



Université Constantine 1
Ex Université Mentouri - Constantine



جامعة قسنطينة 1
سابقا جامعة منتوري قسنطينة



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 :

Caractérisation morphologique, biochimique et mutagénèse des *Klebsiella pneumoniae* au CHU de Constantine.

Présenté et soutenu par : BOUGHACHICHE ROUMEISSA

Le : 21/06/2016

SEBAIS SAFA

Devant le Jury:

Président du jury : Mme. GHARZOULI R Maitre de conférences B (Université Constantine 1).

Rapporteur : Mme. BECHKRI S Maitre-assistante A (Université Constantine 1).

Examineur : Mme. SAOUDI M Maitre-assistante A (Université Constantine1).

Année universitaire
2015 - 2016

Remerciements

«Nous tenons à remercier Dieu le tout puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience pour achever ce travail ».

*Nous tenons avant tout à exprimer nos remerciements les plus sincères à notre encadreur Mme **Bechkri S**, pour avoir accepté de diriger ce travail, pour ses précieux conseils, son aide, ses suggestions sur la rédaction de ce mémoire ainsi que la confiance qu'elle nous a témoigné tout au long de cette étude.*

Qu'elle trouve ici l'expression de notre reconnaissance et de notre respect.

*Nous tenons également à remercier Mr Pr **Benlabed K** Chef du laboratoire de Microbiologie du CHU Ben Badis de Constantine pour nous avoir accueillis au sein de leur laboratoire ainsi pour sa disponibilité et ses pertinents conseils sans oublier tout le personnel pour leur bienveillance et leur éclaircissement et leur appui scientifique dans la recherche.*

*Nos vifs remerciements pour les membres du jury à commencer par Mme Dr. **Gharzouli R** Maitre de conférences B à l'Université Constantine 1. Qui nous a fait l'honneur de présider notre jury. Qu'elle trouve ici l'expression de notre profond respect.*

*A Mme **Saoudi M** d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail et de l'attribuer des remarques et des corrections très intéressantes.*

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 vous nos enseignements de génétique que dieu vous bénisse et vous donne la santé.

*Un merci particulier à Mme. **Saoudi M** pour son aide et ses précieux conseils lors de la réalisation de notre travail au sien du laboratoire des Biotechnologies.*

A toute personne qui participé de près ou de loin pour l'accomplissement de ce modeste travail.

Merci à tous.....

Dédicace

*Je tiens à dédier ce modeste travail à : **Mon cher papa « El-Hacen »***

école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études et à mis à ma disposition tous les moyens nécessaires pour que je réussisse, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger.

Ma chère maman « Nabiha »

qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, quoique je fasse, je ne pourrais te rendre ce que tu as fait pour moi. Soyez fière de moi aujourd'hui et voyez à travers ce travail mon amour sincère et ma

Gratitude profonde que dieu vous garde et protège pour moi inshallah.

A ma petite sœur « Sirine » et a mon chère frère « Zaki »

je vous remercie et j'espère que vous ferez mieux que votre grande sœur.

Pour l'homme de ma vie « Abdou » *qui n'a jamais cessé de croire en moi, sans son aide, ses conseils et ses encouragements ce travail n'aurait vu le jour, que dieu réunisse nos chemins pour un long commun serein et que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle.*

A ma belle famille « Kenoucha » *un grand merci*

A toute ma famille : *oncles, tantes, cousins et cousines, petits et grands*

A mes chères copines intimes « Chourouk et Houda » *qui étions avec moi depuis mon enfance*

Jusqu'à maintenant que dieu préserve notre amitié.

A mes très chères amies « Sofia, Amina et Rayene »

A mes chers collègues d'environnement *qui m'ont aidé durant cette période « madame Saida, madame Lamia, Asma, Linda, Hassiba, Asma, Moufida, Khadija, Lilia et son oublié Oussama »*
merci pour tout

Aussi beaucoup d'autres personnes que je n'ai pas eu l'occasion de les mentionner. Ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.

A mon binôme « Safa » *qui a partagé avec moi les moments difficiles de ce travail*

A tous ceux qui m'aiment, a tous ceux que j'aime

Roumeissa

Dédicace

Je Dédie ce travail.

A ma très chère mère « Salima »

*Affable, honorable, aimable : tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence,
La source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager
et de prier pour moi.*

Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

*Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour
exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as
cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance
et même à l'âge adulte. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et
t'accorder santé, longue vie et bonheur.*

A mon très chère père « Abd el-Hamid »

*Pour son soutien constant, son amour et ses mots d'encouragement
qui m'ont permis de me rendre ici aujourd'hui. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as
consentis pour mon éducation et ma formation. Que Dieu tout puissant te garde et te procure santé,
bonheur et longue vie.*

A ma chère sœur « Maroua »

*En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour toi.
Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de
réussite et de sérénité.*

A mon cher frère « Amine »

*Que ce travail te reflète ma profonde affection, que Dieu te protège et te procure bonheur,
santé et prospérité.*

A mes très chères amies

Imene, Radia, Rayen, Sofia, Amina, Roumeissa et Kaouther.

A mes chers collègues

Ils vont trouver ici le témoignage d'une fidélité et d'une amitié infinie.

A toute ma famille maternelle et paternelle.

A tous ce qui me sont chers.

Sommaire

Résumé

Introduction	1
---------------------------	---

Revue bibliographique

I-Généralité sur <i>Klebsiella pneumonia</i>	4
I-1- Dénomination.....	4
I-2- Présentation du genre	4
I-3- Classification.....	4
I-4- Habitat.....	5
I-5- Caractères bactériologiques	5
I-5-1- Caractères morphologiques.....	5
I-5-2- Caractères cultureux.....	5
I-5-3- Caractères biochimiques	6
I-5-4- Caractères antigéniques.....	8
II-Pathogénicité de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	8
II-1- Transmission.....	8
II-2- Génétique des <i>Klebsiella pneumoniae</i>	9
II-3- Pouvoir pathogène	10
II-4- Facteurs de pathogénicité	11
II-4-1- Antigènes de surface.....	12
II-4-2- Le lipopolysaccharide (LPS)	12
II-4-3- La capsule	13
II-4-4- Adhésines.....	13
II-4-5- Le fer.....	13
II-4-6- Ilot de pathogénicité	14
III-Resistance de <i>Klebsiella Pneumoniae</i> aux Antibiotiques	14
III-1- Les antibiotiques.....	14
III-1-1- Définition.....	14
III-1-1- critères de classifications.....	14

III-1-1- Mode d'action.....	14
III-2- Notion de la résistance bactérienne	15
III-3- Types de résistance aux antibiotiques	15
III-3-1- Résistance naturelle.....	15
III-3-2- Résistance acquise.....	16
III-4- Résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux β -lactamines	16
III-4-1- Mécanismes de résistance	16
III-5- Résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux aminosides.....	19
III-6- Résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux quinolones:.....	20
III-6-1- résistance par la modification de la cible	20
III-6-2- résistance par défaut d'accumulation	21
III-6-3- résistance plasmidiques aux quinolones.....	21
IV-Agents mutagènes	21
Matériel et méthodes	
I-Lieu et durée de l'étude.....	24
II-Echantillonnage	24
III-Matériel utilisé.....	24
IV-Milieus de culture	25
IV-1- Milieux de culture solides	25
IV-2- Milieux de culture liquides.....	25
IV-3- Milieux d'identification biochimiques et métaboliques.....	25
V-Colorants et réactifs.....	25
VI-Méthodologie	25
VI-1- Prélèvements	25
VI-2- Transport	26
VI-3- Analyse des prélèvements au laboratoire.....	26
VI-3-1- Examen macroscopique	27
VI-3-2- Examens microscopiques	27

VI-3-3- Culture.....	28
VI-3-4- Isolement et purification	29
VI-3-5- Critères d'identifications de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	29
VI-3-6- Étude de la sensibilité aux antibiotiques	31
VII-Mutagénèse	33
VII-1- Définition.....	33
VII-2- But.....	34
VII-3- Mode opératoire.....	34
VII-3-1- Préparation de la suspension bactérienne	34
VII-3-2- Préparation et stérilisation du matériel utilisé.....	34
VII-3-3- Dilution	35
VII-3-4- Ensemencement sur la Gélose Nutritive	35
VII-3-5- Irradiation.....	35
Résultats et discussion	
I-Prélèvements	38
I-1- Distribution des souches <i>K. pneumoniae</i> selon l'origine du prélèvement	38
I-2- Distribution des souches parmi les prélèvements cliniques.....	38
I-3- Distribution des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> selon le sexe	39
II-Analyse des prélèvements au laboratoire	40
II-1- Examen macroscopique	40
II-2- Examen microscopique.....	41
II-2-1- Etat frais.....	41
II-2-2- Bleu de méthyle	41
II-2-3- Coloration de Gram	41
II-3- Critères d'identification de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	41
II-3-1- Identification par galeries classique.....	41
II-4- Etude de la sensibilité aux antibiotiques.....	43
II-4-1- Antibiogramme	43

II-4- Les phénotypes de résistance de <i>K. pneumoniae</i> aux antibiotiques	45
II-4-1- Phénotypes de résistance aux β -lactamines	46
II-4-2- Phénotypes de résistance aux aminosides.....	47
II-4-3- Phénotypes de résistance aux quinolones	48
III-Mutagénèse.....	49
Conclusion	52
Références bibliographiques	54
Annexes	

Liste des abréviations

- **ADH** : Arginine déshydrogénase
- **AmpC** : Bêta-lactamase chromosomique
- **ARN** : Acide ribonucléique
- **ARNm** : Acide ribonucléique messager
- **ARNr** : Acide ribonucléique ribosomique
- **ARNt** : Acide ribonucléique de transfert
- **ATB** : Antibiotique
- **BK** : Bacille de Koch
- **BLSE** : β -lactamase à spectre étendu
- **BMR** : Bactéries multi-résistantes
- **C** : Chloramphénicol
- **C+G %** : Pourcentage en guanine + cytosine du génome (anciennement coefficient de Chagaff)
- **C1G** : Céphalosporine de première génération
- **C2G** : Céphalosporine de deuxième génération
- **C3G** : Céphalosporine de troisième génération
- **CHUC** : Centre Hospitalo-Universitaire de Constantine
- **CTX-M** : Céfotaximase-Munich
- **FOX** : Gène codant pour une céphalosporinase
- **H₂S** : sulfure d'hydrogène
- **I** : Intermédiaire
- **Iga** : immunoglobuline A
- **IU** : Infection Urinaire
- **Kb** : kilo bases
- ***K.Pneumoniae*** : *Klebsiella pneumoniae*
- **KPC** : *Klebsiella pneumoniae* Carbapénémase
- **LCR** : Liquide céphalorachidien
- **LDC** : Lysine décarboxylase
- **LPS** : lipo-polysaccharide
- **NHSN** : National Healthcare Safety Network
- **nm** : nanomètre
- **ODC** : Ornithine décarboxylase

- **ONPG** : Orthonitrophényl-β-D-galactopyranoside
- **ORL** : Oto-rhino-laryngologie
- **PBN** : Pénicillinase de bas niveau
- **PHN** : Pénicillinase de haut niveau
- **R** : Résistante
- **RM** : Rouge de Méthyle
- **S** : Sensible
- **SHV** : Sulfhydryl variable
- **Sub sp** : sous espèce
- **TDA** : Tryptophane désaminase
- **TEM** : D'après Temoniera : nom du malade chez qui la première souche a été isolée
- **TSI** : Triple Sucre à Identifié
- **UV** : Ultra-violets
- **VIH** : Virus de l'immunodéficience humaine
- **VP**: Voges-Proskauer
- **µm** : micromètre

Liste des figures

Figure 1 : Aspect des colonies de <i>K. pneumoniae</i> sur milieu gélosé (Gueye, 2007).	6
Figure 2 : Séquence du génome complet de <i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i> HS11286 (Liu et al., 2012).	9
Figure 3 : Représentation schématique des facteurs de pathogénicité de <i>K. pneumoniae</i> (Podschun et Ullmann, 1998).	12
Figure 4 : Mécanisme d'action des antibiotiques (Paul H. Roy, 1997).	15
Figure 6 : Formation de dimère de pyrimidines (Klug et Spencer, 2006).	22
Figure 7 : Galerie biochimique témoin de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	29
Figure 8 : Antibiogramme de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	32
Figure 9 : Répartition des souches <i>K. pneumoniae</i> selon l'origine du prélèvement.	38
Figure 10 : Répartition de <i>Klebsiella pneumoniae</i> parmi les prélèvements cliniques.	39
Figure 11 : Distribution des souches de <i>K. pneumoniae</i> selon le sexe.	40
Figure 12 : Aspect des colonies des <i>Klebsiella pneumoniae</i> sur milieu Hektoen.	40
Figure 13 : Coloration de Gram de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	41
Figure 14 : Résultats de galerie biochimique de <i>K. pneumoniae</i>	42
Figure 15 : Résultats d'antibiogramme d'une souche <i>Klebsiella pneumoniae</i>	43
Figure 16 : Taux de résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux β -lactamines.	44
Figure 17 : Taux de résistance de <i>K. pneumoniae</i> aux autres classes d'antibiotiques.	45
Figure 18 : Répartition des principaux phénotypes de résistance aux β -lactamines	46
Figure 19 : Représentation graphique des phénotypes de résistance de <i>K. pneumoniae</i> aux Aminoside.	47
Figure 20 : Représentation graphique des phénotypes de résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux Quinolones.	48
Figure 21 : <i>Klebsiella pneumoniae</i> sauvage et mutante	49
Figure 22 : la courbe de survie de la souche <i>Klebsiella pneumoniae</i>	50

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux caractères biochimiques de <i>K. pneumoniae</i> (Joly et Reynaud, 2002).....	7
Tableau 2 : Caractères biochimiques d'identification des espèces du genre <i>Klebsiella</i> (Freney et Riegel, 2007).....	7
Tableau 3 : Distribution des souches <i>K. pneumoniae</i> selon l'origine du prélèvement.	38
Tableau 4 : Répartition des souches de <i>K. pneumoniae</i> parmi les prélèvements cliniques.	39
Tableau 5 : Distribution des souches de <i>K. pneumoniae</i> selon le sexe.	39
Tableau 6 : Répartition des principaux phénotypes de résistance aux β -lactamines.....	46
Tableau 7 : Répartition des principaux phénotypes de résistance aux Aminosides.	47
Tableau 8 : Répartition des principaux phénotypes de résistance aux quinolones.	48
Tableau 9 : Temps d'irradiation et pourcentage de survie de la souche <i>Klebsiella pneumoniae</i>	49

Résumé

Klebsiella pneumoniae est une bactérie pathogène opportuniste. elle est le chef de file des germes responsables d'infections nosocomiales sévères et difficiles à traiter, L'augmentation et la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif, notamment chez *K. pneumoniae*, représente un problème majeur de santé publique.

La mise en évidence du caractère épidémique de l'infection est importante pour la mise en oeuvre rapide des mesures préventives. Dans ce but, nous nous sommes fixés les objectifs suivants : l'identification de 20 souches de *K.P* selon ses caractères biochimiques, isolées à partir des différents prélèvements cliniques au niveau du service de microbiologie du CHU Benbadis Constantine, L'étude de la résistance aux antibiotiques des souches de *K.P* et déterminer leurs phénotypes de résistance, à la fin une mutagénèse a été réalisée par irradiation des souches au Rayons Ultra-violet pour déterminer leurs effets sur la survie de ces bactéries.

Les résultats issus de cette étude ont montré une résistance élevée des souches cliniques de *K.pneumoniae* à la majorité des antibiotiques cliniquement utilisés particulièrement aux β -lactamines 50 % des souches étaient productrices de BLSE.

Mots clés

Klebsiella pneumoniae – isolement – identification – caractères biochimiques – résistance -antibiotiques – phénotypes – BLSE – irradiation U.V – survie des bactéries.

Abstract

Klebsiella pneumoniae is an opportunistic pathogen bacterium. It is the leader of the germs responsible for severe nosocomial infections and difficult to treat. The increase and spread of antibiotic resistance among Gram-negative bacilli, especially in *K. pneumoniae* is a major public health problem.

The identification of the epidemic of infection is important for the quick implementation of preventive measures, For this purpose, we have set the following objectives : The identification of 20 strains of *k.pneumoniae* according to its biochemical characteristics, isolated from different clinical samples at the microbiology department of University Hospital Center Benbadis Constantine. The study of the resistance of *K.P* strains against the antibiotics and determine their resistance phenotypes, at the end, a mutagenesis was performed by the irradiation of the strains by the ultraviolet rays, in order to determine their effects on the survival of these bacteria.

The results of this study showed a high resistance of clinical isolates of *K. pneumoniae* to the majority of antibiotics clinically used particularly to β -lactams; which 50 % of the strains were ESBL-producers.

Key words:

Klebsiella pneumoniae, isolation, identification, biochemical characteristics, resistance, antibiotics, phenotypes, ESBL, ultraviolet rays, survival of bacteria.

ملخص

الكلبسيلة الرئوية هي بكتيريا انتهازية ممرضة، و هي الرائدة في الجراثيم المسؤولة عن عدوى المستشفيات المستعصية وصعبة العلاج، زيادة وانتشار المقاومة للمضادات الحيوية في العصيات سلبية الغرام، خصوصا عند الكلبسيلة الرئوية ، يشكل مشكلة رئيسية للصحة عامة .

تحديد وباء العدوى مهم لسرعة تنفيذ التدابير الوقائية. لهذا الغرض، وضعنا الأهداف التالية: تحديد 20 سلالة من الكلبسيلات الرئوية وفقا لخصائصها البيوكيميائية ، معزولة من عينات سريرية مختلفة في قسم علم الأحياء الدقيقة بالمستشفى الجامعي ابن باديس قسنطينة، دراسة مقاومة سلالات الكلبسيلات الرئوية للمضادات الحيوية و كذلك تحديد مظاهر المقاومة للمضادات الحيوية الخاصة بهم. ، في النهاية إحداث طفرات في هذه السلالات بواسطة الأشعة فوق البنفسجية لتحديد آثارها على بقاء هذه البكتيريا.

أظهرت نتائج هذه الدراسة وجود مقاومة عالية من طرف العزلات السريرية للكلبسيلات الرئوية لمعظم المضادات الحيوية المستخدمة سريريا خاصة اتجاه البيتا لكتامين (β -lactamines) حيث 50 ٪ من السلالات كانت منتجة ل BLSE.

الكلمات المفتاحية :

الكلبسيلة الرئوية - عزل - تحديد - الخصائص البيوكيميائية - المقاومة - المضادات الحيوية - الظواهر - BLSE - الأشعة فوق البنفسجية - بقاء البكتيريا.

Introduction

Introduction

Les infections nosocomiales constituent un problème majeur de santé publique reconnu à l'échelon mondial. Ces maladies suscitent autant d'inquiétudes que d'interrogations, depuis l'utilisation de l'antibiothérapie, elles sont progressivement changées de visage et les cliniciens ont été confrontés à des infections à germes autrefois réputés non pathogènes ou saprophytes. L'un des exemples le plus frappant pour illustrer ce propos est *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*).

Klebsiella pneumoniae est une entérobactérie qui fait partie des espèces commensales de l'homme et des animaux, c'est-à-dire des flores normales du sujet sain (**Kariuki et al., 2007**). Elle est responsable d'infections communautaires (urinaires et respiratoires) et d'infections opportunistes chez les malades hospitalisés (infections urinaires, broncho-pulmonaires, septicémies avec choc, de pneumonies et de bactériémies) (**Berrazeg et Rolain, 2013**). D'après le rapport de l'European Antibiotics Resistance Surveillance System (EARSS) de 2008, elle est responsable de plus de 10 % des infections nosocomiales.

Les espèces du genre *Klebsiella* sont présentes dans le monde entier, en particulier dans les régions tropicales et subtropicales. Elles sont ubiquistes, c'est-à-dire qu'on les rencontre partout, notamment dans les milieux forestiers, la végétation, le sol, l'eau et les muqueuses des espèces hôtes (**Janda et Abbott, 2006**). Le risque d'infection et le taux de portage de *Klebsiella* augmentent avec la durée du séjour à l'hôpital. D'après une étude, le taux de portage augmente de 11 à 42 % en 14 jours d'hospitalisation (**Janda et Abbott, 2006**). Par ailleurs, les taux d'infection et de portage augmentent avec l'utilisation d'agents antimicrobiens, ce qui conduit en général à l'apparition de bêta-lactamases à large spectre qui confèrent une résistance aux antibiotiques (**Janda et Abbott, 2006 ; Podschun et Ullmann, 1998**).

L'augmentation à l'échelle mondiale de la résistance médiée par les *Klebsiella pneumoniae* productrices de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) constitue une menace importante pour la santé publique, puisque des souches de *K. pneumoniae* BLSE+ résistantes à toutes les β -lactamines ont été isolées. D'après le Réseau d'Alerte d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN) de France, en 2001. Au niveau national, et selon le réseau de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques (2007-2008), sur 3277 bactéries multi résistantes toutes espèces confondues, isolées en milieu hospitalier et sur un effectif global de 13620 isolats, *K. pneumoniae* vient en tête avec 31,5 % des cas. Le réseau rapporte aussi que 46,2 % des souches de *K. pneumoniae* isolées à l'hôpital sont des BLSE. Les souches résistantes aux β -lactamines sont souvent résistantes aux autres familles d'antibiotiques laissant le champ thérapeutique très réduit. Le service de microbiologie du CHU Benbadis enregistre en moyenne 400 souches de *K. pneumoniae* par an, faisant de cette espèce la deuxième entérobactérie isolée par ordre de fréquence après *E. coli*.

C'est dans ce contexte général que nous avons choisi de mener ce travail de mémoire sur *Klebsiella pneumoniae*, qui a pour objectifs :

- L'enrichissement des connaissances bactériologiques et génétiques concernant *K. pneumoniae*, on réalisant une recherche bibliographique approfondie.
- L'isolement et l'identification des souches de *K. pneumoniae* au niveau du service de microbiologie du CHU Benbadis Constantine durant une période de deux mois.
- L'étude de la résistance aux antibiotiques des souches de *K. pneumoniae* et déterminer leurs phénotypes de résistance.
- Effectuer une mutagénèse en irradiant une souche de *K. pneumoniae* par un agent mutagène physique (Rayons Ultras Violets) et observer les résultats obtenus. Cette manipulation a été effectuée au sein du laboratoire des biotechnologies de la faculté des sciences de la nature et de la vie.

Le présent mémoire est structuré en :

- Une introduction
- Une revue bibliographique
- Une partie pratique incluant :
 - Matériel et méthodes
 - Résultats et discussion
- Une conclusion.

Revue bibliographique

I- Généralité sur *Klebsiella pneumoniae*

I-1- Dénomination

Le nom *Klebsiella* provient du nom du bactériologiste Klebs (1877) et l'espèce type dénommée «pneumobacille» par Friedlander qui l'a décrit comme agent de pneumonies mortelles pendant la période 1882- 1884 (Duca et Furtunescu, 1979).

I-2- Présentation du genre

Les espèces du genre *Klebsiella* sont des bactéries en forme de bâtonnet et font partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Elles se distinguent par leur immobilité constante, et leur groupement en diplobacilles. Elles sont souvent encapsulées et forment des colonies mucoïdes (Janda et Abbott, 2006; Abbott, 2007). Les Klebsielles sont ONPG positives et VP positif caractère clé ; car elles font partie du groupe "KESH" = KLEBSIELLA ENTEROBACTER SERRATIA HAFNIA. Ces entérobactéries, sont fréquemment responsables d'infections hospitalières.

Ce genre comporte 5 espèces différenciées par des caractères biochimiques, l'espèce type est *Klebsiella pneumoniae* parce qu'elle est la plus fréquemment retrouvée en clinique humaine (Brisse et Grimont, 2006 ; Carbonnelle et Vargues, 1987). Cette bactérie possède toutes les caractéristiques des *Enterobacteriaceae*. C'est une bactérie commensale de l'homme et des animaux. Elle est responsable d'infections communautaires (urinaires et respiratoires) et d'infections opportunistes chez les malades hospitalisés (Avril et al., 2000 ; Iliquer, 2010).

I-3- Classification

Règne : Bacteria

Embranchement : Proteobacteria

Classe : Gamma Proteobacteria

Ordre : Enterobacterales

Famille : Enterobacteriaceae

Genre : *Klebsiella*

Espèce :

- *Klebsiella pneumoniae*
 - Subsp. *Ozenae*.
 - Subsp. *Pneumoniae*.
 - Subsp. *Rhinoscleromatis*
- *Klebsiella oxytoca*
- *Klebsiella planticola*
- *Klebsiella terrigena*
- *Klebsiella ornithinolytica*. (George et al, 2004).

I-4- Habitat

Les espèces du genre *Klebsiella* sont présentes dans le monde entier, en particulier dans les régions tropicales et subtropicales. Elles sont ubiquistes, c'est-à-dire qu'on les rencontre partout, notamment dans les milieux forestiers, le sol, eaux de surface, eaux usées, effluents industriels (papeteries, minoteries, scieries, usines textiles...), le bois, les végétaux divers, les aliments et les muqueuses des espèces hôtes (**Janda et Abbott, 2006**). *Klebsiella pneumoniae* et *Klebsiella oxytoca* sont répandues dans la nature. On peut les isoler de l'eau, de végétaux, d'aliments divers. Ces deux espèces sont rencontrées dans la flore fécale de 30 à 40 % des animaux sauvages ou domestiques et de l'homme. On peut les rencontrer aussi à l'état commensal sur la peau, les muqueuses et les voies respiratoires supérieures. *Klebsiella ozaenae* et *Klebsiella rhinoscleromatis* ne sont pratiquement isolées que de l'arbre respiratoire de l'homme (**Leon et Michel, 1989**). Le portage digestif de *Klebsiella* est plus important chez les malades hospitalisés que dans la population normale. Sur les mains du personnel et sur les objets de l'environnement dans les services hospitaliers, la présence de *Klebsiella* est très fréquente (**Fauchere et Avril, 2002**).

I-5- Caractères bactériologiques

I-5-1- Caractères morphologiques

Les *Klebsiella* sont des bacilles à Gram négatif (coloration bipolaire fréquente), toujours immobiles, de dimensions comparables à celles d'*Escherichia coli* (0,3 à 1,0 µm de diamètre sur 0,6 à 6,0 µm de longueur), très souvent encapsulées. Cette capsule de nature polysaccharidique contient des acides hexuroniques (acides glycuronique et galacturonique) et de 2 à 4 sucres (galactose, glucose, mannose, fucose, rhamnose). La taille des capsules va en croissant de *Klebsiella oxytoca* (20 à 25 % de souches non capsulées) à *Klebsiella pneumoniae* (5 % environ de souches non capsulées) et surtout à *Klebsiella ozaenae* et *Klebsiella rhinoscleromatis* qui possèdent de volumineuses capsules. La culture sur milieu sucré, tel que le milieu hypersaccharosé de Worfel-Ferguson favorise la formation de capsules. Au contraire, l'évolution vers des formes non capsulées peut être obtenue par croissance en bouillon bilié à 50 % (**Richard et Grimont, 1992**). Les *Klebsiella* ont un poids moléculaire d'environ 3,36.10⁹ daltons (**Leclerc, 1983**).

I-5-2- Caractères cultureux

Sur les milieux classiques d'isolement pour les entérobactéries (Drigalski, EMB, Hektoen, Mac Conkey), les colonies de *Klebsiella pneumoniae* et *Klebsiella oxytoca* sont lactoses positives, bombées, muqueuses, parfois filantes à l'anse de platine (**Le Minor et Véron, 1989 ; Freney et Bollet, 2000**), d'un diamètre de 3 à 4 mm en 18 à 24 heures à 37 °C. La croissance de *Klebsiella ozaenae* et *Klebsiella rhinoscleromatis* sur les mêmes milieux est quelquefois plus lente (48 heures), leurs colonies sont alors

volumineuses, bombées, muqueuses, translucides, avec tendance à la confluence. Des milieux sélectifs ont été proposés pour l'isolement des *Klebsiella* lors d'épidémies hospitalières ou pour la numération de leurs colonies en bactériologie alimentaire : milieu « MacConkey- inositol- carbénicilline » (croissance possible des *Serratia*), milieu synthétique de Bruce et coll (au citrate- L- ornithine- raffinose- rouge de phénol, pH 5,6), milieu synthétique de Wong et coll (au lactose-KNO₃- rouge neutre- cristal violet), milieu synthétique de Van Kregten et coll (au citrate-inositol).

En milieu liquide (bouillon nutritif, eau peptonée), la culture est rapide (quelques heures) à 30° et 37° C pour *Klebsiella pneumoniae* et *Klebsiella oxytoca* avec parfois dépôt muqueux et collerette visqueuse en surface. A 10° C, seules se développent *Klebsiella terrigena*, *Klebsiella planticola* et 60 % des souches de *Klebsiella oxytoca*. A la différence des autres espèces de *Klebsiella*, plus de 90 % des souches de *K.pneumoniae* croissent à 44° C en bouillon lactosé bilié vert brillant et plus de 80 % en fermentant le lactose avec production de gaz (test des « coliformes fécaux » positif) (Le Minor et Véron, 1989).

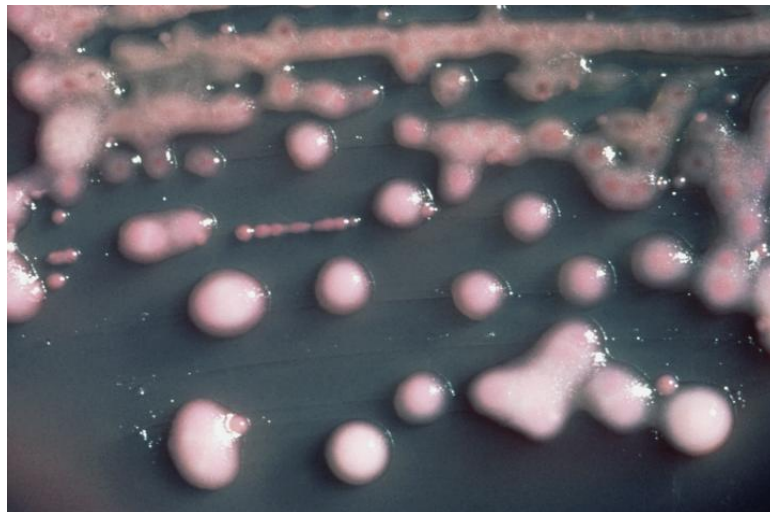


Figure 1 : Aspect des colonies de *K. pneumoniae* sur milieu gélosé (Gueye, 2007).

I-5-3- Caractères biochimiques

Les *klebsiella* sont des bactéries immobiles, non sporulées, aéro-anaérobies, ayant un métabolisme respiratoire et fermentatif, fermentant le glucose avec production de gaz, oxydase négative, catalase positive, ODC négative, ADH négative, tryptophane désaminase et phénylalanine désaminase négatives, bêta-glucuronidase négative. N'hydrolysant ni l'ADN ni le Tween 80, ne produisant pas d'hydrogène sulfuré et fermentant de nombreux sucres dont l'inositol. Réaction de Voges-Proskauer positive (VP+) et uréase + (Jarlier et Nordman, 2000 ; Nauciel, 2000).

- *Klebsiella pneumoniae* peut être définie comme une Entérobactérie immobile, VP +, RM -, uréase + lentement (uréase moins active que celle des *Proteus*), ONPG +, β -xylosidase +, H₂S -, indole -, désaminase oxydative -, LDC +, ODC -, lipase, DNase et gélatinase -, KCN +, fermentant de nombreux substrats glucidiques avec production de gaz, utilisant le citrate de Simmons et le malonate.

Tableau 1 : Principaux caractères biochimiques de *K. pneumoniae* (Joly et Reynaud, 2002).

Glucose	Indole	ONPG	Gaz	Mobilité	VP	RM	TDA	H2S	ODC	ADH	LDC	Citrate
+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+

- *Klebsiella oxytoca* se différencie de *Klebsiella pneumoniae* par la production constante d'indole. Environ 80 % des souches possèdent de plus une gélatinase d'activité modérée, 20 % une TTR. Toutes les souches de *Klebsiella oxytoca* fermentent le sorbose. *Klebsiella ozaenae* et *Klebsiella rhinoscleromatis*, outre le caractère VP -, sont moins glucidolytiques que les deux espèces précédentes. *Klebsiella ozaenae* n'utilise jamais le malonate. *Klebsiella rhinoscleromatis* est caractérisée par une stricte auxotrophie, l'absence de production de gaz et une activité biochimique réduite.

Tableau 2 : Caractères biochimiques d'identification des espèces du genre *Klebsiella* (Freney et Riegel, 2007). V : variable.

	<i>Klebsiella pneumoniae</i>			<i>Klebsiella oxytoca</i>
	Subsp. <i>pneumoniae</i>	Subsp. <i>ozaenae</i>	Subsp. <i>rhinoscleromatis</i>	
Indole	-	-	-	+
ODC	-	-	-	-
LDC	+	v	-	+
VP	+	-	-	+

- Certaines souches de *Klebsiella pneumoniae* et de *Klebsiella oxytoca* peuvent paraître « uréase - » après 24 heures à 37°C si on utilise des cultures sur gélose nutritive et un milieu réactif à l'urée du type Ferguson (par exemple, milieu « urée-indole »). Chez plus de la moitié de ces souches, l'uréase peut être mise en évidence en quelques heures, lorsqu'elles ont été cultivées sur des milieux contenant des sucres fermentescibles (milieu de Hajna ou milieu hypersaccharosé de

Worfel-Ferguson) : la fermentation des glucides, en acidifiant les milieux de culture, favorise la synthèse de l'uréase par les *Klebsiella*. L'autre moitié de ces souches, effectivement dépourvues d'uréase, acidifie pour une raison inconnue le milieu «urée-indole », dont l'indicateur vire au jaune citrin (Courvalin et Phillippon, 1989).

I-5-4- Caractères antigéniques

Les *Klebsiella* possèdent des antigènes O (somatiques), et K (capsulaires). La recherche des antigènes O présente peu d'intérêt pratique, en raison de leur nombre réduit (13 antigènes O différents) et de la difficulté de leur détermination par suite du caractère thermostable des antigènes capsulaires K qui masquent l'agglutination O (Singleton, 2005). La recherche des antigènes K est indispensable à toute enquête épidémiologique. Ils sont recherchés par agglutination sur lame ou en tubes, ou encore par la réaction de Neufeld dite du « gonflement » de la capsule (opacification de la capsule résultant d'une réaction antigène-anticorps).

Il existe 77 types capsulaires, soit K1 à K72, K74, K79 à 82. Les souches les plus souvent pathogènes pour l'homme et les animaux appartiennent au type capsulaire 1 et 2, plus rarement 3 et 4 K (Struve et al., 2003). *Klebsiella pneumoniae* et *Klebsiella oxytoca* se distribuent selon un grand nombre de types capsulaires. *K. pneumoniae* type capsulaire K1 croît plus lentement et après 48 heures d'incubation, les colonies sont volumineuses, bombées, très muqueuses translucides et elles présentent une tendance à la confluence (Riegel, 2003 ; Fauchère et Avril 2002). *Klebsiella ozaenae* appartient généralement au type 4, plus rarement aux types 1, 5, 6, 22. *Klebsiella rhinoscleromatis* uniquement au type 3 (Euzéby, 2004). Il existe des communautés antigéniques K entre *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* et d'autres entérobactéries quand elles sont capsulées (Richard et Grimont, 1992).

II- Pathogénicité de *Klebsiella pneumoniae*

II-1- Transmission

Klebsiella pneumoniae est responsable d'infections spontanées dans 25% des cas, mais surtout d'infections nosocomiales sévères et difficiles à traiter (Arafa et al., 2009). La transmission de ces bactéries d'un patient à un autre se fait facilement par les mains du personnel soignant ou les instruments de travail du personnel médical ou paramédical (cathéter, masque à oxygène...) (Raud, 2003), ou moins souvent par la contamination de l'environnement. La transmission de *K. pneumoniae* est très facile et rapide mais ne se propage pas dans l'air. Elle est pathogène chez l'immunodéprimé, souvent traité par les antibiotiques, chez lequel elle est parfois inoculée lors de manœuvres dans un but diagnostique ou thérapeutique. Les paramètres de santé sont les plus vulnérables aux infections à *Klebsiella* en raison de la

nature des procédures qui permettent un accès facile des bactéries dans le corps et causer cette infection mortelle (**Boston Medical Research Occupational Health Program, 2012**).

II-2- Génétique des *Klebsiella pneumoniae*

La figure 2 représente une souche résistante aux carbapénèmes appartenant au clone dominant ST11 de *Klebsiella pneumoniae* en Chine.

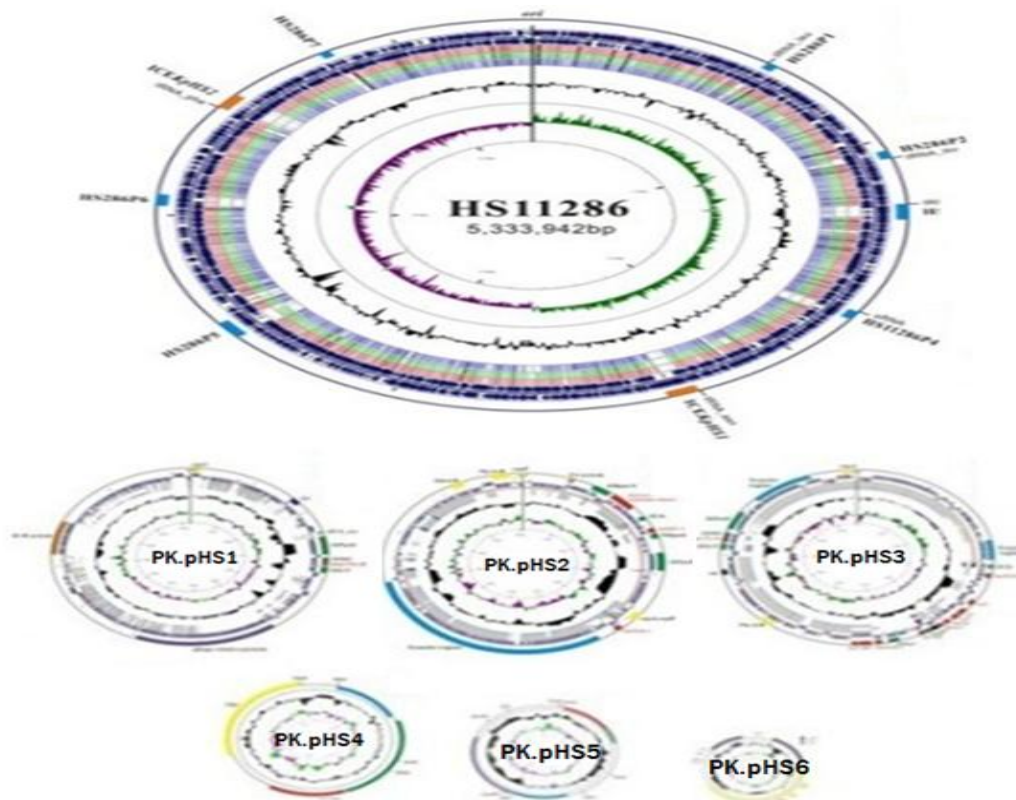


Figure 2: Séquence du génome complet de *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* HS11286 (Liu et al., 2012).

La souche multirésistante de *K. pneumoniae* HS11286 a été isolée à partir d'un échantillon de crachat en 2011 à l'Hôpital Huashan, Shanghai, Chine. Elle 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 l'ARNr 16S-23S-5S (Shao et al., 2010). Six plasmides se produisent naturellement dans la souche *K. pneumoniae*:

- 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% teneur en G + C).

- pKPHS5 (3353 pb, 42,8% teneur en G + C).
- pKPHS6 (1308 pb, 47,9% teneur en G + C).

pKPHS1 code pour un bêta-lactamase a spectre étendu 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 le plasmide pKP048 de *K. pneumoniae* (Jiang et al. 2010).

pKPHS3 possède 13 déterminants de résistance importants, tels que tetG, chat, sull1, dfra12, aac (HennequinC et Forestier, 2007) -Ia et aph, et est le plus semblable à un plasmide *Yersinia pestis*, pIP1202 (Galimand et al., 1997). 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 pKPHS4, pKPHS5 et pKPHS6 codent pour des protéines inconnues. À notre connaissance, le plasmide pKPHS6 de 1-kb est le plus petit plasmide de *K. pneumoniae* 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 (Kone Koumba Diallo, 2010).

II-3- Pouvoir pathogène

Les espèces du genre *Klebsiella* sont d'importants pathogènes communs, à l'origine de pneumonies nosocomiales (7 à 14 % de tous les cas), de septicémies (4 à 15 %), d'infections urinaires (6 à 17 %), d'infections de plaies (2 à 4 %), d'infections survenant dans les unités de soins intensifs (USI) (4 à 17 %) et de septicémies néonatales (3 à 20 %) (Janda et Abbott, 2006). Elles peuvent également causer des bactériémies et des infections hépatiques et ont été isolées dans un grand nombre d'infections inhabituelles, notamment des cas (d'endocardite, d'abcès médiastinal primaire gazeux, de péritonite, de cholécystite aiguë, de myonécrose crépitante, de pyomyosite, de fasciite nécrosante, d'abcès du psoas, d'infection de l'espace fascial au niveau de la tête et du cou, et d'arthrite septique) (Janda et Abbott, 2006). Ce sont également des pathogènes opportunistes importants, en particulier chez les personnes immunodéprimées.

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 (Boukadida et Salem, 2002). Elle est l'une des principales espèces bactériennes impliquées dans les IU soit de 6 à 17 % d'infection (Ben Haj Khalifa et Khedher, 2010). Selon le NHSN (National Healthcare Safety Network), *K. pneumoniae* est responsable de 7,9 % de l'ensemble des infections urinaire 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 % (Nedjai et Barguigua, 2011). *K.*

pneumoniae fait partie du groupe KESH qui est d'une grande importance en clinique hospitalière (Podschun et Ullmann, 1998).

- *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 (Carpenter, 1990).
- *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 (Podschun et Ullmann, 1998). Elle 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 (Strampfer et Cunha, 1987).

Les facteurs de pathogénicité des espèces du genre *Klebsiella* comprennent des adhésines, des sidérophores, des polysaccharides capsulaires, des lipopolysaccharides de surface cellulaire (LSP) et des toxines, qui jouent chacun un rôle particulier dans la pathogénèse associée à ces espèces. Selon le type d'infection et le mode d'infectivité, les bactéries du genre *Klebsiella* peuvent, en vue de les attaquer, adhérer aux cellules épithéliales des voies respiratoires supérieures, aux cellules du tractus gastro-intestinal, aux cellules endothéliales ou aux cellules uroépithéliales, avant de coloniser les muqueuses. Les affections sous-jacentes sont souvent l'alcoolisme, le diabète sucré, l'atteinte chronique du foie (cirrhose), l'insuffisance rénale chronique, le cancer, les greffes, les brûlures et l'utilisation de cathéters (Janda et Abbott, 2006).

II-4- Facteurs de pathogénicité

Les facteurs de pathogénicité de *K. pneumoniae* sont représentés dans la figure 3.

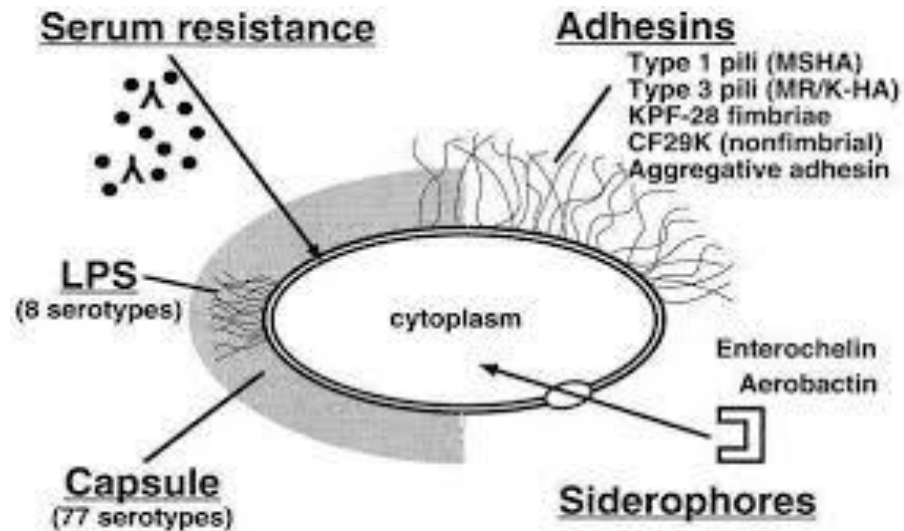


Figure 3 : Représentation schématique des facteurs de pathogénicité de *K. pneumoniae* (Podschun et Ullmann, 1998).

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 (Podschun et Ullmann, 1998).

II-4-1- 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.

II-4-2- Le lipopolysaccharide (LPS)

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 (Dabernat et Schlemmer, 1997).

II-4-3- La capsule

La capsule a été le premier facteur de virulence décrit (**Hennequin et al., 2012 ; Hsieh, 2012**). Elle confère à *Klebsiella pneumoniae* un fort pouvoir invasif en protégeant les bactéries de la phagocytose et du pouvoir bactéricide du sérum (**Lai et al., 2000; Held et al., 2000 ; Ofek et al., 2001**). C'est une véritable enveloppe de nature polysaccharidique présentant un antigène K (**Hennequin et al., 2007**). In vitro, la présence d'une capsule diminue l'attachement aux cellules intestinales HCT-8 et aux cellules vésicales T-24. Toutefois, in vivo la capsule n'inhibe pas la colonisation de l'intestin et elle semble être un facteur de virulence important dans les infections urinaires. Divers modèles expérimentaux montrent qu'il existe une relation entre la taille de la capsule et l'intensité du pouvoir pathogène. Parmi les 77 sérotypes capsulaires K1, K2, K4 et K5 sont les plus pathogènes (**Fung et Chang, 2000 ; Lai et al., 2000**).

II-4-4- Adhésines

Les adhésines sont des facteurs d'adhésion produits par la majorité des souches dont deux types ont été mis en évidence chez des souches pathogènes pour l'homme : les pili de type 1 et de type 3 qui permettent l'adhérence de la bactérie à la face baso-latérale des cellules trachéales et bronchiques et une adhésine non filamenteuse (adhésine CF 29 K) qui permet l'adhérence de la bactérie aux cellules intestinales et uro-épithéliales (**Joly et Reynaud, 2002 ; Hennequin et al., 2007**). *K. pneumoniae* peut produire des fimbriae de type 1 qui semblent être impliquées dans l'attachement aux cellules ciliées de l'appareil respiratoire et aux cellules vésicales (**Hennequin et al., 2007**). Elle peut également produire des fimbriae de type 3 (**Stahlhut, 2012 ; Aartsen, 2012**) dont l'importance in vivo est mal connue, mais qui pourraient permettre un attachement sur des surfaces inertes comme du matériel médical (**Lai et al., 2000 ; Di-Martino et al., 2003; Riegel 2003**), dans une étude au Danemark, montrent que le genre fimbriae type 1 est un facteur significatif dans les infections du tractus urinaire.

II-4-5- Le fer

Il joue un rôle essentiel dans la croissance et la multiplication bactérienne et la majorité des bactéries pathogènes ont développé des systèmes de captation du fer. Les souches de *K. pneumoniae* sont aptes à synthétiser des sidérophores de type aérobactine (hydroxamate) et entérochéline ou entérobactine (phénolate) qui favorisent la multiplication bactérienne dans les tissus (**Joly et Reynaud, 2002**). Grâce à ces sidérophores, environ 97 % des souches de *K. pneumoniae* utilisent l'hémoglobine et 56% utilisent l'hémoglobine liée à l'haptoglobine (**Fauchère et Avril, 2002**). La grande majorité des souches synthétise de l'entérobactine. Son rôle dans la virulence est mal connu. Dans le sérum, ce sidérophore est inactivé par l'albumine et les IgA. Cependant, l'entérobactine semble être un facteur de virulence important dans les infections urinaires (**Euzéby, 2004**). L'aérobactine est produite par environ 16% à 50% des souches. Les gènes codant pour la synthèse de l'aérobactine sont présents sur un plasmide de 180 kb. L'introduction de ce plasmide dans une souche qui en est dépourvue permet d'augmenter la virulence d'un

facteur 100. Parmi les souches produisant de l'aérobactine, certaines d'entre elles hébergent l'îlot de pathogénéicité HPI (High Pathogenecity Island) des *Yersinia sp* synthétisent de la yersiniobactine (**Lai et al., 2000**).

II-4-6- Ilot de pathogénéicité

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 (**Carniel, 1999**).

III- Résistance de *Klebsiella Pneumoniae* aux Antibiotiques

III-1- Les antibiotiques

III-1-1- Définition

Les antibiotiques sont des molécules à activité antibactérienne. Ils sont soit d'origine biologique (β -lactamines, aminosides, macrolides, polypeptides) semi synthétiques ou synthétiques (sulfamides, quinolones). Ils agissent spécifiquement sur des cibles moléculaires perturbant une étape essentielle du métabolisme des bactéries (synthés protéiques, synthèse des acides nucléiques, réplication, transcription, transport transmembranaire...).

III-1-1- critères de classifications

Les antibiotiques peuvent être classés selon leur mode d'action, leur spectre d'activité, l'origine de la molécule et la structure chimique. Au sein de la même famille, les antibiotiques peuvent aussi être regroupés en fonction des modifications successives apportées a leurs structure chimique pour élargir leur spectre d'activité ou améliorer leur pharmacologie. On parle de 'génération d'antibiotiques' telles les céphalosporines et les quinolones.

III-1-1- Mode d'action

Les antibiotiques agissent à l'échelon moléculaire sur une ou plusieurs étapes métaboliques indispensables à la vie de la bactérie au niveau de :

- La paroi bactérienne.
- La membrane cytoplasmique.
- La synthèse des protéines.
- La synthèse des acides nucléiques.
- la synthèse des folates (**Yala et al, 2001**).

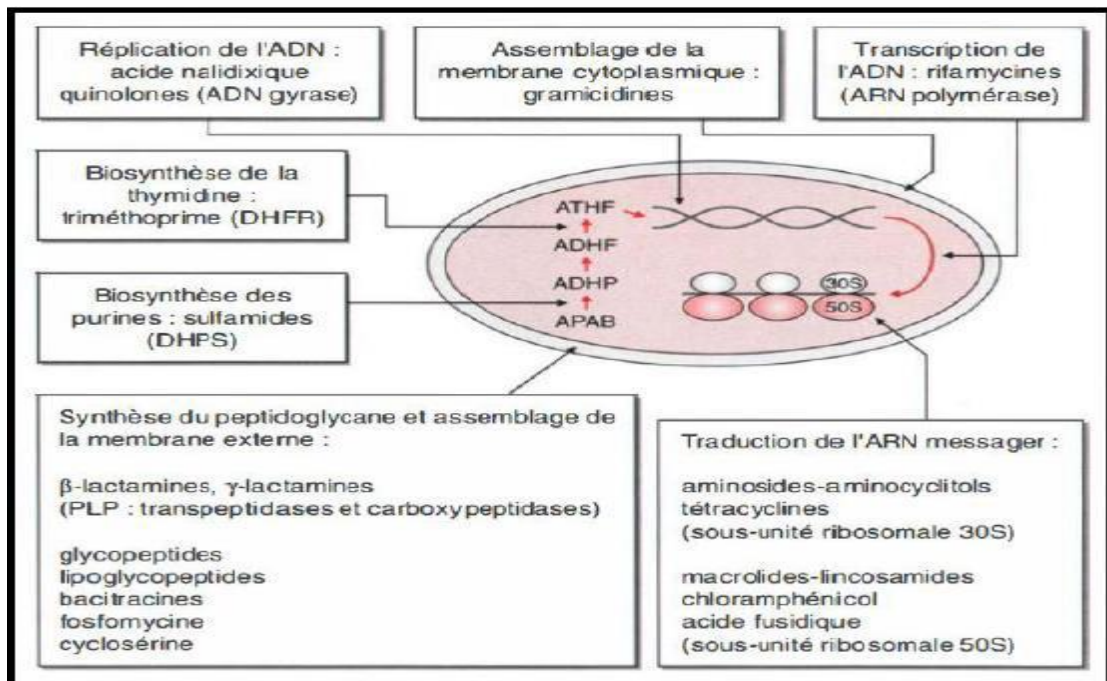


Figure 4 : Mécanisme d'action des antibiotiques (Paul H. Roy, 1997).

III-2- Notion de la résistance bactérienne

Une bactérie est dite résistante lorsqu'elle supporte une concentration d'antibiotique nettement plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres bactéries de la même espèce. (Carl, 2009). La résistance bactérienne est à différencier de la résistance clinique qui est la non réponse au traitement, responsable de l'échec thérapeutique.

III-3- 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 (Comité de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie, 1997).

III-3-1- Résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque est un caractère d'espèce qui touche toutes les cellules de toutes les souches. Elle est stable, transmise à la descendance mais pas ou peu transmissible sur un mode horizontal. La résistance naturelle a pour support génétique le chromosome bactérien et elle permet de définir le spectre d'activité des antibiotiques (Fauchère et Avril, 2002).

Les mécanismes de la résistance naturelle peuvent être l'imperméabilité de la paroi bactérienne ou la synthèse d'enzymes naturelle chromosomiques. *K. pneumoniae* est naturellement résistante aux

aminopénicillines (amoxicilline, ticarcilline) par production d'une β -lactamase de classe A d'espèce (chromosomique) du groupe fonctionnel 2a, inhibée par l'acide clavulanique (exemple : *Klebsiella pneumoniae* 1189) (Haeggman, 1997 ; Chaves, 1995).

III-3-2- Résistance acquise

La résistance acquise est un caractère qui ne concerne que quelques (ou parfois de nombreuses) souches d'une espèce donnée. Elle est moins stable, mais elle se propage souvent de façon importante dans le monde bactérien 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 (Yala et Ouar, 2001).

De nombreuses souches de *K. pneumoniae* résistent aux inhibiteurs des beta-lactamases (des beta-lactamases de classe A de type IRT insensibles à l'acide clavulanique (mutants d'enzymes TEM) ont été décrites) (Lemozy, 1995 ; Bermudes, 1997).

III-4- Résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux β -lactamines

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 (Bryskier, 1984).

III-4-1- 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.

a- Enzymatique

- 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 (Joly et Reynaud, 2002).

- 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 uréedopénicillines 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 (Jarlier et Nordmann, 2000).

- Céphalosporinase de haut niveau

Ce 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) qui a migré des espèces naturellement productrices d'Amp C (groupe III des enterobactéries) sur des plasmides. Cette résistance a été décrite en 1990 pour la première fois avec MIR-1 chez *Klebsiella pneumoniae* (**Gueudet et al, 2009**).

Klebsiella pneumoniae, ont connu un grand nombre de β -lactamase plasmidiques de classe C qui dérivent des céphalosporinases chromosomiques. On peut citer FOX-1 et MOX-1 (homologues à AmpC de *P. aeruginosa*), et LAT-1 et CMY-2 (homologues à AmpC de *Citrobacter freundii*) (**Sougakoff et Trystram 2003**). Les premières souches cliniques de *Klebsiella pneumoniae* ayant acquis un plasmide codant pour une β -lactamase de classe C sont décrites en 1988 (**Cavallo et al, 2004**).

- Carbapénèmases

Les carbapénèmases de classe A, les plus fréquentes, sont les carbapénèmases de type KPC (KPC-2 à KPC-8). La première souche exprimant KPC-2 (*Klebsiella pneumoniae* carbapénémase) fut identifiée dans une souche de *K. pneumoniae* en 1996, aux États-Unis. KPC-2 hydrolyse toutes les β -lactamines sauf les céfamycines et la ceftazidime (**Nordmann et al, 2010**). 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. (**Grall et al, 2011**). 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 (**Nordmann et al, 2010**).

Les enzymes de type GES sont initialement des BLSE dont seuls quelques variants touchent les carbapénèmes. Ces carbapénèmases 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* (**Grall et al, 2011**).

Les carbapénèmases de classe B : les enzymes de type VIM (Verona Integron encoded Metallo- β -lactamase) et IMP (Imipénémase) qui représentent la majorité des carbapénèmases de classe B ont été rejointes en 2008 par une nouvelle enzyme appelée NDM-1 (New Delhi metallo- β -lactamase 1). Le cas décrit était celui d'un patient d'origine indienne ayant auparavant été hospitalisé à New Delhi. Ce type d'enzyme a été principalement isolé chez *K. pneumoniae* (**Boutet-Dubois et al, 2012**).

La carbapénémase de classe D, OXA-48, décrite chez *K. pneumoniae*, hydrolyse fortement les carbapénèmes et n'hydrolyse pas les céphalosporines de 3^{ème} génération. Son activité n'est pas inhibée par l'acide clavulanique (**Nordmann et al, 2010**). La première souche de *K. pneumoniae* productrice d'OXA-48 a été isolée en Turquie en 2003 (**Boutet-Dubois et al, 2012**).

- **β -lactamase à spectre élargi (BLSE)**

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 (disque d'augmentin ou de claventin) (exemple, *K. pneumoniae* 1249). On peut noter que certaines BLSE sont caractérisées par une activité faible vis-à-vis des céphalosporines de troisième génération. Dans ce cas, le niveau de résistance est bas et les images de synergies sont plus discrètes (exemple, *K. pneumoniae* 1112). 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 (**Jarlier et Nordmann, 2000**). En 2009 plus de 160 variants de TEM et 100 variants de SHV sont connus (**Carrer et Nordmann, 2009**) dont la diversité des β -lactamases à spectre étendus décrites dans *Klebsiella pneumoniae* est très grande, des BLSE tels que TEM-3, TEM-10, TEM-12, TEM-24, TEM-26 ont été décrites. De nombreux variants de types SHV sont également connus (SHV-4, SHV-5, SHV-6 ou SHV-8) (**Sougakoff et Trystram, 2003**). Plus récemment, la BLSE TEM-52 a été caractérisée : elle présente une activité inhabituelle vis-à-vis du moxalactame, ainsi qu'une synergie entre cet antibiotique et le clavulanate.

Il existe un autre type de β -lactamases à spectre étendu il s'agit de CTX-M, enzymes hydrolysant le cefotaxime, la ceftriaxone plus efficacement que ceftazidime (**Gniadkowski, 2001 ; Villegas et al., 2004**). C'est une grande famille phylogénétiquement différentes de TEM et SHV, qui comprend plus de 19 enzymes (**Arafa, 2011**). En juin 2009 la dissémination de ces enzymes concerne maintenant l'ensemble des entérobactéries notamment *Klebsiella pneumoniae*. Les enzymes de type CTX-M sont divisées en 5 sous groupes phylogénétiquement différents (**Carrer et Nordmann, 2009**).

La résistance au cefepime et au cefpirome a été récemment décrite chez *Klebsiella pneumoniae* et semble liée à la combinaison de deux mécanismes : la production à haut niveau d'une BLSE SHV-5 et une diminution de la perméabilité de la membrane externe (**Sougakoff et Trystram, 2003**). 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 (**Boukadida et al, 2002**). La résistance à l'imipénème chez k.p peut être due à l'association d'une imperméabilité de la membrane externe (perte d'une porine de 42 Kda) à une production à haut niveau d'une β -lactamase plasmidique de classe C (ACT-1, homologue à AmpC de *E. cloacae* et MIR-1). On a également décrit au Japon une

souche de *K. pneumoniae* résistante à l'imipénème et à la ceftazidime et hébergeant le gène d'une métallo-beta-lactamase IMP sur une structure de type intégron.

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 (**Ben Haj Khalifa et al, 2010**).

b- Non enzymatique

- 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 céphalosporinases 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 (**Nordmann et al, 2010**).

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 (**Nordmann et al, 2010**).

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 (**Grall et al, 2011**).

III-5- Résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux aminosides

Comme la plupart des entérobactéries, *Klebsiella* présente une résistance aux aminosides gentamicine et à la nétilmicine alors que leur résistance à l'amikacine, ciprofloxacine est faible (**Hmamouchi et al, 2005**). La résistance acquise résulte d'une mauvaise pénétration de l'aminoside à l'intérieur de la cellule bactérienne ou de la modification enzymatique des antibiotiques par phosphorylation (APH aminoside phosphotransférase), nucléotidylation (ANT aminoside nucléotidylation transférase) ou acétylation (AAC aminoside acétyltransférase) (**Archambaud et Clave, 2008**).

En 1990 14% en moyenne des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées dans les CHU étaient productrices de BLSE mais l'écart aller de 2 à 47% selon les centres. Leurs profil de résistance à d'autres antibiotiques que les beta-lactamines indique une résistance aux aminosides de 74% pour l'Amikacine, de 95% pour la Tobramycine ; elle n'est que de 40 à 55% pour la Gentamycine, l'enzyme d'inactivation des aminosides produit par les *Klebsiella* étant une acétylase de type AAC6'IV qui n'active pas la Gentamycine ; celle-ci peut être inactivée par une autre acétylase de type (AAC(3)II) ou par une

adénylase de type ANT (2^{''}) produites par *klebsiella pneumoniae*, bactérie susceptible de présenter une multi-résistance aux aminosides (kanamycine, gentamycine, tobramycine, netilmecine-R) associé ou non a la production des BLSE (Eyquem et al., 2000).

III-6- Résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux quinolones:

La résistance des bactéries, notamment *Klebsiella pneumoniae*, aux fluoroquinolones est devenue préoccupante tant en milieu hospitalier qu'en médecine communautaire. 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 (Leshner et Brundage, 1962).

Chez *klebsiella pneumoniae*, la résistance aux fluoroquinolones est limitée pour les souches sauvages a 9-10%, est très fortement associée pour les souches productrices de BLSE atteignant des taux de 80% a 97% (Eyquem et al., 2000). La résistance aux quinolones fait intervenir différents mécanismes, dont le mécanisme le plus fréquent et le mieux connu est la modification de la cible.

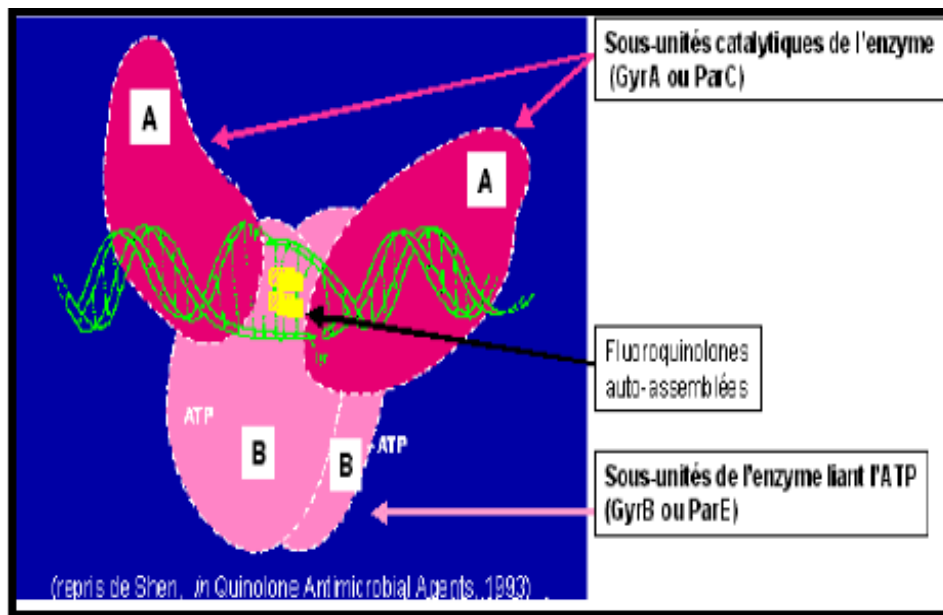


Figure 5 : Mécanisme d'action des Quinolones (Claire, 2013).

III-6-1- résistance par la modification de la cible

Ce mécanisme de résistance correspondant a une modification de cible de l'antibiotique avec une altération de l'ADN gyrase (sous-unité GyrA) et de la topoisomérase (sous-unité ParC) 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 (Archamboud et Clave, 2008).

III-6-2- résistance par défaut d'accumulation

Klebsiella pneumoniae peut également développer une résistance aux quinolones par diminution de pénétration à travers la paroi ou par efflux actif, cette résistance par défaut d'accumulation concerne surtout les quinolones hydrophiles (Illiaquer, 2010).

III-6-3- résistance plasmidiques aux quinolones

Le support de la résistance aux quinolones étaient supposé être uniquement chromosomique jusqu'en 1998 où Martinez-Martinez à découvert le premier déterminant de résistance plasmidique aux quinolones chez *K. pneumoniae* qui est un plasmide transférable (pMG252) qui héberge le gène qnr A. La protéine codée par le gène de résistance (qnr A) à été nommée QNR A, de 218 acides aminés appartenant à la famille des protéines à motifs pentapeptidiques répétés qui protège le complexe ADN-gyrase de l'inhibition par les quinolones. Quatre autres déterminants plasmidiques également impliqués dans la résistance aux quinolones ont été rapportés (qnr B, qnr S, qnr C et qnr D), ainsi que différents variants des protéines Qnr A et Qnr B. (Meradi et al, 2009). Il existe une fréquente association entre les déterminants génétiques de type Qnr et ceux des BLSE, ce qui souligne la possibilité d'une co-sélection de ces deux mécanismes de résistance plasmidique (Ben Haj Khalifa et al, 2010).

IV- Agents mutagènes

On appelle agent mutagène tout agent naturel ou résultant de l'activité humaine, physique ou chimique qui augmente la mutagénèse et qui peut entraîner une mutation génétique (Ennis, 2001). Les agents mutagènes ont des actions aléatoires qui peuvent altérer la structure de l'ADN, n'importe quelle partie du génome ou du gène peut subir une modification (Morère et Pujol, 2003).

De nombreux produits chimiques différents peuvent avoir une action mutagène (Winter et al., 1999). Parmi ces agents chimiques : les analogues de bases, agents désaminants (ou modifiant l'ADN), les agents alkylants et agents intercalants. On les distingue par leur mode d'action. Certains agissent par des mécanismes semblables aux mécanismes spontanés, d'autres agissent davantage comme les radiations. Parallèlement, différentes actions peuvent avoir lieu par des mutagènes physiques, Les agents physiques sont le principal agent mutagène et sont essentiellement des rayonnements ionisants ou non ionisants (ex : Champs électromagnétiques, rayonnements optiques et rayonnements ultraviolets (UV)). La lumière UV est la plus fréquemment utilisée au laboratoire pour induire des mutations et son mécanisme d'action est le plus connu. Leurs longueurs d'onde sont absorbées préférentiellement par des bases de l'ADN et par les acides aminés aromatiques des protéines. Les acides nucléiques absorbant le rayonnement UV a une longueur d'onde d'environ 260 nm, une propriété utile pour la détection des acides nucléiques. Leur principal effet est la création de dimères de pyrimidine cyclobutane et plus particulièrement des dimères de thymine impliquant des thymines contigües (TT) mais, selon la longueur d'onde, la dose et les séquences adjacentes, des dimères TC, CT ou CC peuvent également être formés

mais sont plus rares. Ces dimères créent des distorsions dans la conformation de la double hélice, ce qui inhibe la transcription et la réplication normale et introduit des erreurs dans la séquence d'ADN (**Nicklin, 2000 ; Ravanat et al., 2001 ; William et Michael, 2006**). On distingue parmi les UV :

- les UV-C (100 - 280 nm) : les plus énergétiques. Ils sont létaux mais absorbés par la couche d'ozone.
- les UV-B (280 - 320 nm) : ils peuvent être létaux. Ils constituent le rayonnement mutagène de la lumière solaire.
- les UV-A (320 - 400) : ils ont des effets délétères parce qu'ils créent des radicaux oxygénés mais ils produisent peu de dimères de la pyrimidine. (**Centre canadien d'hygiène et de sécurité au travail, 2013**).

La figure 6 représente un dimère de cytosines induit par Les rayons UV (UVB et UVC), provoquant une déformation de l'ADN qui amènera des mutations lors de la réplication de l'ADN.

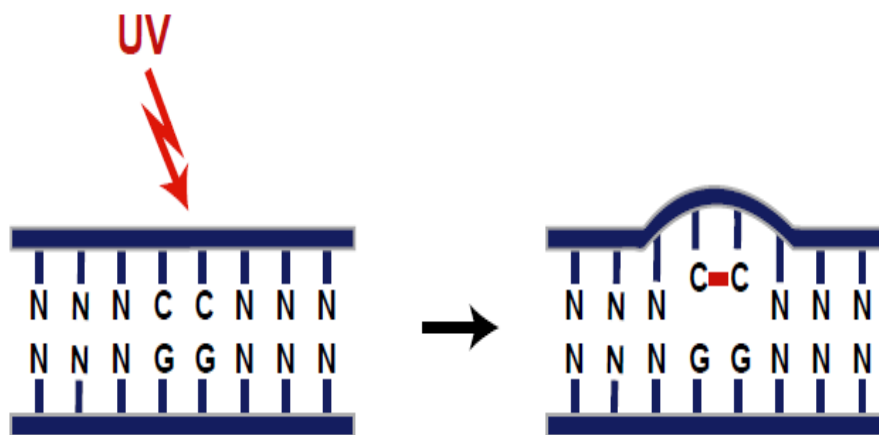


Figure 6 : Formation de dimère de pyrimidines (Klug et Spencer, 2006).

Matériel et méthodes

I- Lieu et durée de l'étude

Cette étude a été réalisée en grande partie au laboratoire de microbiologie du Centre Hospitalo-universitaire Benbadis de Constantine. Notre étude s'est étalée sur une période de deux mois (du 31 janvier au 31 mars 2016).

L'induction des mutants a été réalisée au laboratoire des biotechnologies de la faculté des sciences de la nature et de la vie durant une période de 15 jours.

II- Echantillonnage

Nous avons choisi de mener ce travail de mémoire sur *Klebsiella pneumoniae*, du fait d'une documentation devenue nécessaire chez nous à cause de sa fréquence dans les services et des épidémies causées par des souches résistantes à une large variété d'antibiotiques.

Durant la période de notre stage, 20 souches de *Klebsiella pneumoniae* ont été isolées à partir des prélèvements pathologiques des différents services du CHU de Constantine (Réanimation, Médecine, Pédiatrie, Chirurgie...), dont 5 communautaires et 15 hospitalières, 9 souches proviennent de femmes et 11 d'hommes.

Une étude rétrospective portant sur des résultats bactériologiques enregistrés pendant l'année 2015 a été réalisée. Les résultats de cette étude sont représentés dans **l'Annexe 9**.

III- Matériel utilisé

Pipettes Pasteur ;

Anse de platine ;

Boîtes de pétri ;

Lames et lamelles ;

Etuve ;

Distributeurs et disques d'antibiotiques ;

Ecouvillons ;

Pince ;

Huile à immersion ;

Pipette graduée ;

Autoclave ;

Hotte d'isolement ;

Vortex ;

Agitateur magnétique ;

pH-mètre.

IV-Milieus de culture

IV-1- Milieux de culture solides

Milieu Chapman ;
Milieu Hektoen;
Milieu gélose au Chocolat ;
Milieu Mueller Hinton ;
Milieu gélose nutritive.

IV-2- Milieux de culture liquides

Bouillon cœur cervelle
Bouillon nutritif

IV-3- Milieux d'identification biochimiques et métaboliques

Milieu TSI;
Milieu Mannitol mobilité;
Milieu Citrate de Simmons;
Milieu Liquide Urée-Indole.

V- Colorants et réactifs

Bleu de méthyle ;
Violet de gentiane ;
Lugol ;
Fuchsine ;
Réactif de Kovacs.

VI-Méthodologie

VI-1- Prélèvements

Les prélèvements reçus au laboratoire sont accompagnés d'une fiche de renseignements qui comporte :

- Nom et prénom du malade.
- Age et sexe.
- Service d'hospitalisation.
- Nature de prélèvements.
- Date et heure du prélèvement.
- Antibiothérapie éventuelle (nature et durée).
- Renseignements cliniques.

Tous les prélèvements sont réalisés à des fins diagnostiques. Pour chaque site, la nature de l'examen réalisé est indiquée entre parenthèses. Les sites sont les suivants :

- Le sang (hémoculture).
- L'urine (examen cytobactériologique des urines).
- Pus profond et séreuses (examen bactériologique des liquides des séreuses infectées).
- Cathéter vasculaire (analyse bactériologique après ablation d'un cathéter).
- Sonde urinaire ou sonde d'intubation (analyse bactériologique après ablation de la sonde).
- Le site broncho-pulmonaire (examen cytobactériologique des sécrétions broncho-pulmonaires).
- Drain (analyse bactériologique après ablation du drain).
- Le site cutané superficiel (écouvillonnage des plaies et des pus superficiels).
- Autres sites : site ORL (écouvillonnage), site uro-génital (examen des sécrétions et exsudats urogénitaux).

VI-2- Transport

Le prélèvement doit être transporté rapidement au laboratoire d'analyse. La durée de transport doit être aussi courte que possible (si possible inférieur, à 1 heure). Pour ce qui est de la température de transport, on distingue :

-Les prélèvements qu'il est préférable de garder à + 4° C : ils comportent une flore microbienne qui risque d'interférer avec l'agent causal. La multiplication de cette flore est ralentie à + 4° C. C'est le cas pour tous les prélèvements poly microbiens. Ces prélèvements sont : les urines post-mictionnelles, les selles, les expectorations pour la recherche du BK.

-Les prélèvements que l'on doit maintenir à + 37° C (étuve) : ils sont mono microbiens et renferment généralement des bactéries pathogènes fragiles, supportant mal les écarts de température. Ceci justifie le transport rapide vers le laboratoire, à l'abri du froid et de la dessiccation. Ce sont les hémocultures, les LCR et liquide de ponction, les pus d'abcès non fistualisés, les prothèses et les pièces opératoires ou biopsie.

-Les prélèvements qu'il faut mettre immédiatement en culture en raison du risque de dessiccation on couru si la culture est retardée. En effet, ces prélèvements sont généralement pratiqués à l'aide d'un écouvillon, dispositif stérile constitué d'une tige surmontée d'un coton. De tels prélèvements doivent être réalisés au laboratoire même. C'est le cas des prélèvements de gorge, des pus d'oreille, des pus d'abcès fistualisés, des prélèvements génitaux masculins et féminins.

VI-3- Analyse des prélèvements au laboratoire

Le traitement des prélèvements au niveau du laboratoire se fait selon les étapes suivantes :

VI-3-1- Examen macroscopique

a- Urines

L'urine normale a une couleur claire, d'aspect jaune citron tandis que l'urine infectée est souvent trouble, d'odeur nauséabonde et de couleur plus foncée. Parfois, on note même la présence de sédiments tantôt blanchâtres (phosphates), tantôt rouge brique (acide urique).

b- Pus

Il est difficile de faire une évaluation macroscopique des prélèvements de pus. Un technicien expérimenté doit évaluer soigneusement la couleur, la consistance, l'aspect et l'odeur des prélèvements de pus reçus au niveau du laboratoire (le pus peut être épais, visqueux, élastique, mélangé au sang ou non, fluide ou séreux. La couleur varie de la teinte chocolat au blanc, certains pus sont verdâtres ou bleutés).

c- LCR

Après homogénéisation par une légère agitation, on note le degré de limpidité du liquide et sa coloration. Un liquide clair (appelé souvent eau de roche) correspond soit à un liquide normal, soit à un liquide pathologique. Un liquide trouble ou franchement purulent (eau de riz) correspond à une réaction leucocytaire marquée. En cas de piqûre d'un vaisseau au cours de la ponction, on note une coloration rouge du liquide avec souvent formation d'un petit caillot. Les liquides sanglants ou jaunes (appelés xanthochromiques) évoquent plutôt une hémorragie méningée.

VI-3-2- Examens microscopiques

a- État frais

- Principe et technique

C'est un examen de mise en œuvre très simple qui permet d'apprécier la morphologie des bactéries, leur mode de regroupement, et surtout leur mobilité. Il est réalisé en déposant sur une lame porte objet stérile une goutte d'eau physiologique et une colonie homogénéisée et de recouvrir d'une lamelle en évitant d'emprisonner les bulles d'air. La préparation est examinée au Microscope Optique au grossissement x40.

b- Coloration au bleu de méthylène

La coloration au bleu de méthylène (BM) est une coloration très simple qui permet d'apprécier la morphologie des bactéries (ne permet pas de différencier les bactéries de même morphologie), mais aussi les cellules qui sont en général mieux conservées qu'avec la coloration de Gram.

- Technique

- Réaliser un frottis et le fixer à la chaleur
- Le recouvrir de bleu de méthylène et laisser agir 3 min
- Rincer à l'eau distillée
- Sécher entre 2 feuilles de papier essuie-tout.

- **Observations**

Examiner à l'objectif x100 à immersion (avec une goutte d'huile) avec un éclairage important (diaphragme ouvert). Toutes les cellules apparaissent colorées en bleu.

Noter:

- La morphologie des bactéries: bacilles, coques...
- Leur mode de groupement: isolées, par 2, en amas, en chaînettes.
- La présence de cellules (polynucléaires, lymphocytes et cellules épithéliales...) et de germes.

c- Coloration de Gram

- **Principe et technique**

La coloration de Gram est la coloration de base de la bactériologie. C'est une coloration double qui permet de différencier les bactéries non seulement d'après leur forme et leur disposition, mais surtout d'après leur affinité pour les colorants liée à la structure de la paroi.

La coloration de Gram se déroule en plusieurs étapes qui consistent à :

- Faire un frottis ;
- fixer le frottis a la flamme d'un bec bunsen ;
- recouvrir le frottis de la solution de violet de gentiane on laisse agir une minute ;
- rejeter le colorant puis laver à l'eau ;
- recouvrir la préparation de lugol, laisser agir 30 secondes ;
- rejeter le lugol puis laver à l'eau ;
- décolorer à l'alcool on le laissant agir pendant 30 secondes ;
- rincer a l'eau courante et recouvrir la lame de solution de fuchsine diluée, laisser agir 30 secondes ;
- rejeter la fuchsine, laver abondamment, égoutter, sécher entre deux feuilles de papier buvard propres.

- **Lecture**

La lecture se fait au grossissement x 100 avec une goutte d'huile à immersion. Les bactéries à Gram positif apparaissent colorées en violet, alors que les bactéries à Gram négatif sont roses.

VI-3-3- Culture

Les prélèvements ont été réalisés par écouvillonnage, on procède directement à une recherche de germes et cela en déchargeant en stries condensées l'écouvillon de prélèvement sur toute la surface des boites gélosées des trois milieux solides différents (milieux Hektoen, Chapman et chocolat) puis introduire l'écouvillon de prélèvement dans un tube contenant du bouillon d'enrichissement (bouillon cœur cerveau).

Le milieu Hektoen est un milieu gélosé sélectif pour les entérobactéries qui contient des sels biliaires lactosé, sacharosé, et saliciné et du verre brillant qui permet le développement des bacilles à Gram négatif et l'inhibition de la croissance des germes à Gram positif.

Le milieu de Chapman est utilisé pour l'isolement des *Staphylococcus* ; il inhibe la grande majorité des autres bactéries.

Le milieu gélose au chocolat permet la culture des bactéries exigeantes et des bactéries non exigeantes.

Les milieuxensemencés, sont incubés à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 18 à 24 heures.

VI-3-4- Isolement et purification

Après la lecture des boîtes de cultures, et après l'identification des germes. Si on trouve une *Klebsiella* sur le milieu Hektoen les différentes colonies obtenues sont ré-isolées sur le même milieu afin d'obtenir des souches pures.

VI-3-5- Critères d'identifications de *Klebsiella pneumoniae*

L'identification des souches est réalisée par l'étude de plusieurs tests biochimiques et métaboliques.

- **Identification par galeries classiques**

- **Préparation de la suspension bactérienne**

La préparation de la suspension bactérienne consiste en un transfert en condition aseptique d'une ou de plusieurs (4 à 5 colonies identiques) bien isolée sur un milieu Hektoen vers un tube qui contient 1 à 2 ml d'eau physiologique stérile. Cette suspension sert à ensemencer différents milieux de culture et d'identification permettant ainsi de mettre en évidence différents caractères biochimiques.

- **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 et leurs modes d'ensemencement sont mentionnés ci dessous.

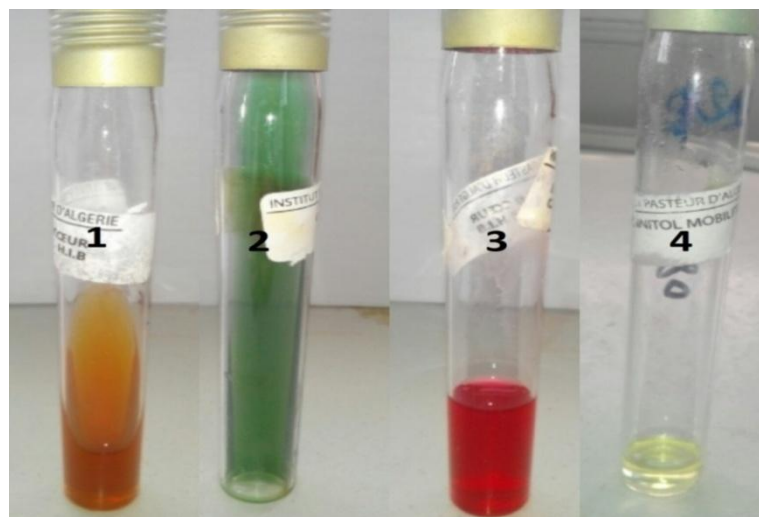


Figure 7 : galerie biochimique témoin de *klebsiella pneumoniae*. 1 : TSI ; 2 : Citrate de Simmons ; 3 : Mannitol-mobilité ; 4 : Urée-indole.

a- Milieu TSI

Le milieu Triple-Sugar-Iron est un milieu d'identification rapide pour les entérobactéries, il permet de mettre en évidence la fermentation du glucose (avec ou sans dégagement gazeux), du lactose, du saccharose et la production de H₂S.

La technique consiste à ensemencer à l'aide d'une pipette pasteur en stries serrées la pente de la gélose puis par piqûre centrale le culot, la lecture se fait après 24 h d'incubation à 37°C.

▪ Lecture

La fermentation du glucose se traduit par le virage au jaune du culot, et la production de gaz se traduit par la formation de bulles de gaz dans la gélose ou le décollement de celle-ci.

La fermentation du lactose et/ou du saccharose se traduit par le virage au jaune de la pente. Production du H₂S se traduit par noircissement au niveau du culot.

b- Milieu citrate de Simmons

Le milieu citrate de Simmons est utilisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif. Il permet de rechercher l'utilisation de citrate comme seule source de carbone.

L'ensemencement se fait au moyen d'une pipette pasteur par des stries longitudinales de la pente, la lecture se fait après 24 h à 7 jours d'incubation à 37°C.

▪ Lecture

L'utilisation du citrate de Simmons se traduit par un virage de couleur du vert au bleu qui signifie qu'il y a eu une alcalinisation du milieu et que la bactérie possède un citrate perméase plus observation d'apparition des colonies sur le milieu.

c- Milieu mannitol-mobilité

Le milieu mannitol-mobilité est utilisé pour la différenciation rapide des Entérobactéries.

Il permet de déceler la dégradation du mannitol et la mobilité de la bactérie.

L'ensemencement se fait au moyen d'une pipette pasteur par une simple piqure centrale jusqu'au fond du tube, la lecture se fait après 24 h d'incubation à 37°C.

▪ Lecture

La fermentation du mannitol se traduit par un virage de couleur du rouge au jaune.

La présence des bactéries au-delà de l'axe central signifie qu'elles sont mobiles; cependant leur présence uniquement au niveau de la piqure centrale signifie qu'elles sont immobiles.

d- Milieu urée-indole

Le milieu urée-tryptophane appelé improprement milieu urée-indole c'est un milieu complexe qui fournit un ensemble de résultats utiles pour la différenciation des entérobactéries. Il permet de rechercher :

-L'uréase

Les entérobactéries peuvent dégrader l'urée qui est un composé organique et qui peut servir de source d'azote unique aux bactéries possédant une uréase très active. En présence de cette enzyme, les bactéries uréolytiques peuvent transformer l'urée en ammoniac et en carbonate d'ammonium qui alcalinise le milieu, et qui fait virer l'indicateur coloré de pH (le rouge de phénol) du jaune au rouge-rose en milieu basique.

-La tryptophanase

Après addition du réactif de Kovacs : le diméthylamino- 4-benzaldéhyde contenu dans le réactif de Kovacs réagit avec l'indole, produit de l'activité de la tryptophanase, et forme un anneau coloré en rouge à l'interface du tube.

L'ensemencement se fait au moyen d'une pipette pasteur par l'ajout de quelques gouttes du milieu urée-indole dans un tube contenant la suspension bactérienne. La lecture se fait après 24 h d'incubation à 37°C.

- **Lecture**

-L'hydrolyse de l'urée

Le virage de la couleur de l'orange vers le rouge ou le rose violet signifie qu'il y a eu une alcalinisation du milieu et que la bactérie possède une uréase.

-La tryptophanase

Après addition du réactif de Kovacs, l'apparition d'un anneau rouge à l'interface du tube montre que la bactérie est indole positif.

VI-3-6- Étude de la sensibilité aux antibiotiques

- **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. Le résultat numérique brut est accompagné d'une interprétation ou remplacé par elle: résistant, sensible, intermédiaire, ou (indéterminée) (**Scavizzi et al., 2000**).

Pour chaque souche de *Klebsiella pneumoniae* isolée, un antibiogramme est réalisé par la méthode de diffusion en milieu gélosé Mueller Hinton. La technique de l'écouvillonnage et la mesure des diamètres se font selon les recommandations du CLSI.

Les résultats de cet examen peuvent aider les médecins dans le choix de l'antibiotique approprié pour la thérapie.

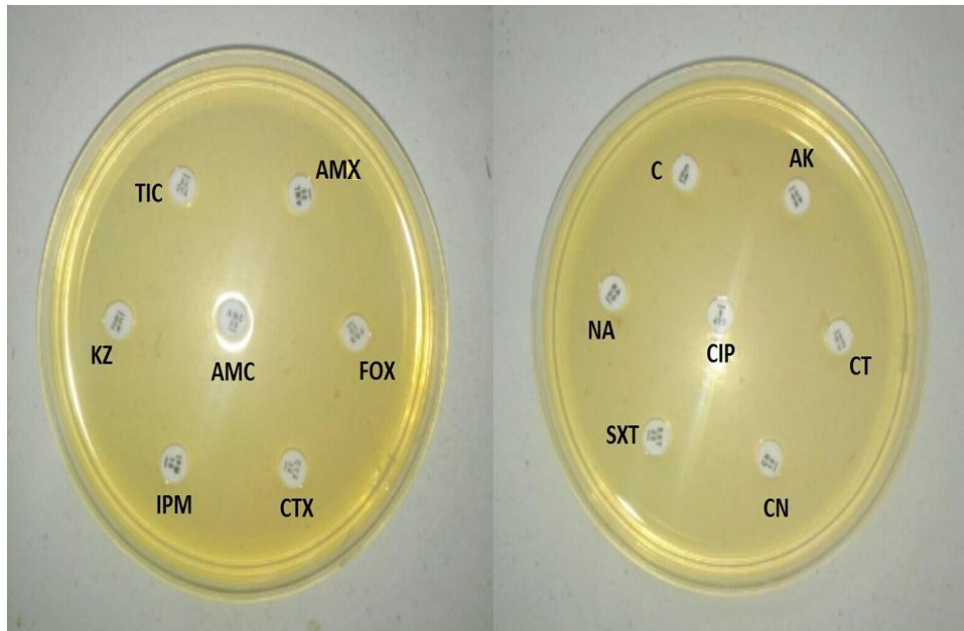


Figure 8 : Antibiogramme de *Klebsiella pneumoniae*.

a- Milieu pour l'antibiogramme

On utilise un milieu non sélectif Mueller-Hinton, il doit être coulé en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4mm, les boîtes doivent être séchées avant leur emploi.

b- Réalisation de l'inoculum bactérienne

A partir d'une culture pure de 18 h à 24 h sur milieu d'isolement approprié, prélever à l'aide d'un écouvillon stérile une ou plusieurs (4 à 5 colonies identiques) bien isolée, et les transférer dans un tube contenant 2.5 ml d'eau physiologique stérile. Bien homogénéiser la suspension bactérienne en frottant l'écouvillon sur la paroi interne du tube.

c- Ensemencement par écouvillonnage

- L'écouvillon est trempé 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 gélosée, de haut en bas, en stries serrées, l'opération est répétée 2 fois, en tournant la 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 ;
- Recharger l'écouvillon pour chaque boîte de Pétri.

d- Choix des antibiotiques

Dans notre étude, les antibiotiques utilisés sont :

- Pour les β -lactamines : Amoxicilline (AMX), Amoxicilline+acide clavulanique (AMC), Ticarcilline (TIC), Céfazoline (KZ), Céfoxitine (FOX), Céfotaxime (CTX), Imipénèmes (IPM).

- Pour les quinolones : Ciproflaxacine (CIP), acide nalidixique (NA).
- Pour les aminosides : Amikacine (AK), Gentamicine (CN).
- Pour les sulfamides : sulfamethoxazole+trimetoprim (SXT).
- Pour les phénicol : chloramphénicol (C).
- Pour les polymyxines : la colistine (CT).

e- Application des disques d'antibiotiques

L'application des disques se fait à l'aide de distributeurs automatiques. Certains disques sont déposés manuellement avec une pince flambée (utiles pour un rapprochement ou éloignement des disques, ou pour un choix positionnel) qui sont parfaitement appliqués à plat sans glissement en appuyant légèrement sur la surface de la gélose. Une distance minimale de 15 mm doit séparer un disque périphérique du bord de la boîte et deux disques doivent être éloignés au minimum de 30mm de sorte que les zones d'inhibitions ne se chevauchent pas. Les boîtes sont ensuite portées à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures.

f- Lecture et interprétation

Les résultats sont exprimés en mm après lecture des diamètres des zones d'inhibition et sont interprétés en trois catégories: S= sensible, R= résistant, et I= intermédiaire, en se référant aux normes CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

VII- Mutagenèse

VII-1- Définition

Ensemble de technologie permettant d'accroître la fréquence des mutations. La mutagenèse, fait parfois appel au génie génétique, Deux méthodes sont possibles, la mutagenèse aléatoire et la mutagenèse dirigée. La première consiste à utiliser un agent mutagène, qui induira de manière aléatoire des mutations dans le génome de l'organisme étudié. L'endroit et la nature des mutations ne sont pas prévisibles et ne peuvent pas être contrôlés. La seconde utilisera des méthodes de biologie moléculaire pour induire une mutation précise dans le gène ciblé.

• **La mutagenèse classique aux UV**

D'un point de vue de la sécurité, les UV sont préférables en particulier depuis que du matériel facile d'utilisation et parfaitement sécurisé est disponible. Cependant, le spectre des mutations obtenues avec les UV ne permet pas toujours d'obtenir ce que l'on désire. De même, certains organismes sont très résistants aux traitements avec des UV. Les mutagènes chimiques sont alors utilisés. Il existe alors des conditions draconiennes d'utilisation de ces produits qui se fait dans des pièces sécurisées. Pour que ce traitement soit efficace, il faut que de nombreuses mutations soient produites. Les mutations apparaissant au hasard dans le génome, beaucoup d'entre elles vont toucher des gènes essentiels et donc après le traitement le taux de survie va être fortement diminué. En pratique, il faut donc partir d'un effectif

suffisamment grand pour tenir compte de cette létalité. Réciproquement, le taux de survie est une indication de l'efficacité du traitement mutagène. Classiquement, un taux de survie de 1 à 5% est indicatif que le traitement a bien fonctionné et que de nombreuses mutations ont été produites.

Les mutations obtenues avec ce type de traitement sont le plus souvent ponctuelles (il est aussi possible d'obtenir avec certains produits des délétions). Elles peuvent inactiver le gène, modifier son fonctionnement voire augmenter son fonctionnement. Ce type de mutagenèse permet donc d'obtenir des mutations qui ont un large éventail d'effets. (M. Silar, Université de Paris Diderot 2008).

VII-2- But

Le but de cette manipulation est d'induire des mutations et de voir l'influence des UV sur la survie des souches de *Klebsiella pneumoniae* après irradiation aux rayons ultraviolets.

VII-3- Mode opératoire

VII-3-1- Préparation de la suspension bactérienne

Sous la hotte d'isolement à l'aide d'une anse de platine stérile (tournée dans un flacon d'éthanol puis flambée au bec bunsen) on prélève à partir des boîtes de gélose Hektoen une colonie de *Klebsiella pneumoniae* bien isolée puis l'introduire dans un tube stérile contenant du bouillon nutritif on vortex les tubes pendant 1 à 2 min pour bien homogénéiser le milieu puis on réalise une incubation à l'étuve à 37 ° C, pendant 24h.

VII-3-2- Préparation et stérilisation du matériel utilisé

Pour chaque souche on a besoin d'une pipette graduée et 5 tubes contenant 9 ml d'eau distillé (tout le matériel est stérilisé à l'autoclave à 110 ° - 120 ° C), puis on prépare la gélose nutritive, les ingrédients constituant le milieu sont pesés puis dissous dans 500 ml d'eau distillé, ce qui peut nécessiter un léger chauffage sous agitation constante pour assurer la fusion et l'homogénéisation du milieu. La solution portée ensuite au volume 1000 ml et ajustée au PH désiré c'est-à-dire 7.2 - 7.4 est répartie en 100 ml par flacon de 250 ml de volume. Les flacons bouchés, sans que la vis soit trop serrée, sont stérilisés à l'autoclave pendant 20 à 30 min à 110 ° - 120 ° C. on visse les flacons après autoclavage et refroidissement complet du milieu. Les boîtes de pétri sont coulées immédiatement sous une hotte à flux laminaire par les étapes suivantes :

- On débouche éventuellement le bouchon du flacon contenant le milieu gélosé en surfusion.
- On tient le flacon et on l'ouvre dans le périmètre de stérilité on maintient le bouchon contre la pomme de la main droite avec le petit doigt pour éviter de le poser sur le plan de travail.
- On entrouvre la boîte de pétri à couler, placée à gauche du brûleur à gaz, avec la main gauche.

- On passe l'ouverture du flacon dans la flamme du bec bunsen et on verse entre 10 à 20 ml de milieu fondu (45° C - 50° C) dans la boîte de manière à couvrir le fond.
- On laisse la boîte à moitié ouverte en direction de la flamme pendant quelques instants pour permettre l'évacuation de la vapeur d'eau. On passe l'ouverture du flacon dans la flamme du brûleur à gaz une deuxième fois, puis on coule les boîtes suivantes de la même manière avant de fermer le flacon définitivement.
- On déplace les boîtes par glissement doux sur une zone froide sous la hotte et on les referme dès qu'elles sont complètement solidifiées.
- On retourne les boîtes pour empêcher l'eau de condensation accumulée sous le couvercle de retomber sur le milieu.

VII-3-3- Dilution

Toujours sous la hotte, à partir de chaque suspension et à l'aide d'une pipette graduée stérile on réalise des séries de dilutions de 10^{-1} , 10^{-2} jusqu'à 10^{-5} dans les tubes à essais contenant 9 ml d'eau physiologique stérile. Une dilution au 1/10 est obtenue en mélangeant 1 ml d'échantillon à 9ml de diluant. Si 1 ml de cette dilution au 1/10 est ajoutée à 9ml de diluant, on obtient une dilution au 1/100 le processus de dilution est répété jusqu'à obtention d'une souche diluée à 10^{-5} (après chaque dilution on vortex les tubes pendant 1 à 2 min pour homogénéiser la suspension).

VII-3-4- Ensemencement sur la Gélose Nutritive

A partir du dernier tube contenant la suspension diluée à 10^{-5} et au moyen d'une pipette pasteur stérile :

- On tient le tube contenant la suspension microbienne dans la main gauche, en position horizontale, l'ouverture dirigée vers la flamme, afin de réduire l'entrée d'éventuelles chutes de germes.
- On ouvre le tube en saisissant le bouchon dans la main droite entre le petit doigt et la pomme de la main, alors que la pipette pasteur est tenue entre le pouce et l'index.
- On flambe légèrement l'orifice du tube et on prélève la souche en y introduisant la pipette pasteur flambée et refroidie de telle sorte que la suspension reste pure sans qu'il y ait un apport de germes étrangers c'est-à-dire une contamination.
- On pose le tube sur un portoir placé à gauche du brûleur, et on dépose un faible volume de l'ordre de 0,1 ml de suspension à la surface des 5 boîtes de pétri qui contiennent la GN stérile. L'échantillon est alors étalé de façon homogène sur la surface au moyen d'un râtelier stérile formé à l'aide d'une pipette pasteur, on recourbant la partie effilée de la pipette à environ 4 cm de la pointe boutonnée puis une deuxième fois à 4 cm de la partie coudée.

VII-3-5- Irradiation

- L'irradiation se fait à l'aide d'une lampe à UV (à une longueur d'onde égale à 320 nm).

- Mettre une boîte sous les UV, enlever le couvercle, enlever les mains de dessous les UV et déclencher le chronomètre.
- Garder une boîte de la souche non irradiée comme témoin.
- Le nombre des boîtes irradiées est de 4.
- Les boîtes de pétri sont irradiées, ouvertes pendant différents temps (5s, 10s, 15s, 20s), à une distance fixe de 30 cm de la source des rayons ultra-violets.
- Marquer les durées d'exposition aux UV au dos des boîtes.
- N'exposer pas les boîtes à une trop forte intensité de lumière visible après la mutagenèse afin d'éviter la photoréversion.
- Les boîtes sont enveloppées par du papier aluminium, et incubées dans l'étuve à 37 ° C pendant 24h.
- Le nombre de colonie dans chacune des boîtes est compté. Le pourcentage de survivants est ensuite calculé. La courbe de survie est enfin tracée.

Résultats et discussion

I- Prélèvements

I-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, (2000).

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

Origine	Effectif	Pourcentage (%)
Souches hospitalières	15	75
Souches communautaires	5	25
Total	20	100

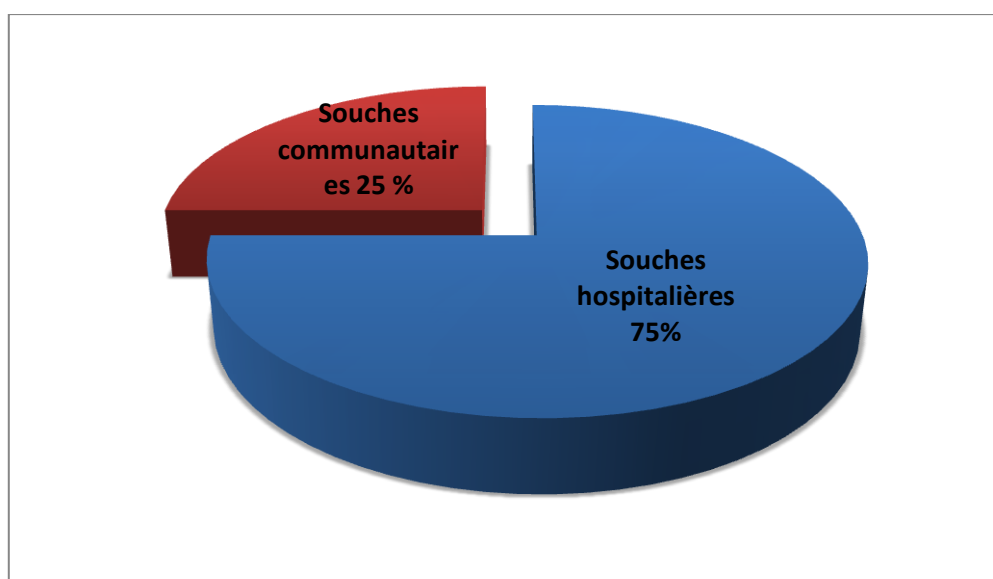


Figure 9: Répartition des souches *K. pneumoniae* selon l'origine du prélèvement.

I-2- Distribution des souches parmi les prélèvements cliniques

Sur les 20 souches de *K. pneumoniae* isolées, 40 % des prélèvements ont été diagnostiquées dans les urines, 35 % proviennent des prélèvements de pus, 15 % de liquide bronchique et 10 % de sang. Dans notre étude *K. pneumoniae* est isolée essentiellement à partir des urines. Ces résultats correspondent aux rapports de la littérature, où les prélèvements urinaires sont toujours dominants.

Tableau 4: Répartition des souches de *K. pneumoniae* parmi les prélèvements cliniques n= 20.

Prélèvement	Nombre de <i>K.p</i> isolée	Pourcentage (%)
Urines	8	40
Pus	7	35
Liquide bronchiques	3	15
Sang	2	10
Total	20	100

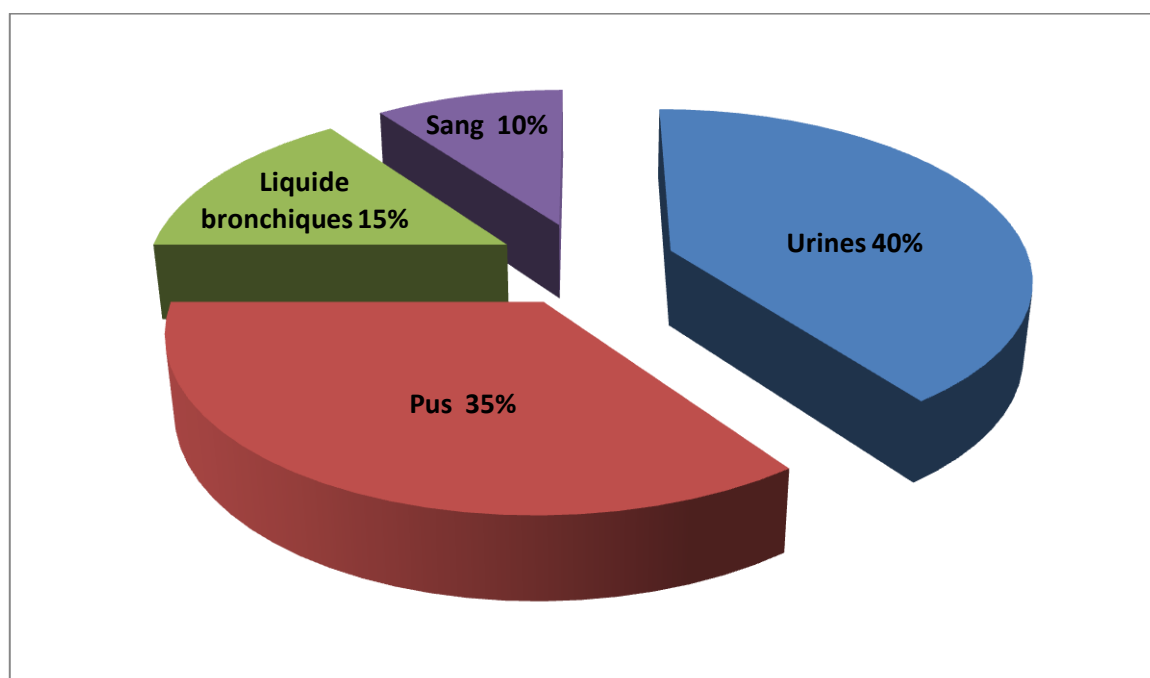


Figure 10 : Répartition de *Klebsiella pneumoniae* parmi les prélèvements cliniques.

I-3- Distribution des souches de *Klebsiella pneumoniae* selon le sexe

Parmi les 20 souches isolées, On peut remarquer une légère prédominance des souches isolées chez les hommes (55 %) par rapport à celle des femmes (45 %). Le sexe ratio est de 1,22.

Ces résultats correspondent à ceux de l'étude de Sekhri A (2011), avec une prédominance masculine.

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

Sexe	Effectif	Pourcentage (%)
Femme	9	45
Homme	11	55
Total	20	100

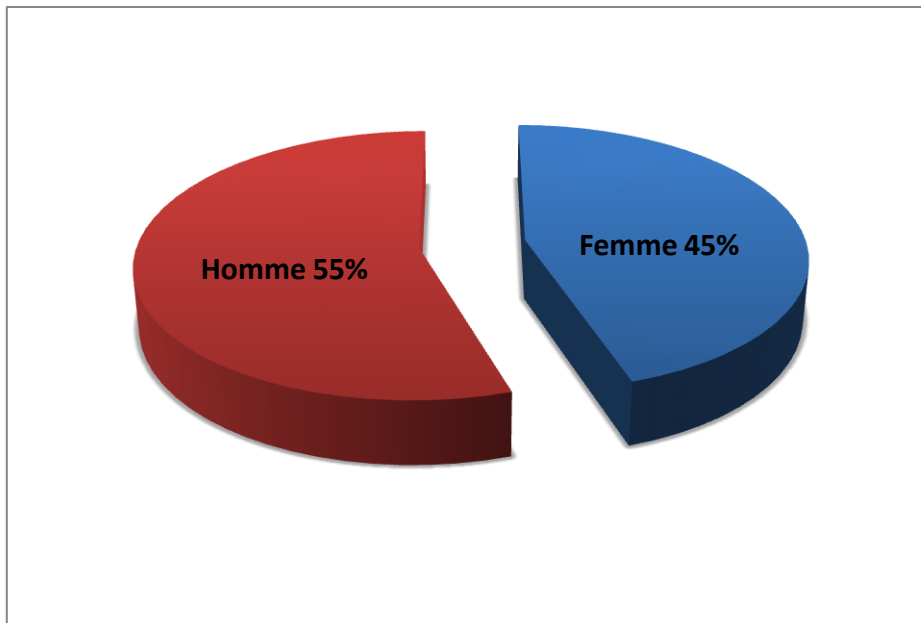


Figure 11 : Distribution des souches de *K. pneumoniae* selon le sexe.

II- Analyse des prélèvements au laboratoire

II-1- Examen macroscopique

L'aspect des colonies sur le milieu solide permet de déterminer la forme, le relief, la taille, la consistance et la couleur (fermentation) sur boîte de Pétri.



Figure 12: Aspect des colonies des *klebsiella pneumoniae* sur milieu Hektoen.

L'aspect des colonies sur milieu Hektoen est en relation de la capacité des microorganismes à fermenter le lactose mis dans le milieu. Cela conduit à une production d'acide qui abaisse le pH et modifie l'indicateur de pH placé dans le milieu qui vire du vert au jaune-oronge, Notre souche se présente sous formes de

grosses colonies muqueuses, bombées, lactose (+), ayant un aspect d'une goutte de miel, avec une tendance à la confluence. Ces résultats sont compatibles avec ceux mentionnés par Illiaquer (2010).

II-2- Examen microscopique

II-2-1- Etat frais

L'observation microscopique montre des bacilles immobiles courts. Ce résultat est compatible avec celui de Seck (2005).

II-2-2- Bleu de méthyle

L'observation microscopique montre la présence de 8 à 10 lymphocytes par champ et de 3 à 4 polynucléaires par champ.

II-2-3- Coloration de Gram

Les résultats obtenus par observation microscopique après coloration de Gram, montre que les souches se présentent sous forme de bacilles ou diplobacilles colorés en rose. Donc ce sont des bacilles à Gram négatif, Ceci est compatible avec les résultats de Gueye (2007).

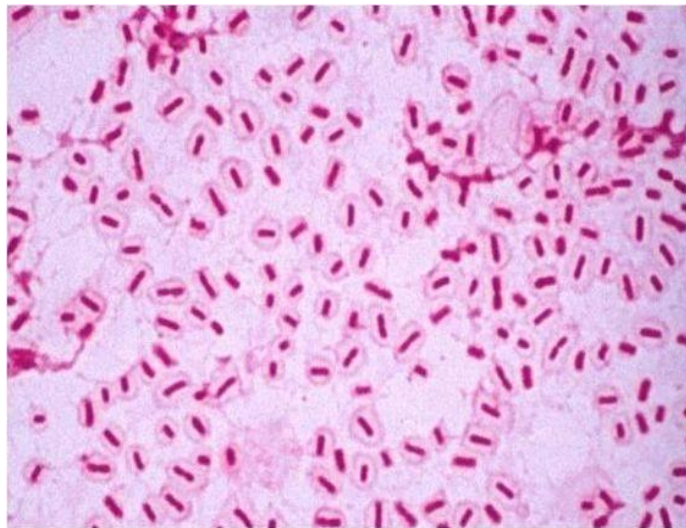


Figure 13 : Coloration de Gram de *Klebsiella pneumoniae*.

II-3- Critères d'identification de *klebsiella pneumoniae*.

II-3-1- Identification par galeries classique

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*.

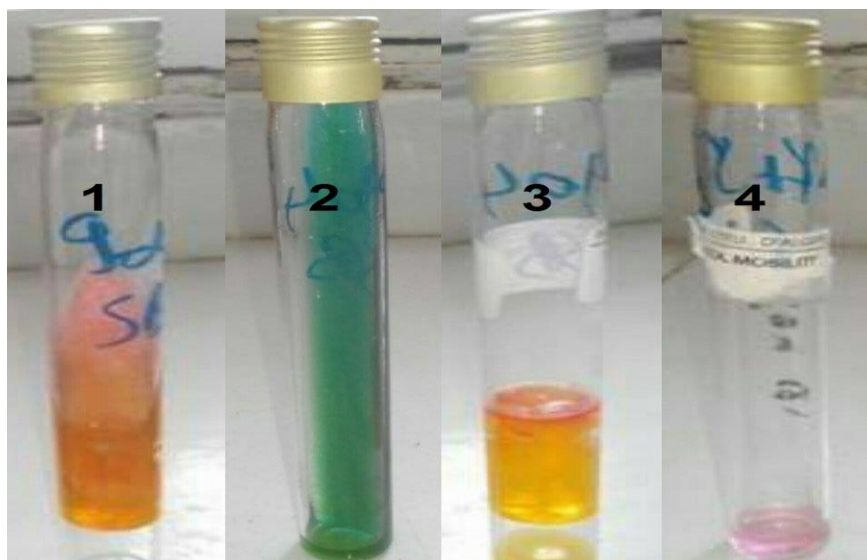


Figure 14 : Résultats de galerie biochimique de *K. pneumoniae*.

Les résultats de la galerie biochimique des souches étudiés sont notés dans l'Annexe 7.

a- Milieu TSI

Après l'incubation, on a remarqué que la souche *K. pneumoniae* a fermenté le lactose ainsi que le saccharose, il y a eu une acidification dans la pente et le culot, d'où le virage du rouge de phénol au jaune (tube 1, figure 14) avec présence des bulles d'air et absence de noircissement du milieu car il n'y a pas eu de production de sulfure d'hydrogène (H₂S). Donc la souche est: lactose et saccharose (+), glucose (+), gaz (+), H₂S (-), comme signalé par Meziani (2012).

b- Milieu citrate de Simmons

Après 24 h d'incubation on a remarqué qu'il y a eu une alcalinisation du milieu, d'où le virage du bleu de bromothymol du vert au bleu (tube 2, figure 14), donc la souche K.P utilise le citrate comme seule source de carbone. Les résultats obtenus sont superposables à ceux obtenus par les travaux de Meziani (2012).

c- Milieu mannitol mobilité

Les résultats qu'on a obtenus montrent que il y a eu une acidification du milieu la souche a fermenté le mannitol, d'où le virage du rouge de phénol au jaune (tube 3, figure 14), donc la souche est mannitol (+). En ce qui concerne la mobilité *Klebsiella pneumoniae* a poussé le long de la strie d'ensemencement mais elle ne crée pas un trouble du milieu donc elle est immobile. Conformément à la littérature de Nkang et al (2009) et Gueye (2007), nous avons bien observé la souche de *K. pneumoniae*, qui a utilisé le mannitol comme source de carbone et d'énergie.

d- Milieu urée-indole

- **L'uréase**

Concernant l'hydrolyse de l'urée, *Klebsiella pneumoniae* étaient urée (+) car il y a eu une alcalinisation du milieu d'où le virage de couleur de l'orange vers le rouge-rose (tube 4, figure 14). Les résultats obtenus du test uréase sont accords avec ceux obtenues par Carleen et al (2006) et Meziani (2012).

- **L'indole**

Notre souche est indole négatif, car l'indole ne se matérialise pas par un anneau rouge, après addition du réactif de Kovacs (tube 4, figure 14). Notre résultat est compatible avec ceux obtenues par Alves et al (2006) et Nkang et al (2009).

II-4- Etude de la sensibilité aux antibiotiques

II-4-1- Antibiogramme

Toutes les souches de *Klebsiella pneumoniae* ont été testées vis-à-vis de 14 molécules d'antibiotiques appartenant à 4 familles différentes dont 7 β -lactamines, 2 aminosides, 2 quinolones, et autres (Bactrim, chloramphénicol et colistine).

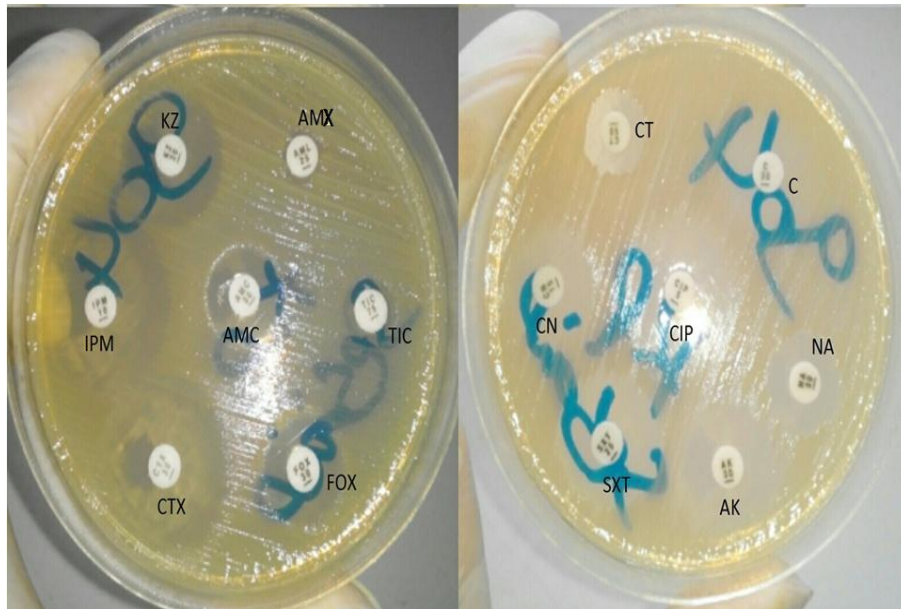


Figure 15 : Résultats d'antibiogramme d'une souche *Klebsiella pneumoniae*.

Les résultats d'antibiogramme des souches étudiés sont notés dans l'Annexe 8.

a- β -lactamines

A partir des résultats obtenus, toutes les souches étudiées sont résistantes à l'amoxiciline et la ticarcilline avec un taux de résistance de 100%, les résultats obtenus sont donc en parfait accord avec les résistances naturelles de ces bactéries mentionnées par Arafa et al (2009) et Gavaret et Briffaud (2009). L'association amoxicilline-acide clavulanique et la céfazoline présentent un taux de résistance de 60 % suivis par le céfotaxime qui présente un taux de résistance de 50 %. Ces résultats sont différents de ceux de Sekhri A (2011), 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 mêmes résultats pour l'imipinèm et la céfoxitine qui présentent une bonne activité sur les souches de *Klebsiella pneumoniae* (aucune résistance observée).

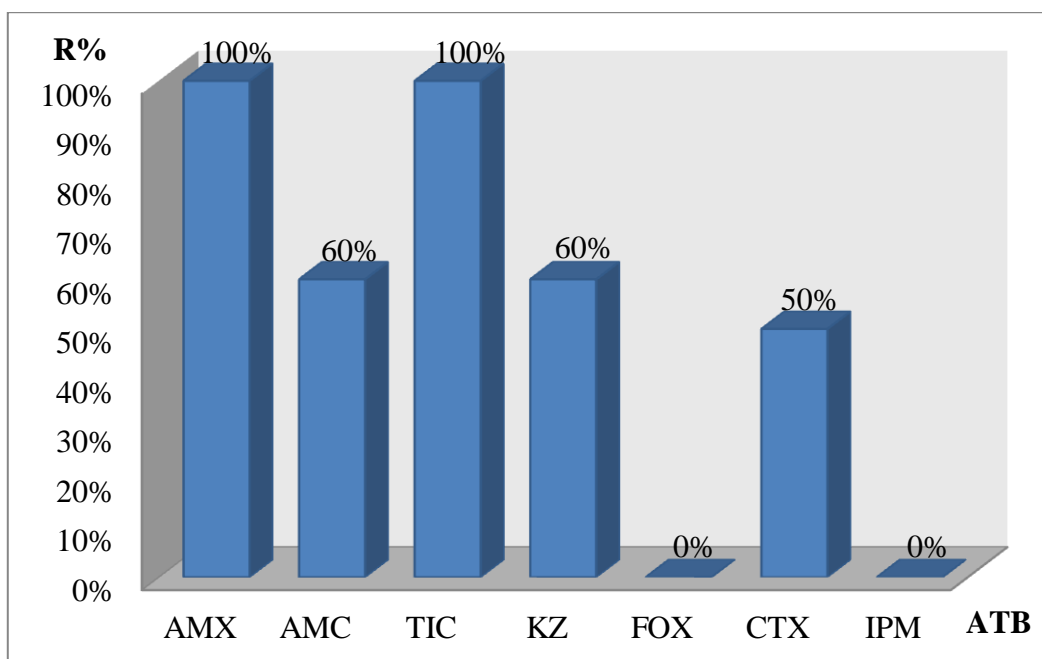


Figure 16 : Taux de résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux β -lactamines.

b- Aminosides

Pour les aminosides toutes les souches de *Klebsiella pneumoniae* présente un taux de résistance de 45 % pour la gentamycine, mais beaucoup faible pour l'amikacine qui présente un taux de résistance de 10 %, donc une excellente activité est enregistrée pour ce dernier. Ces résultats sont différents de ceux de Sekhri A (2011), qui rapportent des taux de résistance respectivement de 69,23 % pour gentamycine et de 48,07 % pour l'amikacine.

c- Quinolones

En ce qui concerne les quinolones, les souches de *K. pneumoniae* présentent des taux de résistances respectivement de 40 % pour l'acide nalidixique et de 20 % pour la ciprofloxacine. Ces résultats sont différents de ceux de Sekhri A (2011), qui rapportent un taux de résistance de 28,84 % pour l'acide nalidixique et une sensibilité à 100 % pour la ciprofloxacine. Selon Ben Haj Khalifa et Khedher (2010), *K. pneumoniae* est naturellement sensible aux quinolones. Donc se sont des résistances acquises.

d- Autres

Pour l'association sulfaméthazole+triméthoprim (Bactrim), les souches de *K. pneumoniae* présentent un taux de résistance de 50 % suivi par une faible résistance (10 %) au chloramphénicol et une sensibilité à 100 % pour la colistine. Les résultats obtenus sont différents de ceux de Sekhri A (2011), qui rapportent des taux de résistance respectivement de 65,38 % pour le Bactrim et de 20 % pour le chloramphénicol.

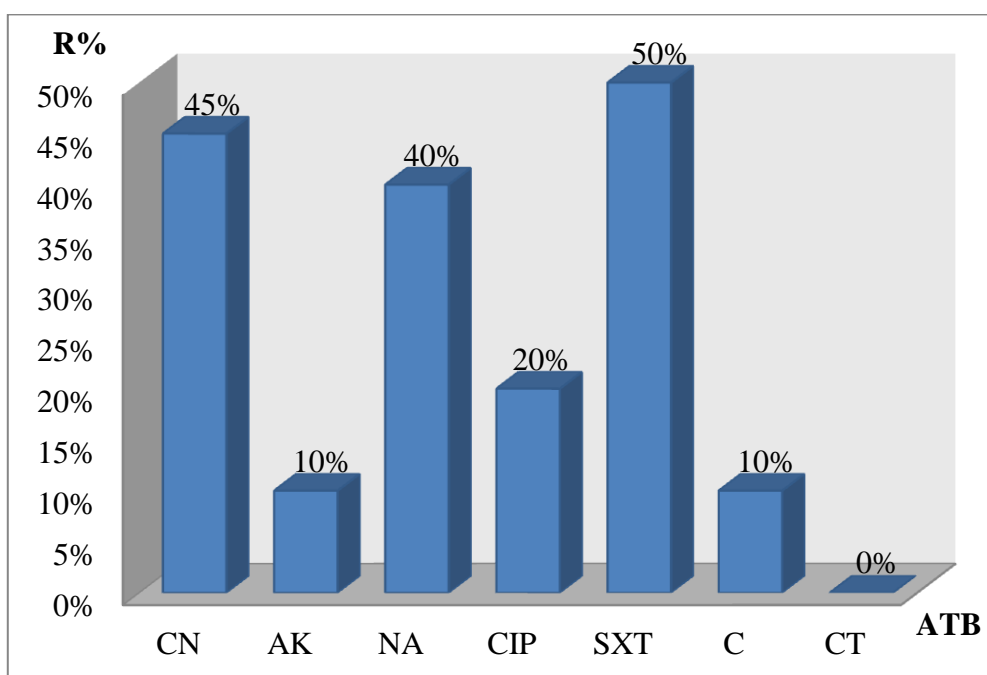


Figure 17 : Taux de résistance de *K. pneumoniae* aux autres classes d'antibiotiques.

II-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.

II-4-1- Phénotypes de résistance aux β -lactamines

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

Tableau 6 : Répartition des principaux phénotypes de résistance aux β -lactamines n=20. BLSE: β -lactamases à spectre étendu, PBN : Pénicillinase de bas niveau, PHN : Pénicillinase de haut niveau.

Phénotype de résistance	Effectifs	Fréquence %
BLSE	10	50
PBN	8	40
PHN	2	10

L'analyse phénotypique des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées montre trois phénotypes de résistance aux β -lactamines, dont un sauvage (PBN), sont représentés dans notre étude. Celui des BLSE domine dans 50 % des cas, suivi de celui du type sauvage dans 40 %, du type PHN dans 10 %. Les résultats de notre étude sont accord avec ceux de Sekhri A (2011), 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.

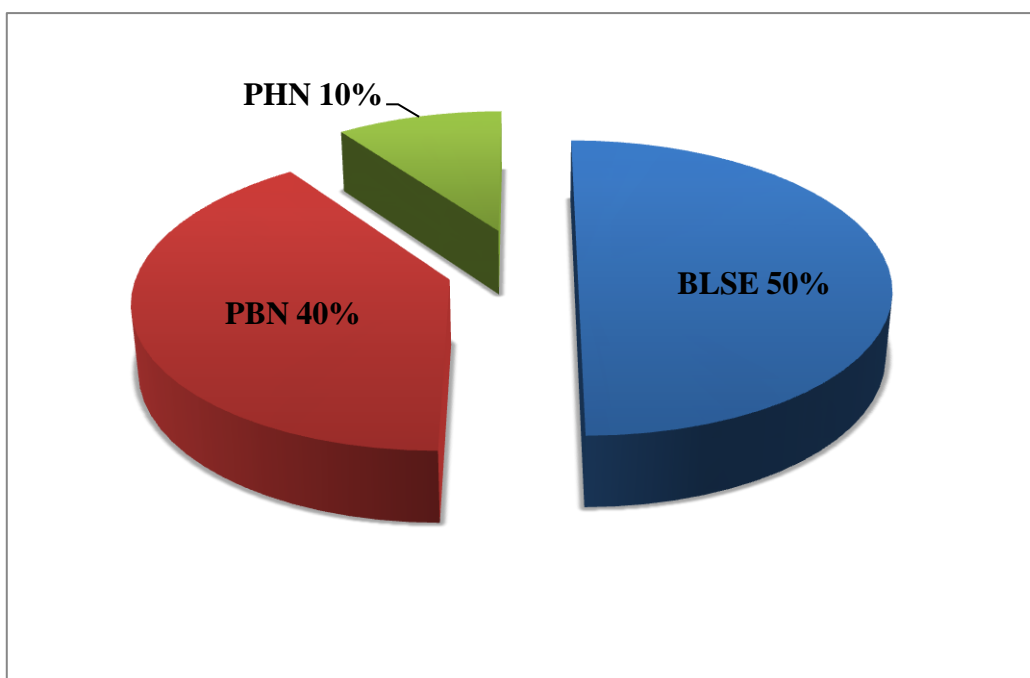


Figure 18 : Répartition des principaux phénotypes de résistance aux β -lactamines

II-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 %
	CN	AK		
I (sauvage)	S	S	11	55
II	R	S	7	35
III	R	R	2	10

La répartition des phénotypes de résistance aux aminosides montre une nette prédominance du phénotype I ou sauvage sensible avec une fréquence de 55 %, suivi du phénotype II conférant une résistance à la gentamicine dans 35 % des cas, et du phénotype III qui confère une association de la résistance dans 3% des cas. Nos résultats sont différents de Sekhri A (2011), qui montre plusieurs phénotypes, 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 %.

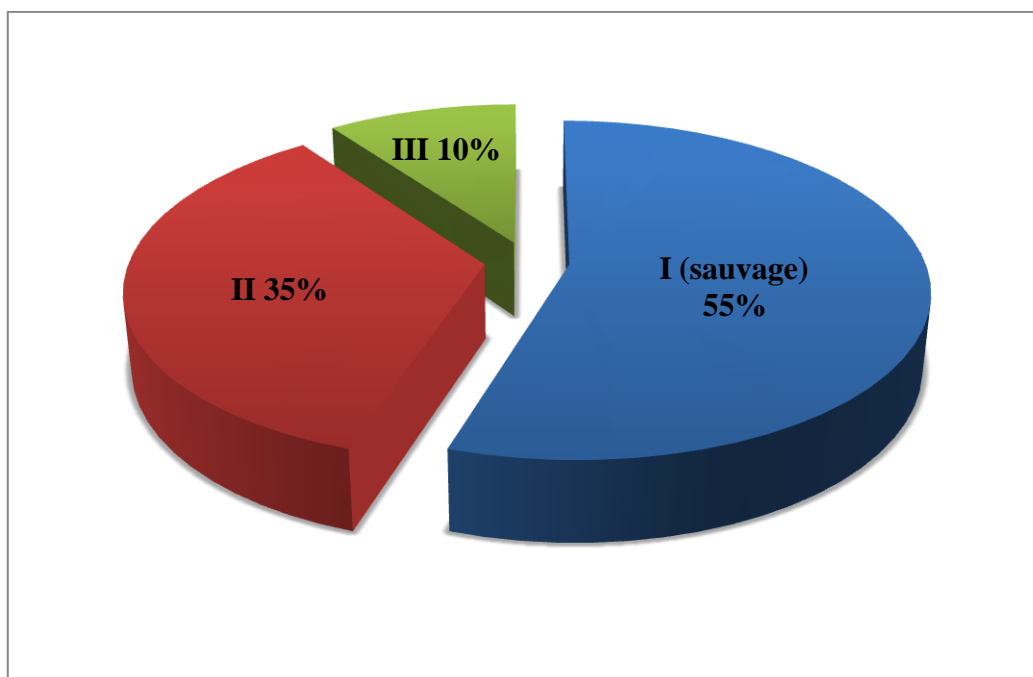


Figure 19 : Représentation graphique des phénotypes de résistance de *K. pneumoniae* aux Aminoside.

II-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	11	55
II	R	I	5	25
III	R	R	4	20

La répartition des phénotypes de résistance aux quinolones montre une prédominance du phénotype I ou sauvage sensible avec une fréquence de 55 %, suivis du phénotype II qui confère une résistance à l'ac-nalidixique dans 25 % des cas, et le phénotype III de la résistance associée entre l'ac-nalidixique et la ciprofloxacine qui est représenté dans 20 % des cas. Ces résultats sont similaires de ceux de Sekhri A en (2011), le phénotype I sauvage sensible est le plus fréquent (65,38 %) dans les deux études.

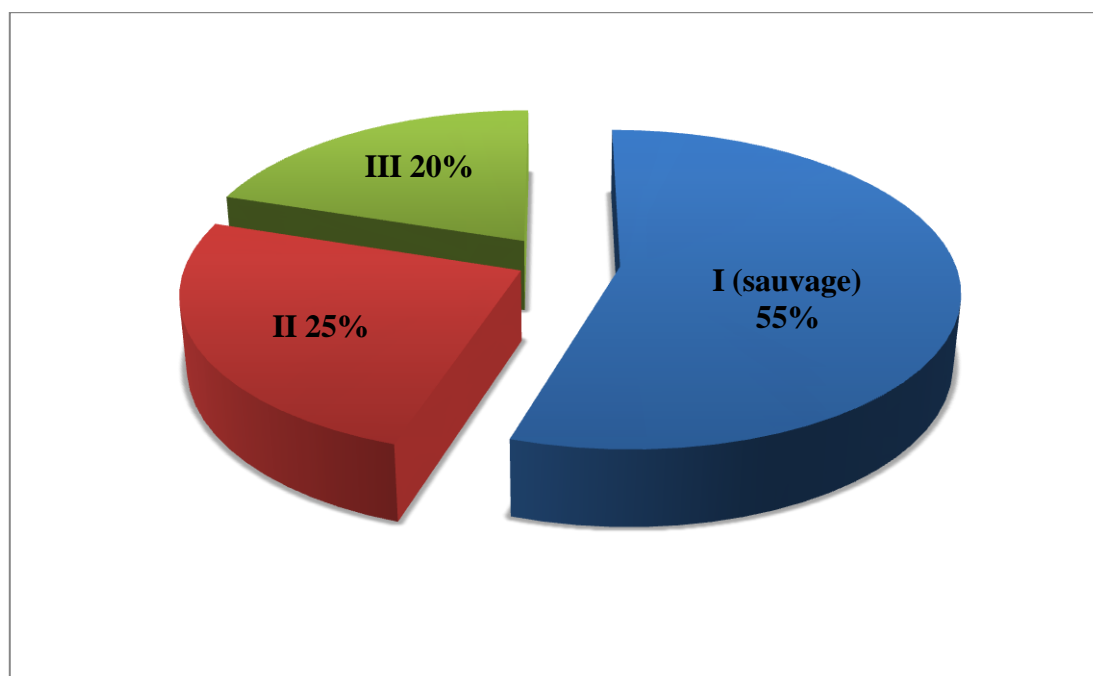


Figure 20: Représentation graphique des phénotypes de résistance de *K. pneumoniae* aux Quinolones.

III- Mutagénèse

Les boîtes de pétri de la souche sauvage de *Klebsiella pneumoniae* et les résultats obtenues après mutagénèse aux rayons UV sont représentés dans la figure 21.

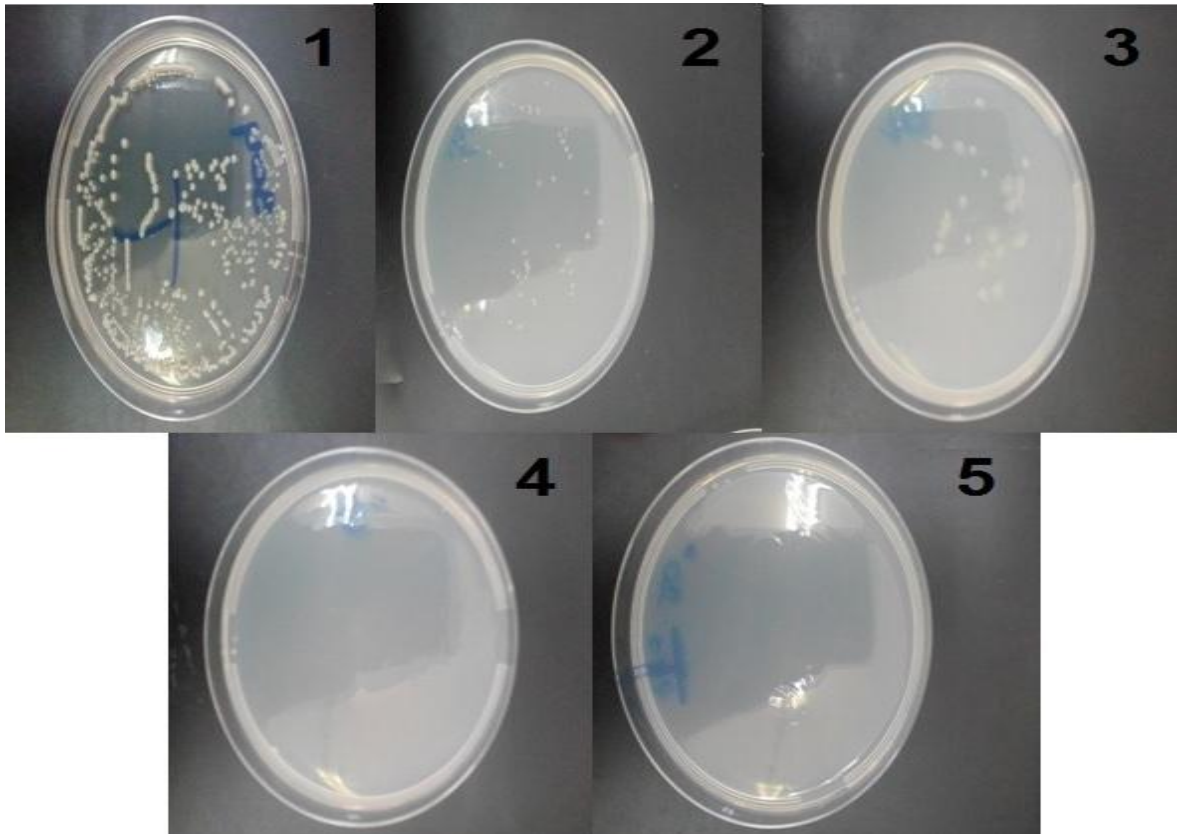


Figure 21 : *Klebsiella pneumoniae* sauvage et mutante

- 1 : souche de K.P témoin ;
- 2 : souche de K.P après irradiation pendant 5s ;
- 3 : souche de K.P après irradiation pendant 10s ;
- 4 : souche de K.P après irradiation pendant 15s ;
- 5 : souche de K.P après irradiation pendant 20s.

Les résultats du comptage des colonies de *Klebsiella pneumoniae* témoins et ceux obtenues après irradiation aux UV a des différents temps sont mentionnes dans le tableau 9.

Tableau 9 : temps d’irradiation et pourcentage de survie de la souche *klebsiella pneumoniae*.

Le temps d’irradiation	00s	05s	10s	15s	20s
Nombre de colonies	474	64	30	2	0
% de survie	100 %	13.50 %	6.32 %	0.42 %	0 %

La courbe de survie de *K. pneumoniae* est montrée dans la figure 22.

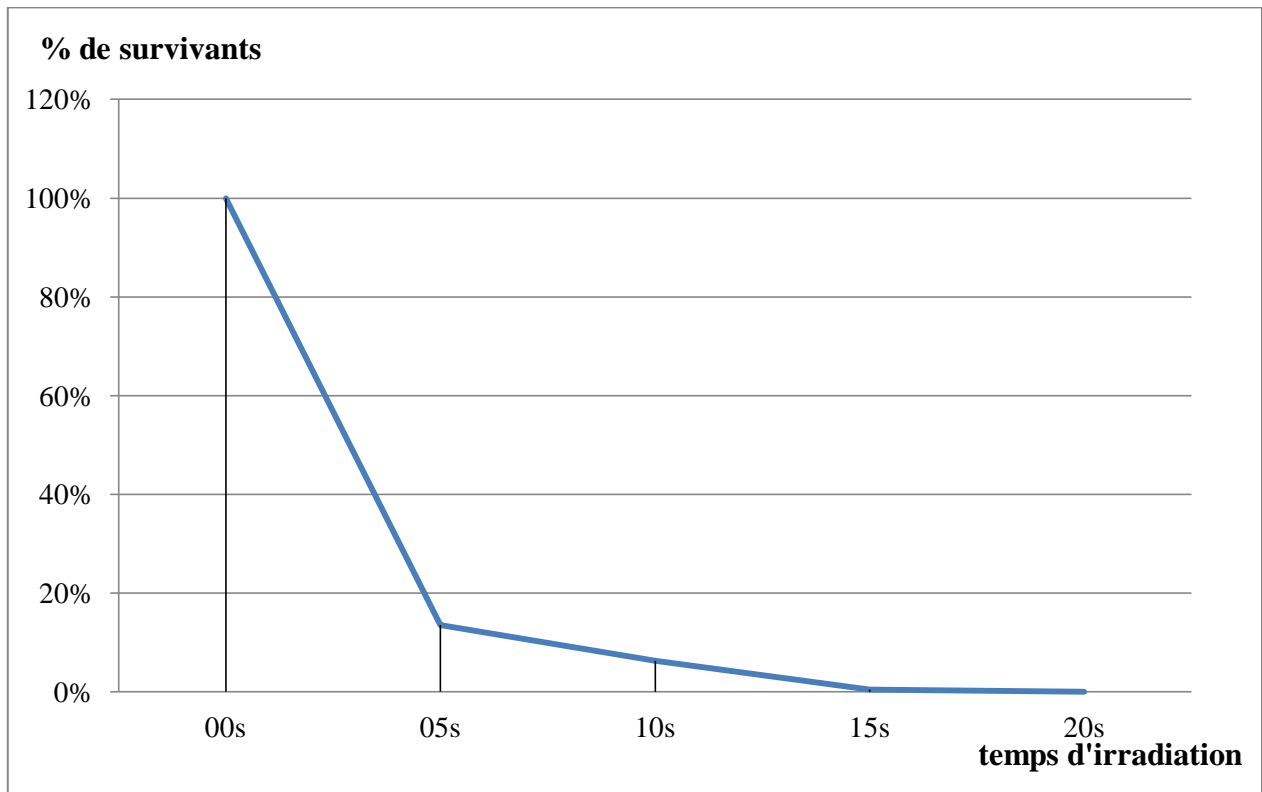


Figure 22: la courbe de survie de la souche *Klebsiella pneumoniae*.

D'après les résultats obtenus et la courbe de survie de *Klebsiella pneumoniae*, on constate que plus la durée d'irradiation est importante, plus le nombre total de colonies est faible. Ainsi, les UV agissent en augmentant la fréquence des mutations dans le génome des cellules exposées (lésions au niveau de l'ADN qui est dénaturé ou des modifications structurales membranaires induisant des pertes en composés cellulaires vitaux). Ces mutations conduisent d'une part à la mortalité des cellules et d'autre part à la modification de l'information génétique, d'où l'impossibilité pour une bactérie de former une colonie visible après irradiation. Un changement d'aspect des colonies a été observé après irradiation les colonies sont plates et de couleur plus claire par rapport aux colonies de *Klebsiella pneumoniae* sauvage qui sont bombées et de couleur un peu foncer. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux obtenus par Cottaz et al (*E. coli*) (2008).

Conclusion

Conclusion

Le pouvoir pathogène de *K. pneumoniae* a évolué depuis plusieurs décennies, en particulier dans le domaine humain. Les infections dont elle est responsable sont devenues plus variées dans leur localisation et leur manifestation. Les résultats de cette étude permettent de fournir des données épidémiologiques sur *K. pneumoniae* au niveau de l'hôpital Benbadis ainsi qu'une évaluation de la sensibilité à plusieurs antibiotiques des trois principales familles. Ce type d'étude d'incidence représente un des éléments épidémiologiques qui peut être intégré dans un programme plus global de lutte contre les infections nosocomiales.

Rappelons que notre étude pratique avait pour principaux objectifs l'identification d'une souche de *K.pneumoniae* par la galerie biochimique classique (après isolement et identification, *K. pneumoniae* a montré les caractères biochimiques suivants : Lactose (+), Gaz (+), Citrate (+), mannitol (+), H₂S (-), Uréase (+) et Indole (-), et l'établissement du profil de résistance ou de sensibilité vis-à-vis de 14 antibiotique réalisé par la méthode de diffusion sur disque (les résultats de l'antibiogramme de *Klebsiella pneumoniae* ont révélés que 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 cefoxitine et la colistine restent les molécules les plus actives). L'application de la mutagénèse aux Rayons UV sur une souche de *K. pneumoniae* permis de montrer l'effet de la lumière ultra-violette sur la survie de cette bactérie : diminution du nombre de colonies en fonction de l'augmentation du temps d'irradiation, se traduisant par un effet bactéricide dû à la dénaturation de l'ADN de la bactérie (gène de survie).

Les infections à *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* et surtout à *K. pneumoniae* productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) représentent une cause importante de morbidité et de mortalité en milieu hospitalier. 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, en 2002, sur 350 *K. pneumoniae* hospitalières, 67.3 % sont des *K. pneumoniae* BLSE, en 2004 la fréquence diminue légèrement pour atteindre 65 %. Entre 2005-2006 le taux des *K. pneumoniae* BLSE+ diminue à 56% (Résultats du réseau national de la surveillance de la résistance aux antibiotiques) ces chiffres restent considérables. L'analyse phénotypique des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées est en faveur d'une production de β -lactamase à spectre étendu (BLSE) soit 50 %, qui ont exprimé également des résistances notamment aux aminosides et aux fluoroquinolones, mais le phénotype carbapénémase n'a pas été retrouvé dans notre série.

La dissémination de la résistance aux antibiotiques n'est pas due à la transmission clonale de souches résistantes, en revanche, la pression de sélection exercée par les antibiotiques (β -lactamines et aminosides, et quinolones) favorise cette évolution. La promotion d'alternatives thérapeutiques et un

usage raisonné des antibiotiques sont probablement indispensables pour contrôler la diffusion de la résistance chez les souches de *K. pneumoniae*. La résistance change d'un pays à l'autre, bien que l'émergence se développe rapidement localement puisque les bactéries sont exposées aux mêmes antibiotiques et soumis aux mêmes conditions.

La résistance bactérienne est générée par l'homme, par un mauvais usage des antibiotiques prescrits soit inutilement, soit incorrectement, les bactéries multi résistantes se transmettent ensuite en faveur d'un manque d'hygiène. Nous rappelons les objectifs prioritaires pour la structure de soins que sont des mesures d'hygiène strictes, une politique de l'usage antibiotique et l'apport d'information régulière sur l'épidémiologie des souches et des résistances dans les services.

Il convient donc de souligner que l'émergence de tel clone multi résistant qui est à l'origine d'épidémie est inquiétante car cela a déjà limité les options du traitement pour ce type d'infections. En définitive, une politique de surveillance régulière des mécanismes de résistance doit être mise en place dans nos hôpitaux pour définir des stratégies préventives et l'usage plus rationnel des antibiotiques afin de limiter l'émergence des BMR en Algérie.

Références bibliographiques

A /

- Aartsen J J., Stahlhut S G., Harrison EM., Crosatti M., Ou H-Y., Krogfelt K A., Struve C and Rajakumar K. 2012. Characterization of a novel chaperone/usher fimbrial operon present on KpGI-5, a methionine tRNA gene-associated genomic island in *Klebsiella pneumoniae*. van Aartsen et al. BMC Microbiology 2012, 12:59.
- Abbott, S. L. (2007). *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Plesiomonas*, and Other Enterobacteriaceae. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry & M. A. Pfaller (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology* (9th ed., pp. 698-711). Washington, USA: ASM Press.
- Alobwed I, M'Zali F.H, Livermore D.M, Heritage J, Todd N, Hawkey P.M. 2003. CTX-M extended-spectrum β -lactamase arrives in hte UK. *J Emerging Infectious Diseases* 7: 178-82.
- Alves M.S., Rubens C.S.D., De Castro A.C.D., Riley L.W., Moreira B.M. 2006. Identification of clinical isolates of indole-positive and indole-negative *Klebsiella spp* *Journal of clinical microbiology* 44, p3640-3646.
- Arafa N, Smati F, Scheftel M.J, Meunier O. 2009. Caractérisation phénotypique et génotypique de souches de *Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae* isolées a l'hôpital universitaire, Algérie. *Science et Technologie* 30, P44, 45, 46.
- Archambaud M., Clave D. 2008. Fiche technique : *Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae*. Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique. Laboratoire de Bactériologie Hygiène CHU Toulouse. Fiche technique-Bactériologie 83 EN.FTBAC.14610611.01.
- Avril J-L., Dabernat H., Denis F. et al. (2000). *Bactériologie Clinique*. Ellipses. 3ème Edition. 511p..

B/

- 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.
- Bermudes H. Jude F. Arpin C. Quentin C. Morand A. Labia R. Characterization of an inhibitor-resistant tem (irt) beta-lactamase in a novel strain of *klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*, page 222, 1997 Jan.
- 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.
- Boucher A.S ,2002- Mutation, mutagenèse et réparation de l'ADN. A partir d'un article de Beth A. Montelone , Division of Biology, Kansas State University.

- 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.
- Boutet-Dubois A., Pantel A., Sotto A., Philippe Lavigne J. 2012. Les entérobactéries productrices de carbapénémases. Lettre d'information du CCLin Sud-Est destinée aux Acteurs de la Lutte contre les Infections Nosocomiales & Associées aux Soins. Avril 2012.
- Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. Imipenem resistance in *klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of act-1, a plasmid-mediated ampc beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. Antimicrobial Agents and Chemotherapy., pages 563-9, 1997 Mar.
- Brisse S, Grimont F Et Grimont P. A. D. (2006). The Genus *Klebsiella*. Prokaryotes. Chapitre 3.3.8.
- Bryskier, A. 1984. (Classification of beta-lactams). Pathol.Biol.(Paris) 32:658-667.

C/

- Carbonnelle B., Denis F., Marmonier A., Pinon G et Vargues R. (1987). Bactériologie Médicale : Techniques usuelles. S.I.M.E.P. S. A., Paris, p 121-137; 146-155.
- Carleen M.C, Delia M.G, Heike L. 2006. Identification of a nitrogen-regulated promoter controlling expression of *Klebsiella pneumoniae* urease genes. Molecular Microbiology 8, P187-198.
- Carl S. 2009. La Résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important. le parrainage des antimicrobiennes .p47 .
- Carniel, E. 1999. The *Yersinia* high-pathogenicity island. Int.Microbiol. 2:161-167.
- Carpenter, J. L. 1990. *Klebsiella* pulmonary infections: occurrence at one medical center and review. Rev.Infect.Dis. 12:672-682. Strampfer, M. J., P. E. Schoch, and B. A. Cunha. 1987. Cerebral abscess caused by *Klebsiella ozaenae*. J.Clin.Microbiol. 25:1553-1554.
- Carrer A, Nordman P.2009. *Klebsiella pneumoniae* CTX-M-15 : vers une modification de l'épidémiologie des bêta-lactamases à spectre étendu. Pathologie Biologie 59, P 133-135.
- Cavallo J-D., R. Fabre R., Jehl F., Rapp C., Garrab E. 2004. Bêta-lactamines. EMC-Maladies Infectieuses 1 (2004) 129-202.
- Chaves J, Coira A, Segura C, Reig R. Identification and location of the *shv-1* gene in *klebsiella pneumoniae* strains. Journal of Chemotherapy., pages 49-51, 1995 Nov.
- Comité de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie. 1997.
- Courvalin P, Leclercq R, Bingen E. 2006. Antibiogramme. 141. ED. Masson.

D/

- Dabernat, H., O. Petitjean, and S. J. P. W. P. Schlemmer. 1997. Infectiologie de A à Z.354-355.
- Di Martino P, Cafferini N, Joly B, Darfeuille-Michaud A. 2003. Klebsiella pneumoniae type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. Research in Microbiology 154: 9-16.
- Duca M., Furtunescu G., Microbiologie médicale, 2e Ed. Didactique et pédagogique, Bucarest, 1979, 436p.

E/

- Ennis D.G.2001.Mutagenesis.Encyclopedia of life sciences.P4.
- Euzéby J.P 2004. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire.
- Eyquem A, Alouf J, Montagnier L. 2000 Traite de microbiologie clinique : deuxième mises a jour et compléments. Piccin, P84.

F/

- Fauchère J.L et Avril J.L. 2002. Bactériologie générale et médicale. Ed Ellipses. 15: 252-253; 10: 151-176.
- Freney J, R. F., Hansen W, and Bollet TC. 2000. Précis de bactériologie clinique.
- Freney J, Renaud F, R. Leclercq, and Riegel P. 2007. Précis de Bactériologie Clinique.1001-1014.649-665.
- Fung C.P, Hu B.S, Chang F.Y. 2000. A 5-year study of the seroepidemiology of Klebsiella pneumoniae: high prevalence of capsular serotype K1 in Taiwan and implication for vaccine efficacy. J Infect Dis 181: 2075-9.

G/

- Galimand M, et al., 1997. Résistance Multidrug dans Yersinia pestis médiée par un plasmide transférable. N. Engl. J. Med 337:. 677-681.)
- Gavaret T, Briffaud M. 2009. Klebsiella pneumoniae en aviculture fréquence d'isolement sensibilité aux antibiotiques. Huitièmes Journée de la Recherche Avicole, St Malo. P423-424.
- George M Garrity., Julia A Bell et Timothy G Lilburn. 2004. Taxonomic Outline of the Procaryotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition.DOI: 10.1007/bergeysoutline 200405.
- Gniadkowski M. 2001. Evolution and epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases (EBLSs) and EBLS-producing microorganisms. Clin Microbiol Infect 7. P597-608.
- Grall N., Andremont A., Armand-Lefèvre L. 2011. Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse ? ANTINF-16 ; No. of Pages 16.

- 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.
- Gueye O. 2007. Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles a Gram négatif. P27, 28-44.

H/

- Haeggman S. Lofdahl S. Burman LG. An allelic variant of the chromosomal gene for class a beta-lactamase k2, specific for *klebsiella pneumoniae*, is the ancestor of shv-1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pages 2705-2709, 1997 Dec.
- Held T.K, Jendrike N.R.M, Rukavina T, Podschun R, Trautman M. 2000. Binding to an Opsonophagocytic Activity of O-antigen-specific Monoclonal antibodies against Encapsulated and nonencapsulated *Klebsiella pneumoniae* serotype O1 strains. *Infect Immun* 68: 2402-2409.
- 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.)
- Hsieh P-F., Lin TL., Yang FL., Wu M-C., Pan YJ., Wu S H., Wang J T.2012. Lipopolysaccharide O1 Antigen Contributes to the Virulence in *Klebsiella pneumoniae* Causing Pyogenic Liver Abscess. March 2012 | Volume 7 | Issue 3 | e33155.

I/

- Iliquer M. (2010). Epidémiologie et caractérisation moléculaire de souches cliniques de *Klebsiella pneumoniae* résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération hors BLSE, isolées entre 2007 et 2009, au C.H.U de Nantes. Université de Nantes. 123p.

J/

- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2006). The Genera *Klebsiella* and *Raoultella*. *The Enterobacteria* (2nd ed., pp. 115-129). Washington, USA: ASM Press.
- Jarlier V, Nordmann P. 2000. Entérobactéries et bêta-lactamines. In Freney J, Renaud F, Hansen W, Botler C. Précis de bactériologie clinique. Ed Paris; ed ESKA 649-665.
- Jiang Y, et al. 2010. Séquence de nucleotides complète de *Klebsiella pneumoniae* multirésistance pKP048 plasmide, portant blaKPC-2, blaDHA-1, qnrB4, et armA. *Antimicrob. . Agents Chemother* 54: 3967-3969.).
- Joly B et Reynaud A. 2002. Entérobactéries. Systématique et méthodes de diagnostic. P : 79-80-83.

K/

- 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.
- Klug W. Cummings M. Spencer Ch. 2006. Génétique 8^{ème} édition. Ed. Nouveaux horizons.
- 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.).

L/

- Lai Y.C, Yang S.L, Peng H.L, Chang H.Y. 2000. Identification of genes present specifically in a virulent strains of *Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun 68: 7149-7151.
- Le Minor L and Véron M. 1989. Bactériologie médicale, 2^{ème} édition, Flammarion Médecine-Sciences, Paris.2:428-432.
- Lemozy J. Sirot D. Chanal C. Huc C. Labia R. Dabernat H. Sirot J. First characterization of inhibitor-resistant tem (irt) beta-lactamases in *klebsiella pneumoniae* strains. Antimicrobial Agents and Chemotherapy., pages 2580-2, 1995 Nov.
- Leon le Minor, Michel Veron, Bactériologie Médicale 2^{ème}Edition Paris, 1989, 396- 795p.
- 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.
- Liu, et al. Journal of Bacteriology, 2012.

M/

- Meziani M. 2012. Contribution du diagnostic biochimique bactérien dans l'établissement des parentes phylogénétiques : cas des Entérobactéries et *Pseudomonas*. P39-41-45.
- Meradi L., Djahoudi A., Abdi A., Bouchakour M., Perrier Gros Claude J-D., Timinouni M. 2009.Resistance aux quinolones de types qnr, aac (60)-Ib-cr chez les entérobactéries isolées à Annaba en Algérie. Pathologie Biologie 59(2011) e73-e78.
- Morère J.L ,Pujol R. 2003.Dictionnaire raisonné de biologie .Paris :frison Roche.

N/

- Nauciel C. 2000. Bctériologie médicale. P 55-64 .Ed Masson.
- 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.

- Nkang A.O, Okonko O.I, Fowotade A, Udeze A.O, Ogunnusi T.A, Fajobi E.A, et al. 2009. Antibiotics susceptibility profiles of bacteria from clinical samples in Calabar, Nigeria. J. Bacteriol. Res 1, P89-96.
- Nicklin J, Graeme-cook K, Paget T, Killington R. 2000. L'essentiel en microbiologie. Port Royal livres. BERTI Edition. P 113-121.
- Nordmann P et Carrer A. 2010. Les carbapénèmases des entérobactéries. Archives de pédiatrie 2010 ; 17 :S154-162.

O/

- Ofek I, Messika A, Kalina M, Keisari Y, Podschun R, Sahly H, Chang D, McGregor D, Crouch E. 2001. Surfactant protein D enhances phagocytosis and killing of unencapsulated phase variants of *Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun 69:24-33.

P/

- Phillippon A, Arlet G. 2006. β -lactamases de bacilles à Gram négatif: le mouvement perpétuel! J Ann Biol Clin 64 (1): 37-51.
- Podschun, R. and U. Ullmann. 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin. Microbiol. Rev. 11:589-603.
- Poyart C. Mugnier P. Quesne G. Berche P. Trieucot P. A novel extended-spectrum tem-type beta-lactamase (tem-52) associated with decreased susceptibility to moxalactam in *klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy., pages 108-113, 1998 Jan.

R/

- Raud P. 2003. Etude de la diversité génétique des souches de *Klebsiella pneumoniae* productrices de beta-lactamases à spectre étendu (BLSE), isolées au CHU de Nantes, de 1990 à 2001. P39-41,77-79.
- Ravanat J.L, Douki T. and Cadet J. 2001. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. Journal of photochemistry and photobiology 63, P 88-102
- Richard Cl. Et Grimont F. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, In : LE MINOR (L). Bactériologie médicale, Paris : Flammarion, 1992, 427-31p. LECLERC H., Microbiologie générale, 2e édition, 1983, 95p .
- Riegel P. 2002. Aspects bactériologiques des infections urinaires nosocomiales. J Médecine et maladies infectieuses 33: 255s-265s.

S/

- Seck R. 2005. Resistance des souches d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae* isolées d'infections urinaires, P12-13.

- Sekhri Arafa N. 2011. Fréquence et marqueurs épidémiologiques de *Klebsiella pneumoniae* dans les services à haut risque infectieux au niveau du CHU Benbadis de Constantine. Thèse Pour l'obtention du Grade de Docteur en Sciences.
- Senda K. Arakawa Y. Ichiyama S. Nakashima K. Ito H. Ohsuka S. Shimokata K. Kato N. Ohta M. Pcr detection of metallo-beta-lactamase gene (bla_{imp}) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. *Journal of Clinical Microbiology.*, pages 2909-13, 1996 Dec.
- Singleton P. 2005. Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies. Ed Dunno, 6ème édition. Sciences SUP. 15: 464-467.
- Sougakoff W, Trystram D. 2003. Résistance aux beta-lactamines. P41-42.
- Stahlhut S G., Struve C., Krogfelt K A et Reisner A. 2012. Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65 (2012) 350–359.
- Struve C, Bojer M, Krogfelt K.A. 2008. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *J Infect Immun* 76(9): 4055-65.

T/

- Tzouveleki LS. Tzelepi E. Prinarakis E. Gazouli M. Katrahoura A. Giakkoupi P. Paniara O. Legakis NJ. Sporadic emergence of *klebsiella pneumoniae* strains resistant to cefepime and ceftazidime in greek hospitals. *Journal of Clinical Microbiology.*, pages 266-268, 1998 Jan.

U/

- Urban C. Rahal JJ. *Klebsiella* and extended spectrum beta-lactamases. *International Journal of Antimicrobial Agents.*, pages 37-43, 1997 Feb.

V/

- Villegas M.V, Correa A, Perez F, Zuluaga T, Radice M, Gutkind G, Casellas J.M, Ayala J, Quinn JP. 2004. CTX-M-12 beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolate in Colombia. *J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy* 48, P 629-631.

W/

- William K.S, Michael C.C. 2006. Génétique 8ème édition .P 380
- Winter P.C, Hickey G.I , Fletcher H.L. 1999. L'essentiel en génétique .Berti Edition .P 108-109

Y/

- Yala D, Merad A.S, Mohamadi D, et Ouar Korich M.N. 2001. Classification et mode d'action des antibiotiques, *Médecine du Maghreb* 91. P1, 2-13.
- 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.

- 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.)

Webographie :

- Boston Medical Research Occupational Health Program, 2012 Available at <http://www.bu.edu/rohp/files/2012/08/KPC-Klebsiella.pdf>
- Centre canadien d'hygiène et de sécurité au travail, 2013 valable a http://www.cchst.com/oshanswers/phys_agents/ultravioletradiation.html
- M. Silar Université de Paris Diderot 2008 valable a <http://gec.sdv.univ-paris-diderot.fr/genetique/chapitre5.html>

Annexes

Annexe 1 : Composition des milieux de cultures

1. Gélose de Chapman

Peptones	11 g/l
Extrait de viande	1 g/l
Chlorure de sodium	75 g/l
Mannitol	10 g/l
Rouge de phénol	0,025 g/l
Agar	15 g/l
pH = 7,4	

2. Gélose de chocolat

Peptone tryptique de caséine	7,5 g/l
Peptone pepsique de viande	7,5 g/l
Amidon de maïs	1 g/l
Hydrogénophosphate de potassium	4 g/l
Dihydrogénophosphate de potassium	1 g/l
NaCl	5 g/l
Hémoglobine	10 g/l
Agar	15 g/l
pH = 7,2	

3. Gélose Hektoen

Protéose-peptone	12 g/l
Extrait de levure	3 g/l
Lactose	12 g/l
Saccharose	12 g/l
Salicine	2 g/l
Citrate de fer III et d'ammonium	1,5 g/l

Sels biliaires	9 g/l
Fuchsine acide	0,1 g/l
Bleu de bromothymol	0,065 g/l
Chlorure de sodium	5 g/l
Thiosulfate de sodium	5 g/l
Agar	14 g/l
pH = 7,5	

4. Gélose de Mueller Hinton

Infusion de viande de bœuf	300 g/l
Peptone de caséine	17,5 g/l
Amidon de maïs	1,5 g/l
Agar	17 g/l
pH = 7,4	

5. Gélose nutritive

Extrait de viande	1 g
Extrait de levure	2 g
Peptone	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar	15 g
pH = 7	

6. Milieu TSI

Peptone	15 g
Extrait de viande	3 g
Extrait de levure	3 g
Peptone pepsique de viande	5 g

Glucose	1 g
Lactose	10 g
Saccharose	10 g
Rouge de phénol	0,024 g
Chlorure de sodium	5 g
Sulfate de fer II (pasteur)	0,2 g
Thiosulfate de sodium	0,3 g
Agar	11 g
pH = 7,5	

7. Milieu citrate de Simmons

Citrate de sodium	2 g/l
Bleu de bromothymol	0,08 g/l
Chlorure de sodium	0,08 g/l
Sulfate de magnésium	5 g/l
Hydrogénophosphate de potassium	0,2 g/l
Dihydrogénophosphate d'ammonium	1 g/l
Agar	1 g/l
	15 g/l
pH = 6,9	

8. Milieu Mannitol-Mobilité

Peptone	20 g/l
Nitrate de potassium	1 g/l
Mannitol	12 g/l
Rouge de phénol	40 mg/l
Gélose	4 g/l
pH= 7,6 - 7,8	

9. Milieu Urée-Indole

Urée	2 g
L-tryptophane	0,3 g
KHPO ₄	0,1 g
KH ₂ PO ₄	0,1 g
NaCl	0,5 g
Alcool à 95 °C	1,0 g
Rouge de phénol à 1 %	0,25 g
Eau distillée	100 ml
pH = 7	

10. Bouillon cœur cervelle

Protéose-peptone	10 g/l
Infusion de cervelle de veau	12,5 g/l
Infusion de cœur de bœuf	5 g/l
Glucose	2 g/l
Chlorure de sodium	5 g/l
Hydrogénophosphate de sodium	2,5 g/l
pH = 7,4	

11. Bouillon nutritif

Peptone	10 g/l
Extrait de viande	4 g/l
Chlorure de sodium	5 g/l
pH = 7,2	

Annexe 2 : Les réactifs

1. Réactif de Kovacs

Para diméthylamino benzaldehyde	0,5 g
Alcool iso anylique	75 ml
Acide chlorhydrique	25 ml

Annexe 3 : Les colorants

1. Violet de gentiane

Violet de gentiane	1 g/l
Ethanol a 90%	10 ml
Phénol	2 g/l
Eau distillé	100 ml

2. Lugol

Lode	1 g/l
Lodure de potassium	2 g/l
Eau distillé	300 ml

3. Fuchsine

Fuchsine basique	1 g/l
alcool éthylique a 90°	10 ml
Phénol	5 g/l
Eau distillé	10 ml

Annexe 4 : Antibiogramme des entérobactéries.

CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DR.BENBADIS CONSTANTINE
 SERVICE DE MICROBIOLOGIE – PR.K. BENLABED – Poste : 20 – 94

N° : _____ /

ANTIBIOGRAMME - ENTEROBACTERIE

Nom.....Prénom.....Age.....

Nature du Prélèvement.....Service :.....

Diagnostic Bactériologique :.....

AMOXICILLINE			GENTAMYCINE		
AMOXICILLINE + AC.CLAVULANIQUE			KANAMYCINE		
TICARCILLINE			TOBRAMYCINE		
PIPERACILLINE			NETILMYCINE		
CEFAZOLINE			AMIKACINE		
CEFOXITINE			ACIDE NALIDIXIQUE		
CEFOTAXIME			PEFLOXACINE		
CEFTAZIDIME			CIPROFLOXACINE		
CEFEPIME			SULFAMETHOXAZOLE + TRIMETOPRIM		
AZTREONAM			COLISTINE		
ERTAPENEM			CHLORAMPHENICOL		
IMIPINEM			NITROFURANTOINE		
FOSFOMYCINE					
TETRACYCLINE					

S = SENSIBLE

I = INTERMEDIAIRE

R = RESISTANT

Constantine le,.....
 Le Chef d'Unité,

Annexe 5 : Tableau des antibiotiques testés.

Familles d'antibiotiques	Antibiotiques testés	Abréviation	Charge des Disques
β-Lactamines	Amoxicilline	AMX	25 µg
	Amoxicilline-acide clavulanique	AMC	30 µg
	Ticarciline	TIC	75 µg
	Céfazoline	KZ	30 µg
	Cefoxitine	FOX	30 µg
	Céfotaxime	CTX	30 µg
	Imipénème	IPM	10 µg
Aminosides	Amikacine	AK	30 µg
	Gentamicine	CN	15 µg
Quinolones	Acide Nalidixique	NA	30 µg
	Ciprofloxacine	CIP	5 µg
Sulfamides	Triméthoprimé-Sulfaméthoxazole	SXT	25 µg
phénicol	Chloramphénicol	C	30 µg
polymixines	Colistine	CT	50 µg

Annexe 6 : Break-points des antibiotiques selon le CLSI:

Antibiotiques	Break-points
Amoxicilline	14- 16
Amoxicilline-acide clavulanique	15 – 20
Ticarciline	15 - 19
Céfazoline	15 – 17
Cefoxitine	15 – 17
Céfotaxime	15 – 22
Imipénème	14 – 15
Amikacine	15 – 17
Gentamicine	13 – 14
Acide Nalidixique	14 - 18
Ciprofloxacine	16 - 20
Triméthoprim- Sulfaméthoxazole	11 - 15
Chloramphénicol	8 - 16
Colistine	10 - 11

Annexe 7 : résultats de la galerie biochimique des 20 souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées.

souches	Galeries biochimique			
	TSI	CITRATE	MANNITOL	UREE
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	+	+	+
5	+	+	+	+
6	+	+	+	+
7	+	+	+	-
8	+	+	+	-
9	+	-	+	-
10	+	-	+	-
11	+	+	+	-
12	+	+	+	-
13	+	-	+	-
14	+	-	+	-
15	+	+	+	+
16	+	+	+	+
17	+	+	+	+
18	+	+	+	+
19	+	+	+	+
20	+	+	+	+

Annexe 8 : résultats d'antibiogramme des 20 souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées.

souches	Antibiotiques testés													
	AMX	AMC	TIC	KZ	FOX	CTX	IPM	CN	AK	NA	CIP	SXT	C	CT
1	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R	I	R	S	S
2	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R	I	R	S	S
3	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	S
4	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	S
5	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	S
6	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
7	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
9	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
10	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S
11	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
12	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R	I	R	S	S
13	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	I	R	S	S
14	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
15	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
16	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S
17	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S
18	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
19	R	R	R	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
20	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
R%	100	60	100	60	0	50	0	45	10	40	20	50	10	0
S%	0	40	0	40	100	50	100	55	90	55	60	50	90	100
I%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	20	0	0	0

Annexe 9 : résultats de l'étude rétrospective sur les souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées durant l'année 2015.

1. Distribution des souches isolées selon l'espèce :

543 souches de *Klebsiella pneumoniae* ont été isolées dont 0,36 % (2/543) *Klebsiella pneumoniae subsp ozenae* et 99,63 % (541/543) *Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae*. Ces résultats montrent que *Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae* est l'espèce la plus fréquemment isolée en milieu hospitalier.

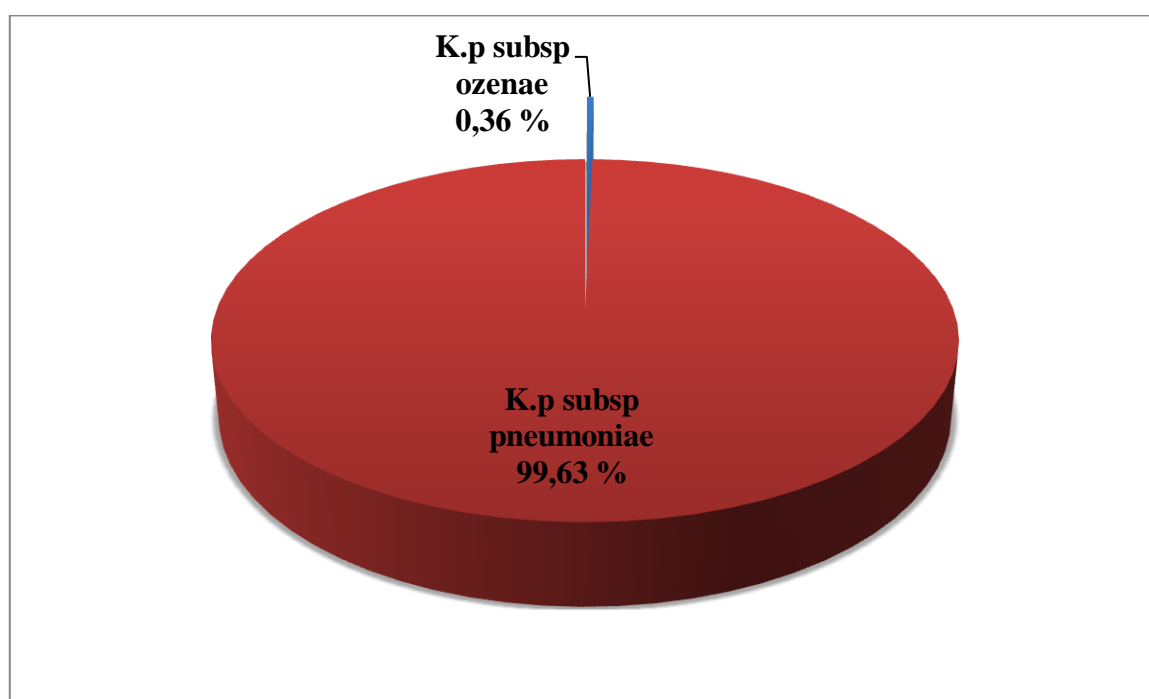


Figure 1 : Distribution des souches isolées selon l'espèce n = 543.

2. Distribution des souches isolées selon l'origine du prélèvement

Parmi les 543 souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées, 16,39 % (89/543) communautaires et 83,60 % (454/543) hospitalières. Ces résultats 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, (2000).

Tableau 1: Distribution des souches *K. pneumoniae* selon l'origine du prélèvement.

Origine	Effectif	Pourcentage (%)
Souches hospitalières	454	83,60
Souches communautaires	89	16,39
Total	543	100

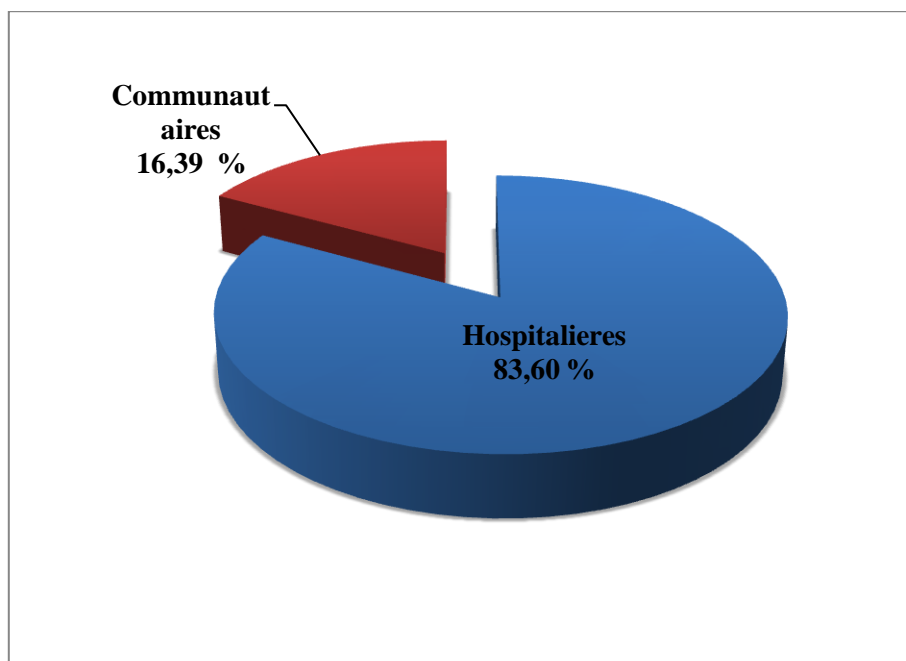


Figure 2 : Distribution des souches isolées selon l'origine du prélèvement n = 543.

3. Distribution des souches parmi les prélèvements cliniques

Sur les 543 souches isolées, 38,67 % proviennent de la bactériologie générale (qui regroupe les prélèvements de pus et sérosités purulentes, prélèvements respiratoires, drains, sondes urinaires et trachéal), 41,80 % d'urines et 18,04 % d'hémocultures. Dans notre étude le nombre de prélèvements urinaires est le plus élevé. Cette valeur correspond aux rapports de la littérature, où les prélèvements urinaires sont toujours dominants.

Tableau 2: Répartition des souches de *K. pneumoniae* parmi les prélèvements cliniques n = 543.

Prélèvement	Nombre de <i>K. pneumoniae</i> isolée	Pourcentage (%)
Urines	227	41,80
Pus et sérosité	210	38,67
Hémoculture	98	18,04
LCR	8	1,47
Total	543	100

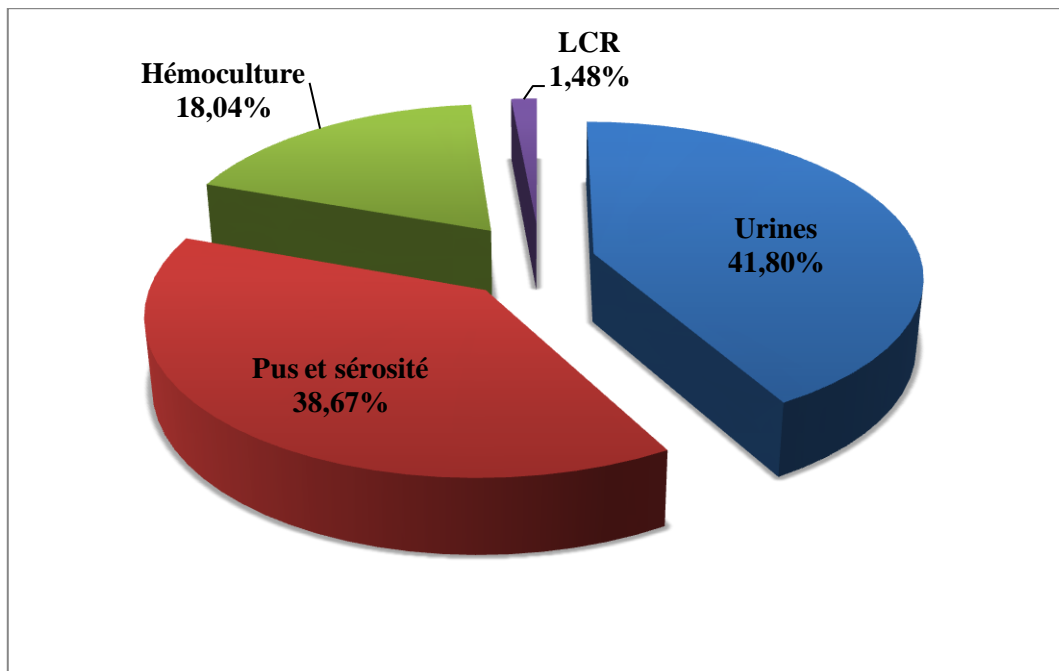


Figure 3 : Répartition de *Klebsiella pneumoniae* parmi les prélèvements cliniques

4. Fréquence d'isolement de *Klebsiella pneumoniae* au CHU de Constantine parmi les prélèvements effectués en 2015

Parmi tous les prélèvements effectués en 2015, *K. pneumoniae* enregistre une fréquence de 3,15 %.

Tableau 3 : Fréquence d'isolement de *Klebsiella pneumoniae* au CHU de Constantine parmi les prélèvements effectués en 2015.

Année	Nombre total de prélèvements	Nombre de <i>K. pneumoniae</i> isolée	Pourcentage (%)
2015	17228	543	3,15

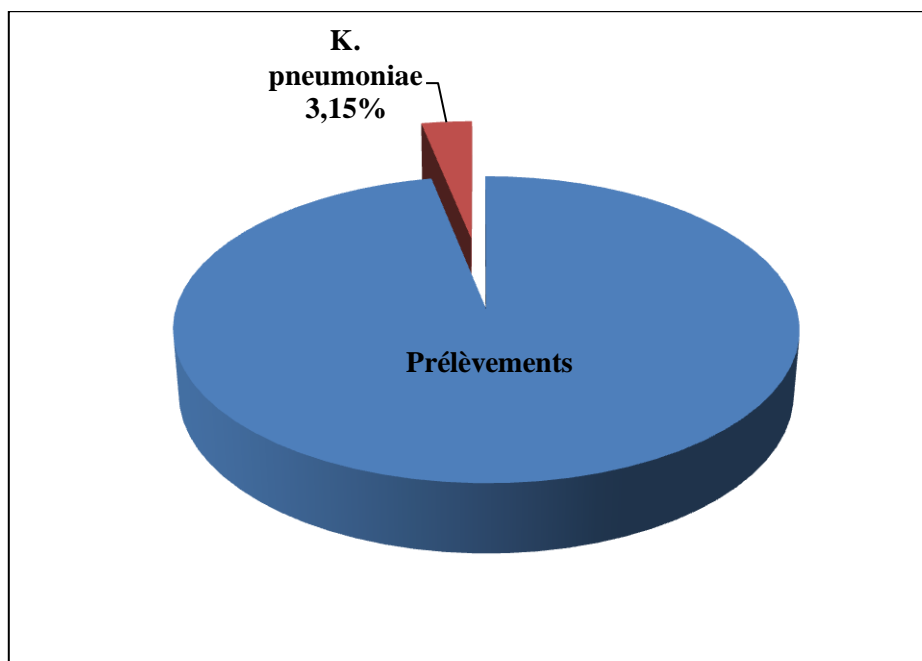


Figure 4 : Fréquence d'isolement de *Klebsiella pneumoniae* au CHU de Constantine parmi les prélèvements effectués en 2015.

5. Répartition des souches selon l'origine et le service d'hospitalisation

La répartition des souches selon leur provenance montre que 83,58 % des souches sont isolées des différents services de l'hôpital, (souches hospitalières), contre 16,39 % isolées de l'extérieur (souches communautaires). Les services de Médecines enregistre un taux important de souches de *K. pneumoniae* avec une fréquence de 28,54 %, suivi des services des unités de soins intensifs avec une fréquence de 23,38 %, Pédiatrie avec une fréquence de 14,91 %, et de chirurgie avec une fréquence de 13,62 %. En revanche la plus basse distribution est enregistrée aux autres services de l'hôpital (Épidémiologie, ERB, Protection sanitaire, Biochimie, Médecine légale et Médecine de travail) avec une fréquence de 3,13 %.

Tableau 4 : Répartition des souches par service d'hospitalisation

Service	Effectif	Pourcentage %
Médecine	155	28,54
Unités de soin Intensif	127	23,38
Pédiatrie	81	14,91
Chirurgie	74	13,62
Autres	17	3,13
Externes	89	16,39
Total	543	100

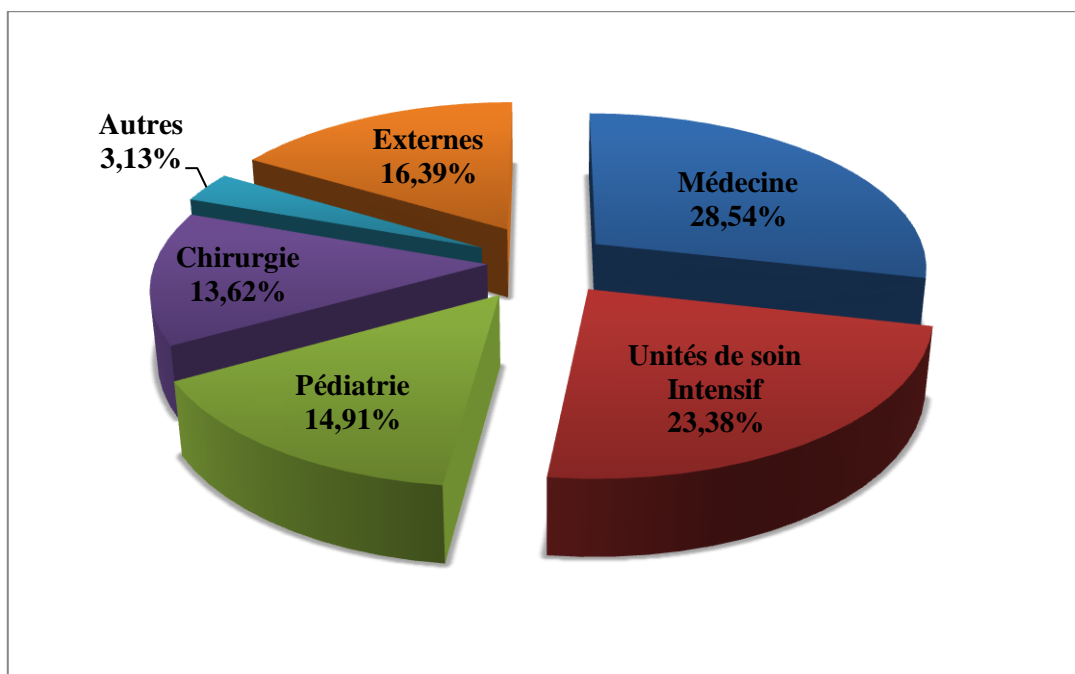


Figure 5 : Répartition des souches par service d'hospitalisation.

6. Distribution globale selon le sexe :

274 (50,46 %) des souches isolées proviennent de femmes et 269 (49,53 %) d'hommes, Le sexe ratio est de 0,98. On peut remarquer que les souches de *Klebsiella pneumoniae* se répartissent presque à part égale pour les deux sexes. Ce critère physiologique ne semble pas influencer les infections nosocomiales. Selon le sexe la fréquence d'isolement est statistiquement non significative. Par contre celui de l'âge et qui est en rapport avec le statut immunitaire des patients, aurait son influence, c'est en effet un des facteurs de risque pour l'infection par *Klebsiella pneumoniae*, puisque les plus touchés sont les personnes âgées et les immunodéprimées, ainsi que les nourrissons, conformément à de nombreux rapports.

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

Sexe	Effectif	Pourcentage (%)
Femme	274	50,46
Homme	269	49,53
Total	543	100

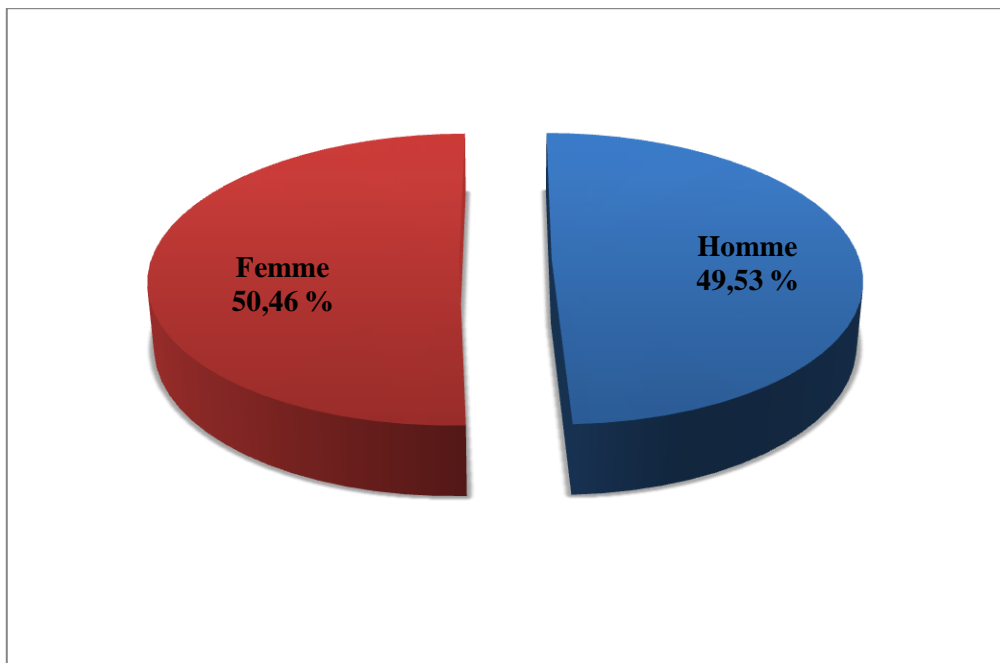


Figure 6 : Distribution globale des souches isolées selon le sexe n = 543.

Année universitaire : 2015/2016

Présenté par : BOUGHACHICHE ROUMEISSA
SEBAIS SAFA

Caractérisation morphologique, biochimique et mutagénèse des *Klebsiella pneumoniae* au CHU de Constantine.

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Génétique Moléculaire.

Résumé :

Klebsiella pneumoniae est une bactérie pathogène opportuniste. elle est le chef de file des germes responsables d'infections nosocomiales sévères et difficiles à traiter, L'augmentation et la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif, notamment chez *K. pneumoniae*, représente un problème majeur de santé publique.

La mise en évidence du caractère épidémique de l'infection est importante pour la mise en œuvre rapide des mesures préventives. Dans ce but, nous nous sommes fixés les objectifs suivants : l'identification de 20 souches de *K. pneumoniae* selon ses caractères biochimiques, isolées à partir des différents prélèvements cliniques au niveau du service de microbiologie du CHU Benbadis Constantine, L'étude de la résistance aux antibiotiques des souches de *K. pneumoniae* et déterminer leurs phénotypes de résistance, à la fin une mutagénèse a été réalisée par irradiation des souches au Rayons Ultra-violet pour déterminer leurs effets sur la survie de ces bactéries.

Les résultats issus de cette étude ont montré une résistance élevée des souches cliniques de *K. pneumoniae* à la majorité des antibiotiques cliniquement utilisés particulièrement aux β -lactamines 50 % des souches étaient productrices de BLSE.

Mots clés : *Klebsiella pneumoniae* – isolement – identification – caractères biochimiques – résistance - antibiotiques – phénotypes – BLSE – irradiation U.V – survie des bacteries.

Lieu de l'étude : laboratoire de Microbiologie du Centre Hospitalo-Universitaire Benbadis Constantine.

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme. GHARZOULI R Maitre de conférences B (Université Constantine 1).

Rapporteur : Mme. BECHKRI S Maitre-assistante A (Université Constantine 1).

Examineur : Mme. SAOUDI M Maitre-assistante A (Université Constantine1).

Date de soutenance : 21/06/2016