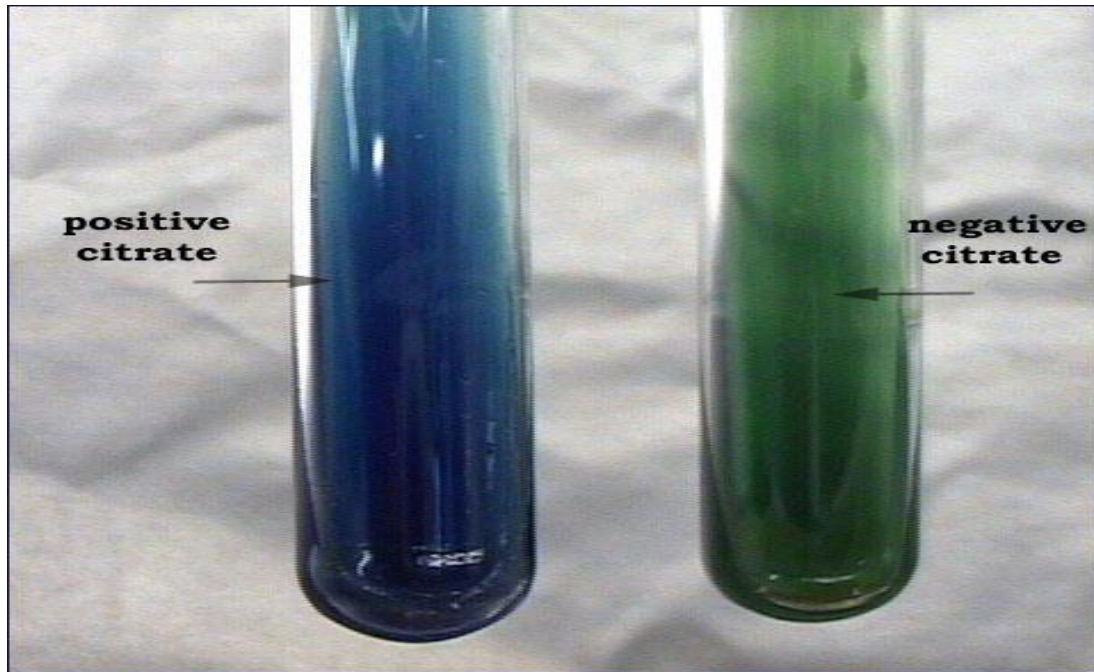
Les bactéries utilisent le citrate comme seule source de carbone sans alcalinisation du milieu.

Conclusion : Les bactéries possèdent une citrate perméase Elles sont dites citrate +

3-Absence de culture bactérienne (Milieu inchangé = vert) :

Les bactéries n'utilisent pas le citrate comme seule source de carbone.

Conclusion : Les bactéries ne possèdent pas de citrate perméase Elles sont dites citrate –



**Figure 18** : Milieu de citrate de Simmons.

### **Milieu TSI (Triple Sugar Iron) :**

Préparation de l'inoculum :

-A partir d'une culture pure de 24h sur gélose hektoen, racler à l'aide d'une pipette pasteur une colonie bien isolée.

-Bien décharger la pipette dans le bouillant nutritif, et bien homogénéiser la suspension bactérienne.

Remplir la pipette pasteur par l'inoculum puis la vider sur le milieu TSI, ensemercer le culot par piqûre centrale et la surface inclinée par des stries serrées.

Incuber à 37°C pendant 24 heures (capsules desserrées) de manière à favoriser les échanges gazeux.

### **Lecture et interprétation :**

L'utilisation de l'un des sucres contenus dans le milieu se traduit par une acidification (virage au jaune du rouge de phénol). Une alcalinisation se révèle par une

coloration rouge foncé. La production de sulfure d'hydrogène à partir du thiosulfate est mise en évidence par la formation d'une coloration noire.

La gélose TSI fournit quatre renseignements principaux :

#### 1- Fermentation de glucose

Culot rouge : glucose non fermenté

Culot jaune : glucose fermenté

#### 2-Fermentation du lactose et/ou du saccharose

Pente inclinée rouge : lactose et saccharose non fermentés

Pente inclinée jaune : lactose et/ou saccharose fermenté(s)

#### 3- Production de gaz

Apparition de gaz dans le culot.

#### 4-Formation d'H<sub>2</sub>S

Formation d'une coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la piqûre.



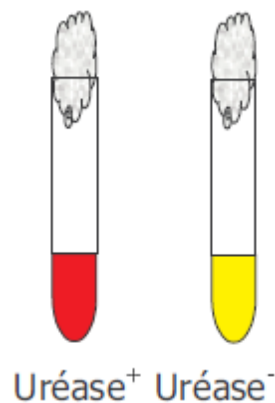
**Figure 19** : Les différents résultats de la gélose TSI.

**Milieu Urée-Indole :**

- Verser une petite quantité d'urée dans un écouvillon
- A l'aide d'une pipette pasteur prendre un peu de l'inoculum et le verser dans l'écouvillon.
- Incuber pendant 24h à 37°C.

**Lecture :**

Après incubation lire l'urée.



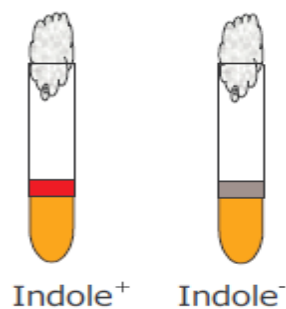
**Figure 20 :** Résultats urée-indole après incubation.

Urée + : Rouge.

Urée - : Orange.

Recherche de la production d'indole :

Ajouter 5 gouttes de réactif de **Kovacs**



**Figure 21 :** Résultats après l'ajout du Kovacs pour lire l'Indole.



**Interprétation :**

Grâce à une tryptophanas, les bactéries peuvent dégrader le tryptophane en indole, acide pyruvique et  $\text{NH}_3$ .

- Indole + : anneau rouge.

-Indole - : anneau jaune.

**Milieu ONPG :**

-Verser une petite quantité d'eau distillée dans un écouvillon et ajouter un disque d'ONPG.

-A l'aide d'une pipette pasteur prendre un peu de l'inoculum déjà préparé et le verser dans l'écouvillon.

-Incuber à  $37^\circ\text{C}$  pendant 24 heures.



**Figure 22 :** Milieu ONPG.

**Lecture :**

ONPG+ : jaune.

ONPG- : incolore.

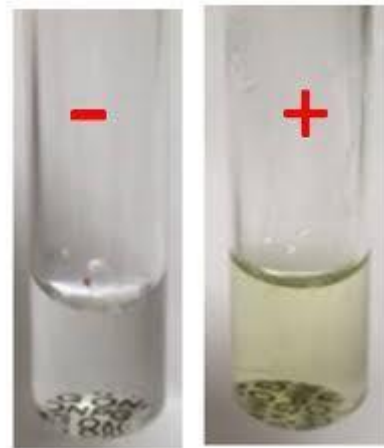


Figure 23 : Résultats de l'ONPG.

#### II.2.6.4 Antibiogramme :

##### a. Définition :

Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques connus.

Le principe consiste à placer la culture de bactéries en présence des disques d'antibiotiques et à observer leur comportement.

##### Milieu pour antibiogramme :

- on utilise la gélose Mueller Hinton (MH).
- il doit être coulé en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4mm.
- les géloses doivent être séchées avant l'emploi.



Figure 24 : Gélose Mueller-Hinton.

**b. Préparation de l'inoculum :**

-A partir d'une culture pure de 24h sur gélose hektoen, racler à l'aide d'une pipette pasteur une colonie bien isolée.

-Bien décharger la pipette dans le bouillant nutritif, et bien homogénéiser la suspension bactérienne.

**c. Ensemencement :**

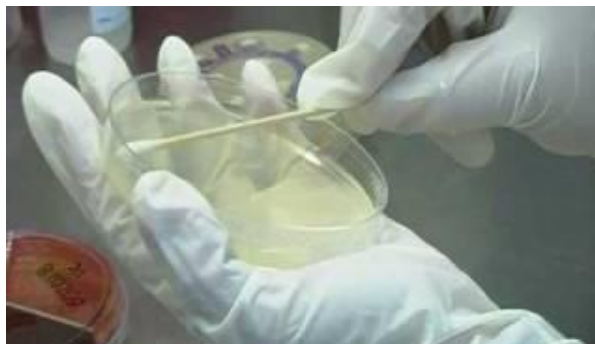
-Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum.

-L'essorer en le pressant fermement et en le tournant contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.

-Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosé sèche, de haut en bas, en stries serrées.

-Répéter l'emploi 2 fois, en tournant 1 boîte de 60 à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

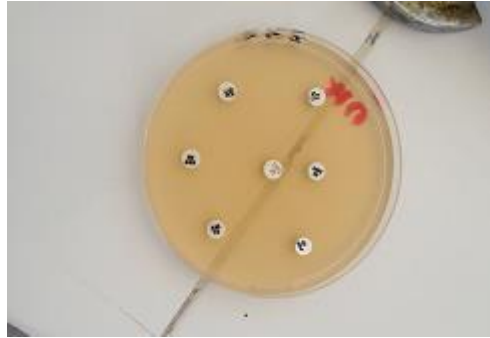
-Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîte de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.



**Figure 25 :** L'ensemencement de l'inoculum sur MH.

**d. Application des disques d'antibiotiques :**

-Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide de pince stérile, et ne pas déplacer les disques après application, tout en respectant la distance de 2 cm entre les disques et 1 cm du bord de la boîte.



**Figure 26** : Application des disques d'antibiotiques. (Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima)

**e. Liste des antibiotiques utilisés :**

CN 10 $\mu$ g : Gentamycine

AMC 30 $\mu$ g : Augmentin

FOX 30 $\mu$ g : Cefoxitine

CRO 30 $\mu$ g : Ceftriaxone

AM 10 $\mu$ g : Ampiciline

SXT 25 $\mu$ g : Bactrim

AK 30 $\mu$ g : Amikacine

CT 10 $\mu$ g : Colistine

CIP 5 $\mu$ g : Ciprofloxacine

CZ 30 $\mu$ g : Cefazoline

C 30 $\mu$ g : Cloramphenol

F 300 $\mu$ g : Furanes

IMP 10 $\mu$ g : Imipenem

NA : Ac. Nalidixique

**f. Incubation :**

L'incubation des antibiogrammes se fait à 37°C pendant 18-24 heures.

**g. Lecture :**

Après incubation, autour de chacun des disques on a soit une pousse bactérienne soit une zone d'inhibition. La mesure du diamètre de ces zones est faite avec le pied à coulisse nous permet de déterminer le comportement de *Klebsiella pneumoniae* vis-à-vis de cet antibiotique dont on détermine si elle est sensible, intermédiaire ou résistante en se référant aux valeurs données dans le tableau suivant :

**Tableau IV :** Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CIM pour Entérobactéries.

| Antibiotique testé             | Charge des disques | Diamètre Critiques (mm) |       |       | CMI Critiques (µg/ml) |       |        |
|--------------------------------|--------------------|-------------------------|-------|-------|-----------------------|-------|--------|
|                                |                    | R                       | I     | S     | R                     | I     | S      |
| Ampiciline                     | 10 µg              | ≤ 13                    | 14-16 | ≥ 17  | ≥ 32                  | 16    | ≤ 8    |
| Amoxiciline+ AC.clavulanique   | 20 µg              | ≤ 13                    | 14-17 | ≥ 18  | ≥ 32/16               | 16/8  | ≤ 8/14 |
| Céfazoline                     | 30 µg              | ≤ 19                    | 20-22 | ≥ 23  | ≥ 8                   | 4     | ≤ 2    |
| Céfalotine                     | 30 µg              | ≤ 14                    | 15-17 | ≥ 18  | ≥ 32                  | 16    | ≤ 8    |
| Cefoxitine                     | 30 µg              | ≤ 14                    | 15-17 | ≥ 18  | ≥ 32                  | 16    | ≤ 8    |
| Cefotaxime                     | 30 µg              | ≤ 22                    | 23-25 | ≥ 26  | ≥ 4                   | 2     | ≤ 1    |
| Ceftriaxone                    | 30 µg              | ≤ 19                    | 20-22 | ≥ 23  | ≥ 4                   | 2     | ≤ 1    |
| Imipenem                       | 10 µg              | ≤ 19                    | 20-22 | ≥ 23  | ≥ 4                   | 2     | ≤ 1    |
| Ertafénème                     | 10 µg              | ≤ 19                    | 20-22 | ≥ 23  | ≥ 1                   | 0.5   | ≤ 0.25 |
| Amikacine                      | 30 µg              | ≤ 14                    | 15-16 | ≥ 17  | ≥ 64                  | 32    | ≤ 16   |
| Gentamycine                    | 10 µg              | ≤ 12                    | 13-14 | ≥ 15  | ≥ 16                  | 8     | ≤ 4    |
| Ac. Nalidixique                | 30 µg              | ≤ 13                    | 14-18 | ≥ 19  | ≥ 32                  | ..... | ≤ 16   |
| Ciprofloxacine                 | 5 µg               | ≤ 15                    | 16-20 | ≥ 21  | ≥ 4                   | 2     | ≤ 1    |
| Cloramphenol                   | 30 µg              | ≤ 12                    | 13-17 | ≥ 18  | ≥ 32                  | 16    | ≤ 8    |
| Colistine                      | .....              | .....                   | ..... | ..... | .....                 | ..... | .....  |
| Furanes                        | 300 µg             | ≤ 14                    | 15-16 | ≥ 17  | ≥ 128                 | 64    | ≤ 32   |
| Fosfomycine                    | 200 µg             | ≤ 12                    | 13-15 | ≥ 16  | ≥ 256                 | 128   | ≤ 64   |
| Thriméthoprime+ Sulfméthxasole | 1.25 / 23.75 µg    | ≤ 10                    | 11-15 | ≥ 16  | ≥ 4/76                | ..... | ≤ 2/38 |

# Chapitre III :

## résultats et interprétations

### III.1 LES CARACTERISTIQUES MACROSCOPIQUES DE LA SOUCHE BACTERIENNE:

**Tableau V** : les caractéristiques macroscopiques de *Klebsiella pneumoniae* cultivée sur milieu Hektoen après incubation 37°C.

|      | Viabilité des colonies | Pureté des colonies | Pigmentation des colonies | Forme du relief de colonies | Allure du contour des colonies | Aspect de la surface des colonies | Taille des colonies |
|------|------------------------|---------------------|---------------------------|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|---------------------|
| Rp 1 | Viable                 | Pure                | Jaune                     | Bombée                      | Régulière                      | Lisse et muqueuse                 | 3-4 mm              |
| R p2 | Viable                 | Pure                | Jaune                     | Bombée                      | Régulière                      | Lisse et muqueuse                 | 3-4 mm              |
| R p3 | Viable                 | Pure                | Jaune                     | Bombée                      | Régulière                      | Lisse et muqueuse                 | 3-4 mm              |
| R p4 | Viable                 | Pure                | Jaune                     | Bombée                      | Régulière                      | Lisse et muqueuse                 | 3-4 mm              |
| R p5 | Viable                 | Pure                | Jaune                     | Bombée                      | Régulière                      | Lisse et muqueuse                 | 3-4 mm              |
| R p6 | Viable                 | Pure                | Jaune                     | Bombée                      | Régulière                      | Lisse et muqueuse                 | 3-4 mm              |
| R p7 | Viable                 | Pure                | Jaune                     | Bombée                      | Régulière                      | Lisse et muqueuse                 | 3-4 mm              |
| R p8 | Viable                 | Pure                | Jaune                     | Bombée                      | Régulière                      | Lisse et muqueuse                 | 3-4 mm              |
| R p9 | Viable                 | Pure                | Jaune                     | Bombée                      | Régulière                      | Lisse et muqueuse                 | 3-4 mm              |
| Rp10 | Viable                 | Pure                | Jaune                     | Bombée                      | Régulière                      | Lisse et muqueuse                 | 3-4 mm              |
| Rp11 | Viable                 | Pure                | Jaune                     | Bombée                      | Régulière                      | Lisse et muqueuse                 | 3-4 mm              |
| Rp12 | Viable                 | Pure                | Jaune                     | Bombée                      | Régulière                      | Lisse et muqueuse                 | 3-4 mm              |
| Rp13 | Viable                 | Pure                | Jaune                     | Bombée                      | Régulière                      | Lisse et muqueuse                 | 3-4 mm              |
| Rp14 | Viable                 | Pure                | Jaune                     | Bombée                      | Régulière                      | Lisse et muqueuse                 | 3-4 mm              |
| Rp15 | Viable                 | Pure                | Jaune                     | Bombée                      | Régulière                      | Lisse et muqueuse                 | 3-4 mm              |
| Rp16 | Viable                 | Pure                | Jaune                     | Bombée                      | Régulière                      | Lisse et muqueuse                 | 3-4 mm              |
| Rp17 | Viable                 | Pure                | Jaune                     | Bombée                      | Régulière                      | Lisse et muqueuse                 | 3-4 mm              |
| Rp18 | Viable                 | Pure                | Jaune                     | Bombée                      | Régulière                      | Lisse et muqueuse                 | 3-4 mm              |
| Rp19 | Viable                 | Pure                | Jaune                     | Bombée                      | Régulière                      | Lisse et muqueuse                 | 3-4 mm              |

**Rp** : Repiquage

#### Interprétation :

#### Pureté :

La souche *Klebsiella pneumoniae* est restée pure durant les 19 repiquages malgré l'utilisation d'un milieu sélectif et cela montre l'absence de la contamination de notre souche bactérienne par d'autres bactéries. Ceci est effectivement lié à la manière de travailler qui a consisté à :

- la décontamination régulière des surfaces des paillasse avec un désinfectant.
- le lavage des mains avant et après chaque manipulation.

- la réalisation de toutes les manipulations à proximité du bec benzène (diamètre du 20cm).
- la stérilisation de l'anse et de la pipette pasteur avant chaque repiquage et après chaque Ensemencement.

**Viabilité:**

La souche *Klebsiella pneumoniae* est restée viable durant les 19 repiquages vu que:

- le délai qui séparait deux repiquages successifs ne dépassait pas les 3 jours.
- les milieux de cultures utilisés étaient frais, correctement préparés et bien séchés à L'étuve avant chaque utilisation.
- le refroidissement des pipettes Pasteur après stérilisation par la flamme du bec benzène.

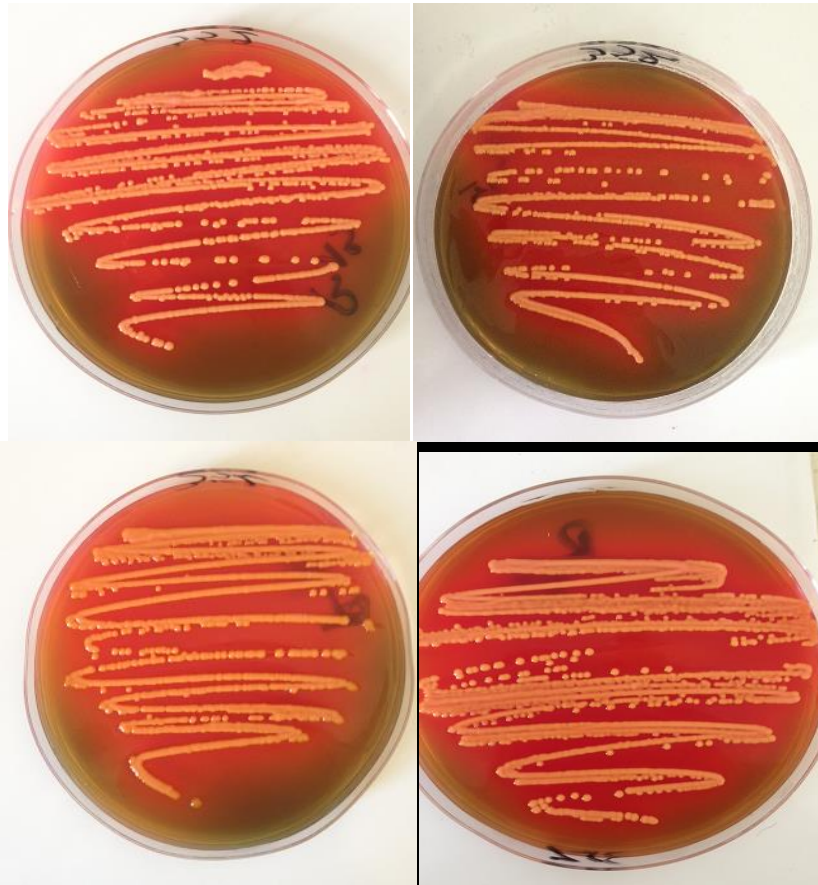
**Pigmentation:**

La pigmentation a été conservée durant les 19 repiquages après incubation de *Klebsiella pneumoniae* sur milieu Hektoen, les colonies ont pris une pigmentation jaune.

**Forme, allure et aspect des Colonies:**

La souche *Klebsiella pneumoniae* a garde sa forme de relief (bombée) son allure de contour (régulière) son aspect de surface (lisse et muqueuse) et sa taille (entre 3-4 mm de diamètre) durant les 19 repiquages.





**Figure 27:** les résultats de différents repiquages sur milieu Hektoen. (Laboratoire de bactériologie clinique d’Urologie – Néphrologie Daksi – Constantine.)

(Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima)

L’apparition de la couleur rouge sur milieu Hektoen après incubation explique l’utilisation du glucose par la *Klebsiella pneumoniae*.

### III.2 Les caractéristiques microscopiques :

#### Etat frais:

On a observé sous microscope (x40) que *Klebsiella pneumoniae* a gardé son immobilité jusqu’au 19ème repiquage.

#### Coloration de Gram:

*Klebsiella pneumoniae* appartient à la famille des entérobactéries, qui sont des bacilles à Gram négatif (BGN).

Après repiquages successifs, l’aspect du Gram est comme suit :

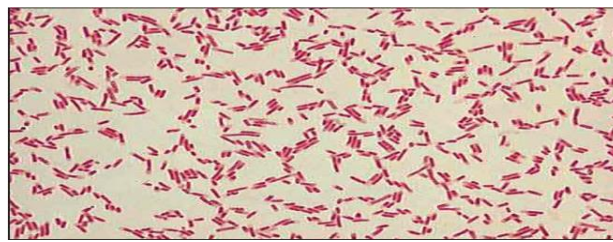
A → Du repiquage 1 au repiquage 6 : apparition des formes bacillaire.

B → Du repiquage 7 au repiquage 10 : apparition des formes coccobacillaires.

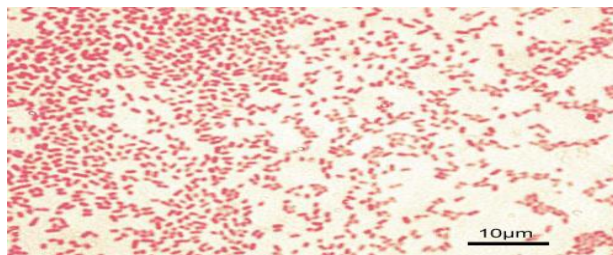
C → Du repiquage 11 au repiquage 15 : apparition des formes bacillaires.

D → Du repiquage 16 au repiquage 19 : apparition des formes bacillaires.

- Ce changement de la forme ne peut être lié qu'à une agression du peptidoglycane.



**Figure 28 :** Gram- et forme bacille de *Klebsiella pneumoniae* sous microscope.



**Figure 29 :** Gram – et forme coccobacille d *Klebsiella pneumoniae* e sous microscope.

### III.3 Les paramètres biochimiques:

#### La Galerie API 20 E:

**Tableau VI :** Les paramètres biochimiques de *Klebsiella pneumoniae* lus par la galerie API 20 E après Incubation à 37°C

|           | ONPG | ADH | LDC | ODC | CIT | H2S | URE | TDA | IND | VP | GEL | GLU | MAN | INO | POR | RHA | SAC | MEL | AMY | ARA |
|-----------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <b>3</b>  | +    | -   | -   | -   | +   | -   | +   | -   | -   | +  | -   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| <b>17</b> | +    | -   | -   | -   | +   | -   | +   | -   | -   | +  | -   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |

(+) : Réaction positive, (-) : Réaction négative

Nous avons utilisé la galerie API 20 E pour le repiquage 3 et 17 où les paramètres biochimiques suivants se sont avérés en faveur de *Klebsiella pneumoniae* :

- ONPG → Ortho nitro-phényle-galactoside → positive.
- ADH → Arginine déshydrogénase → négative.
- LDC → lysine décarboxylase → négatives.
- ODC → ornithine décarboxylase → négative.
- CIT → Citrate → positive.
- H2S → Thiosulfate de sodium → négative.
- Ure → Urée → positive.
- TDA → Tryptophane désaminase → négative.
- IND → Indole → négatives.
- VP → Réaction de Voges-Proskauer → positive.
- GEL → Gélatinase → négative.
- GLU → Glucose → positive.
- MAN → Mannitol → positive.
- INO → Inositol → positive.
- SOR → Sorbitol → positive.
- RHA → Rhamnose → positive.
- SAC → Saccharose → positive.

- MEL→Melibiose→ positive.
- AMY→amygdaline→ positive.
- ARA→arabinose→ positive.



**Figure 30 :** Lecture de la galerie miniaturisée API 20 E après incubation à l'étuve 37°C.  
(Laboratoire de bactériologie clinique d'Urologie – Néphrologie Daksi – Constantine)

(Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima)

## Galerie Classique:

**Tableau VII :** Les paramètres biochimiques de *Klebsiella pneumoniae* lus par la galerie classique après Incubation à 37°C

|      | Citrate de Simons | TSI               |                   |                               |                   | Urée     | Indole   | ONPG     |
|------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|----------|----------|----------|
|      |                   | Fermentation de L | Fermentation de G | Production d H <sub>2</sub> S | Production de gaz |          |          |          |
| R 1  | Positive          | Positive          | Positive          | Négative                      | Positive          | Positive | Négative | Positive |
| R 2  | Positive          | Positive          | Positive          | Négative                      | Positive          | Positive | Négative | Positive |
| R 3  | Positive          | Positive          | Positive          | Négative                      | Positive          | Positive | Négative | Positive |
| R 4  | Positive          | Positive          | Positive          | Négative                      | Positive          | Positive | Négative | Positive |
| R 5  | Positive          | Positive          | Positive          | Négative                      | Positive          | Positive | Négative | Positive |
| R 6  | Positive          | Positive          | Positive          | Négative                      | Positive          | Positive | Négative | Positive |
| R 7  | Positive          | Positive          | Positive          | Négative                      | Positive          | Positive | Négative | Positive |
| R 8  | Positive          | Positive          | Positive          | Négative                      | Positive          | Positive | Négative | Positive |
| R 9  | Positive          | Positive          | Positive          | Négative                      | Positive          | Positive | Négative | Positive |
| R 10 | Positive          | Positive          | Positive          | Négative                      | Positive          | Positive | Négative | Positive |
| R 11 | Positive          | Positive          | Positive          | Négative                      | Positive          | Positive | Négative | Positive |
| R 12 | Positive          | Positive          | Positive          | Négative                      | Positive          | Positive | Négative | Positive |
| R 13 | Positive          | Positive          | Positive          | Négative                      | Positive          | Positive | Négative | Positive |
| R 14 | Positive          | Positive          | Positive          | Négative                      | Positive          | Positive | Négative | Positive |
| R 15 | Positive          | Positive          | Positive          | Négative                      | Positive          | Positive | Négative | Positive |
| R 16 | Positive          | Positive          | Positive          | Négative                      | Positive          | Positive | Négative | Positive |
| R 17 | Positive          | Positive          | Positive          | Négative                      | Positive          | Positive | Négative | Positive |
| R 18 | Positive          | Positive          | Positive          | Négative                      | Positive          | Positive | Négative | Positive |
| R 19 | Positive          | Positive          | Positive          | Négative                      | Positive          | Positive | Négative | Positive |

L : Lactose, G : Glucose, (+) : réaction positive, (-) : réaction négative

**Interprétation :**

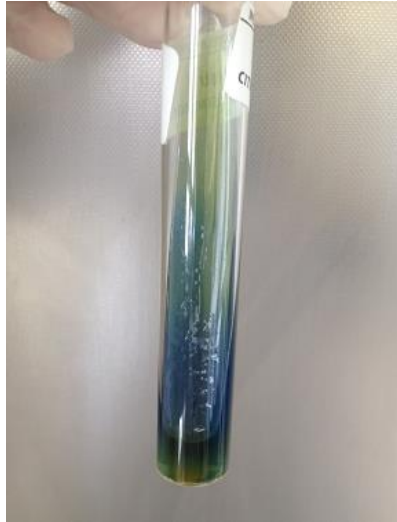
Du premier jusqu'au dernier repiquage tous les caractères biochimiques n'ont pas changé, que ce soit :

**Le citrate de Simmons:**

Est resté positif durant les 19 repiquages:

-libération de CO<sub>2</sub> volatile et consommation de H.

-changement de la couleur du milieu du vert vers le bleu ce que explique l'utilisation de citrate et alcalinisation de milieu donc la bactérie possède une Citrate perméase.



**Figure 31** : milieu au citrate de Simmons ensemencé avec la *Klebsiella pneumoniae*.  
(Laboratoire de bactériologie clinique d’Urologie – Néphrologie Daksi – Constantine)

(Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima)

#### TSI:

Durant les 19 repiquages :

- fermentation de lactose et de glucose:

Sont resté positif du 1er jusqu’au 19ème repiquages

- ✓ Culot jaune: glucose ferment
- ✓ Pente inclinée jaune: lactose ferment

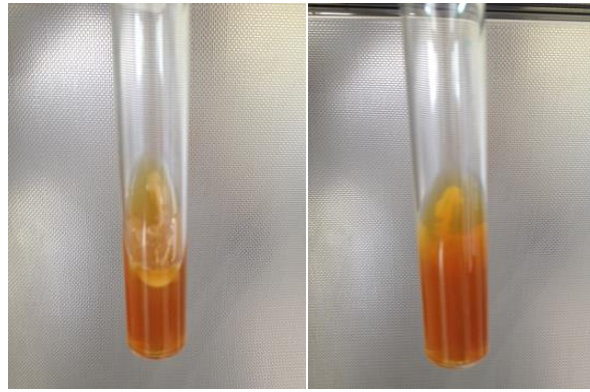
Cela explique que *Klebsiella pneumoniae* a utilisé les sucres comme source d’énergie.

- Production de gaz :

- ✓ l’apparition de gaz dans le culot qui est expliqué par la présence des bulles.

- production de H<sub>2</sub>S:

Pendant les 19 repiquages nous avons observé la non présence de la coloration noir entre le culot et la pente tout le long de la pique cela explique la non production de H<sub>2</sub>S.



**Figure 32 :** milieu TSI ensemencé par *Klebsiella pneumoniae*. (Laboratoire de bactériologie clinique d’Urologie – Néphrologie Daksi – Constantine.)

(Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima)

#### Urée:

Durant les 19 repiquages le résultat est resté positif (rouge).

Cela justifie la présence de l’activité enzymatique de l’uréase.



**Figure 33 :** milieu urée ensemencé par *Klebsiella pneumoniae*. (Laboratoire de bactériologie clinique d’Urologie – Néphrologie Daksi – Constantine)

(Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima)

#### Indole:

Après l’ajout du réactif de Kovacs les résultats n’ont pas changé durant les 19 repiquages qui ont été négatifs (anneau jaune) et cela explique la non production d’indole donc l’absence de la tryptophanase.



**Figure 34 :** Après l'ajout du Kovacs. (Laboratoire de bactériologie clinique d'Urologie – Néphrologie Daksi – Constantine.)

(Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima)

### ONPG:

Durant les 19 repiquages le résultat est resté positif.

L'ONPG est utilisé pour la recherche de la  $\beta$ - galactosidase dans l'identification d'une bactérie.

L'apparition d'une couleur jaune (ONP) indique la présence de la  $\beta$ -galactosidase.

**NB:** La  $\beta$ -galactosidase hydrolyse les  $\beta$ -galactosides en monosaccharides.



**Figure 35:** milieu ONPG ensemencé avec *Klebsiella pneumoniae*. (Laboratoire de bactériologie clinique d'Urologie – Néphrologie Daksi – Constantine.)

(Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima)



## III.4 Le comportement vis-à-vis de certains antibiotiques:

Tableau VIII : Le comportement de *Klebsiella pneumoniae* vis-à-vis certains antibiotiques.

|      | AM | CZ | FOX | CRO | C | NA | F | IMP | SXT | CN | AK | CT | CIP | AM |
|------|----|----|-----|-----|---|----|---|-----|-----|----|----|----|-----|----|
| Rp1  | R  | R  | R   | R   | S | R  | R | S   | R   | R  | R  | R  | R   | R  |
| Rp2  | R  | R  | R   | R   | S | R  | R | S   | R   | R  | R  | R  | R   | R  |
| Rp3  | R  | R  | R   | R   | S | R  | R | S   | R   | R  | R  | R  | R   | R  |
| Rp4  | R  | R  | R   | R   | S | R  | R | S   | R   | R  | R  | R  | R   | R  |
| Rp5  | R  | R  | R   | R   | S | R  | R | S   | R   | R  | R  | R  | R   | R  |
| Rp6  | R  | R  | R   | R   | S | R  | R | S   | R   | R  | R  | R  | R   | R  |
| Rp7  | R  | R  | R   | R   | S | R  | R | S   | R   | R  | R  | R  | R   | R  |
| Rp8  | R  | R  | R   | R   | S | R  | R | S   | R   | R  | R  | R  | R   | R  |
| R p9 | R  | R  | R   | R   | S | R  | R | R   | R   | R  | R  | R  | R   | R  |
| Rp10 | R  | R  | R   | R   | S | R  | R | R   | R   | R  | R  | R  | R   | R  |
| Rp11 | R  | R  | R   | R   | S | R  | R | R   | R   | R  | R  | R  | R   | R  |
| Rp12 | R  | R  | R   | R   | S | R  | R | R   | R   | R  | R  | R  | R   | R  |
| Rp13 | R  | R  | R   | R   | S | R  | R | R   | R   | R  | R  | R  | R   | R  |
| Rp14 | R  | R  | R   | R   | S | R  | R | R   | R   | R  | R  | R  | R   | R  |
| Rp15 | R  | R  | R   | R   | S | R  | R | R   | R   | R  | R  | R  | R   | R  |
| Rp16 | R  | R  | R   | R   | S | R  | R | R   | R   | R  | R  | R  | R   | R  |
| Rp17 | R  | R  | R   | R   | S | R  | R | R   | R   | R  | R  | R  | R   | R  |
| Rp18 | R  | R  | R   | R   | S | R  | R | R   | R   | R  | R  | R  | R   | R  |
| Rp19 | R  | R  | R   | R   | S | R  | R | R   | R   | R  | R  | R  | R   | R  |

Rp : Repiquage, R : Résistant, S : Sensible,

Tableau IX : Le diamètre de la zone d'inhibition de l'IMP.

| Rp | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| D  | 22 | 22 | 20 | 22 | 22 | 22 | 20 | 21 | 16 | 19 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 19 | 19 | 18 | 18 |

Rp : Repiquage, D: diamètre (mm)

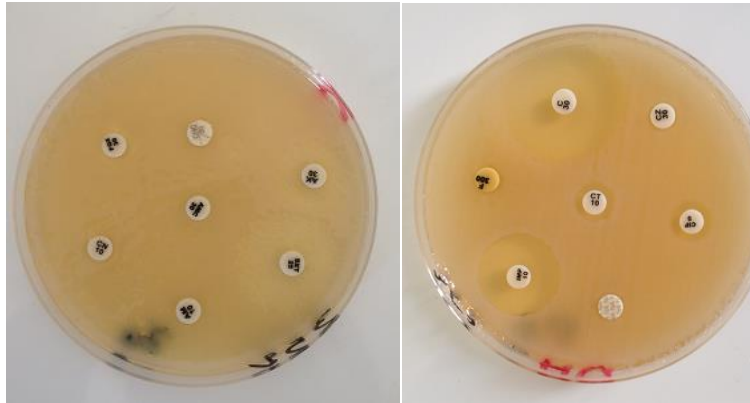
## Interprétation :

*Klebsiella pneumoniae* avec laquelle nous avons travaillé avait le phénotype suivant:

Une résistance à: AM, CZ, FOX, CRO, NA, F, SXT, CN, AK, CT, CIP, AM.

Une sensibilité à : C, IMP.

Le comportement vis-à-vis des antibiotiques testés a été conservé jusqu'au dernier repiquage, exception faite pour l'IMP, où *Klebsiella pneumoniae* était sensible jusqu'au 8ème repiquage et à partir du 9ème est devenue résistante où l'instabilité des résultats pour l'IPM, n'est probablement due qu'à la qualité des disques utilisés, à la non standardisation de l'inoculum et/ou au non respect de la chaîne de froid.



**Figure 36 :** les résultats de l'antibiogramme. (Laboratoire de bactériologie clinique d'Urologie – Néphrologie Daksi – Constantine.)

. (Photo prise par CHOUGUIAT Meriem et ZAAROUR Halima)

Conclusion

## Conclusion

---

Le repiquage en bactériologie permet d'avoir un nombre élevé de bactéries à partir d'une seule souche de départ. La détermination du comportement des bactéries repiquées successivement, dans les mêmes conditions (milieu de culture, durée et température d'incubation), s'avère donc important.

Les 19 repiquages successifs réalisés sur une souche de *Klebsiella pneumoniae*, dans des conditions de stérilisation et d'hygiène adéquates, n'ont pas d'influence sur certains paramètres étudiés (pureté, viabilité, pigmentation, forme des reliefs, allure du contour, aspect des colonies, la taille et caractères biochimiques). Contrairement à leurs effets sur autres paramètres (la forme sous microscope et l'effet de l'antibiotique de l'IMP sur *Klebsiella pneumoniae*). L'explication nécessite des études plus poussés et du matériel plus performant.

Il serait donc impératif d'effectuer d'autres études (observation sous microscope électronique et la biologie moléculaire) pour arriver à l'explication des changements notés suite à l'effet des repiquages successifs.

# Références Bibliographiques

## Références bibliographiques :

### C

- ❖ 1. **C.Nauciel,** ( ) : Bactériologie médicale, page : 51.

### J

- ❖ 2. **J-L. Avril, H .Dabernat, F.Denis, H.monteil.,** (2000) : Bactériologie clinique. 3<sup>ème</sup> édition, page : 209.
- ❖ 3. **J-L. Avril, H .Dabernat, F.Denis, H.monteil.,** (2000) : Bactériologie clinique. 3<sup>ème</sup> édition, page : 209.
- ❖ 4. **J-L. Avril, H .Dabernat, F.Denis, H.monteil.,** (2000) : Bactériologie clinique. 3<sup>ème</sup> édition, page : 210.
- ❖ 5. **J-L. Avril, H .Dabernat, F.Denis, H.monteil.,** (2000) : Bactériologie clinique. 3<sup>ème</sup> édition, page : 210.
- ❖ 6. **J-L. Avril, H. Dabernat, F.Denis, H.monteil .,** (2000) : Bactériologie clinique, page:211.
- ❖ 7. **Jean-Louis FAUCHERE, Jean-Loup AVRIL.,** (2000) : Bactériologie générale et médicale, page : 152.
- ❖ 8. **Jean-Louis FAUCHERE, Jean-Loup AVRIL.,** (2000) : Bactériologie générale et médicale, page : 154.
- ❖ 9. **Jean Figarella et Guy Leyral.,** (2000) : Microbiologie technique : documentation technique : 2<sup>ème</sup> édition.

### P

- ❖ 10. **Patrick berche, Jean-Louis Gaillard, Michel Simonet.,** (2000) : Bactériologie – les bactéries des infections humaines – de la biologie à la clinique, page : 120-121.
- ❖ 11. **Patrick berche, Jean-Louis Gaillard, Michel Simonet.,** (2000) : Bactériologie – les bactéries des infections humaines – de la biologie à la clinique, page : 123.
- ❖ 12. **Patrick berche, Jean-Louis Gaillard, Michel Simonet.,** (2000) : Bactériologie – les bactéries des infections humaines – de la biologie à la clinique, page : 123.

## **Sites d'internet :**

- ❖ 13. [[https://fr.wikipedia.org/wiki/Klebsiella#Notes\\_et\\_r.C3.A9f.C3.A9rences](https://fr.wikipedia.org/wiki/Klebsiella#Notes_et_r.C3.A9f.C3.A9rences)].
- ❖ 14. [<https://fr.wikipedia.org/wiki/Klebsiella>]
- ❖ 15. [<http://www.vulgaris-medical.com/encyclopedie-medicale/klebsiella/traitement>].
- ❖ 16. [[http://www.biokar-diagnostics.fr/solabia/produitsDiagnostic.nsf/SW\\_PROD/CE015232274A4385C12574B7002A6AF2?opendocument](http://www.biokar-diagnostics.fr/solabia/produitsDiagnostic.nsf/SW_PROD/CE015232274A4385C12574B7002A6AF2?opendocument)]
- ❖ 17. [[http://www.biokar-diagnostics.fr/solabia/produitsDiagnostic.nsf/SW\\_PROD/CEA062801F63038AC12574B30025E35B?opendocument](http://www.biokar-diagnostics.fr/solabia/produitsDiagnostic.nsf/SW_PROD/CEA062801F63038AC12574B30025E35B?opendocument)]
- ❖ 18. [[http://www.biokar-diagnostics.fr/solabia/produitsDiagnostic.nsf/SW\\_PROD/D5D9F075857C0657C12574B4002A40BF?opendocument](http://www.biokar-diagnostics.fr/solabia/produitsDiagnostic.nsf/SW_PROD/D5D9F075857C0657C12574B4002A40BF?opendocument)]
- ❖ 19. [https://fr.wikipedia.org/wiki/Citrate de Simmons](https://fr.wikipedia.org/wiki/Citrate_de_Simmons)
- ❖ 20. <https://fr.wikipedia.org/wiki/Ortho-nitroph%C3%A9nyl-%CE%B2-galactoside>

# Annexes



## Annexes :

### **Annexe 1:**

**Tableau :** Composition de milieu de culture Hektoen

|  |         |
|--|---------|
| Protéose-peptone   | 12,0 g  |
| Extrait de levure (facteur de croissance)                      | 3,0 g   |
| Lactose : critère de différenciation                           | 12,0 g  |
| Saccharose : critère de différenciation                        | 12,0 g  |
| Salicine : critère de différenciation                          | 2,0 g   |
| Citrate de fer III et d'ammonium révélateur d'H <sub>2</sub> S | 1,5 g   |
| Sels biliaires : inhibiteur                                    | 9,0 g   |
| Fuchsine acide : inhibiteur                                    | 0,1 g   |
| Bleu de bromothymol : indicateur de pH                         | 0,065 g |
| Chlorure de sodium : maintien de la pression osmotique         | 5,0 g   |
| Thiosulfate de sodium : précurseur d'H <sub>2</sub> S          | 5,0 g   |
| Agar   | 14,0 g  |
| pH   | 7,6     |
| Eau distillée  | 1L      |

### **Annexe 2 :**

**Tableau :** Composition de milieu Mueller Hinton.

|                            |          |
|----------------------------|----------|
| Infusion de viande de bœuf | 300,0 ml |
| Peptone de caséine         | 17,5 g   |
| Amidon de maïs             | 1,5 g    |
| Agar                       | 17,0 g   |
| pH                         | 7,4      |
| Eau distillée              | 1L       |

### **Annexe 3 :**

**Tableau :** Composition de milieu de culture Citrate de simmons.

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| Citrate de sodium               | 1,0 g  |
| Bleu de bromothymol             | 0,08 g |
| Chlorure de sodium              | 5,0 g  |
| Sulfate de magnésium            | 0,2 g  |
| Hydrogénophosphate de potassium | 1,0 g  |
| Dihydrogénophosphate d'ammonium | 1,0 g  |
| Agar-agar                       | 15,0 g |
| pH                              | 6,9    |
| Eau distillée                   | 1L     |

#### Annexe 4 :

**Tableau :** Composition de milieu Urée-Indole.

|                                      |       |
|--------------------------------------|-------|
| <u>L-tryptophane</u>                 | 3g    |
| <u>Urée</u>                          | 20g   |
| Monophydrogénophosphate de potassium | 1g    |
| Dihydrogénophosphate de potassium    | 1g    |
| <u>Chlorure de sodium</u>            | 5 g   |
| <u>Éthanol</u>                       | 10 ml |
| <u>Rouge de phénol</u>               | 25 mg |
| <u>Eau distillée</u>                 | 1 L   |

#### Annexe 5 :

**Tableau :** Composition de milieu TSI.

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| Peptones de caséine             | 15g    |
| Peptones de viande              | 5g     |
| Extraits de viande              | 3g     |
| Peptones de levure              | 3g     |
| NaCl                            | 5g     |
| Lactose                         | 10g    |
| Saccharose                      | 10g    |
| Glucose                         | 1g     |
| Citrate ammoniacal de Fer (III) | 0,5g   |
| Thiosulfate de sodium           | 0,5g   |
| Rouge de phénol                 | 0,024g |
| Agar                            | 12g    |
| <u>Eau distillée</u>            | 1L     |

**Titre :** L'effet du repiquage de *Klebsiella pneumoniae* sur les caractères morphologiques, biochimiques et sensibilités aux antibiotiques

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en biochimie moléculaire et santé.

**Résumé :**

Le repiquage consiste en l'ensemencement successif d'une même bactérie sur des milieux de culture semblables pour avoir un nombre élevé de bactéries à partir d'une seule souche de départ.

*Klebsiella pneumoniae* est une entérobactérie impliquée dans des infections sévères. Elle survient chez des malades immunodéprimés

L'objectif principal de notre travail est de déterminer l'effet des repiquages successifs sur le comportement d'une souche de *Klebsiella pneumoniae* de point de vue morphologique, biochimiques et sensibilité aux antibiotiques.

Les 19 repiquages successifs réalisés sur une souche de *Klebsiella pneumoniae*, dans des conditions de stérilisation et d'hygiène adéquates, n'ont pas d'influence sur certains paramètres étudiés (viabilité, pureté, pigmentation, forme du relief, allure du contour, aspect de la surface, la taille, caractères biochimiques, et antibiogramme sauf l'IMP). Contrairement à leurs effets sur d'autres paramètres ; la forme de la bactérie vue au microscope optique après coloration de gram qui a changé suite à une agression mécanique du peptidoglycane ; la compréhension de cet événement ne peut être apportée que par des méthodes de biologie moléculaire et par observation sous microscope électronique, et l'instabilité des résultats pour l'IMP n'est probablement due qu'à la qualité des disques utilisés, à la non standardisation de l'inoculum et/ou au non respect de la chaîne de froid.

**Mots clés :** Repiquage, *Klebsiella pneumoniae*, Pureté, Viabilité, IMP.

**Laboratoire de recherche :** Laboratoire de bactériologie de la clinique d'Urologie – Néphrologie à Daksi – Constantine.

Jury d'évaluation :

**Président du jury :** LABBANI Zelikha – Professeur – U. Constantine 1.

**Rapporteur :** YAOU Arezki – Maître-assistant A – U. Constantine 1.

**Examineur :** MADACI Brahim – Maître-assistant A – U. Constantine 1.

**Date de soutenance :** 23/06/2016