

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abou Bekr Belkaid - Tlemcen

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et

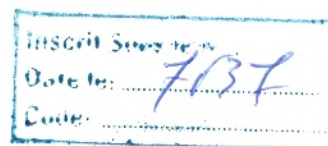
Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie



Laboratoire

Antifongiques, Antibiotiques : Physico-chimie, Synthèse et activité biologique



Mémoire en vue de l'obtention du Diplôme de Master

En Biologie

Option : Contrôle de développement microbien

Intitulé

**Profils de virulence et de résistance aux β -
lactamines de souches cliniques de *Klebsiella*
pneumoniae isolées de sondes urinaires**

Présentée par :

➤ BERRIAH Asma

Soutenu devant le jury :

❖ Mme Boucherit Z.	Professeur	Présidente
❖ Mme Hassaine H.	Professeur	Examinatrice
❖ Mme Kazi Tani Z.	Maître Assistant A	Promotrice

Année Universitaire : 2013-2014

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abou Bekr Belkaid -Tlemcen

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et

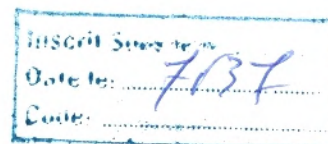
Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie



Laboratoire

Antifongiques, Antibiotiques : Physico-chimie, Synthèse et activité biologique



Mémoire en vue de l'obtention du Diplôme de Master

En Biologie

Option : Contrôle de développement microbien

Intitulé

**Profils de virulence et de résistance aux β -
lactamines de souches cliniques de *Klebsiella*
pneumoniae isolées de sondes urinaires**

Présentée par :

➤ BERRIAH Asma

Soutenu devant le jury :

❖ Mme Boucherit Z.	Professeur	Présidente
❖ Mme Hassaine H.	Professeur	Examinatrice
❖ Mme Kazi Tani Z.	Maître Assistant A	Promotrice

Année Universitaire : 2013-2014

Remerciements

Je remercie mon dieu le tout puissant pour le travail que j'ai réalisé

Je remercie d'abord mon encadreur madame **KAZI TANI Z.** maitre assistant A à l'université Abou Bekr Belkaid Tlemcen. J'adresse ma profonde gratitude d'avoir accepté la charge de m'encadrer. Vous m'avez guidé dans la réalisation de ce travail malgré vos multiples occupations, infatigable. C'était vraiment un très grand plaisir de travailler avec vous.

Je remercie aussi très vraiment, madame **BOUCHERIT Z.** professeur à l'université Abou Bakr Belkaid. Vous me faite le grand honneur de présider ce jury. Je vous prie de bien vouloir recevoir mon profond respect.

J'adresse mes sincères remerciements à madame **HASSAINE H.** professeur à l'université Abou Bakr Belkaid. Je vous remercie de m'honorer par votre présence en tant qu'examinatrice et pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire. En plus de votre permission de faire ma partie pratique dans votre laboratoire de recherche.

Les doctorantes du laboratoire LAMAABE, qu'elles m'ont écouté, conseillé, aidé avec patience, rigueur et sympathie.

Enfin, merci à tous ceux qui, d'une manière ou d'autre ont contribué à la réalisation de ce travail.

BERRIAH Asma



Dédicace



Je dédie ce modeste travail aux êtres les plus au monde qui n'ont pas cessé de me fournir leur soutien et leurs encouragements depuis ma naissance.

A mes très chers parents

Vos conseils et vos soutiens m'ont permis d'atteindre le bout du chemin, si je suis arrivée là, c'est bien grâce à vous. Que dieu vous donne longue vie et vous protège pour moi. Je vous remercie de m'avoir accompagnée tout au long de mon parcours

Mes belles sœurs Naima, Samira, Nacera, Amina et Sara et surtout Samira qui m'a aidé, écouté, encouragé et supporté pendant ce travail

Mes collègues du laboratoire : Khadîdja, Ammaria, Nacera et Nabila, pour les moments inoubliables passés ensemble et pour leur soutien

Listes des figures

Introduction.....	1
Synthèse bibliographique.....	2
1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>.....	2
1.1. Caractères bactériologiques et biochimiques.....	2
1.2. Caractères cultureux.....	2
1.3. Habitat.....	3
2. Virulence et pathogénicité de <i>K. pneumoniae</i>.....	3
2.1. Pouvoir pathogène.....	3
2.2. Facteurs de pathogénicité.....	4
2.2.1. Les fimbriae.....	4
2.2.2. La capsule.....	5
2.2.3. Le lipopolysaccharide.....	5
2.2.4. Les sidérophores.....	6
3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> et β-lactamines.....	7
3.1 Les β -lactamines.....	7
3.1.1. Définition.....	7
3.1.2. Classification.....	7
3.1.3 Mode d'action.....	8
3.2 Résistance de <i>K. pneumoniae</i>	9
3.2.1 Résistance non enzymatique.....	9
3.2.2 Résistance enzymatique par production des β -lactamases.....	10

Matériels et méthodes

I. Matériel.....	11
1. Souche bactériennes.....	12
2. Test biochimique.....	12
3. Les antibiotiques (β -lactamines).....	12
II. Méthodes.....	11
1. Isolement.....	11
2. Identification	12
3. Etude de la résistance de <i>Klebsielle pneumoniae</i> aux β -lactamines.....	12
4. Détection de la capsule.....	14

Résultats et discussion

1. Isolement et identification.....	15
2. Résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux β -lactamines.....	15
3. Détection de la capsule.....	16

Conclusion	17
-------------------------	-----------

Références bibliographiques.....	18
---	-----------

Annexes	25
----------------------	-----------

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

Figure 2: Représentation schématique des facteurs de virulence chez *K. pneumoniae*

Figure 3: Disposition des antibiotiques selon le schéma de Vedel

Figure 4: Identification de *Klebsiella pneumoniae* par galerie API 20 E

Figure 5: Phénotype de résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux β -lactamines

Figure 6: Phénotype muqueux de souches de *Klebsiella pneumoniae*

Après un demi-siècle d'utilisation des antibiotiques, l'émergence et la dissémination de la résistance bactérienne à cette classe thérapeutique posent un problème de santé publique très important dont la maîtrise constitue un véritable défi pour les cliniciens, les microbiologistes et les autorités sanitaires (**Muller et al ; 2006**).

Ce problème a recensé dans le monde des pathologies de plus en plus lourdes en termes de financement de recherche et de cout de prise en charge. L'infection nosocomiale est l'une de ces pathologies qui prend des proportions alarmantes par les taux de prévalence et de cout de soins qu'elle engendre. Les infections nosocomiales causées par les bactéries Gram négatif multi-résistantes sont associées à une morbidité et mortalité élevées, spécialement dans les unités de soins et de réanimation, et un séjour d'hospitalisation augmentés (**Evans et Sawyer; 2009**).

Klebsiella pneumoniae est l'un des exemples de pathogènes opportunistes jouant un rôle majeur dans les infections nosocomiales. Elle requière une attention particulière lors de la prise en charge d'infections sévères en raison de l'émergence constante de résistance aux antibiotiques. *K. pneumoniae* est le plus souvent isolée d'infections urinaires, respiratoires, ou lors de septicémies. Elle profite d'une défaillance du système immunitaire de l'hôte pour provoquer une infection (**Illiaquer ; 2010**). Cette pathogénicité est due à la nature et le nombre des facteurs de virulence exprimés favorisant sa diffusion épidémique en milieu hospitalier (**Yu et al ; 2005**).

L'objectif de notre travail est de déterminer les profils de virulence et de résistance aux β -lactamines de souches cliniques de *K. pneumoniae* du laboratoire « Antibiotiques, Antifongique : physico-chimie, Synthèse et activité biologique (LapSaB) ».

1. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae est l'espèce la plus souvent rencontrée dans le genre *Klebsiella* encore appelé pneumobacille Fúeollander (**Seck, 2005**). Elle est le chef de file du groupe des entérobactéries pathogènes opportunistes très incriminée dans les infections nosocomiales (**Collignon., 2002**).

1.1. Caractères bactériologiques et biochimiques

K. pneumoniae est une entérobactérie qui fait partie des espèces commensales, c'est-à-dire des flores normales du sujet sain (**Kariuki et al., 2007**).

C'est un bacille à Gram négatif, de 0,3 à 1 µm de diamètre sur 0,6 à 6 µm de longueur, immobile, non sporulé, aéro-anaérobie, il a un métabolisme respiratoire et fermentatif, fermente le glucose avec production de gaz, VP (réaction de Voges-Proskauer) et uréase positif, oxydase négative, catalase positive, ODC négative, ADH négative, LDC positif, tryptophane désaminase et phénylalanine désaminase négative, β-galactosidase positif, ne produisent pas d'hydrogène sulfuré (**Boye et Hansen, 2003**). Il est généralement entourée d'une capsule, donnant un aspect muqueux assez typique (**Jonas et al., 2004**).

1.2. Caractères cultureux

K. pneumoniae est une bactérie non exigeante qui se développe facilement sur des milieux gélosés non enrichis, à une température optimum de 37°C. Au bout de 18 à 24 h d'incubation, des colonies arrondies sont obtenues, lactose positives, muqueuses, de 3 à 4 mm de diamètre, généralement bombées et translucides (**Brisse et al., 2006**) (**Figure 1**).

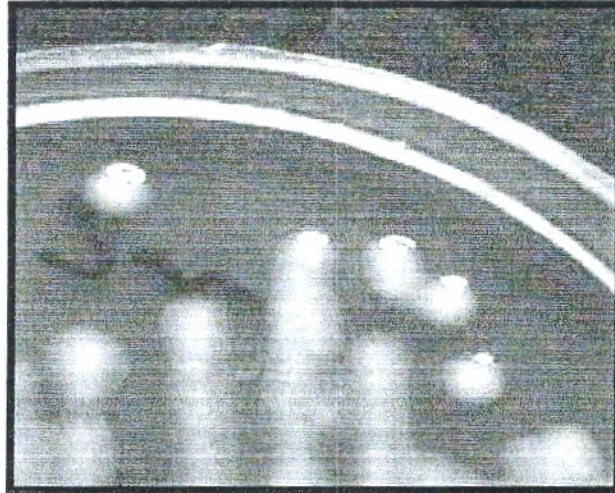


Figure 1. Aspect des colonies de *K. pneumoniae* sur milieu gélosé (Derakhshan *et al.*, 2008)

1.3. Habitat

K. pneumoniae est une espèce ubiquiste, isolée des eaux de surface, des eaux usées, des effluents industriels, du sol, du bois, de végétaux divers et des aliments (Euzéby, 2004). Elle est également retrouvée dans la flore fécale d'environ 30% des animaux et de l'homme, elle existe à l'état commensal sur la peau et les muqueuses, notamment respiratoires (Baerwolf *et al.*, 2002). Elle est présente dans l'environnement hospitalier, au niveau des individus (patient, personnel soignant) ou de l'environnement inerte (surfaces, instruments, solutés) (Raud, 2003).

2. Virulence et pathogénicité de *K. pneumoniae*

2.1. Pouvoir pathogène

La bactérie *K. pneumoniae* est placée au premier plan des pathogènes opportunistes qui profitent de l'affaiblissement des défenses de l'organisme pour induire différents types de pathologies infectieuses, sous la forme d'infections urinaires et respiratoires, de bactériémies et de surinfections de plaies opératoires (Balestrino, 2006). En milieu hospitalier, elle est la principale cause d'infections graves chez les nouveau-nés, les patients atteints de leucémie et les immunodéprimés (Kim *et al.*, 2002). Elle peut causer aussi des pneumonies, des méningites et des abcès hépatiques (Ko *et al.*, 2002). L'arthrite à *K. pneumoniae* est rare mais elle peut détruire l'articulation provoquant un handicap définitif (Schelenz *et al.*, 2007). *K.*

pneumoniae peut aussi être à l'origine d'infections communautaires entraînant habituellement des infections broncho-pulmonaires et intra-abdominales (Méric *et al.*, 2007).

2.2. Facteurs de pathogénicité

Les différences dans les caractéristiques cliniques des infections dues à *K. pneumoniae* sont liées à la nature et le nombre de facteurs de virulence exprimés (Yu *et al.*, 2007). Ces facteurs comprennent la capsule et l'hypermucoviscosité, le lipopolysaccharide, les adhésines, le système d'acquisition de Fer, et la formation de biofilm (Wiskur *et al.*, 2008) (Figure 2).

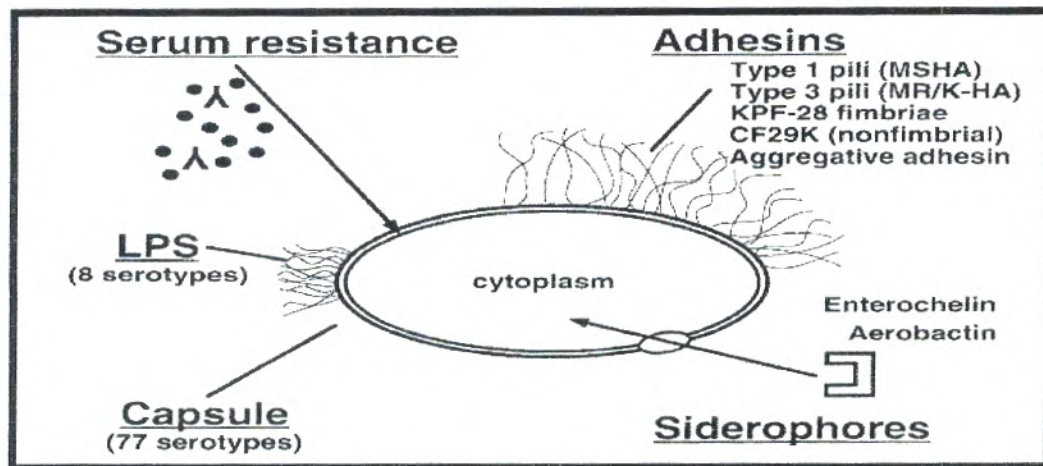


Figure 2. Représentation schématique des facteurs de virulence chez *K. pneumoniae* (Podschun, 1998)

2.2.1. Les fimbriae

K. pneumoniae exprime deux types d'adhésines fimbriales, fimbriae de type 1 et de type 3 (Kim *et al.*, 2010). Les fimbriae de type 1 sont impliqués dans la formation de biofilm (Schembri *et al.*, 2005). Les gènes gouvernants la biosynthèse de ces fimbriae sont regroupés au sein de l'opéron *fim* porté par le chromosome (Balestrino, 2006). C'est un facteur essentiel chez *K. pneumoniae* causant des infections urinaires (Struve *et al.*, 2009). Les fimbriae de type 3 servent d'adhésion pour plusieurs types cellulaires *in vitro* (Kim *et al.*, 2010). Ils peuvent être responsables de la colonisation des surfaces de dispositifs à demeure, de même qu'ils sont impliqués dans l'adhésion aux surfaces abiotiques et la formation de biofilm (Di Martino *et al.*, 2003). Ils sont codés par un opéron multigénique *mrk ABCDF* (Huang *et al.*, 2006). Dans une recherche de facteurs bactériens responsable de l'adhésion de *K. pneumoniae* aux cellules de l'intestin, Darfeuille-Michaud *et al.* (1992) ont trouvé une adhésine non

fimbriale de 29 kDa qui a été désignée « CF29K ». Son gène était porté par un plasmide conjugatif, qui contenait également des gènes de résistance aux céphalosporines, et d'aérobactine (**Darfeuille-Michaud et al., 1992**).

2.2.2. La capsule polysaccharidique

La grande majorité des isolats de *K. pneumoniae* exprime une capsule polysaccharidique recouvrant toute la surface bactérienne, ce qui entraîne un phénotype caractéristique mucoïde lorsqu'elles sont cultivées sur gélose. La capsule est généralement considérée comme un important facteur de virulence chez *K. pneumoniae*. Des études *in vitro* ont montré qu'elle est un médiateur de protection contre la phagocytose et l'effet bactéricide du sérum (**Struve et al., 2003**). Il a été démontré (*in vivo*) dans un modèle murin, que la capsule favorise la capacité des bactéries à s'implanter au sein du tractus de l'hôte (**Favre-Bonte et al., 1999**). Divers modèles expérimentaux montrent qu'il existe une relation entre la taille de la capsule et l'intensité du pouvoir pathogène et que les types capsulaires K1, K2, K4, et K5 sont les plus pathogènes (**Lai et al., 2000**). En présence de polymyxine B et de lactoferrine, *K. pneumoniae* est capable d'accroître la synthèse de sa capsule en augmentant la transcription du gène *cps* correspondant (**Campos et al., 2004**).

Un gène de virulence *magA* (mucoviscosity associated gene) a été identifié dans des souches pathogènes causant un abcès du foie en Taiwan (**Fang et al., 2004**). Ce gène a été associé à une hypermucoviscosité, et une résistance à la destruction par le sérum humain et à la phagocytose (**Yeh et al., 2006**). Un autre gène associé à l'hypermucoviscosité, le *rmpA*, est connu comme un régulateur de synthèse polysaccharidique extracapsulaire. Il peut contrôler le phénotype mucoïde de *K. pneumoniae*. Il est généralement situé sur un plasmide (**Yu et al., 2005**).

2.2.3. Le lipopolysaccharide (LPS)

Le lipopolysaccharide (LPS) est un composant majeur de la paroi cellulaire des bactéries Gram négatives et possède de puissantes propriétés immuno-modulatrices (**Strieter et al., 1990**). Il est composé du lipide A, de structure oligosaccharidique et une chaîne polysaccharidique appelée « O-antigène ». Neuf types d'O-antigène sont distingués chez *K. pneumoniae*, dont O1 est le plus fréquent (**Hansen et al., 1999**). Il contient deux domaines structurellement distincts, composé des unités récurrentes, D-galactane I et D-galactane II. La biosynthèse d'O-antigène est effectuée par la production du gène *wb* (**Hsieh et al., 2012**). Les

chaînes polysaccharidiques terminales (chaînes O spécifiques) du lipopolysaccharide protègent les bactéries de l'activation du système complémentaire et des anticorps spécifiques (Echeverri Toro et Catano Correa, 2010).

2.2.4. Système de captation de Fer

La capacité d'acquérir le Fer est essentiel pour la croissance bactérienne et la réplication. La plupart des bactéries sécrètent des chélateurs de Fer de faible poids moléculaire, les sidérophores, capables de rentrer en compétition avec les protéines de l'hôte, pour capter le Fer. Chez *K. pneumoniae*, il a été démontré qu'il joue un rôle crucial dans la progression de l'infection (Shon *et al.*, 2012). L'enterobactine, l'aérobactine et yersiniabactine sont des sidérophores qui ont été décrits chez *K. pneumoniae* (Hsieh *et al.*, 2008). L'entérobactine (*entB*) est un sidérophore qui semble être rependue chez les souches de *K. pneumoniae* (Koczura and Kaznowski, 2003). C'est un facteur de virulence important dans les infections urinaires. L'expression du gène *entB* favorise le développement et la maturation du biofilm. En plus de l'enterobactine, *K. pneumoniae* peut produire l'aérobactine, un chélateur de Fer hydroxamate. Les gènes codants pour la synthèse de l'aérobactine sont présents sur un plasmide conjugatif de 180kb (May *et al.*, 2011). *K. pneumoniae* peut produire un autre sidérophore, yersiniabactine (*YbtS*). Il est suffisant pour permettre une colonisation du tractus respiratoire et causer une pneumonie (Bachman *et al.*, 2009).

3. *Klebsiella pneumoniae* et β -lactamines

La résistance aux antibiotiques est devenue l'un des problèmes les plus importants des thérapeutiques anti-infectieuses dans le monde (Archibald *et al.*, 1997). Parmi ces antibiotiques, la famille des β -lactamines, est la plus largement prescrite. Les bactéries ont développées différents mécanismes pour contrecarrer l'action des β -lactamines, dont la modification des porines, la surproduction des pompes d'efflux qui peuvent expulser l'antibiotique hors de la cellule, et la synthèse des enzymes qui inactivent les β -lactamines par modification chimique (Kollef et Fraser, 2001).

3.1. Les β -lactamines

3.1.1. Définition

Les β -lactamines constituent la famille d'antibiotiques la plus importante, aussi bien par le nombre et la diversité des molécules utilisables que par leurs indications en thérapeutique et en prophylaxie des infections bactériennes (**Courlavin et Bingen, 2006**). Cette famille, qui regroupe les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames, est caractérisée par la présence constante du cycle β -lactam associé à des cycles et des chaînes latérales variables qui expliquent les propriétés pharmacocinétiques et le spectre d'activité des différents produits. La grande variété de leurs modes d'administration, leur large spectre d'activité antibactérien associé à une action bactéricide, une bonne diffusion tissulaire, une bonne tolérance et un faible nombre d'interactions médicamenteuses expliquent leur popularité et l'importance de leur utilisation, seules ou en association (**Cavallo et al., 2004**).

3.1.2. Classification

- Péname (pénicilline)

Ils sont constitués d'un cycle β -lactam accolé à un cycle thiazolidine. Les pénicillines les plus fréquemment utilisés sont : Les aminopénicillines (ampicilline, amoxicilline), carboxypénicilline (ticarcilline), uréidopénicillines (pipéracilline) (**Seck, 2005**).

- Céphème

Elles sont constituées d'un cycle β -lactam accolé à un cycle dihydrothiazolidine. Elles sont subdivisées en quatre groupes : les céphalosporines de 1^{er} génération : céfalotine, céfalozone et céfalaridine; 2^{ème} génération : céfoxitine, céfamandole et céfuroxime; 3^{ème} génération : céfotaxime, céftazidime et céftriaxone; 4^{ème} génération : céfépime et ceftiofime (**Seck, 2005**).

- Monobactame

Leur noyau se caractérise par la présence du noyau monocyclique, azétidine, limité au cycle β -lactam. Seule la molécule d'aztréonam est prescrite (**Cavallo et al., 2004**).

- Carbapénèmes

Ils sont caractérisés par un noyau pénème (**Cavallo et al., 2004**). L'imipénème et le méropénème ont été les deux premiers représentants disponibles en clinique. Une troisième molécule s'est ajoutée, l'ertapénème (**Zhanet et al., 2005**). Parmi les nouvelles carbapénèmes, le doripénème garde une meilleure activité sur les bacilles à Gram négatif et particulièrement sur les aérobies stricts (**Zahar et al., 2010**).

- Inhibiteurs de β -lactamases

Ce sont des inhibiteurs suicides de β -lactamases qui, associés avec une β -lactamine, lui permettent de conserver son activité vis à vis des souches productrices des β -lactamases (**Cavallo et al., 2004**). L'acide clavulanique, le tazobactam et le sulbactam sont des inhibiteurs de β -lactamases disponibles en thérapeutique (**Alain, 2008**).

3.1.3. Mécanisme d'action

Le cycle β -lactam, commun à toutes les molécules de cette famille d'antibiotiques, se comporte comme un substrat-suicide d'enzymes, les PLPs, impliquées dans les étapes finales de la biosynthèse du peptidoglycane. Par analogie structurale avec le motif D-Ala-D-Ala, substrat naturel des PLPs, le cycle β -lactam se lie de manière covalente et irréversible au site actif de l'enzyme provoquant son inactivation. Il en résulte un déséquilibre en faveur des mécanismes de destruction du peptidoglycane aboutissant à la lyse bactérienne (**Gautier, 2007**). L'effet bactéricide est obtenu avec l'activation du système enzymatique de la muréine hydrolase qui provoque l'éclatement de la bactérie (**Louis et Martin, 2005**).

3.2. Résistance de *K. pneumoniae*

3.2.1. Résistance non enzymatique

3.2.1.1. Diminution de la perméabilité de la membrane externe

La pénétration des β -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides, s'effectue à travers les porines qui sont les canaux protéiques remplis d'eau. La sensibilité aux antibiotiques dépend du nombre de porines fonctionnelles (**Seck, 2005**). La perte de porine provoque l'augmentation des concentrations minimales inhibitrices de certaines β -lactamines comme cela a été mis en évidence chez *K. pneumoniae* (**Nikaido, 2000**). Des modifications des gènes codant les porines (OmpK35 et OmpK36) de *K. pneumoniae* sont à l'origine de l'imperméabilité (**Doménech-Sánchez et al., 2003**).

3.2.1.2. Surexpression des pompes d'efflux actifs

Les pompes à efflux illustrent un phénomène unique dans la résistance aux médicaments: un seul mécanisme provoquant la résistance contre les différentes classes d'antibiotiques (**Wieczorek et al., 2008**). Ce sont des systèmes complexes à trois composants qui permettent le rejet des molécules depuis l'espace périplasmique vers le milieu extérieur (**Piddock, 2006**).

Ces complexes sont composés d'une protéine d'efflux cytoplasmique, d'une protéine de fusion membranaire et d'une protéine de membrane externe. Ils sont soit spécifiques d'un substrat ou d'un groupe de molécules de structure similaire (**Blair et Piddock, 2009**).

3.2.2. Résistance enzymatique par production des β -lactamases

- *K. pneumoniae* est naturellement résistante aux amino-pénicillines (ampicilline et amoxicilline) et aux carboxypénicillines (carbénicilline) en raison de la production d'une pénicillinase naturelle de type SHV-1 (**Girlich et al., 2000**).

- Le phénotype céphalosporinase de haut niveau est associé à l'acquisition d'un gène plasmidique (*ampC*). Cette résistance a été décrite en 1990 pour la première fois avec MIR-1 (**Papanicolau et al., 1990**). Plusieurs céphalosporinases transférables ont été mises en évidence chez les entérobactéries, dont le type ACC-1, rapportée en 1999 chez une souche de *K. pneumoniae* à Kiel en Allemagne (**Bauernfeind et al., 1999**).

Chez *K. pneumoniae*, on connaît un grand nombre de β -lactamases de classe C qui dérivent des céphalosporinases chromosomiques. On peut citer FOX-1 et MOX-1 (homologue à Amp C de *Pseudomonas aeruginosa*), et LAT-1 et CMY-2 (homologue à Amp C de *Citrobacter freundii*) (**Uzun et al., 2008**).

-Les BLSE sont principalement identifiées dans des souches de *K. pneumoniae* en milieu hospitalier. Ces BLSE dérivent des pénicillinases à spectre restreint TEM et SHV, dont le spectre d'hydrolyse était élargi par la sélection de mutations ponctuelles localisées au niveau du site actif de l'enzyme (**Carrër et Nordmann, 2011**).

Une proportion importante des *K. pneumoniae* était productrice de BLSE de types SHV-5 et résistants à l'aztréonam (**Psichogiou et al., 2008**).

-La β -lactamase à spectre étendu de type CTX-M constitue le majeur groupe d'enzymes codées par des plasmides transférables (**Pieboji et al., 2005**). Des infections nosocomiales associées à la production d'*E. Coli* CTX-M ont été mondialement décrites (**Pai et al., 2006**). La dissémination de ces enzymes et en particulier du variant CTX-M-15 concerne maintenant l'ensemble des entérobactéries, notamment *K. pneumoniae* (**Carrër et Nordmann, 2011**). Le CTX-M-15 confère une forte résistance au céfotaxime, au ceftriaxone, et à l'aztréonam et est bien inhibé par l'acide clavulanique et le tazobactam (**Poirel et al., 2002**).

- Les carbapénèmases les plus répandues chez les entérobactéries sont les enzymes de type KPC. Ces enzymes ont principalement été décrites chez *K. pneumoniae* avec un support

plasmidique. Elles possèdent un pouvoir de dissémination important et sont émergentes dans de nombreux pays (Nordmann *et al.*, 2009).

La première souche productrice de KPC-1 a été isolée en Caroline du Sud (Yigit *et al.*, 2001). Il s'agissait d'une souche de *K. pneumoniae* résistante à toutes les β -lactamines. Cette première description a été rapidement suivie par la publication d'un autre variant KPC-2 (Moland *et al.*, 2003). Depuis, un nouveau séquençage du gène bla_{KPC-1} a révélé une parfaite homologie avec bla_{KPC-2} (Yigit *et al.*, 2008). Sept autres variant ont été rapportés (KPC-3 à KPC-9). Ils se distinguent par au moins deux substitutions d'acides aminés (Yigit *et al.*, 2001).

-La métallo- β -lactamase NDM-1 (*new Delhi* métallo- β -lactamase) a été identifiée tout d'abord en Suède dans deux souches chez un patient d'origine indienne au début de l'année 2008, la première souche NDM-1 fut une souche de *K. pneumoniae* isolée d'un prélèvement urinaire (Yong *et al.*, 2009). C'est une enzyme qui confère à la bactérie qui la synthétise une résistance aux antibiotiques de la famille des carbapénèmes (Yong *et al.*, 2009). Le gène bla_{NDM-1} est généralement pris en charge par des plasmides conjugatifs qui portent des déterminants supplémentaires, conduisant à la multi-résistance (Poirel *et al.*, 2011).

-Les métallo- β -lactamases de type VIM ont été identifiés dans différent pays dont la source principale est *K. pneumoniae*. Le groupe VIM inclus 23 variant dont les principaux représentants sont VIM-1, VIM-2, et VIM-7 (Robin *et al.*, 2010, Rodriguez-Martinez *et al.*, 2010). Une résistance à la colistine a été décrite parmi les souches de *K. pneumoniae* productrices de carbapénémases de type VIM-1 (Antoniadou *et al.*, 2007).

Le carbapénémase OXA-48 a été identifiée initialement chez une souche de *K. pneumoniae* en Turquie. Cette β -lactamase de classe D hydrolyse les carbapénèmes plus faiblement que KPC et n'hydrolyse pas les céphalosporines de troisième génération. Son activité n'est pas inhibée par l'acide clavulanique (Uzun *et al.*, 2008).

1. Matériel

1.1. Souches bactériennes

10 souches de *Klebsiella pneumoniae* du laboratoire « Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, Synthèse et activité biologique » isolées à partir de sondes urinaires prélevées chez des malades hospitalisée au niveau de réanimation du CHU de Tlemcen, ont fait l'objet de ce travail.

1.2. Test biochimique

Galerie API 20 E (Bio Mérieux)

1.3. Les antibiotiques (β -lactamines)

Ampicilline (10 μ g), Ticarcilline (75 μ g), Imipenème (10 μ g), Céfalotine (30 μ g), Céfoxitine (30 μ g), Céftazidime (30 μ g), Céftriaxone (30 μ g).

2. Méthodes

2.1. Isolement

L'ensemencement des souches de *K. pneumoniae* a été réalisé sur milieu Mac-Conkey puis incubé à 37°C pendant 24h. Après incubation, une purification des colonies bactériennes par ré-isolement sur le même milieu sera effectuée afin d'obtenir des souches pures à identifier.

2.2. Identification

L'identification des souches a été réalisée par galerie API 20E qui se compose de 20 microtubes contenant des substrats déshydratés pour la mise en évidence d'enzymes ou de fermentation de sucres. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

2.2.1. Mode opératoire

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir 5 ml d'eau distillée stérile (ou eau physiologique stérile) dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Incrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Sortir la galerie de son emballage et placer la galerie dans la boîte d'incubation.
- A l'aide d'une anse de platine, prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé

- Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant les bactéries dans 5 mL d'eau physiologique.
- Introduire la suspension bactérienne dans les micro-tubes de la galerie à l'aide de la même pipette:
 - pour les tests CIT , VP , et GEL remplir tube et cupule,
 - pour les autres tests, remplir uniquement les tubes (et non les cupules),
 - pour les tests : ADH, LDC, ODC, H₂S, URE créer une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Mettre la boîte en incubation pendant 24 heures à 37°C.

2.2.2. Lecture

La lecture de la galerie est réalisée en se référant au tableau de lecture (tableau X, annexe), noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :

- Test TDA : ajouter 1 goutte de réactif TDA.
- Test IND : ajouter 1 goutte de réactif KOVACS.
- Test VP : ajouter 1 goutte de réactifs VP 1 et VP 2.

L'identification est obtenue à l'aide du tableau d'identification du Catalogue Analytique (Annexe 2).

2.3. Antibiogramme

L'antibiogramme a été réalisé par la méthode de diffusion des disques imprégnés d'antibiotiques en milieu gélosé Mueller-Hinton selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM 2013). La technique consiste à utiliser des disques d'antibiotiques déposés à la surface d'une gélose ensemencée avec la bactérie à étudier. Chaque antibiotique diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine un gradient de concentration. Les bactéries croissent sur toute la surface de la gélose, sauf là où elles rencontrent une concentration d'antibiotique suffisante qui inhibe leur croissance.

2.3.1. Mode opératoire

- **Préparation de la gélose**

La gélose Mueller-Hinton fondue au bain-marie a été versée en boîte de Pétri en respectant une épaisseur d'environ 4 mm.

- **Préparation de l'inoculum**

L'inoculum a été préparé à partir d'une souche bactérienne de 18 heures. Des colonies de la bactérie à étudier ont été prélevées avec la pipette Pasteur et ont été introduites dans un tube contenant 5 mL d'eau physiologique. La densité optique a été ajustée a

On calibre la D.O de la culture obtenue entre 0.08-0.1 (10^8 CFU/ml) à une longueur d'onde de 625 nm.

- **Ensemencement**

-Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne

-L'essorer en le pressant fermement sur la paroi interne du tube pour le décharger

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

- Répéter l'opération deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.

- **Application des disques d'antibiotiques**

Les disques ont été déposés sur la gélose à l'aide d'une pince stérile selon le schéma de Vedel (**Figure 1**), en appuyant doucement sur chaque disque pour assurer un contact uniforme avec le milieu.

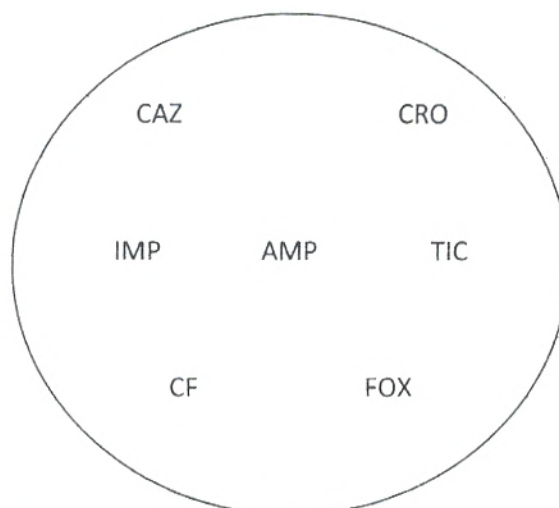


Figure 3. Disposition des antibiotiques selon le schéma de Vedel (Vedel, 2005)

- **Incubation**

L'incubation a été réalisée à 37°C pendant 24 heures.

2.3.2. Lecture interprétative

Après incubation, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés et comparés aux diamètres critiques conformément aux normes CASFM, 2013 (Annexe 3)

3. Détection de la capsule

La présence de la capsule a été révélée à l'état frais par coloration négative à l'encre de chine

3.1. Mode opératoire

- Déposer sur une lame propre, une goutte de culture en milieu liquide;
- Déposer à côté une petite goutte d'encre de chine;
- Recouvrir d'une lamelle (les deux gouttes se mélangent);
- Examiner la préparation sous microscopie optique à l'objectif x 40

1. Isolement et identification

L'identification par galerie API 20 E nous a permis de confirmer l'appartenance des souches au genre espèce *Klebsiella pneumoniae* (figure 4). Ces souches ont été toutes isolées à partir de sondes urinaires prélevées chez des malades admis au service de réanimation du CHU de Tlemcen.

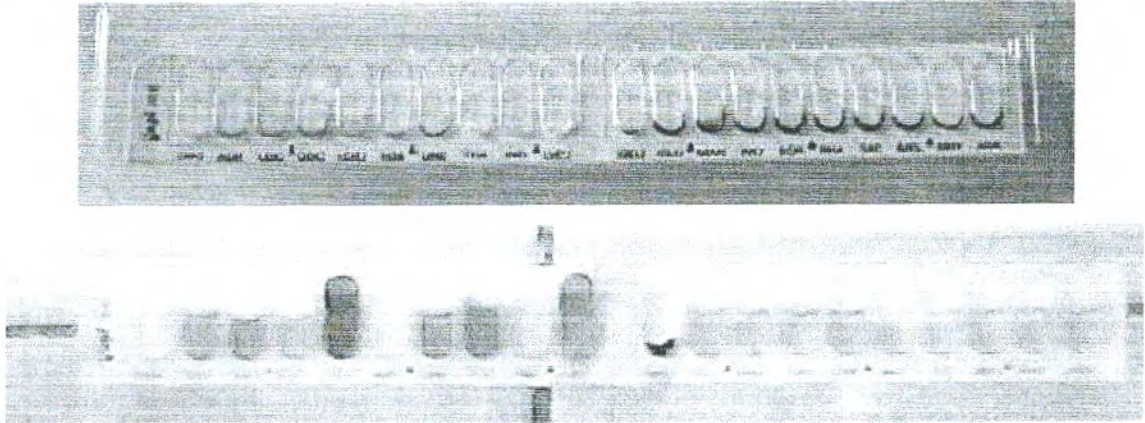


Figure 4. Identification de *Klebsiella pneumoniae* par galerie API 20 E

2. Résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux β -lactamines

Les résultats de l'antibiogramme réalisé vis-à-vis des molécules de β -lactamines ont révélés que toutes les souches étudiées étaient résistantes aux pénicillines (ampicilline, ticarcilline), aux céphalosporines (céphalotine, céftriaxone, ceftazidime) et sensibles à la céfoxitine et à l'imipénème (figure 5).

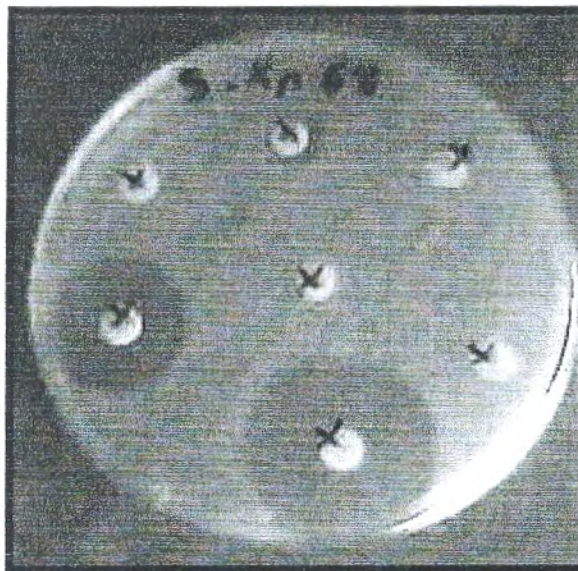


Figure 5. Phénotype de résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux β -lactamines

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés pour les souches de *K. pneumoniae* par le 13^{ème} rapport d'évaluation de la surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques publié par le ministère de la santé de la population et de la réforme hospitalière d'Algérie (2011).

K. pneumoniae joue un rôle important dans l'apparition et/ou la dissémination des résistances en particulier vis-à-vis des β -lactamines. C'est une espèce qui dispose d'un arsenal enzymatique extrêmement vaste et divers pour contrecarrer l'action des β -lactamines.

Cette espèce possède des mécanismes de résistances naturelles aux amino-pénicillines et aux carboxy-pénicillines, correspondant principalement à la production des pénicillinases, et qui a été révélée par la totalité de nos souches dans la résistance à l'ampicilline et la ticarcilline.

La totalité des souches étaient sensibles à l'imipénème, indiquant sa place en premier choix dans le traitement des infections sévères aux bactéries multi-résistantes

3. Détection de la capsule.

La majorité des souches de *K. pneumoniae* produit une capsule de nature polysaccharidique, elle donne aux colonies sur gélose une apparence plus ou moins muqueuse caractéristique, ce qui est observé chez la totalité de nos souches sur milieu Mac Conkey. Elle est non colorable par la méthode classique, il faut utiliser la coloration à l'encre de chine pour la mise en évidence.

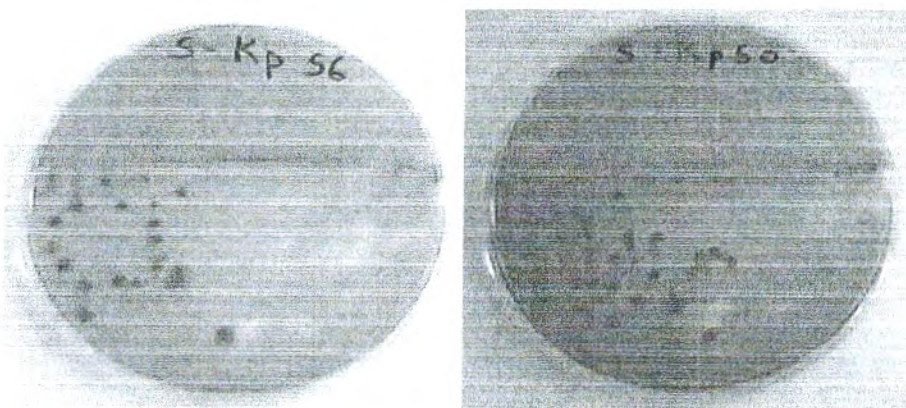


Figure 6: Phénotype muqueux de souches de *Klebsiella pneumoniae*

Les résultats des tests à l'encre de chine sous microscope confirment l'observation précédente par la présence d'un halo clair au tour des corps bactérien dans la totalité de nos souches.

Klebsiella pneumoniae est un pathogène opportuniste découvert depuis plus d'une centaine d'années. Aujourd'hui elle est le chef de file des germes responsable d'infections nosocomiales sévères et difficile à traiter, des épidémies sont causées par des souches résistantes à une large variété d'antibiotiques principalement les β -lactamines, et par leur pouvoir virulent grâce aux différents facteurs telle la capsule.

D'après les résultats de ce travail, les souches de *Klebsiella pneumoniae* étaient toutes résistantes à l'ampicilline, à la ticarcilline, à la ceftazidime et à la ceftriaxone, alors qu'elles étaient toutes sensible à l'imipenème. Cette molécule reste donc la molécule de choix pour le traitement des infections à *K. pneumoniae*.

Toutes les souches possédaient une capsule. Ce composant qui est considéré comme un important facteur de virulence chez *Klebsiella pneumoniae* permettant l'implantation au sein de tractus de l'hôte et de causer des maladies grave.

En revanche, la multi-résistance reste le problème majeur par l'usage abusif des antibiotiques qui exerce une pression sur les micro-organismes, ce qui développent la résistance par plusieurs mécanismes. La prescription de première intension, ou empirique non documentée par les données bactériologiques serait à l'origine de l'émergence préoccupante de souches de *Klebsiella pneumoniae* multi-résistantes. À côté de l'antibiothérapie, les procédures d'hygiène (lavage des mains), nettoyage soigneux des surfaces, et surtout dépistage des patients porteurs, sont d'importants éléments à considérer

1. **Allain P. (2008)**. Bêta-lactamines, pénicillines et céphalosporines. Les médicaments. 3ème édition. P 4-5
2. **Antoniadou A., Kontopidou F., Poulakou G., Koratzanis E., Galani I., Papadomichelakis E., et al. (2007)**. Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster. *J Antimicrob Chemother*; 59:786–90.
3. **Archibald L., Phillips L., Monnet D., et al. (1997)**. Antimicrobial resistance in isolates from in patients and outpatients in the United States. Increasing importance of the intensive care unit. *Clinic Infect Dis*; 24: 211-215.
4. **Bachman MA., Miller VL., Weiser JN. (2009)**. Mucosal lipocalin 2 has pro-inflammatory and iron-sequestering effects in response to bacterial enterobactin. *PLoS Pathog*; 5: e1000622.
5. **Baerwolf S., Geffers C., Behnke M. (2002)**. Correlation between transmissions and the nosocomial infection rate in five different intensive care units in German university hospital. SHEA. 216-217.
6. **Balestrino D. (2006)**. Formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae* : Facteurs impliqués et rôle du Quorum-sensing, thèse de doctorat, Ecole Doctorale Des sciences de la vie et de la Santé. P 3-5
7. **Bauernfeind A., Schneider I., Jungwirth R., Sahly H., Ullmann U. (1999)**. A novel type of AmpC β -lactamase, ACC-1, produced by a *Klebsiella pneumoniae* strain causing nosocomial pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother*. 43: 1924-31.
8. **Boye K., Hansen DS. (2003)**. sequencing of 16s rDNA of *Klebsiella*: taxonomic relations within the genus and to other Enterobacteriaceae. *Int J Med Microbiol*; 292: 495- 503.
9. **Brisse S., Grimont F., Grimont PAD. (2006)**. The Genus *Klebsiella*. *Prokaryotes*; 6: 159-196.
10. **Campos MA, Vargas MA, et al. (2004)**. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immune*; 72(12): 7107-7114.
11. **Carrër A., Nordmann P. (2011)**. CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae*: A change in the epidemiology of ESBL Pathologie Biologie. *ELSEVIER Masson France*; 59 e133–e135.
12. **CA SFM (2013)**. Communiqué du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. <http://www.sfm.asso.fr/>.

13. Cavallo JD., Fabre R., Jehl F., Rapp C., Garrabé E. (2004). Bêtalactamines. *EMC-Maladies infectieuses*. 1 : 129-202.
14. Collignon A. (2002). Nutrition, Croissance bactérienne. Cours de bactériologie. P 2, 3, 8.
15. Courvalin P., Leclercq R. et Bingen E. (2006). Antibiogramme. Paris. ESKA : 2^{ème} édition, P141-162
16. Derakhshan S., Sattari M., Bigdeli M. (2008). Effect of subinhibitory concentrations of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seed essential oil and alcoholic extract on the morphology, capsule expression and urease activity of *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Antimicrobial Agents*; 32: 432–436
17. Doménech-Sánchez A., Martínez-Martínez L., Hernández-Allés S., Conejo M., Pascual A., Tomás JM., Albertí S and Benedí VJ. (2003). Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 Porin in Antimicrobial Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 47(10): 3332–3335.
18. Darfeuille-Michaud A., Jallat C., Aubel D., Sirot D., Rich C., Sirot J., et Joly B. (1992). R plasmid-encoded adhesive factor in *Klebsiella pneumoniae* strains responsible for human nosocomial infections. *Infect Immun*. 60:44-55.
19. Di Martino P., Cafferini N., Joly B., Darfeuille-Michaud A. (2003). *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. *Res. Microbiol*. 154:9-16.
20. Echeverri Toro L., Catano Correa JC. (2010). *Klebsiella pneumoniae* as a nosocomial pathogen: epidemiology and drug resistance. *Iatreia*; 23(3): 240-249.
21. Eggimann P., Pittet D. (2001). Infection control in the ICU. *Chest*; 120(6): 2059-2093
22. Euzéby JP. (2004). List of prokaryotic names with standing in nomenclature-Genus *Klebsiella*. *Evol Microbiol*; 54: 2131-2136.
23. Evans HL., Sawyer RG. (2009). Preventing bacterial resistance in surgical patients. *Surg Clin N Am*; 89:501–19.
24. Fang CT., Chuang YP., Shun CT., Chang SC and Wang JT. (2004). A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. *J Exp Med* 199, 697–705.
25. Favre-Bonte S., Joly B., Forestier C. (1999). Consequences of reduction of *Klebsiella pneumoniae* capsule expression on interactions of this bacterium with epithelial cells. *Infect Immun*. 67:554–561.

26. **Gautier V. (2007).** Caractérisation et expression des gènes codant pour les β -lactamases chromosomiques au sein des entérobactéries de l'environnement. Thèse de doctorat. P 1- 2
27. **Girlich D., Karim A., Poirel L., Cavin MH., Verny C., Nordmann P. (2000).** Molecular epidemiology of an outbreak due to IRT-2-lactamase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* in a geriatric department. *J. Antimicrob Chemother.* 45:467–73.
28. **Hanberger H., Garcia-Rodriguez JA., Gobernado M., et al. (1999).** Antibiotic susceptibility among aerobic gram-negative bacilli in intensive care units in 5 European countries. French and Portuguese ICU Study Groups. *JAMA*; 281(1):67-71.
29. **Hansen DS., Mestre F., Alberti S., Hernandez-Alles S., Alvarez D., Domenech-Sanchez A., Gil J., Merino S., Tomas JM and Benedi VJ. (1999).** *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide O typing: Revision of prototype strains and O-group distribution among clinical isolates from different sources and countries. *J Clin Microbiol*; 37: 56-62.
30. **Hsieh PF., Lin TL., Lee CZ., Tsai SF., Wang JT. (2008).** Serum-Induced Iron-Acquisition Systems and TonB Contribute to Virulence in *Klebsiella pneumoniae* Causing Primary Pyogenic Liver Abscess. *J Infect Dis*; 197: 1717–1727.
31. **Hsieh PF., Lin TL., Yang FL., Wu MC., Pan YJ., et al. (2012).** Lipopolysaccharide O1 Antigen Contributes to the Virulence in *Klebsiella pneumoniae* Causing Pyogenic Liver Abscess. *PLoS ONE*; 7(3): e33155.
32. **Huang YJ., Wu CC., Chen MC., et al. (2006).** Characterization of the type 3 fimbriae with different MrkD adhesions: Possible role of the MrkD containing an RGD motif. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 350: 537–542.
33. **Jonas D., Spitzmüller B., Daschner FD., Verhoef J., Brisse S. (2004).** Discrimination of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* phylogenetic groups and other *Klebsiella* species by use of amplified fragment length polymorphism. *J Reseach in Microbiology*; 155: 17-23.
34. **Kariuki S., Corkill JE., Revathi G., Musoke R., Hart A., Keynan Y., Rubinstein E. (2007).** The changing face of *Klebsiella pneumoniae* infection in the community. *International journal of antimicrobial. Agents*; 6: 2474-2479.
35. **Kim YK., Pai H., Lee HJ., Park SE., Choi EH., Kim J., et al. (2002).** Bloodstream infections by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome. *Antimicrob Agents Chemother*; 46: 1481–91.

36. **Kim B., Karen A., Struve CS., et al. (2010).** Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC Microbiology*; 10: 179-181.
37. **Ko WC., Paterson DL., Sagnimeni AJ., et al. (2002).** Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. *Emerg Infect Dis*; 8: 160–166.
38. **Koczura R., Kaznowski A. (2003).** Occurrence of the *Yersinia* high-pathogenicity island and iron uptake systems in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial Pathogenesis*; 35: 197–202.
39. **Lai YC., Yang SL., Peng HL and Chang HY. (2000).** Identification of genes present specifically in a virulent strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun*; 68(12): 7149–7151.
40. **May T., Okabe S. (2011).** Enterobactin is required for biofilm development in reduced-genome *Escherichia coli*. *Environ Microbiol*; 13:3149–62.
41. **Méric De Bellefon L., Legrand JC., Codden T., Carlier E., Vanhaeverbeek M. (2007).** Septicémie et méningite à *Klebsiella pneumoniae* au départ d'un abcès hépatique chez un patient diabétique. *Rev Med Brux*; 28: 460-3.
42. **Moland ES., Hanson ND., Herrera VL., Black JA., Lockhart TJ., Hossain A., et al. (2003).** Plasmid mediated, carbapenem hydrolysing β -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Antimicrobiol chemotherapy*; 51: 711-714.
43. **Muller A, Patry I, Talon D, et al. (2006).** Mise en place d'un outil informatisé de surveillance de la résistance bactérienne et de la consommation antibiotique dans un centre hospitalier universitaire. *Pathologie biologie* ; 54 : 112-117.
44. **Nikaido H. (2000).** "Crossing the envelope: How cephalosporin search their targets" *Clin Microbiol Infect*; 6: 22-26.
45. **Nordmann P., Cuzon G., Naas T. (2009).** The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*; 9: 28–36.
46. **Pai H., Kim MR., Seo MR., Choi TY., Oh SH. (2006).** A nosocomial outbreak of *Escherichia coli* producing CTX-M-15 and OXA-30 β -lactamase. *Infect Control Hosp Epidemiol*; 27: 312–4.
47. **Papanicolau GA., Medeiros AA., Jacoby GA. (1990).** Novel plasmid-mediated β -lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and α -methoxy- β -lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*; 34: 2200–9.

48. **Piddock LJ. (2006).** « Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria ». *Clin Microbiol Rev*; 19(2): 382-402.
49. **Pieboji JG., Miriagou V., Vourli S., Tzelepi E., Ngassam P., Tzouveleki LS. (2005).** Emergence of CTX-M-15-producing enterobacteria in Cameroon and characterization of a blaCTX-M-15-carrying element. *Antimicrob Agents Chemother*; 49: 441–3.
50. **Poirel L., Kampfer P., Nordmann P. (2002).** Chromosome-encoded Ambler A β -lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*; 46: 4038-40.
51. **Poirel L., Benouda A., Hays C., Nordmann P. (2011).** Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Morocco. *J Antimicrob Chemother*; 66: 2781–2783.
52. **Psichogiou M., Tassios PT., Avlami A., Stefanou I., Cosmides C., Platsouka E., et al. (2008).** Ongoing epidemic of blaVIM-1-positive *Klebsiella pneumoniae* in Athens, Greece: a prospective survey. *J Antimicrob Chemother*; 61: 59–63.
53. **Podschun R., Ullmann U. (1998).** *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clinical Microbiology Reviews*. 11(4): 589–603.
54. **Pourriat JL., Claude M. (2005).** Principe de réanimation chirurgicale. Edition ARNETTE. P298.
55. **Raud P. (2003).** Etude de la diversité génétique des souches de *klebsiella pneumoniae* productrices de β -lactamase à spectre étendu (BLSE), isolées au C.H.U de Nantes, de 1990 à 2001. Université de Nantes. P 31-32.
56. **Robin F., Aggoune-Khinache N., Delmas J., et al. (2010).** Novel VIM metallo- β -lactamase variant from clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Algeria. *Antimicrob Agents Chemother*; 54: 466–470.
57. **Rodriguez HV., Struelens MJ. (2006).** Résistance bactérienne par β -lactamases à spectre étendu: Implications pour le réanimateur. *Rev Réanimation* 15(3): 205-213.
58. **Rodriguez-Martinez JM., Nordmann P., Fortineau N et al. (2010).** VIM-19, a metallo- β -lactamase with increased carbapenemase activity from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*; 54: 471–6.
59. **Seck R. (2005).** Résistance des souches d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae* isolées d'infections urinaires. Thèse de doctorat p 12-13.
60. **Schembri MA., Blom J., Krogfelt KA., Klemm P. (2005).** Capsule and fimbria interaction in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun*; 73: 4626–4633.

61. Schelenz S., Bramham K., Goldsmith D. (2007). Arthrite à *Klebsiella pneumoniae* producteur de β -lactamase à spectre élargi : à propos de deux observations. *Revue du Rhumatisme*; 74: 491–495.
62. Shon AS., Bajwa RPS., Russo TA. (2012). Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: A new and dangerous breed. *Virulence*; 4(2): 107–118.
63. Siu LK., Koh YL., Fung CP., et al. (2007). Capsular serotype K1 or K2 rather than magA and rmpA, is a major virulence determinant for *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Singapore and Taiwan. *J Clin Microbiol*;45: 466–71.
64. Strieter RM., Lynch JP., 3rd., Basha MA., Standiford TJ., Kasahara K and Kunkel SL. (1990). Host responses in mediating sepsis and adult respiratory distress syndrome. *Serin Respir Infect*; 5: 233–247.
65. Struve C., Krogfelt KA. (2003). Role of capsule in *Klebsiella pneumoniae* virulence: lack of correlation between in vitro and in vivo studies. *FEMS Microbiol Lett*; 218: 149–154.
66. Uzun O., Hascelik G., Livermore DM. (2008). Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. *Int J Antimicrob Agents* ; 31 : 523-6.
67. Wieczorek P., Sacha P., Hauschild T., Zórawski M., Krawczyk M., Tryniszewska E. (2008). Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* –the role of Ade ABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. *Folia. Histochem Cytobiol*; 46 (3): 257-267.
68. Wiskur BJ., Hunt JJ., Callegan MC. (2008). Hypermucoviscosity as a virulence factor in experimental *Klebsiella pneumoniae* endophthalmitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 49: 4931–4938.
69. Yang D., Guo Y., Zhang Z. (2009). Combined porin loss and extended spectrum- β -lactamase production is associated with an increasing imipenem minimal inhibitory concentration in clinical *Klebsiella pneumoniae* strains. *Curr Microbiol*; 58: 366–70.
70. Yeh KM., Chang FY., Fung CP., et al. (2006). Serotype K1 capsule, rather than magA, is really the virulence factor in *Klebsiella pneumoniae* strains that cause primary pyogenic liver abscess. *J Infect Dis*; 194: 403e4.
71. Yigit H., Queenan AM., Anderson GJ., Domenech-Sanchez A., Biddle JW., Steward CD., et al (2001). Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-1 from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 45: 1151–1161.

72. **Yong D., Toleman MA., Giske CG., et al. (2009).** Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla*NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* ; 53: 5046–54.
73. **Yu WL., Ko WC., Cheng KC., et al. (2005).** Association between *rmpA* and *magA* Genes and Clinical Syndromes Caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Clinical Infectious Diseases*; 42:1 351–8.
74. **Yu VL., Hansen DS., Ko WC., Sagnimeni A., Klugman KP., Gottberg V., et al. (2007).** Virulence characteristics of *Klebsiella* and clinical manifestations of *K. pneumoniae* bloodstream infections. *Emerg Infect Dis*; 13: 986–93.
75. **Zahar JR., Grall I., Kouatchet AT. (2010).** Carbapénèmes: nouvelles molécules, différentes indications. *La lettre de l'infectiologue* ; 25(4) 142-146.
76. **Zhanel GG., Johanson C., Embil JM., Noreddin A., Daryl J. (2005).** Ertapenem: review of a new carbapenem. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*; 3(1): 23-39.

Annexe 1. Tableau de lecture des résultats de la galerie API 20E

Tests	Substrats	Réactions/enzymes	Résultats	
			Négatif	Positif
ONPG	2-nitrophényl- β -galactoside	B-galactosidase	Incolore	Jaune
<u>ADH</u>	L-arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge
<u>LDC</u>	L-lysine	Lysine	Jaune	Rouge-orangé
<u>ODC</u>	L-ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge-orangé
CIT	Trisodium citrate	Utilisation citrate	Vert pale	Bleu-vert
<u>H2S</u>	Sodium thiosulfate	Production de H2S	Incolore-grisâtre	Dépôt noir
<u>URE</u>	Urée	Uréase	Jaune	Rouge-orangé
TDA	L-tryptophane	Tryptophane désaminase	Jaune	Marron-rougeâtre
IND	L-tryptophane	Production d'indol	Incolore-vert pale-jaune	Rose
VP	Sodium pyruvate	Production d'acétoïne	Incolore-rose pale	Rose-rouge
GEL	Gélatine (origine bovine)	Gélatinase	Non diffusion	Noir
GLU	D-glucose	Fermentation-oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune/jaune-gris
MAN	D-mannitol	Fermentation-oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation-oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SOR	D-sorbitol	Fermentation-oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
RHA	L-rhamnose	Fermentation-oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SAC	D-saccharose	Fermentation-oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MEL	D-mélobiose	Fermentation-oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
AMY	Amygladine	Fermentation-oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
ARA	L-arabinose	Fermentation-oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune

Annexe2 : tableau d'identification du catalogue analytique API 20 E

% pozytywnych reakcji po 18-24 i 48 godzinach w 38°C ± 2°C

API 20 E	V4.1	ODS	AD1	LDC	ODC	DT	HIS	UFE	DA	PG	VP	CEL	GU	MAN	IND	SVR	RVA	SM	MEI	AMP	ASA	OX	NO2	NE	MOB	MC	CF60	CFSE
Strainella agalactiae	100	0	0	85	25	0	0	0	0	0	0	100	100	0	1	91	0	91	0	91	100	0	100	0	100	100	100	
Coliforma aerobae	99	99	0	99	75	0	0	0	0	0	69	0	100	100	0	0	0	100	0	100	100	0	87	100	100	100		
Coliforma aerobae 2	98	99	0	0	75	0	0	0	0	0	90	0	100	99	0	0	0	0	0	100	100	0	87	100	100	100		
Coliforma aërobia	97	95	0	99	75	81	1	0	4	0	0	100	100	1	100	100	1	91	99	99	0	100	0	85	100	100		
Coliforma aërobia 2	90	24	0	0	75	75	1	0	1	0	0	0	100	99	25	99	99	95	82	40	99	0	95	100	100	100		
Coliforma aërobia 3	99	75	0	100	97	0	1	0	99	0	0	100	100	25	99	99	1	1	98	99	0	100	0	85	100	100		
Shigella boydii	98	2	0	100	25	0	1	0	99	0	0	100	100	1	99	99	96	85	85	99	0	100	0	85	100	100		
Shigella flexneri	100	60	0	1	80	80	0	1	0	1	0	100	100	0	85	100	1	100	0	25	100	0	95	100	100	100		
Shigella flexneri 2	0	0	100	99	97	94	0	0	99	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	200	0	100	100	100		
Shigella flexneri 3	0	0	100	99	1	75	0	0	99	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	94	100	100		
Shigella flexneri 4	99	0	99	68	92	0	1	0	0	85	0	99	99	99	99	99	94	99	94	99	99	0	100	0	97	100	100	
Shigella flexneri 5	99	25	0	99	80	0	0	0	0	75	0	100	100	0	99	100	1	99	99	99	0	100	0	92	100	100		
Shigella flexneri 6	100	25	0	99	30	0	0	0	0	10	0	100	99	25	100	0	99	0	99	99	99	0	100	0	100	100	100	
Shigella flexneri 7	100	75	0	99	99	0	0	0	0	89	0	100	100	0	1	100	1	100	100	100	0	100	0	95	100	100		
Shigella flexneri 8	99	82	1	92	90	0	1	0	0	85	0	99	99	12	98	95	98	90	99	99	0	100	0	85	100	100		
Shigella flexneri 9	99	0	92	100	75	0	99	0	0	90	0	100	99	23	1	100	99	100	99	100	0	100	0	80	100	100		
Shigella flexneri 10	100	99	0	91	94	0	1	0	25	94	10	100	100	15	9	99	99	99	99	99	0	100	0	82	100	100		
Shigella flexneri 11	99	1	74	10	0	1	3	0	68	0	0	99	99	1	91	92	94	75	3	99	0	100	0	86	100	100		
Shigella flexneri 12	27	1	75	20	0	1	1	0	51	0	0	99	90	1	97	91	3	3	1	97	0	100	0	85	100	100		
Shigella flexneri 13	98	1	99	100	1	0	0	1	0	94	0	100	100	1	0	97	0	97	0	99	99	0	100	0	93	100	100	
Shigella flexneri 14	100	0	1	100	1	0	0	0	0	94	0	100	100	0	0	99	25	0	99	99	0	100	0	99	100	100		
Shigella flexneri 15	100	30	50	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	1	95	7	95	95	99	0	100	0	100	100	100		
Shigella flexneri 16	98	0	0	75	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	1	0	1	0	1	0	100	0	100	100	100		
Shigella flexneri 17	78	0	90	99	0	0	10	0	0	95	1	99	99	0	0	1	91	0	0	25	99	0	100	0	100	100		
Shigella flexneri 18	53	0	39	98	1	0	1	0	1	0	0	99	99	0	1	99	0	1	0	0	0	100	0	85	100	100		
Shigella flexneri 19	99	0	80	0	99	0	78	0	99	100	0	100	100	99	100	99	99	100	100	100	0	100	0	100	100	100		
Shigella flexneri 20	94	18	25	1	18	0	1	0	0	1	0	99	99	97	95	20	80	97	85	0	99	0	82	0	100	100	100	
Shigella flexneri 21	94	0	73	0	66	0	0	0	0	0	0	100	99	99	98	93	99	99	99	99	0	100	0	100	100	100		
Shigella flexneri 22	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	100	90	90	75	75	1	99	10	0	100	0	100	100	100		
Shigella flexneri 23	95	0	25	94	60	0	0	0	0	80	0	100	99	0	25	93	63	99	99	99	0	55	0	94	100	100		
Shigella flexneri 24	99	0	0	0	0	0	0	0	0	98	0	100	99	0	2	100	99	99	99	100	0	100	0	100	100	100		
Shigella flexneri 25	97	0	0	0	0	0	0	0	15	1	0	100	1	0	0	100	99	0	0	0	0	100	0	100	100	100		
Shigella flexneri 26	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	95	100	100		
Shigella flexneri 27	85	1	0	10	18	1	1	99	93	99	0	1	100	99	1	73	1	98	25	99	97	88	0	95	100	100		
Shigella flexneri 28	99	1	0	0	99	0	1	0	0	1	9	1	100	99	36	62	90	96	81	99	99	0	85	0	95	100	100	
Shigella flexneri 29	99	1	0	0	99	0	1	0	57	52	4	100	99	34	1	97	94	23	99	97	0	85	0	85	100	100		
Shigella flexneri 30	88	1	0	0	21	0	1	0	1	98	15	100	99	34	1	99	100	97	99	99	0	85	0	85	100	100		
Shigella flexneri 31	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	100	10	92	99	72	89	99	99	0	85	0	85	100	100		
Shigella flexneri 32	1	0	0	89	0	75	99	98	1	1	82	98	0	0	0	0	1	0	0	0	0	99	0	95	100	100		
Shigella flexneri 33	1	0	0	0	1	20	100	99	0	0	97	99	0	0	0	0	100	0	0	0	0	99	0	95	100	100		
Shigella flexneri 34	1	0	0	0	12	23	59	92	0	100	99	1	1	0	1	0	1	63	0	66	1	100	0	94	100	100		
Shigella flexneri 35	1	1	0	0	0	40	0	0	0	100	99	0	0	94	1	0	0	0	0	0	0	100	0	96	100	100		
Shigella flexneri 36	1	0	0	0	74	0	59	99	90	0	0	98	92	79	1	20	25	0	43	1	0	100	0	84	100	100		
Shigella flexneri 37	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	98	3	80	0	0	15	0	0	0	0	100	0	85	100	100		
Shigella flexneri 38	100	0	0	0	0	0	0	1	0	99	0	100	100	0	99	99	100	97	100	99	0	100	0	6	100	100		
Shigella flexneri 39	100	0	59	95	99	0	85	0	100	55	0	100	100	69	100	100	100	100	100	100	0	100	0	100	100	100		
Shigella flexneri 40	100	0	96	6	0	0	0	0	0	75	0	99	99	99	99	99	100	100	100	100	0	100	0	100	100	100		
Shigella flexneri 41	99	75	97	98	75	99	0	0	1	0	0	100	99	0	69	96	1	78	0	99	0	100	0	99	100	100		
Shigella flexneri 42	0	15	99	99	6	64	0	0	0	0	0	100	99	0	63	99	0	20	0	0	0	100	0	85	100	100		
Shigella flexneri 43	0	1	100	1	0	25	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	100	100		

Annexe 3 : tableau des valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour les entérobactéries (CA-SFM, 2013).

Antibiotiques	sigle	Charge de disque	Concentrations critiques en (mg/l)		Diamètres critiques (mm)	
			S	R	S	R
Ampicilline	AMP	10 µg	≤ 4	> 8	≥19	<16
Ticarcilline	TIC	75 µg	≤8	> 16	≥24	<22
Imipenème	IMP	10 µg	≤2	> 8	≥24	<17
Céfalotine	CF	30 µg	≤8	> 32	≥18	<12
Céfoxitine	FOX	30 µg	≤8	>32	≥22	<15
Céftazidime	CAZ	30 µg	≤1	>4	≥26	<21
Céftriaxone	CRO	30 µg	≤1	>2	≥26	<23

Résumé

Klebsiella pneumoniae représente une des principales germes pathogène qui rentre souvent dans le contexte de maladies graves et des infection nosocomiales, dont notre travail s'inscrit dans le cadre de recherche de profils de virulence et de résistance aux β -lactamine de 10 souches de *Klebsiella pneumoniae* pré-identifiées isolées à partir des sondes urinaires portées par le laboratoire du « LapSab». Elles ont été identifiées présomptivement selon leur caractères biochimiques par la méthode standardisée « galerie API 20 E », leur sensibilité ou leur résistance aux β -lactamines par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé, et leur pouvoir virulent, en détectant la présence de la capsule grâce à la coloration à l'encre de chine. Les résultats obtenus révèlent un taux de résistance élevé à l'ampicilline et à la ticarcilline à 100% et aussi aux C3G, par contre elle présente une sensibilité à l'imipenème. La détection de la capsule révèle sa présence dans la totalité des souches sous forme d'un halo clair sous microscope.

Mots clés: *Klebsiella pneumoniae*, virulence, capsule, résistance, β -lactamines

Abstract

Klebsiella pneumoniae represents one of the major pathogenic germs which returned often in the context of serious diseases and nosocomial infection, which our work will be within the framework of research profiles of virulence and resistance to β -lactams of 10 strains of *Klebsiella pneumoniae* pre-identified isolated from probes urinary brought by the laboratory of the " LapSab". They have been identified reliance on depending on their biochemical characters by the standardized method " gallery API 20 E", Their sensitivity or their resistance to beta-lactams by the method of dissemination of disks on agar medium, and their power virulent, in detecting the presence of the capsule through the coloring with china ink. The results indicate a rate of high resistance to ampicillin and ticarcilline to 100% and also to C3G, but it presents a sensitivity to the imipeneme. The detection of the capsule reveals his presence in the whole of the strains in the form of a halo clear under the microscope.

Key world : *Klebsiella pneumoniae*, virulence, capsule, resistance, β -lactams

المخلص

كليبسيلا الرئوية تعتبر واحدة من أهم الجراثيم المضررة و التي تتسبب أحيانا في أمراض خطيرة عدوى المستشفيات ومن هذا فان عملنا يندرج في البحث عن مظاهر الضراوة و المقاومة ضد المضادات الحيوية بيطالكتمين ل10 عينات من كليبسيلا الرئوية المعزولة من جهاز سير البول. وقد تم إعادة تحديد خصائصها الكيميائية و اختبار الحساسية و المقاومة ضد البيطالكتمين. إضافة إلى الكشف عن الكبسولات البوليبيديكاغدية. النتائج أظهرت مقاومة عالية لبينيسيلين وسيفالوسبوغين 1 و3 و حساسية لامبيبينام و سيفوكزيتين. الكشف عن وجود كبسولة تحت المجهر عن طريق تلطيخ بالحبر كشف عن وجودها عند غالبية العينات.

الكلمات المفتاحية: كليبسيلا الرئوية, الضراوة, كبسولة, المقاومة, بيطالكتمين