



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université de Blida 1



Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de biologie et physiologie cellulaire

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLOME DE MASTER
OPTION : MICROBIOLOGIE/ BACTERIOLOGIE**

THEME

**CARACTERISATION ET ANTIBIORESISTANCE DE SOUCHES
DE *KLEBSIELLA* PRODUCTRICE DE BETA LACTAMASE ET
EVALUATION DE LEUR SENSIBILITE VIS A VIS D'UN EXTRAIT
AQUEUX DE *PUNICA GRANATUM*.**

Présenté par :

Mr : KIBERU Paul

M^{elle} : MUSAKWA Rumbidzai

Devant le Jury :

Dr. KHALDOUN Hassina	Maitre de conférences à l'université de Blida	Président
Dr BOUDJEMA Nouara	Maitre de conférences à l'université de Blida	Examineur
Dr DEBIB Aicha	Maitre de conférences à l'université de Blida	Promotrice
M ^{me} NAKKAB Selma	Doctorante à l'université de Blida	Co-promotrice

Année Universitaire 2015-2016

ACKNOWLEDGEMENT



We owe this unique opportunity to express our deep sense of gratitude to our supervisor Dr. A. Debib and assistant supervisor Dr S. Nakkab Department of Cellular Biology and Physiology for their guidance, prudent suggestions and persistent endeavor throughout the course.

We also gratefully acknowledge Mr. Jamal, Laboratory de Hygiene de Wilaya for his wholehearted help and cooperation.

We thank Mrs. Khaldoun H. for accepting to be our president and Dr. Boudjema N. for accepting to be our examiner.

We express our adoration and heartfelt devotion to our family and friends for their countless blessings, unmatched love and inspiration that has given us strength to keep holding on towards our objective goal.

Last but not least our very special appreciation goes to the ALMIGHTY who has been our source of strength, wisdom, inspiration and achievements



DEDICATION



Dedicated to our families and friends for their endless love and support.

Table de matieres

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Résumé	
Introduction générale.....	1
Chapitre I : synthèse bibliographique	
<i>1. Klebsiella.....</i>	3
1.1.Classification et morphologie.....	3
1.2.Manifestation clinique ..	5
1.3.Physiopathologie.....	6
1.4.Pathogénicité et facteurs de virulence ..	7
2. Les bêta-lactamines	9
2.1. Structure ..	9
2.2. Le Mécanisme d'action des bêta-lactamines.....	10
2.3. Les Mécanismes de la résistance aux bêta-lactamines.....	11
2.4. Classification des bêta-lactamases.....	12
2.5. Les Bêta-lactamase cliniquement important.....	14
2.5.1. Les bêta-lactamase de classe A.....	14
2.5.2. Les familles de BLSE.....	14
2.5.3. Les carbapenemases de classe A.....	14
2.5.4. Les Amp C (les bêta-lactamase de classe C).....	15
2.5.5. Les OXA bêta-lactamases de classe D.....	15
2.6. Le mécanisme d'action de bêta-lactamases.....	15
2.7. Les facteurs de risque d'infection due au <i>Klebsiella</i> productrice de bêta-lactamase.....	16
<i>3. Punica granatum</i>	16
3.2. Généralités.....	16
3.3. La description de <i>Punica granatum</i>	17
3.4. La chimie des composants phénoliques de <i>Punica granatum</i>	19
3.5. Les propriétés fonctionnelles de <i>Punica granatum</i>	19
3.6. Préparation des extraits phénoliques.....	20

Chapitre II : Matériel et méthodes	
1. Prélèvement.....	21
2. Coloration de Gram.....	22
3. L'isolement et la purification.....	23
4. Identification de souches	24
5. Sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme).....	25
6. Les tests de détection de BLSE.....	26
6.1.Le test de synergie.....	26
6.2.Le test de double disque.....	27
7. Matériel végétal	28
Chapitre III : Résultats et discussion	
1. Isolement et identification des souches de <i>Klebsiella</i>	29
1.1. Répartition des souches par espèces.....	30
1.2. Répartition des souches selon la nature de prélèvement.....	31
1.3. Répartition des souches par sexe.....	31
1.4. Répartition des souches par âge.....	31
1.5.La répartition des KBLSE selon les patients.....	32
1.5.La répartition des KBLSE selon les services.....	32
2.Profil de sensibilité globale de <i>Klebsiella spp.</i> aux antibiotiques.....	33
3.Fréquence des souches de <i>Klebsiella</i> productrices de Beta-lactamase à spectre entendu	34
4.La sensibilité aux antibiotiques de souche <i>Klebsiella spp.</i> productrices de BLSE.....	34
1. Les activités antibactériennes des extraits aqueux de <i>Punica granatum</i>	36
Discussion générale	37
Conclusion	46
Références bibliographiques.....	48
Annexes.....	I-XI

Liste des figures

Figure	Title	Page
1	La micrographie électronique à balayage (MEB) montre certaines des caractéristiques morphologiques des <i>Klebsiella pneumoniae</i>	3
2	Les images coloscopie chez deux patients avec des antibiotiques associés colite hémorragique due à <i>K. oxytoca</i>	6
3	Représentation schématique des facteurs de pathogénicité de <i>Klebsiella</i>	7
4	La structure de Pénicilline noyau. Anneau bêta-lactamines est carrée au centre	10
5	Céphalosporines antibiotiques montre l'acide 7-aminocéphalosporinique	10
6	Structure générale des carbapénèmes	10
7	Présentation schématique du mode d'action des antibiotiques β -lactames	11
8	Les mécanismes de résistance aux antibiotiques	12
9	Une représentation schématique de l'inactivation d'un bêta-lactamine par une bêta-lactamase	15
10	Caractéristiques botaniques du grenadier	18
11	Isolement des Souches par la méthode des quadrants	23
12	Disposition des disques d'antibiotique pour le test de synergie	26
13	La représentation de la variété de grenade utilisée dans le cadre de notre étude	27
14	L'écorce séchée de <i>P.granatum</i>	27
15	Aspect macroscopique de <i>Klebseilla spp.</i> sur milieu Hektoen et GN.	29
16	Galerie API20 E identifiant <i>K. pneumoniae</i> (A), <i>K. ornithinolytica</i> (B) et <i>K. oxytoca</i> (C)	30
17	La répartition des souches selon la nature de prélèvement	31
18	La répartition des souches par sexe	31
19	La répartition des souches par âge	32
20	Le Profil de sensibilité globale de <i>Klebsiella spp.</i> aux antibiotiques	33
21	L'apparition de bouchon en champagne	34
22	La sensibilité aux β -lactamines de souches <i>Klebsiella spp.</i> productrices	35

	de BLSE	
23	Comparaison de nos résultats de l'aromatogramme (A) avec les résultats trouvés par Debib et al., 2014b	36

Liste des tableaux

Tableau	Titre	page
1	Les réactions biochimiques des espèces <i>Klebsiella</i>	4
2	Les systèmes de classification des bêta-lactamases modifiés de Bush et Jacoby	13
3	Les fréquences des échantillons.	29
4	La répartition de souches de <i>Klebsiella</i> par espèces	30
5	La répartition des KBLSE selon les patients	32
6	La répartition des KBLSE selon les services	32
7	Le taux de résistance aux C3G dans des pays	41
8	Le taux de souches des <i>Klebsiella</i> spp. résistantes à l'imipénème de différents pays.	42
9	Matériel pour analyse microbiologique	Annexe I
10	Les compositions des milieux de culture	
11	La répartition de prélèvement selon le sexe et le service d'hospitalisation	Annexe II
12	La répartition de prélèvement selon l'origine	
13	Le profil 5215773 pour <i>Klebsiella pneumoniae</i>	
14	Le profil 5205773 pour <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Annexe III
15	Le profil 5205773 pour <i>Klebsiella pneumoniae</i>	
16	le profil 5255773 pour <i>Klebsiella oxytoca</i>	
17	le profil 5257773 pour <i>Klebsiella oxytoca</i>	
18	le profil 5357773 pour <i>Klebsiella ornithinolytica</i>	
19	le profil 5355773 pour <i>Klebsiella ornithinolytica</i>	
20	Les fréquences des différents espèces/genre isolés	Annexe IV
21	Les fréquences des souches de <i>Klebsiella</i> spp. selon les échantillons	
22	La fréquence des espèces de <i>Klebsiella</i> isolées dans chaque prélèvement	
23	Les Résultats des tests de sensibilité aux bêta-lactamines	
24	Les résultats de sensibilité aux autres antibiotiques testés	
25	La fréquence de sensibilité aux antibiotiques testés	

26	Les résultats du test de double disque	Annexe IV
27	Les valeurs critique des antibiotiques utilisés	Annexe V

Liste des abréviations

6-APA : 6-amino-acide penicillanique

ABC : L'ATP binding cassette

ADH : Arginine déshydrogénase

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AmpC : Chromosomal located céphalosporinase

API20E : Analytical profile index 20E (E= Entérobactéries)

ATB : Antibiotique

BES : Brazil extended spectrum

BLSE : β -lactamase à spectre étendu

C : céphalosporine

C1G : Céphalosporine de première génération

C2G : Céphalosporine de deuxième génération

C3G : Céphalosporine de troisième génération

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CTX-M : Céfotaximase-Munich.

DHPS, la dihydroptéroate-synthétase

GES: Guiana extended spectrum β -lactamase

GN: gelose nutritive

H₂S: hydrogen sulfide

IMP : Imipénème

IVU : les infections des voies urinaires

K. ornithinolytica : *Klebsiella ornithinolytica*

K. oxytoca : *Klebsiella oxytoca*

K. pneumoniae : *Klebsiella pneumoniae*

KBLSE : *Klebsiella* productrice de bêta-lactamase à spectre étendu

KDa: Kilodalton

KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

KPCR : *K. pneumoniae* carbapénèmes résistantes

LCR : Liquide céphalorachidien

LDC : Lysine décarboxylase

LPS : Lipopolysaccharides

MDR : Multi-résistance aux médicaments

ml : millilitre.

mm : millimètre

Na⁺ : sodium ions

NaCl : Sodium chloride

ODC : Ornithine décarboxylase

OXA: oxacillinase

PER: *Pseudomonas* extended resistant

PHN : Pénicillinase de haut niveau

PLP : protéines liant la pénicilline

Qnr : Quinolone Résistance

RND : Resistance Nodulation Division

SHV: Sulfhydryl variable

SMR: Small multi-drug resistance.

SXT : Sulfamides + Triméthoprine

TEM : D'après Temoniera : nom du malade chez qui la première souche a été isolée

USI : Unités de soins intensifs

VEB : Vietnamese extended spectrum β -lactamase

VP : Réaction de Voges-Proskauer

Résumé

Klebsiella est une flore commensale du tube digestif, néanmoins récemment il était responsable de plus de 8% des infections nosocomiales. Son aptitude à produire des enzymes bêta-lactamase qui hydrolyse les antibiotiques bêta-lactam, a provoqué des difficultés à éliminer ses infections. L'introduction de nouveaux moyens thérapeutiques doit être adoptée. Dans notre étude après l'étude macroscopique, coloration de Gram et biochimique, 18 (11.84%) souches de *Klebsiella* ont été identifiées et isolées des prélèvements des selles, des urines et des eaux usées de l'hôpital de Fabor de Blida. L'espèce la plus isolée était *Klebsiella pneumoniae* avec un taux de 77,77% en revanche on a enregistré une faible fréquence (11,11%) pour les deux souches *Klebsiella oxytoca* et *Klebsiella ornithinolytica* avec une prédominance féminine évidente 78.87% vs 21.43% chez le sexe masculin. La fréquence de la prévalence en Algérie de *Klebsiella spp.* varie entre 13 – 21.5%. Après le test de détection de BLSE de 18 souches, seulement 6 souches étaient BLSE+ qui est légèrement inférieure de celle observée en Algérie qui était de 52.47%. Ces dernières ont montré une résistance totale (100%) aux pénicillines, ampicilline, oxacilline et l'amoxicilline. Concernant les aminosides, on a constaté une résistance assez marquée pour la gentamicine, la tobramicine et la kanamicine avec des fréquences de 72.22%, 66.67% et 61.11% respectivement. La résistance croisée était observée entre les pénicillines et les céphalosporines à large spectre, 81.82% des isolats résistants à l'AMC étaient aussi résistants à la ceftazidime et/ou cefotaxime. La résistance à ces deux antibiotiques était un marqueur important de la détection de la production de BLSE (présence de la synergie entre les antibiotiques). Ces souches BLSE montrent un taux de résistance de 38.89% aux C3G. L'imipénem et la céphamycine (Céfoxitine) restent les antibiotiques les plus actifs sur les KBLSE avec un taux de sensibilité de 94.44% et 83.33% respectivement. Une bonne activité était aussi enregistrée pour les fluoroquinolones dont les taux de résistance étaient 5.56% pour l'Ofloxacine et 16.67% pour la Norfloxacine. Le test de la sensibilité des 18 souches de *Klebsiella* obtenu vis-à-vis de l'extrait aqueux de *Punica granatum*, a révélé une résistance totale à cet extrait naturel. Donc ces souches ont montré un développement de la multi-résistance à la plupart des antibiotiques et à l'extrait de *P. granatum*, peuvent être le processus de la conservation de l'extrait a réduit son activité vis-à-vis *Klebsiella*.

Mots clé : *Klebsiella*, BLSE, C3G, *Punica granatum*, multi-résistante

Summary

Klebsiella is a normal flora of the digestive system, however recently it has caused over 8% of hospital acquired infections. Its ability to produce enzymes Beta-lactamase that hydrolysis beta lactam antibiotics, has made it difficult to eradicate its infections. Therefore, the need for new therapeutic alternatives has to be adopted. In our study after macroscopic study, coloration of Gram and biochemical characterization, 18 (11.84%) *Klebsiella* strains were identified and isolated from samples of stool, urine and flushed water from Fabor hospital in Blida. The most isolated species was *Klebsiella pneumoniae* with a rate of 77.77% on the other hand a low frequency was recorded (11.11%) for both strains *Klebsiella oxytoca* and *Klebsiella ornithinolytica* with an evident predominance by female 78.87% vs 21.43 % in males. The frequency of Algeria on the distribution of *Klebsiella spp.* varied between 13 - 21.5%. After the ESBL detection test for 18 strains, only 6 (33.33%) strains were ESBL+ which was slightly lower than that of Algeria which observed 52.47% of KBLSE+. The later showed total resistance (100%) to penicillins, ampicillin, oxacillin and amoxicillin. Concerning the aminoglycosides, there was a fairly strong resistance to gentamicin, tobramycin and kanamycin with frequencies of 72.22%, 66.67% and 61.11% respectively. Cross-resistance was observed between penicillins and cephalosporins broad spectrum, 81.82% of isolates resistant to AMC were also resistant to ceftazidime and / or cefotaxime. The resistance to these antibiotics was a major sign of the detection of ESBL production (presence of synergy between antibiotics). These ESBL strains show a resistance rate of 38.89% to C3G. The imipenem and cephamycins (Cefoxitin) remain the most active antibiotics on KBLSE with a sensitivity rate of 94.44% and 83.33% respectively. A good activity was also recorded for fluoroquinolones of which the resistance rates were 5.56% for Ofloxacin and 16.67% for norfloxacin. The sensitivity test of 18 *Klebsiella* strains obtained vis-à-vis the aqueous extract of *Punica granatum*, revealed a total resistance to this natural extract. Therefore, we can conclude that these strains showed a development of multidrug resistance to most antibiotics and extract of *P. granatum*, and also that to a lesser extent the conserving process of the extract reduced its activity against *Klebsiella*.

Keywords: *Klebsiella*, ESBL, C3G, multi-resistance, *Punica granatum*

ملخص

كليبسيلا هو الفلورا الطبيعية في الجهاز الهضمي، ولكن في الآونة الأخيرة أنها تسبب أكثر من 8% من عدوى المستشفيات المكتسبة. قدرتها على إنتاج الانزيمات بيتا لاكتاماز أن التحلل المضادات الحيوية اكتام بيتا، جعلت من جديدة لأبد من اعتمادها. في دراستنا بعد therapeutic الصعب للقضاء على العدوى به. ولذلك، فإن الحاجة إلى بدائل الدراسة العيانية، تلوين غرام وتوصيف الكيمياء الحيوية، و18 (11.84%) تم تحديد سلالات كليبسيلا ومعزولة عن في البليدة. وكانت الأنواع الأكثر عزلة كليبسيلا Fabor عينات من البراز والبول والمياه مسح من المستشفى بمعدل 77.77% من جهة أخرى سجلت التردد المنخفض (11.11%) لكل من سلالات كليبسيلا pneumoniae مع غلبة واضحة من جانب الإناث 78.87% مقابل 21.43% في الذكور. ornithinolytica اوكسيتوكا وكليبسيلا لمدة 18 ESBL وتيرة الجزائر على توزيع كليبسيلا النيابة. تتوعدت بين 13 حتي 21.5%. بعد اختبار الكشف عن الذي كان أقل بقليل من الجزائر التي لوحظت + ESBL السلالات، لم يكن هناك سوى 6 (33.33%) سلالات وأظهرت في وقت لاحق المقاومة الكلية (100%) لالبنسلين، الأميسيلين، أوكساسيلين + KBLSE 52.47% من وأموكسيسيلين. وفيما يتعلق أمينوجليكوزيدات، كان هناك مقاومة قوية إلى حد ما جنتاميسين، توبراميسين وكاناميسين مع الترددات من 72.22%، 66.67% و 61.11% على التوالي. وقد لوحظ عبر المقاومة بين البنسلين كانت مقاومة للالسيفنازيديم و / أو سيفوتاكسيم AMC والسيفالوسبورين واسعة، 81.82% من العزلات مقاومة لل وجود التآزر بين المضادات (ESBL أيضا. كانت المقاومة لهذه المضادات الحيوية دلالة كبيرة على كشف الإنتاج cephamycins تبقى إيميبينيم و C3G معدل مقاومة من 38.89% إلى ESBL الحيوية). تظهر هذه السلالات مع معدل حساسية 94.44% و 83.33% على KBLSE سيفوكسيتين) المضادات الحيوية الأكثر نشاطا على) التوالي. تم تسجيل نشاط جيد أيضا لالفلوري الذي كانت معدلات مقاومة 5.56% لأوفلوكساسين و 16.67% لالنورفلوكساسين. اختبار الحساسية من 18 سلالات كليبسيلا التي تم الحصول عليها وجها لوجه مع المستخلص المائي من الرمان، كشفت عن وجود المقاومة الكلية لهذا المستخلص الطبيعي. لذلك، يمكننا أن نستنتج أن هذه ، وأيضا أن إلى حد P. السلالات كانت تطور المقاومة للأدوية المتعددة لمعظم المضادات الحيوية ومستخلص الرمان. خفضت نشاطها ضد كليبسيلا extract أقل في عملية المحافظة على بيئتها الطبيعية.

، متعددة المقاومة، الرمان C3G، ESBL كلمات البحث: كليبسيلا،

Introduction générale

Klebsiella spp. est une entérobactérie qui fait partie des espèces commensales, c'est-à-dire des flores normales du sujet sain, (Kariuki *et al.*, 2007). Actuellement, elle est responsable de plus de 8.87% des infections nosocomiales, d'après le rapport de l'European Antibiotics Resistance Surveillance System (EARSS) de 2014 (ECDC, 2015). En Algérie, les infections nosocomiales causés par *Klebsiella* varient entre 13% à 23% (Nedjai *et al.*, 2010 ; Medboua, 2011; Sekhri-Arafa, 2011, Alima *et al.*, 2012 et Lagha, 2015).

Ce germe pathogène opportuniste est isolé d' infections suppuratives, urinaires, respiratoires, biliaires qui peuvent être à l'origine de bactériémie et surtout de septicémie de pronostic sévère, principalement chez les malades immunodéprimés, cancéreux, brûlés, cirrhotiques, diabétiques, chez les vieillards, nourrissons, nouveau-nés et prématurés (Melano *et al.*, 2003; Sahly *et al.*, 2004)

La famille des β -lactamines comprend un grand nombre de molécules, toutes caractérisées par la présence d'un cycle β -lactame indispensable à l'activité antibiotique, associées à un mode d'action fort complexe sur des protéines de la membrane cytoplasmique, dénommées protéines liant la pénicilline (PLP) ou penicillin binding proteins (Cavallo *et al.*, 2004 ; Cattoir, 2008).

L'introduction des céphalosporines de troisième génération (C3G) en pratique clinique au début des années 1980, permettant de lutter contre les infections à germes producteurs de pénicillinases, a été suivie, dès 1983, de la description de la première β -lactamase à spectre élargi (BLSE) chez *Klebsiella pneumoniae* en Allemagne. Plus de 200 BLSE ont maintenant été décrites et leur diffusion à travers le monde pose un véritable problème de santé publique (Grall *et al.*, 2011). Les carbapénèmes, derniers antibiotiques de la classe des β -lactamines, ont un très large spectre antibactérien et possèdent une grande stabilité vis-à-vis de la quasi-totalité des β -lactamases, ces molécules possèdent un large spectre d'activité *in vitro* contre les bactéries. Comme pour toutes les β -lactamines mises sur le marché, des souches résistantes sont rapidement apparues (Grall *et al.*, 2011).

Jusque dans les années 2000, la diffusion des entérobactéries productrices de BLSE concernait essentiellement le milieu hospitalier, de nombreuses épidémies hospitalières en réanimation ou en hospitalisation de longs séjours ayant été décrites

(Arlet *et al.* 1990 ; Lucet *et al.* 1999). Mais aujourd'hui, la diffusion à grande échelle dans le domaine communautaire de ce type de résistance laisse augurer un problème majeur de santé publique (Pitout *et al.* 2005).

Par conséquent, la nécessité d'un moyen rapide pour la découverte et le développement de nouveaux composés antimicrobiens est évidente. En effet la connaissance des herbes a été transmise de génération en génération depuis des milliers d'années (Dixit et Mittal, 2013). Ces plantes sont douées d'un très large éventail d'activités biologiques grâce à leur métabolites secondaires actifs telle que les composés phénoliques, les alcaloïdes, les huiles essentielles, qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique (Zeghad, 2009)

Punica granatum, communément connu sous le nom de grenade, a été mis en évidence dans certaines études comme ayant cette propriété (Sadeghian *et al.*, 2011). Des extraits de toutes les parties du fruit semblent avoir des propriétés thérapeutiques et certaines études rapportent que les écorces, les racines et les feuilles de l'arbre ont un avantage médicamenteux aussi bien (Moneim, 2012).

Dans cette optique notre étude s'est fixé les objectifs suivants :

- ✓ Evaluer la fréquence d'isolement et la résistance aux antibiotiques des souches de *Klebsiella* responsables d'infections chez les patients hospitalisés et consultants externes, en plus des eaux de certaines infections.
- ✓ Caractériser les souches *Klebsiella* productrices de BLSE par des tests de synergie et des doubles disques (test espagnol).
- ✓ Evaluer la sensibilité des souches de *Klebsiella* isolées vis-à-vis l'extrait aqueux de *Punica granatum*.

Chapitre I :
Synthèse bibliographique

1. *Klebsiella*

1.1. La Classification et la morphologie

Klebsiella est une bactérie à Gram négative, bâtonnet, encapsulée, non-sporulée et immobile. Ils sont des anaérobies facultatifs et pousse à 37°C sur les milieux ordinaires par exemple gélose nutritive et Hektoen. Il mesure entre 0.3 -1.0mm de largeur et 0.6 - 6.0mm de longueur. Les colonies sont d'aspect muqueux.



Figure 1: La micrographie électronique à balayage (MEB) montre certaines des caractéristiques morphologiques de *Klebsiella*.

Selon le manuel de Bergey de bactériologie systématique, *Klebsiella* spp. est classé comme suit (Garrity, 2005);

Règne :	Bactéries
Embranchement :	Proteobacteria
Classe :	Gamma Proteobacteria
Ordre :	Enterobacterales
Famille :	Entérobactéries
Genre :	<i>Klebsiella</i>

Trois espèces du genre *Klebsiella* sont associés à des maladies chez les humaines : *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* et *Klebsiella granulomatis*. Organismes précédemment connu sous le nom *Klebsiella ozaenae* et *Klebsiella rhinoscleromatis* sont considérés comme des sous-espèces non ferments de *Klebsiella pneumoniae* qui ont des manifestations cliniques caractéristiques.

Avec ces exceptions, les souches dans ce genre fermentent le lactose, la plupart produisent des colonies très mucoïdes sur des plaques en raison de la production d'une

capsule polysaccharidique luxuriante, et tous ne sont pas mobiles (Mandell, 2009). Ces dernières années, *Klebsiella* sont devenus importants agents pathogènes dans les infections nosocomiales (Nordmann *et al.*, 2009).

Les espèces de *Klebsiella* sont généralement identifiées et différenciées en fonction de leurs réactions biochimiques. Le genre est défini comme contenant, les bactéries gram-négatives non-motiles, habituellement encapsulés en forme de tige de la famille des entérobactéries qui produisent lysine décarboxylase mais pas décarboxylase ornithine et sont généralement positifs dans le test de Voges-Proskauer (Podschun et Ullmann, 1998). Au sein du genre *Klebsiella*, des espèces individuelles peuvent être différenciées sur la base des caractéristiques énumérées dans le tableau 2. Alors que la plupart des espèces *Klebsiella* peuvent être identifiées par des tests de laboratoire microbiologiques standard, les espèces *K. terrigena* et *K. planticola* exigent, des réactions non conventionnelles spéciales (telles que l'utilisation de m-hydroxybenzoate ou hydroxy-L-proline, la dégradation des pectate, l'acide de mélézitose, ou croissance à 10 ° C)

Tableau 1. Les réactions biochimiques des espèces *Klebsiella* (Podschun et Ullmann, 1998)

Characteristic	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp.			<i>K. oxytoca</i>	<i>K. terrigena</i>	<i>K. planticola</i>	<i>K. ornithinolytica</i>
	P	O	R				
Indole	-	-	-	+	-	v	+
Ornithine decarboxylase	-	-	-	-	-	-	+
Lysine decarboxylase	+	v	-	+	+	+	+
Pectate degradation	-	-	-	+	-	-	-
Gas from lactose at 45°C	+	-	-	-	-	-	-
Acid du:							
D-melezitose	-	-	-	v	+	-	-
L-sorbose	v			+	+	+	
Utilization de:							
m-hydroxybenzoate	-	-	-	+	+	-	-
Hydroxy-I-proline	v			v	v	+	
Malonate	+	-	+	+	+	+	+
Methyl rouge teste	-	+	+	-	+	v	+
Voges-Proskauer	+	-	-	+	+	+	+

P = pneumoniae, O = ozaenae, R = rhinoscleromatis, v = variable, (+) = oui, (-) = non

1.2. Manifestation clinique

Klebsiella sont omniprésents dans la nature chez les humains, ils peuvent coloniser la peau, la gorge ou le tractus gastro-intestinal (Gupta *et al.*, 2011). Ils peuvent également coloniser les plaies stériles et de l'urine (Podschun et Ullmann. 1998). Les taux de portage varient selon les études. *Klebsiella* peut être regardée comme flore normale dans de nombreuses parties du côlon et du tractus intestinal et dans les voies biliaires (Munoz-Price *et al.* 2013).

K. pneumoniae et *K. oxytoca* sont les 2 membres de ce genre responsable de la plupart des infections humaines. Ils sont des agents pathogènes opportunistes présents dans l'environnement et dans les surfaces de mammifères muqueuses. Les principaux réservoirs pathogènes de l'infection sont le tractus gastro-intestinal des patients et les mains du personnel hospitalier. Les organismes peuvent se propager rapidement, ce qui conduit souvent à des épidémies nosocomiales.

L'infection par les organismes *Klebsiella* se produit dans les poumons, où elles provoquent des changements destructeurs. Nécrose, l'inflammation et l'hémorragie se produit dans les tissus pulmonaires, produisant parfois, sanglante, crachats muqueux épais décrit comme l'expectoration de gelée de groseille. La maladie affecte généralement les hommes d'âge moyen et plus âgés souffrant de maladies débilitantes telles que l'alcoolisme, le diabète ou la maladie broncho-pulmonaire chronique. On ne pense que cette population de patients ayant une déficience défenses de l'hôte des voies respiratoires.

Klebsiella ont également été incriminés dans les infections nosocomiales. Des sites communs comprennent les voies urinaires, des voies respiratoires inférieures, des voies biliaires, et des plaies chirurgicales. Le spectre des syndromes cliniques comprend la pneumonie, la bactériémie, la thrombophlébite, infection des voies urinaires (IVU), cholécystite, diarrhée, infection des voies respiratoires supérieures, infection de la plaie, l'ostéomyélite, et la méningite. La présence de dispositifs invasifs, la contamination de l'équipement respiratoire de soutien, l'utilisation de cathéters urinaires, et l'utilisation d'antibiotiques sont des facteurs qui augmentent le risque d'infection nosocomiale avec des espèces *Klebsiella*. Septicémie et choc septique peuvent suivre l'entrée des organismes dans le sang provenant d'une source focale.

Klebsiella granulomatis (anciennement *Calymmatobacterium granulomatis*) est un membre fastidieux du genre qui cause la maladie ulcéreuse génitale chronique. *K. oxytoca* a été impliquée dans la bactériémie néonatale, en particulier chez les nourrissons prématurés et dans les unités de soins intensifs néonataux.



Figure 2 : les images coloscopie chez deux patients avec des antibiotiques associés colite hémorragique due à *K. oxytoca*. Le panneau A montré un œdème et une hémorragie de la muqueuse dans le côlon transverse ; panneau B montre un gros plan de la muqueuse hémorragie. Le panneau C montre une ulcération longitudinale dans le côlon sigmoïde ; panneau D montre épargne rectale. (Christoph et al.,2006)

1.3. Physiopathologie

La défense de l'Hôte contre l'invasion bactérienne dépend de la phagocytose par les granulocytes polynucléaires et l'effet bactéricide de sérum, la médiation en grande partie par les protéines du complément. À la fois classique de voie et l'activation du complément alterné voie ont été décrits, mais celui-ci, qui ne nécessite pas la présence d'immunoglobulines dirigées contre des antigènes bactériens, semble être la voie plus actif dans les infections à *K. pneumoniae*.

Des données récentes provenant d'études précliniques suggèrent un rôle pour neutrophiles myéloperoxydase et la protéine de lipopolysaccharide de liaison dans la défense de l'hôte contre l'infection *K. pneumoniae*. Myéloperoxydase des neutrophiles est considéré comme médiateur l'inactivation oxydative de l'élastase, une enzyme impliquée dans la pathogenèse de diverses maladies des tissus qui détruit la protéine de liaison à lipopolysaccharide, facilite le transfert des composants bactériens de la paroi cellulaire des cellules inflammatoires.

1.4. Pathogénicité et facteurs de virulence

Les termes « facteur de pathogénicité » et « facteur de virulence » sont utilisés indifféremment par certains auteurs, tandis que d'autres mettent l'accent sur une distinction claire entre eux. Dans cette revue, le terme "pathogénicité" définit la capacité d'une bactérie pour causer la maladie alors que la "virulence" est la mesure ou le degré de pathogénicité de toute espèce bactérienne. La recherche des mécanismes pathogènes des infections *Klebsiella* a identifié un certain nombre de facteurs bactériens qui contribuent à la pathogénèse de ces bactéries.

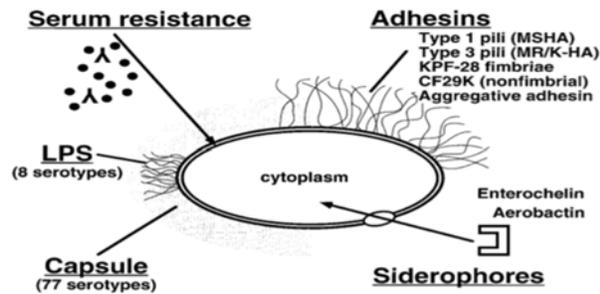


Figure 3. Représentation schématique des facteurs de pathogénicité de *Klebsiella* (Podschn et Ullmann. 1998)

1.4.1. La Capsule.

Klebsiella développent habituellement des capsules importants composés de polysaccharides acides complexes. Les acides uroniques capsulaires sous-unités répétées, composé de quatre à six sucres et, très souvent, (comme composants chargés négativement), peuvent être classifiés en 77 types sérologiques (Podschn et Ullmann, 1998). Ceci protège la bactérie de la phagocytose par les polynucléaires nucléaires d'une part (Podschn et Ullmann.1992) et empêche la destruction des bactéries par des facteurs sériques bactéricides, de l'autre part (Williams et al.1983).

1.4.2. Les Pili (Fimbriae)

En tant que la première étape critique dans le processus infectieux, les microorganismes doivent se rapprocher autant que possible d'accueillir des surfaces muqueuses et maintenir cette proximité en attachant à la cellule hôte (adhérence). Les propriétés adhésives de l'entérobactérie sont généralement médiées par différents types de pili (autrement connu comme fimbriae) (Williams and Tomas. 1990).

La pertinence de ces pili à la virulence bactérienne est considéré comme provenant principalement de la liaison des bactéries au mucus ou cellules épithéliales de l'urogénital, respiratoire, et des voies intestinales (Podschun et Ullmann. 1998).

1.4.3. La résistance sérique et lipopolysaccharide

Etant donné que le LPS est généralement capable d'activer le complément C3b est ensuite déposé sur les molécules de LPS. Cependant, comme il est fixe préférentiellement aux plus longues chaînes latérales O-polysaccharide, C3b est loin de la membrane cellulaire bactérienne. Ainsi, la formation de la lytique complexe d'attaque membranaire (C5b-C9) est empêchée, et les dommages de la membrane subséquente et la mort cellulaire ne se fait pas. En plus de cet encombrement stérique de l'action lytique du complément par le LPS, la quantité de dépôt de C3b détermine également le degré de résistance au sérum (Willey et al.2008)

1.4.4. Les Sidérophores

La croissance des bactéries dans le tissu hôte est limitée non seulement par des mécanismes de défense de l'hôte, mais aussi par son approvisionnement en fer disponible. Le fer est un élément essentiel pour la croissance bactérienne, qui fonctionne principalement comme un catalyseur d'oxydo-réduction dans les protéines qui participent à des processus de transport d'oxygène et d'électrons (Podschun et Ullmann. 1998).

La quantité de fer libre disponible pour les bactéries dans le milieu d'accueil est extrêmement faible, étant donné que cet élément est lié de manière intracellulaire à des protéines telles que l'hémoglobine, ferritine, hémosidérine, et la myoglobine et extracellulaire aux protéines se liant au fer affinité haute tels que la lactoferrine et la transferrine (Bradford, 2001).

De nombreuses bactéries tentent de sécuriser leur approvisionnement en fer dans l'hôte en sécrétant chélateurs du fer à affinité haute et à faible poids moléculaire, appelés sidérophores, qui sont capables de la concurrence en prenant le fer lié à accueillir des protéines (Podschun et Ullmann. 1998). Sidérophores appartiennent à deux groupes chimiques différents, l'un comprenant des sidérophores de type phénolate comme aérobactine et un composé de sidérophores de type hydroxamate comme aérobactine

2. Les β -lactamines

2.1. Structure

La famille des β -lactamines comprend les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et monobactames. Leur nom provient de la présence d'une β -lactame dans leur structure ; cet anneau est vital pour l'activité antimicrobienne (Sherris, 2004) (figure 4).

En 1940, Florey et Heatley voyagé aux États-Unis cherchant de l'aide à la production de masse de la pénicilline par fermentation (Richards, 1943). Ils ont réussi à isoler la pénicilline de *Penicillium chrysogenum*. Ce travail a attiré des entreprises pharmaceutiques d'investir dans une production de la pénicilline en énorme quantité (Chain, 1979). Par la suite, différents composés ont été introduits en pénicilline par Squibb (Chain, 1979) et le groupe de Florey (Queener Florey et al, 1986) produisant des benzyl-pénicilline (pénicilline G) et 2-pentenylpenicillin respectivement (pénicilline F) (Abraham et al., 1949).

Les scientifiques se sont rendu compte que les premiers travaux appliquant différentes conditions de fermentation n'étaient pas que de succès (Behrens et al, 1948). Le noyau β -lactame, qui est de 6-amino-acide penicillanique (6-APA), s'est avérée être la partie essentielle de la pénicilline Synthèse et modification. Par conséquent, Shaheen et Henery (1959) ont utilisé l'acylation du 6-AAP synthétisés chimiquement pour produire de la pénicilline V. Ce travail l'occasion de nouveaux agents β -lactame à être produite par l'ajout de chaînes latérales à 6-APP.

Par la suite, semi-synthétique de β -lactames auront évolué en permanence et de façon systémique ; par exemple, à la méthicilline est le premier publié la pénicilline semi-synthétique en 1960 à résister à l'hydrolyse par pénicillinases (Fairbrother et Taylor, 1960). L'utilisation des sources naturelles ont continué à être fouillé par la production d'agents semi-synthétique.

La céphalosporine C a été isolée à partir de *Cephalosporium acremonium* par Abraham et Newton (Abraham et Newton, 1961). Cet agent a produit une nouvelle famille d'antibiotiques β -lactame où il possède un noyau de 7- aminoacide cephalosporinique au lieu de 6-APA (figure 5).

Carbapénèmes, comme de l'imipénem et méropénem sont devenus l'antibiotique de choix pour le traitement de la plupart des infections bactériennes graves, en raison de son large éventail de l'activité aérobie et anaérobie (Livermore et Woodford, 2006). Les structures des carbapénèmes et des pénicillines chimiquement similaires sauf le teneur en soufre sont atome dans la position 1 de la pénicilline en structure a été substitué par un atome de carbone (Kumagai et al, 2002)

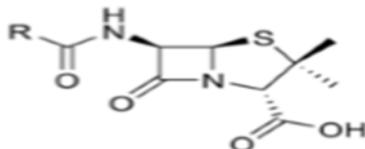


Figure 4: la structure de Pénicilline noyau. Anneau bêta-lactamines est carrée au centre.

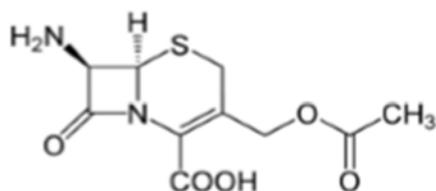


Figure 5 : Céphalosporines antibiotiques montre l'acide 7-aminocéphalosporinique.

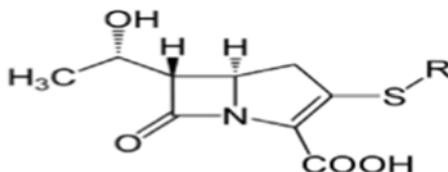


Figure 6 : Structure générale des carbapénèmes

2.2. Le Mécanisme d'action des β -lactamines

Les parois cellulaires bactériennes forment une unité répétitive de base d'une alternance de disaccharides ; N-acétyl glucosamine et N-acétyl muramic acide. Le premier sucre est modifié par un pentapeptide unique. Les unités du peptidoglycane individuelles sont créées à l'intérieur de la cellule bactérienne, mais leur dernière réticulation est catalysée à l'extérieur de la membrane cytoplasmique bactérienne par un groupe d'enzymes bactériennes ancré à membrane appelée la paroi cellulaire transpeptidase (Fisher *et al.*, 2005 ; Wilk *et al.*, 2005).

En mimant la structure tridimensionnelle de la séquence D-Ala-D-Ala, les bêta-lactames se comportent comme des inhibiteurs de la transpeptidase. En présence d'antibiotique, cette enzyme, qui agit comme une acyl-transférase à sérine active, exerce son action hydrolytique sur la molécule antibiotique, conduisant à la formation d'un complexe enzyme-produit qui ne se dissocie pas car l'enzyme est liée de façon covalente au produit. (Takafumi et al.,2015 ; Livermore et Williams, 1996 ; Wilk et al, 2005).

Les schémas suivants exposent l'action de la transpeptidase et le principe antibactérien des β -lactamines

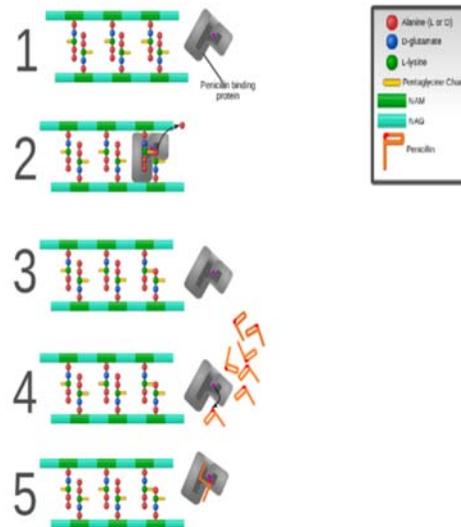


Figure 7: Présentation schématique du mode d'action des antibiotiques β -lactames

2.3.Les Mécanismes de la résistance aux β -lactamines

Les bactéries ont développé différents mécanismes pour contrecarrer l'action des β -lactamines (Walsh, 2003) ;

- Modification de la cible (PLP) qui les rend moins sensibles aux β -lactamines mais permet de maintenir son activité physiologique normale
 - Synthèse des enzymes (β -lactamases) qui inactivent les β -lactamines par modification chimique
 - Acquisition ou surproduction des pompes efflux qui peuvent expulser l'antibiotique hors de la cellule même contre le gradient de concentration.

- Modification des porines chez les bactéries à Gram-négatif, ayant pour résultat la diffusion plus lente des β -lactamines à travers la membrane externe.

Le mécanisme le plus important de la résistance aux β -lactames, particulièrement chez les bactéries Gram négatif, est la production de β -lactamases. Ces enzymes peuvent hydrolyser le cycle β -lactame, résultant un effet antimicrobien inefficace (Helfand et Bonomo, 2003). Les β -lactamases sont des enzymes bactériennes qui catalysent l'hydrolyse de la liaison amide du cycle lactame des antibiotiques de la famille des β -lactamines.

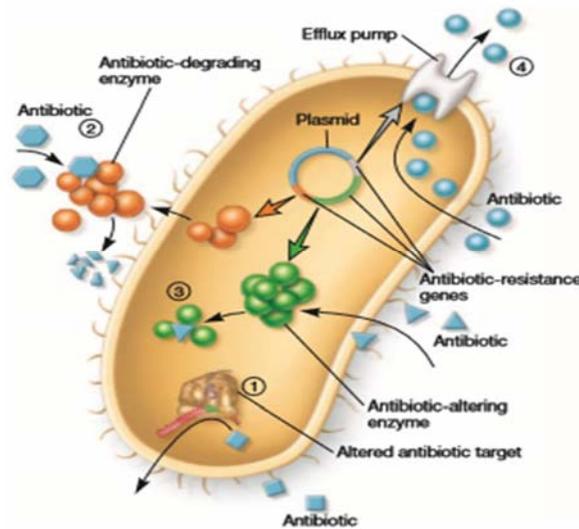


Figure 8 : Les mécanismes de résistance aux antibiotiques. *Les bactéries peuvent résister à l'action des antibiotiques (1) en empêchant l'accès (ou la modification) de la cible de l'antibiotique, (2) dégradant les antibiotiques, (3) la modification de l'antibiotique et / ou (4) l'expulsion rapide de l'antibiotique*

2.4. Classification des bêta-lactamases

Aujourd'hui, les classifications d'Ambler et de Bush-Jacobi-Medeiros sont considérées comme étant les plus pertinentes (Bush et al. 1995).

Table 2: les systèmes de classification des bêta-lactamases modifiés de Bush et Jacoby, (2010)

Groupe de Bush-Jacoby	classe d'Ambler	substrat principale	Inhibé par		enzymes représenté
			CA/TZB	EDTA	
1	C	Céphalosporines	-	-	AmpC, P99, ACT-1 CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	Céphalosporines	-	-	GC-1, CMY-37
2a	A	penicillines	+	-	PC1
2b	A	Pénicillines, première céphalosporins	+	-	TEM-1, TEM-2
2be	A	spéctre -élargi Céphalosporines, monobactames	-	-	TEM-3, SHV-2, CTX- Ms, PER, VEB
2br	A	pénicillines	-	-	TEM-30, SHV-10,
2ber	A	spéctre -élargi cephalosporines, monobactame	-	-	TEM-50
2c	A	carbenicilline	+	-	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbenicilline, cefepime	+	-	RTG-4
2d	D	Cloxacilline	V	-	OXA-1, OXA-10
2de	D	Spéctre-élargi Céphalosporines	V		OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenemes	V	-	OXA-23, OXA-48
2e	A	Spéctre-élargi Céphalosporines	+	-	CEPA
2f	A	Carbapenemes	V	-	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a (B1)	B (B2)	Carbapenemes	-	+	IMP-1, VIM-1, IND-1, CcrA L1, CAU-1, GOB-1 FEZ-1

v= variable, (+) = oui, (-) = non

2.5. Les β -lactamases cliniquement importants

2.5.1. Les β -lactamases de classe A

Généralement, la classe A des β -lactamases, sont sensibles aux inhibiteurs de β -lactamase comme clavulanate, tazobactam et, dans une moindre mesure, sulbactam. Toutefois, *Klebsiella pneumoniae* CPK carbapenemase est peut-être une exception à cette généralisation (Papp-Wallace et al, 2009).

La première nature plasmidique de cette catégorie a été décrite chez *Escherichia coli* en 1963, et a été nommé TEM (Datta et Kontomichalou, 1965). SHV qui est un autre type de β -lactamase détecté principalement dans *Klebsiella pneumoniae* (Matthew et al, 1979). Les TEM et SHV sont les β -lactamases commune décrite dans les isolats cliniques de *Klebsiella pneumoniae*, principalement responsable de voies urinaires, circulation sanguine, et les infections respiratoires nosocomiale (Buynak, 2006).

2.5.2. Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE)

BLSE se trouvent principalement dans la famille des *Enterobacteriaceae* de bactéries Gram-négatives, en particulier *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* (Paterson et Bonomo, 2005). Selon le bush et Jacoby schème (tableau 2) (Bush et Jacoby, 2010) Les BLSE peuvent être divisées en trois grands groupes : groupe 1 céphalosporinases qui ne sont pas inhibés par le clavulanate, groupe 2 enzymes à large spectre qui forment le plus important groupe et sont généralement inhibée par clavulanate sauf le 2D et 2f des groupes, et le groupe 3 métallo- β -lactamases.

2.5.3. Les Carbapenemases de Classe A

Les carbapenemases de classe A ont été détecté pour la première fois en 1986 (Medeiros et Hare, 1986). Ces β -lactamases ont été décrits dans les espèces de la famille des *Enterobacteriaceae*, surtout *Klebsiella pneumoniae* et *Serratia marcescens* dans de petites éclosions et dans les isolats unique (Medeiros et Hare, 1986 ; Nordmann, 1993 ; Yang et Livermore,1990).

2.5.4. Les Amp C (les bêta-lactamase de classe C)

Les β -lactamases de classe C (AmpC) sont un facteur important qui contribue à la résistance multiple aux β -lactamines chez les bactéries Gram négatif, en particulier les

entérobactéries (Goossens, 2001 ; Garcia-Rodriguez et Jones, 2002). Ils montrent l'activité contre les pénicillines mais sont plus actifs contre oxyiminocephalosporins (céfotaxime, de la ceftazidime et de ceftriaxone).

Ils peuvent également s'hydrolysent céphamycines (céfoxitine et cefotetan) et monobactames (aztréonam), mais sont sensibles aux carbapénèmes (et aux céphalosporines de quatrième génération (cefepime et cefprome) (Coudron et al, 2003). Les gènes codant des enzymes de type AmpC sont situés sur les chromosomes de certaines entérobactéries (Stock et al, 2003 ; Stock et Wiedemann, 2003)

2.5.5. Les OXA bêta-lactamases de classe D

Les OXA- β -lactamases appartiennent à la classe D selon Ambler, elles sont fréquemment trouvées chez *Pseudomonas aeruginosa*, mais aussi moins fréquente dans certains organismes Gram négatif comme *Acinetobacter baumannii* (Nass et Nordmann, 1999 ; Paterson et Bonomo, 2005 ; Pournaras et al, 2006). Initialement, OXA β -lactamases étaient connus pour leur haut degré l'hydrolyse de l'oxacilline et cloxacillin. Toutefois, la plupart d'entre eux n'ont pas d'incidence sur les carbapénèmes et les céphalosporines à spectre étendu (Nass et Nordmann, 1999).

2.6. Le Mécanisme d'action de Beta-lactamases

Quelques beta-lactamases utilisent les ions zinc pour perturber le cycle β -lactame, mais un nombre beaucoup plus grand agit via le mécanisme d'ester sérine illustré dans la Figure 1 (Podschn et Ullmann, 1998). Les protéines liant les pénicillines (PLP) réagissent aussi avec beta-lactamines pour donner la sérine esters, mais, contrairement aux esters analogue formé par les β -lactamases ne s'hydrolysent pas facilement (Nass et Nordmann, 1999).

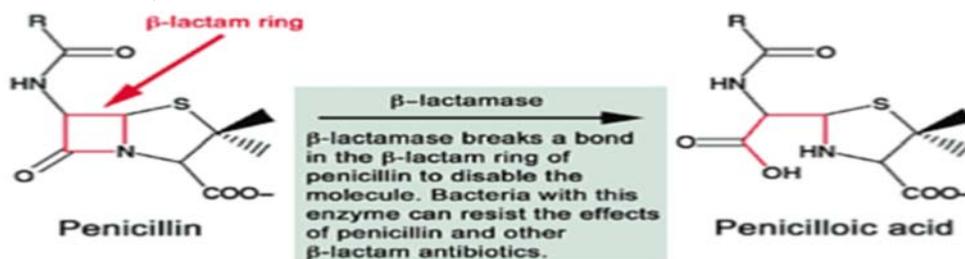


Figure 9 : Une représentation schématique de l'inactivation d'un bêta-lactamine par une bêta-lactamase. (Podschn et Ullmann. 1998).

2.7. Les facteurs de risque d'infection due au *Klebsiella* productrice de bêta-lactamase

Les facteurs de risque de colonisation ou d'infection par des organismes producteurs BLSE sont peu différents des facteurs de risque pour d'autres infections nosocomiales (Safdar et Maki, 2002). Risques signalés, sont liés à une augmentation de la longueur du séjour à l'hôpital (Mangeny et al.,2000; Bisson *et al.*,2002), une augmentation de la longueur du séjour dans l'unité de soins intensifs (Lucet *et al.*,1996 ; De champs *et al.*,1991), gravité accrue de la maladie (Ho *et al.*, 2002), l'utilisation d'un cathéter veineux ou artériel central (Menashe et al.,2001), l'utilisation d'un cathéter urinaire (Mangeny *et al.*,2000), l'assistance ventilatoire, (Menashe *et al.*,2001) l'hémodialyse (D'Agata et al.,1998), une chirurgie abdominale d'urgence (De champs *et al.*, 1991), l'utilisation d'une gastrostomie ou jéjunostomie (Schiappa *et al.*,1996), une colonisation intestinale avant l'administration d'un oxyimino-b-lactame antibiotiques (Kim *et al.*, 2002), et de l'administration antérieure de n'importe quel antibiotique. (Schiappa *et al.*,1996; Menashe *et al.*,2001; Lautenbach *et al.*, 2001).

3. *Punica granatum*

3.1. Généralités

Punica granatum (grenade) est l'un des plus anciens fruits comestibles connus. Il a été largement utilisé dans la médecine traditionnelle en Amérique, en Asie, en Afrique et en Europe pour le traitement de différents types de maladies. En plus de ses usages historiques anciens, la grenade est utilisée dans plusieurs systèmes de médecine pour une variété de maux (Turk et al.2008).

Le jus de grenade a des effets antiathérogènes potentiels chez l'homme en bonne santé et les effets athérosclérotiques chez les souris ainsi que d'autres avantages nutritionnels et sanitaires (Aviram et al., 2004 ; Negi et al, 2005 ; Turk et al., 2008). En conséquence, le jus de grenade est devenu populaire dans le monde entier. De nombreuses études sur l'activité antioxydante ont montré que le jus de grenade contient des niveaux élevés d'antioxydants que la plupart des jus de fruits (Gil et al., 2000 ; Hong et al., 2008).

Des études épidémiologiques ont suggéré que la consommation de jus de fruits rouges, comme la grenade, de baies et de raisin, en corrélation avec un risque réduit de maladie coronarienne, accident vasculaire cérébral, certains types de cancers et le vieillissement (Hertog et al., 1997 ; Sumner et al, 2005).

3.2. La classification de *Punica granatum*

Régne :	Plantae
Sous règne :	Tracheobionta
Division :	Magnoliophyta
Classe :	Magnoliopsida
Sous classe :	Rosidae
Ordre :	Myrtales
Famille :	Punicaceae
Genre :	<i>Punica</i>
Especie :	<i>Punica granatum</i>

3.3. La description de *Punica granatum*

Un arbuste à feuilles caduques ou petit arbre, ériger, jusqu'à 7 m de haut, très ramifiée à partir de la base ; branches grêles ; ramilles se terminant souvent dans les épines, les jeunes quadrangulaires ou presque tetraptera. Feuilles : simples, opposées, verticillées, oblongues-lancéolées, glabres, 1-9 cm de long et 0,5-2,5 cm de large ; apex aigu, obtus ou échancré ; cunéiforme base. Fleurs : 1-5 à l'aisselle des feuilles le plus élevé de ramilles, 1 borne, sessiles ou subsessile. Calyx : 2-3 cm de long, rouge ou jaune pâle ; lobes electropatent à recourbés ; ronde ou obtus pétales, rouge ou blanc. Fruit, une baie, globuleux, 5-13 cm de diamètre, avec une nervure tannée renfermant de nombreuses graines, diversement coloré, jaune-vert, blanc, brun rougeâtre ou rarement noirâtre pourpre. Semences : nombreuses, rouges, roses ou blanches jaunâtre (Organisation mondiale de la Santé 2009.).

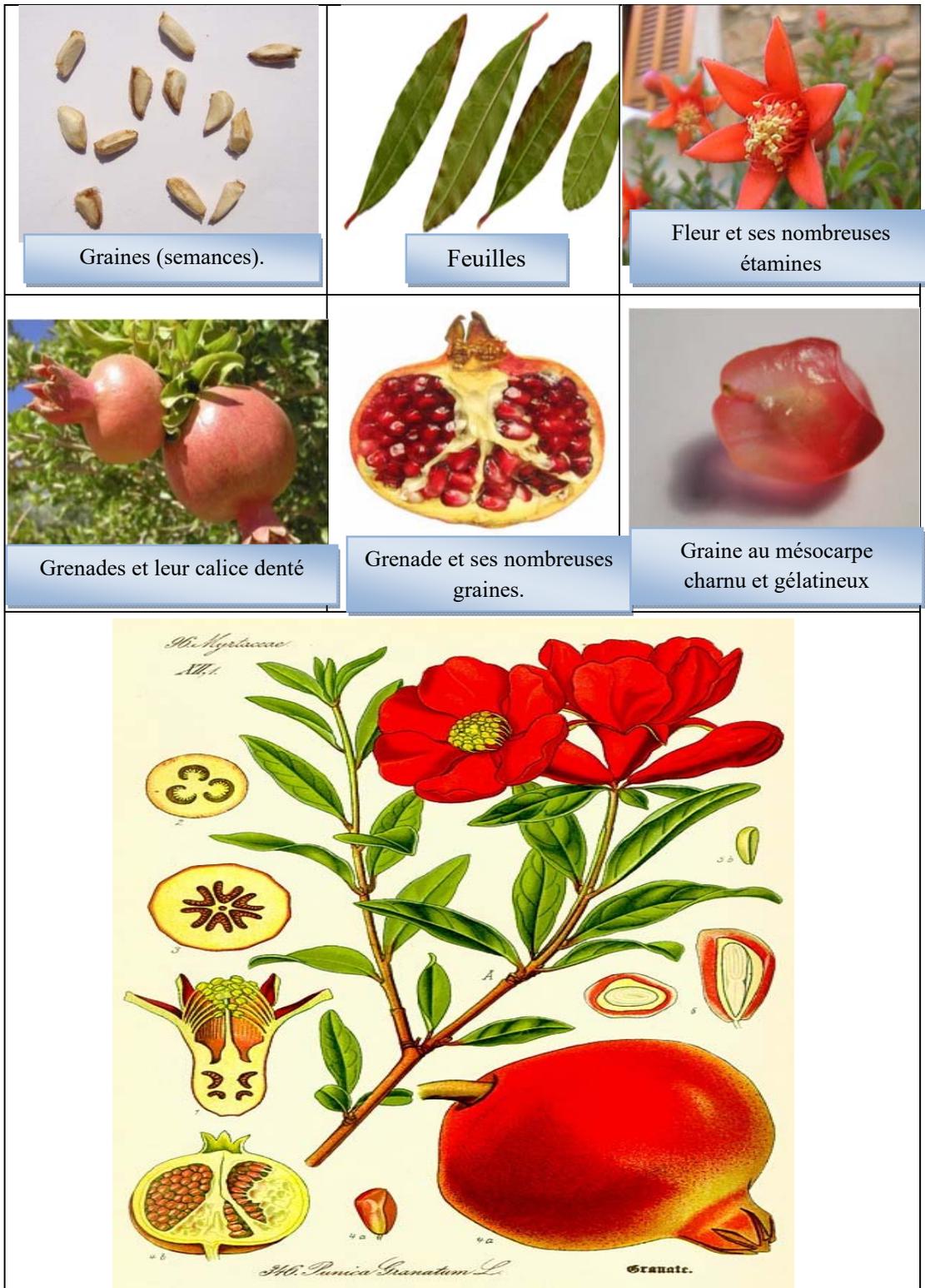


Figure 10 : Caractéristiques botaniques du grenadier

3.4. La Chimie des composants phénoliques (Tanins) de *Punica granatum*

Les polyphénols sont des composants qui se trouvent dans tous les fruits et légumes et jouent un rôle majeur dans leur couleur, la saveur, la texture ainsi qu'antioxydant (Hernandez et al., 1999) ils ont aussi des activités antibactériennes (Negi et Jayaprakasha, 2003). Les composés phénoliques peuvent dénaturer les enzymes, mais ils peuvent aussi se lier à des substrats tels que des minéraux, des vitamines et des hydrates de carbone qui les rend indisponibles pour les micro-organismes (Stern et al, 1996 ; Shahidi et Naczk, 2004 ; Furneri et al., 2002).

En outre, les phénols peuvent être absorbées à la paroi cellulaire, ce qui entraîne une perturbation de la structure de la membrane et la fonction (Hugo et Bloomfield, 1971). Tanins sont des composés de poids moléculaire élevé phénoliques qui sont présents dans de nombreuses plantes, y compris la grenade (*Punica granatum L.*) péricarpe (pelures). Les tanins sont des polymères polyphénoliques hydrosolubles de poids moléculaire relativement élevé et ont une capacité à former des complexes avec des protéines principalement, dans une moindre mesure, avec les hydrates de carbone en raison de la présence d'un grand nombre de groupes hydroxyle phénoliques. Les tanins sont généralement divisés en deux groupes principaux : les tanins hydrolysables (HTS) et des tanins condensés (TPP) (Hassanpour et al, 2011a, 2011b).

3.5. Les propriétés fonctionnelles de Grenade (les effets thérapeutiques)

Les métabolites primaires de grenadiers sont les polyphénols, y compris les anthocyanes, les glycosides de flavonols, les procyanidines, les acides phénoliques et des dérivés de l'acide ellagique (Negi et Jayaprakasha, 2003). En raison de leurs propriétés antioxydantes, les composés phénoliques sont considérés comme ayant un rôle de prévention dans un certain nombre de maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires et les cancers (Heinonen et al., 1998). Les composés phénoliques antioxydants primaires de la grenade sont les punicalagins, suivis par les tanins hydrolysables, les Anthocyanes (ACNs) et les acides ellagiques (Gil et al., 2000). Une couleur rouge attrayante est l'une des critères de qualité les plus importants pour les jus de fruits contenant des anthocyanes, y compris la grenade.

3.6. Préparation des extraits phénoliques

Le but de cette extraction est de libérer et d'extraire le maximum de molécules polyphénoliques présentes dans des structures vacuolaires par rupture du tissu végétal et par diffusion en utilisant des solvants organiques qui accélèrent et augmentent le rendement d'extraction.

- **Extraction des polyphénols par macération à l'eau** (modifié par Debib *et al.*, 2014)

Les extraits polyphénoliques de la grenade ont été obtenus à partir l'**écorce** : le fruit a été pelé manuellement puis les écorces ont été séchées dans l'étuve à une température de 45°C pendant une semaine et broyée en poudre.

Les extraits aqueux ont été obtenus par macération pendant 48 heures de 25 g de matériel végétal (**écorce**, broyées dans 200 ml d'eaux distillé). Les filtrats obtenus sur papier filtre sont alors déshydraté dans un lyophilisateur. Les résidus obtenus sont conservés à 4°C avant la réalisation des tests antibactériens.

Chapitre II :

Matériel et méthodes

Nos objectifs sont :

- ✓ Evaluer la fréquence d'isolement et la résistance aux antibiotiques des souches de *Klebsiella* responsables d'infections chez les patients hospitalisés et consultants externes, en plus des eaux de certaines infections par les études bactériologiques.
- ✓ Caractérisé les souches *Klebsiella* productrices de BLSE par des tests de synergie et des doubles disques (test espagnol).
- ✓ Evaluer la sensibilité des souches de *Klebsiella* isolées vis-à-vis l'extrait aqueux de *Punica granatum*.

1. Prélèvement

Notre travail a été effectué au niveau du laboratoire central de l'hôpital Fabor de Blida durant une période de stage de 3 mois allant du mois de Février au mois d'Avril 2016.

Notre échantillon est composé de 152 prélèvements en total, 93 provient des selles, 49 des urines et 10 des eaux usées à partir des patients hospitalisés au service diabète et pneumonie de l'hôpital Fabor et aussi de personnes externe.

Les selles et les urines sont récupérer dans des boîtes stériles à fermeture hermétique et les eaux dans des flacons stériles, et sont transportés au laboratoire dans une glacière.

Pour la préparation des selles, on a dilué les selles à l'aide d'un écouvillon dans 10ml de l'eau physiologique, puis on a bien mélangé la solution.

Tous les prélèvements reçus au laboratoire doit être accompagnés d'une fiche de renseignement qui nous permet d'obtenir des informations complémentaires, elle comporte :

- Nom et prénom.
- Age et sexe.
- Service d'hospitalisation.
- Nature de prélèvements.
- Antibiothérapie en cours.

2. Coloration de Gram

Principe

La coloration de Gram permet de distinguer les bactéries à Gram négatif qui apparaissent roses et les bactéries à Gram positif qui apparaissent violettes. Cette différence de coloration est liée à des différences de nature de la paroi bactérienne.

Elle permet de renseigner sur :

- Le type Gram + ou Gram -
- la forme des bactéries
- la taille
- le mode de regroupement

Technique

- Réaliser un frottis et le fixer.
- Plonger la lame dans le violet de gentiane (ou cristal violet) phéniqué pendant 1 minute.
- Laver la lame à l'eau distillée.
- Plonger la lame dans une solution de lugol pendant 1 minute
- Laver à l'eau distillée
- Décolorer dix secondes à l'alcool.
- Rincer immédiatement à l'eau distillée
- Plonger la lame dans la safranine (ou la fuchsine) phéniquée pendant 1 minute
- Laver la lame à l'eau distillée.
- Sécher la lame en la tamponnant avec du papier Joseph.

Observer à l'objectif x100 à l'immersion dans l'huile et à pleine lumière

Lecture : Après coloration de Gram *Klebsiella* apparaît sous l'aspect de bacilles Gram négatif.

3. L'Isolement et la purification

3.1. L'isolement :

L'isolement des souches Klebsiella été fait sur milieu GN et Hektoen. On a ensemencé la solution des selles sur milieu Hektoen par stries.

Concernant les urines, l'ensemencement par strie à l'aide d'une pipette pasteur a été réalisé sur milieu GN.

Pour les eaux des rougeurs on a réalisé d'abord un enrichissement de notre prélèvement dans le milieu SFB à double concentration. Après incubation à 37°C pendant 24 h de ce milieu, on a fait l'ensemencement sur milieu Hektoen.

Incubation est faite à 37°C pendant 24h.

3.2. Purification

Après une lecture macroscopique des colonies obtenues, les différentes colonies obtenues sont ré-isolées sur le même milieu afin d'obtenir de souches pures. Nous avons adopté la méthode des quadrants.

- **Technique. (CA-SFM. 2010)**
- Tracer sur le fond extérieur de la boîte de pétri deux diamètres perpendiculaires séparant la boîte en quatre secteurs.
- Prélever à l'anse (stérile) la suspension ou le bouillon dans le cône stérile.
- Avec la main gauche maintenir entrouverte la boîte dans le cône stérile et étaler le prélèvement par stries très serrées dans une moitié de quadrant (quadrants 1 et 2)
- Flamber l'anse et laisser refroidir
- Etaler à nouveau le prélèvement par stries serrées dans la moitié correspondante aux quadrants 2 et 3.
- Flamber l'anse et laisser refroidir.

- Répéter une dernière fois l'étalement en stries serrées dans la moitié correspondante aux quadrants 3 et 4

On a donc réalisé 1 isolement en quadrants dont la richesse en Bactéries diminue du 1^e quadrant au 4^e

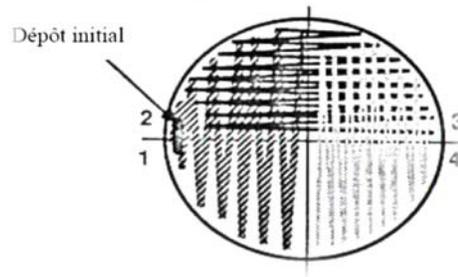


Figure 11 : Isolement des Souches par la méthode des quadrants

4. Identification de souches : (Galerie API 20E)

➤ Principe

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

➤ Technique

On réunit fond et couvercle d'une boîte d'incubation avec la répartition environ 5ml d'eau distillé dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide, sans oublié d'inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. En effet, on retire la galerie de son emballage individuel et on la dépose dans la boîte d'incubation, puis on prépare l'inoculum bactérien : une colonie dans 5ml d'eau physiologique, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland.

A l'aide d'une pipette pasteur munie d'une poire, on remplit les microtubes de la galerie. Au sein des microtubes on distingue deux parties : le tube et la capule selon les

tests, la suspension bactérienne doit être placée uniquement dans le tube ou des le tube et la capule.

- Lorsque le sigle du test souligné ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant le tube et la capule sera secondairement rempli d'huile de paraffine afin de créer une anaérobiose dans les tubes.
- Lorsque le sigle du test encadré, ce qui est le cas des tests CIT, VP et GEL, on remplit le tube et la capule avec la suspension bactérienne.
- On remplit uniquement les tubes des autres tests.

On incube les boîtes d'incubation et les place à 37°C pendant 18 à 24 heures.

✓ **La lecture**

Après incubation, on prélève la boîte de l'étuve et on note les résultats obtenus pour les tests spontanés en se référant au tableau de lecture (voir **Annexe III**).

On révèle les tests nécessitant l'addition de réactifs tels que VP (on ajoute du réactif VP1 et une goutte de réactif VP2). Ensuite on note tous les résultats.

5. Sensibilité aux antibiotiques (Antibiogramme)

➤ **Principe**

L'antibiogramme est réalisé par la méthode de diffusion en gélose (méthode des disques), selon le communiqué du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM. 2010), qui repose sur la connaissance du phénotype sauvage caractéristique de l'espèce et de différents phénotypes de résistance acquis. Ces dernières sont définies non seulement par des caractères de résistance en termes de catégories clinique ("I" ou "R"), mais aussi en termes de diminution significative de sensibilité et par des images typiques (Synergie, Antagonisme).

➤ **Technique (CA-SFM. 2010)**

A partir d'une culture pure de 18-24 h sur milieu gélosé Mueller-Hinton, une suspension en 5 ml de solution saline (0,9 % NaCl) a été préparée en équivalente au standard McFarland 0,5 (~ 10⁸ UFC/ml). A partir de cette suspension bactérienne, une dilution au 1/10 dans l'eau physiologique (0,9 % NaCl) a été réalisée et bien homogénéisée ; puisensemencée par écouvillonnage sur des boîtes de Pétri gélosées en Mueller-Hinton.

Application des disques d'ATB : Les disques d'antibiotiques correspondant ont été appliqués à l'aide d'un distributeur ou par une pince stérile en appuyant légèrement ; puis incubés pendant 18-24h à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

➤ **Lecture**

La lecture a été faite par la mesure avec précision les différents diamètres des zones d'inhibition, en comparaison ces résultats aux valeurs critiques figurant dans l'Annexe N°IV. Les bactéries ont été classées dans l'une des catégories : Sensible, Intermédiaire ou Résistante. Dans notre travail, la souche de référence étudiée est : *E. coli* ATCC 25922 souche sensible, utilisée pour contrôler les paramètres de conformité (conformité des résultats).

6. Les Tests de détection de BLSE

6.1. Le test de synergie.

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

Les BLSE dérivées des enzymes de classe A (Ambler, 1980) sont inhibées par les inhibiteurs de β -lactamases (acide clavulanique, sulbactam et tazobactam).

➤ **Principe** (Jarlier *et al.* 1988).

Le teste de synergie permet la détection de β -lactamases à spectre étendue chez une souche donnée. Ces enzymes peuvent être mises en évidence par la méthode des disques, qui consiste à rechercher une image de synergie entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de B-lactamase et les disques de céphalosporines de troisième génération (cefotaxime, Cefotaxime et ceftriaxone) et l'aztréonam. Cette image dite en "bouchon de champagne".

➤ **Technique**

La recherche de β -lactamase à spectre étendue est fait dans les conditions standard de l'antibiogramme, puis en disposant les disques d'ATB : un disque d'Amoxicilline +

acide clavulanique (AMC 20/10) et les disques de C3G (CTX 30 μ g, CRO 30 μ g, CAZ 30 μ g) et l'aztréonam (ATM 30 μ g) à une distance de 20 à 30 mm sur les boîtes de Pétri (Figure 16). On Incube les boîtes pendant 18 heures à 37°C \pm 1°C.

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

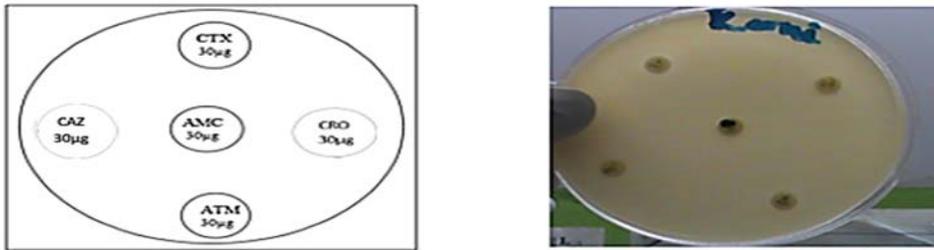


Figure 12 : Disposition des disques d'antibiotique pour le test de synergie

6.2. Le Test du double disque (test espagnol) (Rahal et al.2005)

La détection de la β -lactamase à spectre élargi (étendu) peut être confirmée par le test du double disque. Ce test plus sensible consiste à rechercher une augmentation de la zone d'inhibition d'un disque de C3G.

La technique est la suivante : A partir d'une culture de 18h une suspension est préparée avec une opacité égale à 0.5 Mc Farland, une gélose Mueller-Hinton est ensemencée selon la technique de l'antibiogramme. Deux disques sont déposés, un disque AMC et un disque de C3G (CTX ou CAZ). On laisse diffuser à température ambiante pendant une heure, puis le disque AMC est ôté et remplacé par un disque de C3G (CTX ou CAZ). Les boîtes sont incubées 18h à 37°C.

Le test est considéré positif, si le diamètre de la zone d'inhibition du disque de C3G est inférieur de 4 à 5 mm, comparé à celui observé autour du disque de C3G appliqué après pré diffusion du disque de l'AMC.

7. Matériel végétal



Figure 13 : La représentation de la variété de grenade utilisée dans le cadre de notre étude.



Figure 14 :L'écorce sèche de *P. granatum*

➤ Le Test de Sensibilité des souches *Klebsiella spp.* vis-à-vis d'un extrait aqueux de *Punica granatum*.

Afin d'évaluer l'activité antibactériennes des extraits polyphénoliques de aqueous extrait de *Punica granatum* contre les espèces de klebsiella isolées.

L'extrait aqueux a été fourni par Dr Debib qui a effectué le processus de l'extraction. Elle a acheté les fruits du marché de Koléa au mois d'octobre 2015, ensuite stockés au congélateur dans un emballage alimentaire.

➤ Technique

Nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu gélosé de Mueller et Hinton. Le principe de cette méthode est d'utiliser des disques de papier Whatmann de 6mm de diamètre. Les disques ont été imprégnés dans différentes solution des extraits puis déposés à la surface d'un milieu écouvillonné par une suspension microbienne d'une densité optique de 0.5Mc Farland. A la fin la durée d'incubation (18-24 heures pour les souches bactériennes et 48 h pour la levure à 37 °C), les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés (modifié par Debib *et al.*, 2014)

Chapitre III :
Résultats et discussion

1. Isolement et identification des souches *Klebsiella*

18 souches *Klebsiella spp.* ont été isolées et identifiées, dont 14/18 (77.78%) sont isolées des prélèvements des patients et 4/18 (22.22%) sont des prélèvements issus des eaux.

Tableau 3 : les frequences des échantillons.

Prélèvement	N. d'échantillons	Pourcentage (%)
Urine	49	32.24
Selle	93	61.18
Eau	10	6.58
Total	152	100

➤ Aspect macroscopique

Sur **gelose nutritive** : des grosses colonies, bombées et lisse d'une couleur blanche et d'un aspect muqueux

Sur **Hektoen** : les colonies apparaissent bombées et lisses d'une couleur saumons, contour régulièrement ronde



Figure 15 : Aspect macroscopique de *Klebsiella spp.* sur milieu Hektoen et GN

➤ Etude physiologique et biochimique

Les tests biochimiques de la microgalerie API 20 E a permet l'affirmation des souches étudiées à *Klebsiella spp.*

Les résultats sont illustrés dans le tableau (voir annexe IV).



Figure 16: galerie API20 E identifiant *K. pneumoniae* (A), *K. ornithinolytica* (B) et *K. oxytoca* (C).

1.1. Répartition des souches Klebsiella selon l'espèce.

D'après le tableau ci-dessous, dans notre étude *K. pneumoniae* était l'espèce la plus fréquemment isolée avec un taux de 77.78% suivi par *K. oxytoca* et *K. ornithinolytica* avec un taux de 11.11%.

Tableau 4: La répartition de souches *Klebsiella* par espèces.

Espèce isolée	Nombre de souches isolée	Pourcentage des souches isolées (%)
<i>K.pneumoniae</i>	14	77.78
<i>K. oxytoca</i>	2	11.11
<i>K. ornithinolytica</i>	2	11.11
total	18	100

1.2. Répartition des souches *Klebsiella* selon la nature de prélèvement.

La figure 17 montre qu'un taux de 11/18 (61.11%) de souches de *Klebsiella* sont isolées des urines, 3/18 (16.67%) sont isolées des selles et 4/18 (22.22%) sont isolées des eaux.

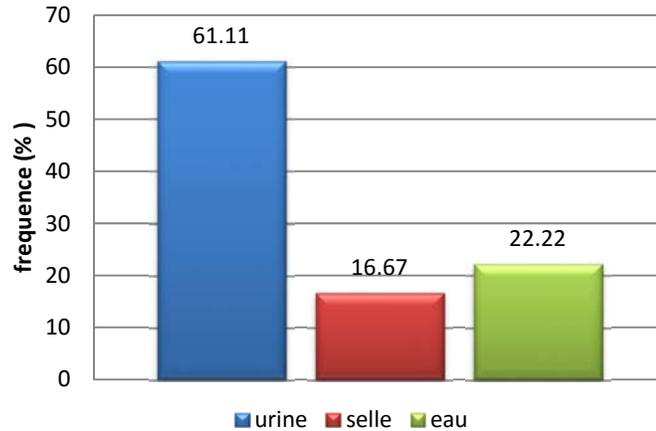


Figure 17 : Répartition des souches selon la nature de prélèvement.

1.3. Répartition des souches par sexe.

Nos résultats montrent une prédominance des souches isolées chez les patients du sexe féminin avec un taux de 78.87% (11/14) contre 21.43% (3/14) des souches sont isolées chez les patients du sexe masculin.

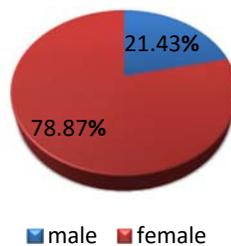


Figure 18: Répartition des souches par sexe.

1.4. Répartition des souches de *Klebsiella* par âge.

La figure 23 montre que les taux d'isolement élevés sont observés dans les catégories d'âge de 0-5ans et plus de 50 ans avec une fréquence de 22.09 % et 36.14 % respectivement.

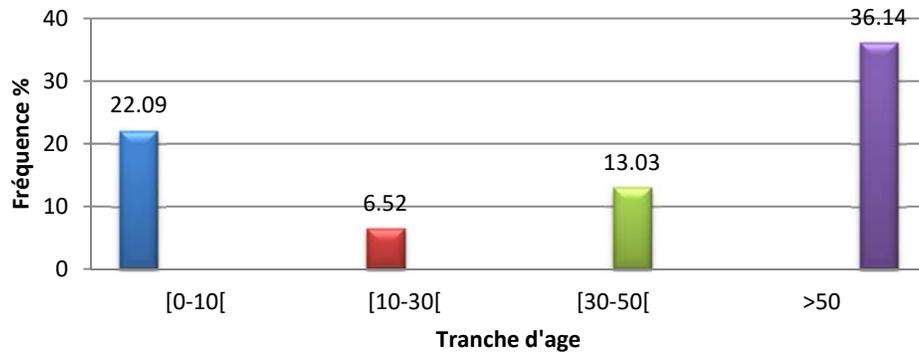


Figure 19 : La répartition des souches par âge.

1.5. La répartition des KBLSE selon les patients.

Notre étude montre que les patients hospitalisés sont les plus concernés par les KBLSE que les patients non hospitalisés. Le tableau ci-dessous montre que 80% (4/5) isolées chez les patients étaient isolées des patients hospitalisés, par contre 20% (1/5) était isolée chez les patients non-hospitalisés.

Table 5 : La répartition des KBLSE selon les patients.

patients	No. de KBLSE isolée	Fréquence (%)
hospitalisé	4	80
Non hospitalisé	1	20
Total	5	100

1.6. La répartition des souches KBLSE selon les services de l'hôpital.

On a isolé 2 souches de KBLSE à partir des prélèvements de service de Pneumonie et 3 souches de service de diabète.

Tableau 6 : la répartition des KBLSE selon les services d'hospitalisation.

service	Nombre de souches	Fréquence en %
Pneumonie	2	40
Diabète	3	60
Total	5	100

2. Le Profil de sensibilité globale de *Klebsiella spp.* aux antibiotiques.

Klebsiella spp. présente une résistance naturelle (chromosomique) aux pénicillines, et peut acquérir des résistances multiples. Selon nos résultats 50% des souches étaient résistantes à l'association amoxicilline-acide clavulanique, 83.33% à la pipéracilline. Le taux de résistance acquise à la cefazoline s'élève à 77.78% et il est de 61,11% pour le céfotaxime, 44.44% pour le ceftazidime et 11.11% pour le ceftriaxone. Concernant le monobactam (aztreonam), on constate une résistance de 66.67%. En revanche les souches restent à 83.33% sensibles aux céphamycines (cefotétane) et 94.44% à l'imipénème.

Concernant les aminosides, on assiste à une résistance assez marquée pour la gentamicine, la tobramicine et la kanamicine 72.22%, 66.67% et 61.11% respectivement. Cette importante résistance concerne aussi les Tétracyclines ; la Doxycycline et la Tétracycline avec 77.78% et 50% respectivement.

Une bonne activité est enregistrée pour les fluoroquinolones ; on a enregistré que 5.56% de souches sont résistantes à l'Ofloxacine et 16.67% la Norfloxacine. Cependant un taux de résistance important est noté pour l'acide nalidixique qui passe à 33.33%, ce qui pourrait refléter l'usage commun de cet antibiotique et ce fait signale l'existence d'un bas niveau de résistance aux fluoroquinolones.

Pour les sulfamides, 66.67% de souches résistent à l'association triméthoprim + sulfaméthazole et 55.56% au sulfamide.

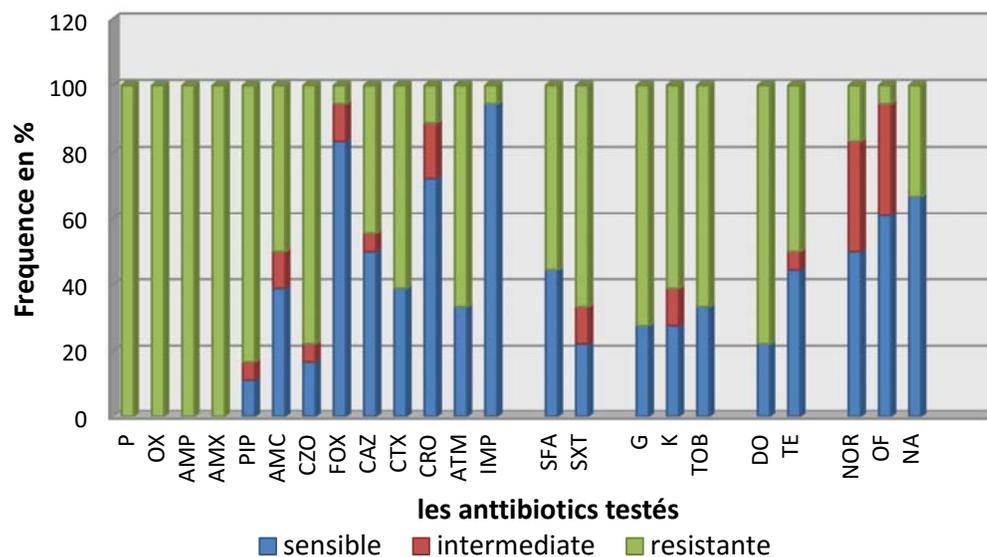


Figure 20: Le Profil de sensibilité globale de *Klebsiella spp.* aux antibiotique

3. Fréquence des souches de *Klebsiella* productrices de bêta-lactamase à spectre étendu.

Au total, nous avons relevé la présence de 6 souches de *Klebsiella* productrices de bêta-lactamase à spectre étendu, provenant de 5 patients et eau, réparties comme suit : 5 souches *Klebsiella pneumoniae*, et une souche de *Klebsiella ornithinolytica*.

Les photos ci-dessus montrent le bouchon en champagne.

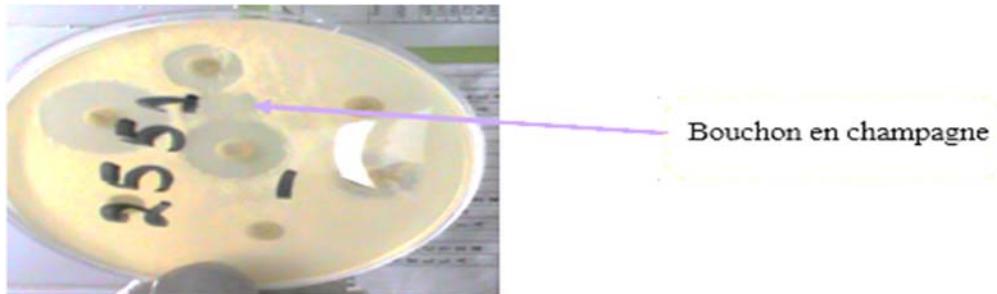


Figure 21 : L'apparition de bouchon en champagne

4. La sensibilité aux antibiotiques de souche *Klebsiella spp.* productrices de BLSE. 4.1. Sensibilité aux β -lactamines.

Les résultats de l'étude de la sensibilité des isolats de *Klebsiella spp.* productrices de BLSE aux 13 différents bêta-lactamines utilisés montrent que toutes les souches sont 100% résistantes à l'amoxicilline, ampicilline, oxacilline, cefazoline et la pipéracilline. Ainsi, les souches étaient résistantes à la plupart des céphalosporines de 3^{ème} génération et l'aztréonam, sauf le ceftriaxone où (66.67%) de souches *Klebsiella spp.* productrice de BLSE étaient sensibles à cet antibiotique.

En ce qui concerne la résistance aux β -lactamines associés à l'acide clavulanique, on assiste à une résistance très remarquable vis-à-vis l'association amoxicilline+ acide clavulanique.

En revanche, les associations C3G/AMC augmentent la sensibilité à ces antibiotiques ; 16.67% à 50% pour le ceftazidime, 16.67 à 33.33% pour le cefotaxime et la résistance au 33.33% à 16.67% l'association ceftazidime + AMC était la plus actif.

Nous avons signalé aussi dans ce travail, la présence d'une souche de *Klebsiella ornithinolytica* résistante à la céfotétane, suggérant la possible production d'une céphalosporinase plasmidique de type AmpC.

L'imipénème reste l'antibiotique de choix avec la sensibilité de 83.33%.

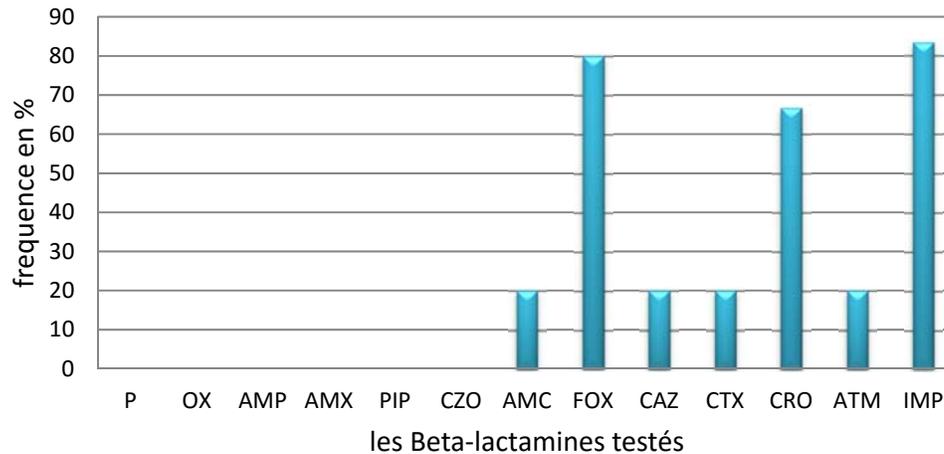


Figure 22 : La sensibilité aux β -lactamines de souches *Klebsiella spp.* productrices de BLSE.

4.2. Sensibilité aux autres antibiotiques

➤ Aminocyclitolides

Les souches KBLSE présentent des taux de résistance très importants, soit 100% aux kanamycine (K) et tobramycine (TOB) et 83.33% aux gentamicines (G), ce qui présente un fort risque d'échec thérapeutique.

➤ Fluoroquinolones et quinolones.

La résistance de souches KBLSE aux Céphalosporines de 3^{ème} génération par production de BLSE est associée à une résistance aux quinolones où elle a été observée chez 50% des souches de *Klebsiella spp.* Productrices de BLSE isolées.

La résistance de souches KBLSE aux quinolones et fluoroquinolones est de 50 % pour l'acide nalidixique, 16.67% pour l'Ofloxacin et de 33.33 % pour la Norfloxacin.

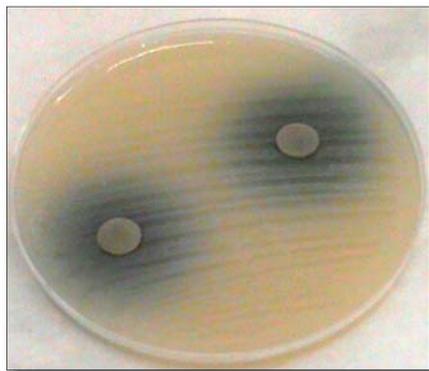
➤ **Autres antibiotiques.**

L'étude de la sensibilité aux autres familles d'antibiotiques a révélé aussi des profils de résistance de la majorité de souches au Doxycycline, Tétracycline, l'association sulfaméthaxazole + triméthoprim et les sulfamides.

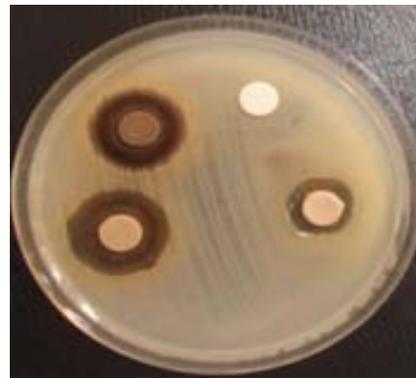
Les souches KBLES étaient résistantes 50% (3/6) à la tétracycline, 83.33% (5/6) à l'association sulfaméthoxazole + triméthoprim, et 66.67% ((4/6) pour Doxycycline et les sulfamides.

5. Les activités antibactériennes des extraits aqueux de *Punica granatum*.

D'après nos résultats obtenus de l'aromatogramme, on remarque une résistance totale des 6 souches à l'extrait aqueux de *Punica granatum* ces résultats sont contradictoires avec les résultats trouvés par Debib et al., 2014b sur des souches de *Klebsiella spp.* isolées des patients dans la wilaya de mascara avec des diamètres qui varient entre 23 et 29 mm.



(A)



(B)

Figure 23 : Comparaison de nos résultats de l'aromatogramme (A) avec les résultats trouvés par Debib et al., 2014b

Discussion générale

Au cours de notre étude, nous avons présenté les principales caractéristiques épidémiologiques de souches de *Klebsiella spp.* isolées entre Février et Avril 2016 au laboratoire d'hygiène de wilaya et l'hôpital Fabor et évalué l'activité des β -lactamines, des aminosides, et des quinolones, principaux antibiotiques bactéricides, sur ces souches présentant différents phénotypes de résistance, en plus de la sensibilité de la *Klebsiella spp.* aux extraits d'écorce aqueuses de *Punica granatum*.

1. Fréquence d'isolement de *Klebsiella spp.*

1.1. La prévalence et la répartition des souches *Klebsiella spp.*

Dans notre étude, nous avons isolé 18 *Klebsiella spp.* Sur les 152 échantillons (11,84%), cette valeur est légèrement inférieure aux valeurs obtenues à partir de différentes parties de l'Algérie qui varient entre 13% et 21,5% (Nedjai et al, 2010 ; Medboua, 2011; Sekhri-Arafa, 2011, Alima et al., 2012 et Lagha, 2015). D'autre part, nos résultats sont bien au-dessus 36/803 (4.48%) de ceux de Abouddihaj et al., 2011 au Maroc

Sur les 18 *Klebsiella spp* isolé, 14 (77,78%) d'entre eux étaient *Klebsiella pneumoniae*, 2 étaient *K. oxytoca* et 2 étaient *K. ornithinolytica*, ceci est en accord avec de nombreuses autres publications qui mettent *K. pneumoniae* comme l'agent pathogène leader parmi le genre *Klebsiella* qui provoque des infections humaines (Takafumi et al, 2015 ; Livermore, 2012 ; Shahab, 2015; Holt et al.2015). *Klebsiella pneumoniae* a été rapporté dans les deux infections nosocomiales et communautaires acquises (Janda et Abbott, 2006).

K. pneumoniae est classé deuxième position après *E. coli* en provoquant les infections des voies urinaires (Alima et al,2012 ; Bouamri et al.,2014) tandis qu'en Turquie, Mustafa et Yusuf a rapporté que *K. pneumoniae* est une cause majeure d'infections nosocomiales, y compris les infections des voies urinaires et bactériémie. (Mustafa et Yusuf, 2009).

1.2. La prévalence et la répartition des souches KBLSE.

Durant notre travail, nous avons relevé la présence de 6 souches de *Klebsiella* productrices de Beta-lactamase à spectre étendu, provenant de 5 patients et eau, réparties comme suit : 5 souches *Klebsiella pneumoniae*, et une souche de *Klebsiella ornithinolytica*.

En effet, les bactéries productrices de BLSE ont été décrites pour la première fois dans les années 80 en Allemagne, en France c'est en 1985 que les premières BLSE ont été décrites. Dans les années qui ont suivi, la prévalence des BLSE n'a cessé de croître et même sur d'autres continents, de plus en plus de souches BLSE ont été isolées (Coudron et al., 1997 ; Winokur et al., 2001).

Les infections causées par les *Klebsiella* BLSE présentent un risque accru d'échec thérapeutique et sont associées à des hospitalisations prolongées et des surcoûts liés aux soins (Talon, 1999 ; Stone-Patricia et al., 2003 ; Rodriguez et Struelens, 2006). Les bactériémies causées par les souches *Klebsiella* BLSE+ sont retrouvées associées à une mortalité plus élevée que celle causées par des souches *klebsiella* non productrices de BLSE.

Cette mortalité élevée est en partie due d'une part à la non détection de la production de la BLSE (Navon-Venezia et al. 2004 ; Bailly et al., 2004) et d'autre part, la présence de plasmides conjugatifs qui peuvent porter plus d'un gène codant pour ces BLSE, comme c'est le cas de l'épidémie à *Klebsiella pneumoniae* BLSE+ au Brésil où des gènes codant pour les enzymes CTX-M et TEM ont été identifiés sur le même plasmide (De Rafales et al., 2003). Ces données entraînent des mesures de surveillance, de contrôle et de détection rapide des BLSE (Navon-Venezia et al., 2004) pour empêcher la propagation de ce type de mécanisme de résistance.

La répartition géographique des *Klebsiella* BLSE+ n'est pas homogène et la prévalence varie considérablement d'une région à une autre. Sahly et al (2004) rapportent que l'incidence des souches de *Klebsiella pneumoniae* BLSE+ varie de 8% en Amérique du nord à 45% en Amérique Latine et 23% en Europe, avec une prévalence dominante aux USI, avec des taux allant de 9% au sud de l'Allemagne à 40% en France, 49% au Portugal et 59% en Turquie. Dans les hôpitaux du sud de l'Europe, la prévalence au niveau des *Klebsiella* BLSE+ atteint les 25%, tandis que parmi les

consultants externes elle est estimée à 4% (Zingg, 2008). Aux USA une fréquence de 23% est enregistrée parmi les externes (CDC,2013). En Asie, souches *Klebsiella spp.* BLSE+ étaient 50% des isolates de *klebsiella spp.* (Mohnarin 2011). Au niveau national, le Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des bactéries aux antibiotiques, indique une incidence de 52.47% de *Klebsiella spp.* BLSE+ (AARN, 2016), ce résultat éloigné des résultats de notre étude (33.33%).

2. Sexe

Notre étude montre que la fréquence de *Klebsiella spp.* est inférieure chez le sexe masculin (21.43%) par rapport au sexe féminin (78.87%). Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Nedjai et al (Nedjai et al. 2012) et Rodriguez-Bano et al., (Rodriguez-Bano et al. 2008b). Néanmoins, d'autres études ont conclu à un risque plus élevé pour les hommes (Colodner et al. 2004 ; Gupta et Datta. 2007 ; Labid et al.,2014).

Notre étude montre que le sexe est un facteur de risque pour l'infection par *K. pneumoniae* BLSE+, en effet sur les 5 souches *K. pneumoniae* BLSE+ isolées chez les patients, 5 proviennent de patients de sexe féminin et non de patients de sexe masculin. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Nedjai et al (Nedjai et al. 2012). Par contre, nos résultats sont en contradiction avec ceux rapportés par Colodner et al 2004 qui rapportent qu'il y'a augmentation significative chez le sexe masculin : 13.7% dans le groupe *K. pneumoniae* BLSE négative à 35.9% dans le groupe *K. pneumoniae* BLSE+, ce même auteur ajoute aussi, être âgé de plus de 60 ans, être diabétique, et avoir pris des antibiotiques à large spectre constituent d'autres facteurs de risque pour l'infection par des *K. pneumoniae* BLSE+. Ces facteurs de risque sont également rapportés par d'autres auteurs (Lautenbach et al., 2001 ; Tumbarello et al., 2006).

3. L'âge :

L'âge 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 spp.* (Colodner et al., 2004; White et al., 2004) et d'autres, s'accordent à dire que les plus touchés sont principalement les personnes âgées, les immunodéprimées, ainsi que les nourrissons et prématurés à faible poids (Van der Zwit et al., 1999; Ayan et al., 2003)

4. Résistance aux antibiotiques de *Klebsiella spp.*

4.1. Résistance de *Klebsiella spp.* aux β -lactamines

Il est bien connu que les β -lactamines sont les antibiotiques de premier choix pour le traitement des infections à *Klebsiella spp.* aussi bien chez l'adulte que chez l'enfant (Ayan et al., 2003; Rebeck et al., 2000; Hussein et al., 2007).

Les résultats de notre étude montrent un taux de résistance naturelle aux pénicillines ; les souches étaient 100% résistants à l'ampicilline, amoxicilline, oxacilline et pénicilline, 83.33% pour la pipéracilline, résultat éloigné de celui de Farah et al (2007), qui rapportent un taux de résistance 81% pour pipéracilline et 73% pour cefazoline. Notre fréquence élevée est probablement due soit à l'acquisition d'une pénicillinase plasmidique de haut niveau, soit à une hyperproduction de la SHV-1 chromosomique, suite à une mutation du promoteur d'où une augmentation de l'expression du gène (Courvalin, 2006).

Les inhibiteurs des β -lactamases associées aux β -lactamines, rétablissent l'action de ces antibiotiques (Li et al., 2004 ; White et al., 2004 ; Lavigne et al., 2004). Ainsi pour l'AMC on passe à 50% contre le 100% de l'AMX, dû à l'effet de l'acide clavulanique sur les β -lactamases chromosomiques (Murbach et al., 2001). On note que 50% des souches restés résistants à l'AMC, ce qui reflète une évolution des β -lactamases de ces souches de *Klebsiella*. Les enzymes en cause sont le plus souvent des TRI (TEM résistants aux inhibiteurs) (Courvalin, 2006).

Parmi les nouvelles β -lactamases à spectre élargi (BLSE) médiatrices de la résistance vis-à-vis des céphalosporines de troisième génération C3G, il convient de citer en premier lieu, le groupe CTX-M, puis les β -lactamases de type BES, GES, PLA, PER, VEB. Les CTX-M constituent une nouvelle famille d'enzymes de la classe A d'Ambler (groupe 2be de Bush) qui s'est vite élargie, et propagée à travers le monde (Lartigue et al., 2003; Gangoue-Pieboji et al., 2005; Moubarek et al., 2005; Livermore et al., 2007; Valverde et al., 2008) à cause d'un manque de détection dans beaucoup de laboratoires (NavonVenezia et al., 2004; Villegas et al., 2004). Le groupe CTX-M (pour céfotaximase) confère à l'origine, chez les Entérobactéries, un plus grand niveau de résistance au céfotaxime (ou ceftriaxone) Céfépime et aztréonam qu'à la ceftazidime (Brenwald, 2004; Hernandez et al., 2005; Phillipon et Arlet, 2006), Certaines d'entre elles ont évolué récemment par mutation ponctuelle ou non, générant un haut niveau de

résistance à la ceftazidime telles les enzymes CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-19 ou encore CTX-M-32 dérivant par simple mutation (Asp240Gly) de CTX-M-1 (Bush, 2001; Navarro et Miro, 2002; Cartelle et al 2004).

Tableau 7 : Le taux de résistance aux C3G dans des pays

PAYS	FREQUENCE en %	REFERENCE
Finlande	1.7	ECDC,2015
Bulgarie	74.8	
France	25.3	WHO,2014
United states of America	11	
Egypt	77.35	
Morocco	5.6	
India	44.7	
Algeria	46.83	
Notre résultat	38.89	AARN, 2016

La gravité de ces *Klebsiella* résistantes aux C3G est d'autant plus alarmante qu'actuellement elles ne sont plus cantonnées à l'hôpital, mais sont aussi responsables d'infections communautaires. En 2007, plus de 30% des souches isolées en ambulatoire étaient résistantes aux C3G dans une étude multicentrique en Tunisie (Boutiba et al., 2007). Les transferts horizontaux et verticaux sont responsables de la large diffusion de ces CTX-M-3 parmi les *K. pneumoniae* BLSE. L'imipénème reste la molécule la plus active, surtout vis-à-vis des *Klebsiella* BLSE, cela indiquant sa place en premier choix dans le traitement des infections sévères à bactéries multirésistantes. Dans notre étude l'apparition d'une souche *Klebsiella ornithinolytica* résistante à l'imipénème. La résistance à l'imipénème est probablement liée soit à un phénomène d'imperméabilité associé à une modification des porines membranaires, soit à une production de carbapénèmases (Nordman et Poirel, 2002 ; Urban et al., 2004).

Les carbapénèmes représentent la dernière ligne de défense dans l'armement antimicrobien contre les infections sérieuses ou invasives (Friedland et al 2003 ; Hussein et al., 2007 ; Dylan et al.,2009). Aujourd'hui, de nombreuses études montrent une rapide dissémination des *Klebsiella* productrices de carbapénèmases, spécialement en Grèce

(ECDC,2015) et au nord des Etats Unis (Bratu et al., 2005 ; Dylan et al., 2009) où des épidémies à *K. pneumoniae* carbapénèmes résistantes (KPCR) sont enregistrées.

Tableau 8 : le taux de souches des *Klebsiella* spp. résistantes à l'imipénème de différents pays.

Pays	Fréquence en %	Référence
Algérie	1.69%	AARN,2016
Iran	1%	Mohammad et al., 2015
South Africa	2%	CDDEP,2015b
India	57%	
Australie	1%	AGAR,2014
Greece	60.5%	ECDC,2015
USA	11%	CDC,2013
Notre résultat	1/18 (5.56%)	

4.2. Résistance de *Klebsiella* spp. aux aminosides :

Dans notre étude *Klebsiella* spp. a une sensibilité diminuée vis-à-vis des aminosides, 72.22% d'isolats résistants à la gentamicine, 66.67% à la Tobramicine et 61.11% à la Kanamicine. Nos résultats sont éloignés de ceux reportés par le Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques avec un taux de résistance 46.99% pour la gentamicine (AARN,2016) et de celui rapporté en Iran avec un taux de résistance 50.9 (Azar et al.2013). En revanche, nos résultats sont en accord avec ceux rapportés en Naples avec un taux de résistance à la gentamicine 72.84% (Shristi et al.,2015).

La résistance aux aminosides est due principalement à l'inactivation enzymatique de l'antibiotique, par acétyl-, phosphoryl- ou nucléotidyl-transférase ; tout à fait, il y a plus de 150 gènes connus différents codant pour ces enzymes. (Carlos et Amabile,2016)

Nos résultats montrent des résistances croisées parmi les aminosides. Ce phénomène est dû au bifonctionnel acétyl- et phosphoryl-transférase qui inactive la plupart des aminosides en usage clinique (Carlos et Amabile.,2016).

La résistance aux aminosides est associée à la résistance acquise aux β -lactamines. 92.3% (12/13) des souches résistantes à la gentamicine étaient aussi résistantes aux C3G.

Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par de nombreux auteurs qui indiquent que la résistance aux aminosides est souvent associée à la résistance aux β -lactamines, résistances médiées par le même plasmide (Winokur et al 2000 ; Bergogne-Berézin 2000 ; Quentin et al., 2004). Il existe une corrélation significative entre l'apparition de mutants résistants et surtout des résistances plasmidiques et l'usage des aminosides (Harbarth et al., 1998 ; Zwet et al., 1999 ; Lambert et Courvalin, 2000 ; Quentin et al., 2004).

4.3. Résistance aux quinolones

Dans notre étude les quinolones et les fluoroquinolones conservent une bonne activité, vis-à-vis de *Klebsiella spp.* L'acide nalidixique marque une fréquence de 33.33% qui se rapproche de celle rapporté au niveau nationale par le Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des bactéries aux antibiotiques, (AARN,2016) avec un taux de résistance de 36.51% mais qui se basé de celle d'Iran à 53.85% (Latifar et al.,2012). En revanche pour les fluoroquinolones (Norfloxacin et ofloxacin), nos isolats restent des moins résistantes avec des taux de 16.67% et 5.56% respectivement.

Au niveau moléculaire la résistance aux quinolones est généralement acquise par des mutations chromosomiques plutôt que par échange de plasmides (. Winokur et al, 2000 ; Wang et al., 2004).

Dans la plupart des cas, la résistance élevée aux fluoroquinolones est due à la mutation chromosomique dans les gènes *gyr A* et *C* ou changement de perméabilité ou efflux, reflétant la pression de sélection dans l'environnement clinique (Hooper, 2001 ; Robert et al, 2001).

4.4. Résistance aux d'autres antibiotiques

4.4.1. Résistance au Sulfamides. (L'association triméthoprime + sulfaméthaxazole et sulfamide) :

Pour l'association sulfamides-triméthoprime, les mécanismes de résistance sont nombreux mais le principal est le support plasmidique. Pour les sulfamides 3 gènes de résistance (Sul I, Sul II, Sul III) codent pour l'enzyme DHPS, la dihydroptéroate-synthétase, conférant une grande résistance (Golstein, 2007). 66.67% de nos souches sont résistantes à cet antibiotique. Au niveau national le réseau de surveillance de 2014 rapporte un taux de 53.33% (56.29% hospitalières et 45.99% externes) (AARN,2016).

4.4.2. Résistance aux tétracyclines (la Doxycycline et la Tétracycline) :

Tétracyclines inhibent la synthèse bactérienne de protéines en se liant à la petite sous-unité ribosomique, le blocage de la fixation des aminoacyl-ARNt au site A (Carlos et Amabile, 2016). Notre étude a révélé un taux de résistance de 63,89 % à tétracyclines qui est un peu plus élevé à celui rapporté par Touati et al., Qui a rapporté un taux de 58,8% (Touati et al., 2012). Il y a plus de 40 gènes médiateurs de résistance à la tétracycline. La plupart d'entre eux codent pour des pompes à efflux spécifiques, tandis qu'environ 10 médient un mécanisme de protection ribosomique et 5, une enzyme inactivant (Carlos et Amabile,2016).

4.5. Les souches de *Klebsiella spp.* Pan-résistantes :

Une souche est dit pan-résistante lors que cette souche est résistante aux tous les antibiotiques testés. Les souches *Klebsiella spp.* pan-résistantes ont été identifiées dans le sous-continent indien (Kumarasamy et al, 2010 ; Livermore, 2012). Dans notre étude, nous avons isolée une seule souche (1/18) qui était pan-résistante. Cela se produit lorsqu'une souche a acquis de multiples méthodes de résistance aux antibiotiques. (Livermore, 2012)

5. La sensibilité des *Klebsiella spp.* vis-à-vis les extraits aqueux de *Punica granatum* :

Notre résultats d'activité antibactérien de *Punica granatum* était négative (absence de zone d'inhibition). Notre résultat était en accord avec les résultats trouve par Abdalnabi et al 2008 ou il a utilisé 3 extraits acquêt de plantes Cumin (*Cuminum cyminum*), Harmal (*Peganum harmala*) et Pomegranate (*Punica granatum*) pour déterminer leur activité antimicrobienne contre *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*. Dans leur étude l'extrait aqueux de *P. granatum* a révélé une activité antibactérienne la plus élevée contre les 2 première bactéries sauf pour *Klebsiella pneumoniae*.

On a aussi confirmé nos résultats avec celui trouve par Elkamali et al 2015 ou ils sont trouvés que le péricarpe de *P. granatum* était efficace contre les bactéries teste (*Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* *E. coli* et quelques isolats de *Salmonella typhi*.) mais chez *Klebsiella pneumoniae* et quelques isolats de *S. typhi* il était trouvé inefficace. Cette résistance peut être due à la structure physiologique de la bactérie qui inclut la perméabilité de la paroi cellulaire (Adwan et al 1996).

Néanmoins notre résultat était en contradiction avec les résultats de Debib et al., 2014 et ceux trouvés par Estherlydia et al 2013 ou ils ont confirmé la sensibilité de microorganismes orales y compris *K. pneumoniae* vis-à-vis un d'un extrait de *P. granatum*. Alya'a et al 2014 ils ont aussi conformé l'efficacité des extraits des *P. granatum* contre les bactéries tel que *K. pneumoniae* et *Streptococcus spp.* La différence dans les résultats pourrait être dû à la différence dans les procédés d'extraction utilisés par les différents groupes, ou en raison du fait que notre extrait été stocké qui a déstabilisé les composants actifs de l'extrait car ils sont instables.

Conclusion

En conclusion, la diffusion de souches multi-résistantes, de *Klebsiella spp.* dans nos hôpitaux constitue une menace de santé publique, réduisant de manière importante les alternatives thérapeutiques pour le traitement des infections sévères.

Pour cela, l'émergence de ces souches permet de rappeler qu'il est évidemment nécessaire d'être attentif aux divers types de souches qui circulent dans nos hôpitaux. La gestion du risque infectieux que représente la diffusion de souches multi-résistantes exige une collaboration étroite entre les différents acteurs de santé concernés (médecins cliniciens, infectiologues, bactériologistes, hygiénistes, personnels soignants...).

Dans notre étude la plus grande résistance a été observée contre les pénicillines (100%) et le taux le plus bas de la résistance a été observée pour l'imipénème (5,56%). Amoxicilline-acide clavulanique a été la première combinaison d'inhibiteurs β -lactamines / bêta lactamase approuvé pour une utilisation dans la pratique clinique, et est utilisé principalement comme une préparation orale, efficace contre pénicillinase bactéries productrices, y compris *E. coli*, *Klebsiellae spp.*, les résistances enregistrées à l'amoxicilline-acide clavulanique (50%) dans cette étude est probablement due à l'utilisation fréquente de cet antibiotique pour traiter les infections causées par les espèces des entérobactéries.

Le taux de productrices de BLSE *Klebsiella spp.* était de 33,33% dans la présente étude montre que ceux-ci sont fréquentes dans notre milieu hospitalier avec résistance à de nombreuses classes d'antibiotiques, ce qui entraîne des options de traitement limitées. La gestion des infections résulté de ces organismes est difficile et plus complexe, en particulier dans les cas graves. Par conséquent, la réalisation d'études moléculaires et épidémiologiques aidera à identifier les différents types de BLSE et l'établissement du matériel de contrôle pour ces souches afin de prévenir et de réduire leur propagation

Les KPC multirésistantes et même les pan-résistantes (c'est-à-dire les bactéries résistantes à toutes les classes d'antibiotique disponibles) peuvent être la source d'impasses thérapeutiques, puisque les antibactériennes nouvelles ne sont pas attendues dans un avenir proche.

Des mesures d'hygiène strictes restent indispensables au sein des services pour limiter la diffusion de ces souches multi-résistantes, on note : L'hygiène des mains, tenue

de protection, port de gants, gestion du matériel et des surfaces souillées, circuit du linge, des déchets et des prélèvements biologiques, la détection précoce des porteurs lors de leur admission à l'hôpital et le renforcement des mesures d'hygiène autour des patients porteurs (application des précautions contact).

La lutte contre l'émergence et la diffusion de ces souches multi-résistantes aux antibiotiques passe enfin par une meilleure et moindre utilisation des antibiotiques. En effet, une politique d'antibiothérapie justifiée et/ou d'une restriction dans la prescription des céphalosporines de troisième génération et même de toutes les céphalosporines conduisent à une diminution significative de la fréquence de BLSE

Nous avons noté la présence de *Klebsiella spp.* à partir des eaux usées de l'hôpital. Les souches isolées montraient divers mécanismes de résistance aux antibiotiques et ces souches résistantes peuvent causer des infections aux êtres-vivants (Les Hommes et les animaux) en bonne santé. Pour réduire au minimum la propagation des isolats résistants aux médicaments de l'hôpital à l'environnement est, donc de bonnes méthodes de stérilisation de sécurité cruciales à adopter avant la libération des matières résiduelles à l'environnement ou des eaux usées.

Finalement la résistance de nos souches à l'extrait aqueux de grenade montre clairement la virulence de ces dernières malgré que l'effet antibactérien de cet extrait et confirmé par plusieurs études.

References

bibliographique

- Abouddihaj B., Fatima E. Mustapha T., Fatna B., Fatima H. Khalid Z., et Mohammed T. (2011). Characterization of extended-spectrum b-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from the community in Morocco. *Journal of Medical Microbiology*, vol. 60, 1344–1352
- Abraham E., and Chain E. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*. 146: 837
- Abraham E., Baker W., Boon W., Calam C., Carrington H., Florey H., Freeman G., Robison R., and Sanders A., (1949). *Chemistry of penicillin*. Edited by Clark H.T. University Press, Princeton
- Abraham, E. and Newton G., (1961). The structure of cephalosporin C. *Biochem J.*; 79:377–93
- Ahmad I., and Beg A. (2001). Antimicrobial and photochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *J. Ethnopharmacol.*, 74: 113-123
- Alima G., Abdelaziz T., Said B., Thomas G., Lucien B., Jannick M. and De Champs C. (2012). CTX-M from community-acquired urinary tract infections in Algeria. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 6(25), pp. 5306-5313
- Ambler, R. (1980). The structure of β -lactamases. *Phil Trans R Soc Lond Biol Sci.* 289: 321331
- Arlet G., and Philippon, A. (2003). Les nouvelles β -lactamases à l'aube du troisième millénaire. *Rev Franç Lab.* 352 : 41-55.
- Arlet G., Sanson-le-Pors M., Rouveau M., Fournier G., Marie O., Schlemmer B., and Philippon, A. 1990. Outbreak of nosocomial infections due to *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-4 beta-lactamase. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 9(11): 797-803
- Astagneau P. and Lepoutre A., (2002). La mortalité attribuable aux infections hospitalières. *Adsp* 38: 27-9.
- Australian Group on Antimicrobial Resistance (AGAR). 2014. *Enterobacteriaceae Sepsis Outcome Programme, 2013 Antimicrobial Susceptibility Report*.34p. Perth.
- Aviram M., Rosenblat A., Gaitini D., Nitecki S., Hoffman A., Dornfeld L., Volkova N., Presser D., Attias J., Liker H. and Hayek T. (2004). Pomegranate juice consumption for

3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clin Nutr.*, 23 3:423-433.

Ayan M., Kuzucu C., Durmaz R., Aktas E. and Cizmeci Z. (2003). Analysis of three outbreaks due to *Klebsiella* species in a neonatal intensive care unit. *J Infect Control Hosp Epidemiol* 24: 495-500

Azar D., Hajar H. and Manijeh M. (2013) prevalence of *klebsiella pneumoniae* Encoding genes for CTX-M-1,TEM-1 and SHV-1 Extended spectrum beta lactamases (ESBL) Enzymes in clinical specimens. *Jundishapur j microbiol*,6(10): e8256

Bailly P., Haore H., Crenn D. and Talon D. (2004). Mortalité hospitalière imputable aux infections nosocomiales: mise en place d'un observatoire dans un centre hospitalier universitaire. *J Médecine et maladies infectieuses* 34: 76-82

Ball P. Shales S. and Chopra I. (1980). Plasmid-mediated tetracycline resistance in *Escherichia coli* involves increased efflux of the antibiotic. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 93:74–81

Bambeke, V. F., Balzi, E. and Tulkens, P. M. (2000). Antibiotic efflux pumps. *Biochemical Pharmacology* 60: 457–70.

Behrens O. Corse J., Huff D. Jones R. and Soper Q. (1948). Whitehead CW. Biosynthesis of penicillins III. Preparation and evaluation of precursors of new penicillins. *J Biol Chem.*; 175:771–92

Bergogne-Bérézin E .2000. Optimiser l ' efficacité des antibiotiques/minimiser la résistance aux antibiotiques : un paradigme pour le nouveau millénaire. *J antibiotiques* 2 : 202-208

Bergogne-Bérézin E. 2002. Modes d'administration des antibiotiques et émergence de résistance chez les bacilles à Gram négatif. *J Antibiotiques* 4: 2836-2841.

Bisson G., Fishman N., Patel J., Edelstein P., and Lautenbach E. (2002). Extended-spectrum b-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species: risk factors for colonization and impact of antimicrobial formulary interventions on colonization prevalence. *Infect Control Hosp Epidemiol*; 23: 25460.

- Bonnet R. (2004). Growing group of extended-spectrum-beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 1–14.
- Bouamri M., Arsalane L., Kamouni Y. et Zouhair S., (2014). Antimicrobial susceptibility of urinary *Klebsiella pneumoniae* and the emergence of carbapenem-resistant strains: A Retrospective study from a university hospital in Morocco, North Africa. *African Journal of urology*, 21: 36-40.
- Boutiba I., Ghozzi R., Jouaihia W., Mahjoubi F., Thabet L., Smaoui H., Ben Hassen A., Hammami A., Kechrid A. and Ben Redjeb S. (2007) Résistance bactérienne aux antibiotiques en Tunisie : Données de 1999 à 2003. *Rev Tun Infectiol*;1(4):5-11.
- Bradford P. (2001). Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *J Clin Microbiology* 14: 933-51
- Braga L., Shupp J., Cummings C., Jett M., Takahashi J., Carmo L., Chartone-Souza E. and Nascimento A. (2005) Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. *J Ethnopharmacol*; 96(1-2):335-9
- Bratu S., Landman D. and Haag R. (2005). Rapid spread of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *J Arch Intern Med* 165: 1430-5.
- Brenwald N., Jevons G., Andrews J., Xiong J., Hawkey P. and Wise R. (2004). An outbreak of CTX-M-type β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: the importance of using cefpodoxime to detect extended-spectrum β -lactamases. *J Antimicrobiol Agents Chemother* 46:871-3.
- Bush K. (2001). New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis.* 32: 1085-1089
- Bush K. et Jacoby G. (2010). Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.54 (3): 969-976.
- Bush K., Jacoby G. and Medeiros, A. (1995). A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39(6): 1211-1233.

Buynak J. (2006). Understanding the longevity of the β -lactam antibiotics and of antibiotic/ β -lactamase inhibitor combinations. *Biochem. Pharmacol.*, 71:930–940

CA-SFM. 2010. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Communiqué 2010. Société Française de Microbiologie, Paris, France: <http://www.sfm.asso.fr>

Carlos F. et Amabile C. (2016) *Antibiotics and Antibiotic Resistance in the Environment*. Taylor and Francis Group. 120p, London.

Cartelle M., Del Mar Thomas M., Molina F., Moure R., Villanuova R. and Bou G. (2004): High level Resistance to ceftazidime conferred by Novel enzyme CTX-M-32, derived from CTX-M-1 through a single Asp 240-Gly Substitution. *Antimicrob Agents Chemother.* 48 : 2308-2313

Cattoir V. (2008). Les nouvelles β -lactamases à spectre étendu (BLSE). *Pathologie infectieuse en réanimation* : 203-209.

Cavallo J., Fabre R., Jehl F., Rapp C. et Garrabé E. (2004). Bêta-lactamines. *EMC Maladies Infectieuses*. 1: 129-202

Center for Disease Dynamics, Economics & Policy (CDDEP). 2015. Drug Resistance Index. Accessed on April 20, 2016. Retrieved from <http://www.cddep.org/projects/resistance-map/drug-resistance-index-urinary-tract-and-skin-infections>.

Chain, E. (1979). The early years of the penicillin discovery. *Trends Pharmacol Sci.*; 1:6–11.

Christoph H., Cord L., Eckhard B., Irmgard T., Rudolf S., Gregor G., Robert K., Nikolas G., Guenter J. and Thomas A. (2006). *Klebsiella oxytoca* in Antibiotic-Associated Colitis. *n engl j med* 355;23 www.nejm.org.

Colodner R., Rock W., Chazan B., Keller N., Guy N., Sakran W. and Raz R. (2004). Risk Factors for development of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Bacteria in Nonhospitalized Patients. *Eur J Microbiol Infect Dis*. 23: 163-167.

Condron P., Moland E. and Sanders C. (1997) Occurrence and Detection of Extended spectrum β -lactamase in Members of the family Enterobacteriaceae at a Veterans Medical center: Seek and you May find. *J clin Microbiol* 35: 2593-259

- Coudron P., Hanson N. and Climo M. (2003). Occurrence of extended-spectrum and AmpC β -lactamases in bloodstream isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiology* 41: 772-7
- Courvalin P., Leclercq R. and Bingen E. (2006). *Antibiogramme*. 141. ED. Masson. De
- Rafales C.A, Carmo J.R, Sader H.S, Medeiros E.A, Vicentim E, Silva R.M. 2003. Première description de CTX-M β -lactamase de *Klebsiella pneumoniae* au Brésil. *J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy* 43: 52-4.
- D'Agata E., Gerrits M., Tang Y., Samore M. and Kusters G. (2001). Comparison of Pulsed-Field Electrophoresis and Amplified Fragment-Length Polymorphism for Epidemiological Investigations of Common Nosocomial Pathogens. *J Infection Control and Hospital Epidemiology* 22: 550-54
- Datta N., and Kontomichalou P. (1965). Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature* 208: 239-241
- De Champs C., Sirot D., Chanal C., Poupart M., Dumas M., and Sirot J. (1991). Concomitant dissemination of three extended-spectrum β -lactamases among different *Enterobacteriaceae* isolated in a French hospital. *J Antimicrobial Chemother.* 27: 441–447.
- Debib A., Tir-Touil A., Mothana R. A. and Meddah B. (2014b.) Antibacterial activity of Algerian *Punica granatum* Linn. extracts (Juice, pericarp and seed) against clinical isolates of β -lactamase producing methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and extended-spectrum beta-lactamase ESBL-producing *Enterobacteriaceae*. III international conference on antimicrobial research (Book of abstracts) 1 – 3 Octobre 2014 (Madrid, Spain) consulté le 06/05/2016. <http://www.icar-2014.org/>
- Debib A., Tir-Touil A., Mothana R. A., Meddah B. and Sonnet P. (2014a). Phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of two fruit varieties of Algerian *Ficus carica* L. *Journal of Food Biochemistry* 38(2): 207-215.
- Dixit P. and Mittal S. (2013). A comprehensive review on Herbal remedies of Diuretic potential. *International Journal of Research in Pharmacy and Science.* 3(1): 4151.

Ducki S. and Blech M. (2004). Surveillance des bactéries multi résistantes en Lorraine : étude d'incidence multicentrique de trois ans. *J Médecine et maladies infectieuses* 34: 70-75

European Centre for Disease prevention and Control, ECDC, (2015) Annual epidemiological report 2014. antimicrobial resistance and healthcare-associated infection. 23P, Stockholm.

Euzéby, J. P. (2010). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47. Retrieved from <http://www.bacterio.cict.fr/m/micrococcus.html>

Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies*, 331: 372-379.

Farah A., Boutefnouchet N., Dekhil M. and Bouzerna N. (2007). *Klebsiella pneumoniae* productrice de beta-lactamases à spectre élargi (BLSE) isolées dans les hôpitaux de la ville de Annaba, Algérie. *J Scientific Study & Research VIII* (2): 199-215.

Fisher J., Meroueh S., and Mobashery S. (2005). Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chem Rev.* 105: 395-424.

Friedland I., Stinson L., Ikaidi M., Harm S. and Woods G. (2003). Resistance in Enterobacteriaceae: Results of a multicenter surveillance study, 1995-2000. *Infect control hosp Epidemiol* 24:607-612

Furneri P., Marino A., Saija N., Uccella N. and Bisignano G. (2002). In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. *Intern. J. Antimicrob.Agents*, 20(4): 293-296

Gangoue-Pieboj J., Miriagou V., Vourli S., Tzelepi E., Ngassem P. and Tzouveleki S. (2005). Emergence of CTX-M-15-producing Enterobacteriaceae in Cameroon and characterization of a blaCTX-M-15-carrying Element. *J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy* 49(1): 441-443.

Garcia-Rodriguez J. and Jones R. (2002). Antimicrobial resistance in gramnegative isolates from European intensive care units: data from the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) programme. *J.Chemother.* 14: 25–32.

George A., Jacoby M and Luisa S. (2005) The New β -Lactamases, mechanisms of disease; *N Engl J Med* 2005;352:380-91.

Gil M., Tomás-Barberán, B., Hess-Pierce D. and Holcroft M. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem* 48:4581-4589

Gill, M., Brenwald, N. and Wise, R. (1999). Identification of an efflux pump gene *pmrA*, associated with fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43: 187–9.

Goldstein F. 2007. Sulfamides et triméthoprime. In *Antibiogramme. Courvalin P. 2^{ème} ed* : 341-348.

Grall N., Andremont A. et Armand-Lefèvre L. (2011). Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse. *Journal des Anti-infectieux*. 13: 87-102

Gupta N., Limbago B., Patel J. and Kallen A. (2011). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis*. 53(1):60-7

Gupta, V., and Datta, P. 2007. Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) in community isolates from North India: frequency and predisposing factors. *Int J Infect Dis*. 11: 88-89.

Hægglman S., Löfdahl S., Burman L., (1997) An allelic variant of the chromosomal gene for class A β -lactamase K2, specific for *Klebsiella pneumoniae*, is the ancestor of SHV-1. *Antimicrob Agents Chemother*

Handwerger S. and Tomasz A. (1985). Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. *Rev. Infect. Dis*. 7:368–382. Imada, A. Kitano, K. Muroi, M. and Asai, M. (1981). Sulfazecin and isosulfazecin, novel β -lactam antibiotics of bacterial origin. *Nature*. 289:590–591

Harbarth S., Haris A. and Carmeli Y. (2001). Parallel analysis of individual and aggregated data on antibiotic exposure and resistance in Gram negative bacilli. *J Clin Infectious Diseases* 33: 1462-8

Hassanpour S., Maheri-Sis N., Eshratkhan B. and Baghbani-Mehmandar F. (2011b). Plants and secondary metabolites (Tannins): A Review. *Int. J. Forest, Soil and Erosion*, 1 (1):47-53. ISSN 2251- 6387

- Hassanpour S., Sadaghian M., MaheriSis N., Eshratkhah B. and Chaichi-Semsari M. (2011a). Effect of condensed tannin on controlling faecal protein excretion in nematode-infected sheep: in vivo study. *J. Amer. Sci.*, 7(5): 896900.
- Hedges R. and Jacob A. (1974) Transposition of ampicillin resistance from RP4 to other replicons. *Mol Gen Genet*; 132:31-40.
- Helfand M., and Bonomo R. 2003. Beta-lactamases: A survey of protein diversity. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 3(1):9–23
- Heritage J., Hawkey P., Todd N., and Lewis I. (1992) Transposition of the gene encoding a TEM12 extended-spectrum b-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*; 36:1981-6.
- Hernandez J., Martinez-Martinez L., Canton R., Coque T., Pascual A. and Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH). (2005). Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum betalactamses in Spain. *J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy* 49: 2122-2125.
- Hertog, M., Sweetnam P., Fehily A., Elwood P. and Kronhout D. (1997). Antioxidant flavonols and ischaemic heart disease in a welsh population of men. *Caerphilly Study, Amer. J. Clin. Nutr.*, 65:1489-1494
- Ho P., Chan W., Tsang K., Wong S., and Young K. (2002) Bacteremia caused by *Escherichia coli* producing extended-spectrum b-lactamase: a case-control study of risk factors and outcomes. *Scand J Infect Dis* ; 34: 567-73
- Holta K.,Wertheim H., Zadokse R., Bakerg F., Whitehouseh C., Danced D., Jenneyb A., Connork T., Li Y., Severinn J., Brisseo S., Caob H., Wilkschb J.,Gorriea P., Schultza M., Edwardsa D., Nguyenq K., Nguyenq T., Daoq T., Mensinke M., Minhg V., Nhug R., Schultszg R, Kuntaman K., Newtond P., Moored S.,Strugnellb R., and Thomsonk N. (2015). Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *PNAS*, 150:3574–3581.
- Hooper D. (2000). Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *J Clin Infect Dis* 31: S24-S28
- Hugo W. and Bloomfield S. (1971). Studies on the mode of action of the phenolic antibacterial agent fentichlor against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. 3. The

effect of fenticlor on the metabolic activities of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J. Appl. Bacteriol.*, 34(3): 579-591

Hussein K., Sprecher H., Mashiach T., Rabino G., Eluk O., Kassis I., Braun E. and Oren I. (2007). First outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella* in an Israeli university hospital. *J Infection Control and Nosocomial Infection* 24: 34-8.

Jacoby A., Mills D. and Chow N. 2004. Role of β -lactamases and porins in Resistance to Ertapenem and other β -lactams in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobiol Agents and Chemotherapy*, 48: 3203-3206

Jacoby G., and Munoz-Price L. 2005. The new beta-lactamases. *J NEJM* 352: 380391.

Janda J., and Abbott S. (2006). The Genera *Klebsiella* and *Raoultella*. *The Enterobacteria* (2nd ed., pp. 115-129). Washington, USA: ASM Press.

Kaatz G. and Seo S. (1995). Inducible Nor A-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39: 2650–2655

Kariuki S., Corkill J., Revathi G., Musoke R., Hart A., Keynan Y. and Rubinstein E. (2007). The changing face of *Klebsiella pneumoniae* infections in the community. *International journal of Antimicrobiol Agents* 6: 2474-2479

Kulkarni A. and Aradhya S. 2005. Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. *Food Chem.*, 93: 319-324

Kumarasamy K., Toleman A., Walsh T., Bagaria J., Butt F., Balakrishnan R., Chaudhary U., Doumith M., Giske C. G., Irfan S., Krishnan P., Kumar V., Maharjan, S., Mushtaq S., Noorie T., Paterson L., Pearson A., Perry C., Pike R., Rao B., Ray U., Sarma B., Sharma M., Sheridan E., Thirunarayan M. A., Turton J., Upadhyay S., Warner M., Welfare W., Livermore M. and Woodford, N. (2010). Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 10(9), 597-602. doi:10.1016/S1473-3099(10)70143-2

Labid A., Gacemi K., Timinouni M., Amoura K. and Rolain J. (2014). High prevalence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producers in fatal cases of pediatric septicemia among the Enterobacteriaceae in the pediatric hospital of Annaba, Algeria. *Vol. 8(9)*, pp. 947-954.

Labid A., Gacemi-Kirane D., Timinouni M., Amoura K., and Rolain J.M. (2014). High prevalence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producers in fatal cases of pediatric septicemia among the Enterobacteriaceae in the pediatric hospital of Annaba, Algeria. *Afr. J. Microbiol. Res.* 8(9) : 947-954

Lagha N. (2015). Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) isolées de l'hôpital de Laghouat. Thèse de Doctorat, Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen. 84 P.

Lambert T. and Courvalin P. (2000). Entérobactéries et aminosides. In Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C (eds). *Précis de Bactériologie Clinique*. ESKA, Paris 666-677.

Lartigue M., Poirel L., Héritier C., Tolun V. and Nordmann P. (2003). First description of CTX-M-15 producing *Klebsiella pneumoniae* in Turkey. *J Antimicrobiol Chemotherapy* 52: 315-316.

Lautenbach E., Patel J.B., Bilker, W., Edelstein P. and Fishman N. (2001). Extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk

Lavigne J., Bonnet R., Michaux-Charachon C., Jourdan J., Caillon J. and Sotto A. (2004a.) Post-antibiotic and post β -lactamase inhibiteur effects of ceftazidime plus sulbactam on extended spectrum β -lactamase producing Gram-negative. *J Antimicrobiol Chemotherapy* 53, 616-619.

Li C., Nicolau D., Lister P., Quintilliani R. and Nightingale C. (2004). Pharmacodynamic study of β -lactams alone and in combination with β -lactamase inhibitors against *Pseudomonas aeruginosa* possessing an inducible β -lactamase. *J Antimicrobiol Chemotherapy* 53:297-304

Li X. Livermore D. and Nikaido H. (1994). Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* resistance to tetracycline,

Livermore D. (2012). Fourteen years in resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 39(4):283-94.

Livermore D. and Williams J. (1996). Mode of action and mechanisms of bacterial resistance. In V. Lorian (Ed.), *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4th Ed. New York, Williams and Wilkins, Baltimore 502-578.

Livermore D. and Woodford N. (2006). The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. Trends Microbiol 14: 413-420

Livermore D., Canton R., Gniadkowski M., Nordmann P., Rossolini M., Arlet G., Poirel L. and Woodford N. 2007. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. J Antimicrob Chemother. 59(2): 165-174

Lucet J., Chevret S., Decre D. (1996) Outbreak of multiply resistant enterobacteriaceae in an intensive care unit: epidemiology and risk factors for acquisition. Clin Infect Dis ;22 :430-6.

Lucet J., Decré D., Fichelle A., Joly-Guillou M., Pernet M., Deblangy C., Kosmann M.J., and Regnier B. (1999). Control of a prolonged outbreak of extended-spectrum β lactamase-producing enterobacteriaceae in a university hospital. Clin Infect Dis. 29: 1411– 1418

Mangeny N., Niel P., Paul G., (2000) A 5-year epidemiological study of extended-spectrum β -lactamase-producing Klebsiella pneumoniae isolates in a medium- and long-stay neurological unit. J Appl Microbiol; 88:504-11.

Marjorie M.C. (1999) Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. ;12(4):564–582.

Martinez-Martinez L., Pscual A., Jacoby G., (1998). Quinolone resistance from a transferable plasmid. J Lancet. 351: 797-9.

Matthew M., Hedges W. and Smith J. 1979. Types of β -lactamase determined by plasmids in gram-negative bacteria. J Bacteriol. 138(3) : 657-662

Medboua C. 2011. Caractérisation des phénotypes de résistance aux beta-lactamines à large spectre des bacilles à Gram négatif isolés au niveau du laboratoire central mère et enfants du CHU Beni-Messous d'Alger. Mémoire En vue de l'obtention du diplôme de Magister, Université Abderrahmane MIRA – Béjaïa. 88 P.

Medeiros A. and Hare R. (1986). β -Lactamase-mediated resistance to penems and carbapenems amongst Enterobacteriaceae, abstr. 116. 26th Intersci.Conf. Antimicrob. Agents Chemother. American Society for Microbiology, Washington, DC.

- Medeiros A.A. 2000. Cooperative evolution of mechanisms of β -lactam resistance. *J Clin Microbiol Infect Dis* 6: 27-33.
- Melano R., Corso A., Petrani A., Centron D., Orman B., Pereyra A., Moreno N. and Galas M. (2003). Multiple antibiotic-resistance mechanisms including a novel combination of extended-spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* clinical strains isolated in Argentina. *J Antimicrobiol chemotherapy* 52: 36-42
- Midolo P., Matthews D. and Fernandez C. (2002). Detection of extended-spectrum β -lactamases in the routine clinical microbiology laboratory. *J Pathology* 34: 362-4.
- Milane H. (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère peroxydant ou thérapeutiques. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur Strasbourg I. 155p
- Mohammad A., Faride A. and Saeid A. (2015) Characterization of CTX and TEM types of β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing Extended Spectrum β -lactamases in Sari, Iran, 2014. *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci.*, Vol. 4 (3):16-19.
- Moland E., Hauson N., Herrera V., Black J., Lockhart T., Hossain A., Johnson J., Goering R., Thomson K. (2003). Plasmid mediated, carbapenem- hydrolysing β -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Antimicrobiol chemotherapy* 51: 711-714
- Moneim A. (2012). Antioxidant activities of *Punica granatum* (pomegranate) peel extract on brain of rats. *Journal of Medicinal Plants Research*. 6(2): 195-199.
- Moubarek C., Doucet-Populaire F., Hamze M., Daoud Z. and Weill F. 2005. First Extended-Spectrum β -lactamase (CTX-M-15) in Lebanon. *J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy* 49(2): 864-65.
- Munoz-Price L., Poirel L., Bonomo R., Schwaber M., Daikos G., Cormican M. (2013) Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis*. 13(9):785-96.
- Murbach V., Dhoyen N. and Linger L. (2001). Evidence for a true post β -lactamase inhibitor effect of clavulanic acid against *Klebsiella pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiology Infection* 7: 661-5.

- Mustafa O. et Yusuf D., (2009). Investigation of some antibiotic susceptibilities, plasmid profiles and ESBL characteristic of *Klebsiella pneumoniae* isolated from system infections. *World applied sciences journal* 6(5): 630-636.
- Naas, T. and Nordmann, P. (1999). OXA-type β -lactamases. *Curr. Pharm. Des.* 5:865-79
- Nikaido, H. (1989). Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1831–1836.
- Navarro F. and Miro E. (2002). Update on CTX-M-type β -lactamases. *J Medical Microbiology* 13: 63-73.
- Navon-Venezia S., Ben-Ami R., Schwaber M., Leavitt A., Schwartz D., Carmeli Y. (2004). Protocol for the Accelerated Detection of Extended-Spectrum β -LactamaseProducing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Strains from Blood Cultures. *Eur J clin Microbiol Infect Dis* 23 : 200-202.
- Nedjai S., Barguigua A., Djahmi N., Jamali L., Zerouali K., Dekhil M., Timinouni. M. (2010). Prevalence and characterization of extended spectrum β -lactamases in *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group bacteria, in Algeria. Service de microbiologie, CHU Ibn Rochd, Annaba, Algeria
- Nedjai S., Barguigua A., Djahmi N., Jamali L., Zerouali K., Dekhil M. and Timinouni, M. (2012). Prevalence and characterization of extended spectrum beta-lactamases in *Klebsiella- Enterobacter-Serratia* group bacteria, in Algeria. *Med. Mal Infect.* 42: 20-29
- Negi P. and Jayaprakasha G. (2003). Antioxidant and antibacterial activities of *Punica granatum* peel extracts. *J. Food Sci.*, 68: 1473-1477
- Nestorovich E. Sugawara E. Nikaido H. and Bezrukov S. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* porin OprF. Properties of the channel. *J. Biol. Chem.* 281, 16230–16237.
- Nikaido H. (2000). Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Seminars in Cellular and Developmental Biology* 12: 215–33
- Nikaido H. (2003) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* Dec ;67(4):593-656.
- Nordmann P. 2006. L'émergence de la résistance plasmidique aux quinolones chez les Entérobactéries. *J Pathologie Biologie* 54 : 7-9.

- Nordmann P. and Mammeri H. (2007). Resistance plasmidique aux quinolones. *J Antibiotiques* 9(4) : 246-253.
- Nordmann P, Poirel L. (2002). Emerging carbapenemases in Gram negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 8: 321-331
- Nordmann P. Ronco E., Naas T., Duport C., Michel-Briand Y. and Labia R. (1993). Characterization of a novel extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:962–969.
- Nordmann P., Cuzon G. and Naas T. (2009) The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing bacteria. *The Lancet infectious diseases.*;9(4):228-236.
- Pagès J. (2004). Role of bacterial porins in antibiotic susceptibility of Gramnegative bacteria in *Bacterial and Eukaryotic Porins* (ed. Benz, R.) 41–59 (WileyVCH, Weinheim).
- Papp-Wallace K.; Bethel C., Distler A., Kasuboski C., Taracila M. and Bonomo A. (2009). Inhibitor resistance in the KPC-2 β -lactamase: a pre-eminent property of this class A β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* [Epub ahead of print.] doi:10.1128/AAC.00693-09
- Pasteran F., Guerriero L., Radice G., Maggiora R., Rapoport M., Di Martino A. and Galas M. (2008). *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. *J EID* 14(7): 2151-62
- Paterson D., Ko W., Von-Gottberg A., Mohapatra S., Casselas J., Goosens H., Mulazimoglu L. and Trenholme G. (2004). Antibiotic therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of production of extended-spectrum-lactamases. *J Clinical Infectious Diseases* 39(1): 31-37
- Paterson L. and Bonomo R.A. 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 18: 657-686.
- Paulsen I. Brown M. and Skurray, R. (1996). Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* 60:575–608.
- Philippon A. and Arlet G. (2006). β -Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel ! *Ann Biol Clin.* 64(1): 37-51

- Philippon A., Arlet G., and Jacoby G. (2002) Plasmid-determined AmpC-type β lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 1-11
- Pitout J., Nordmann P., Laupland K. and Poirel L. (2005). Emergence of Enterobacteriaceae producing extended spectrum betalactamases (ESBL) in the community. *J Antimicrob Chemother.* 56: 52–59.
- Podschun R., and Ullmann U. (1998). Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev.* 11: 589-603
- Poole K. (2000). Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in Gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44: 2233–2241
- Poole K. (2004). Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol Infect* 10: 12-26
- Pournaras S., Markogiannakis A., Ikonomidis A., Kondyli L., Bethimouti K., Maniatis A., Legakis N. and Tsakris A. (2006). Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *J. Antimicrob. Chemother.* 57:557-561
- Preston K., Venezia R., and Stellrecht K. (2004) The SHV-5 extended-spectrum β -lactamase gene of pACM1 is located on the remnant of a compound transposon. *Plasmid* ;51: 48-53.
- Queenan A. and Bush K. (2007). Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 20: 440-58
- Quentin C., Arpin C., Dubois V., André C., Lagrange I., Fischer I., Brochet J., Grobost F., Jullin .J, Dutihl B., Larribet G., and Noury P. (2004). Antibiotic Resistance Rates and phenotypes Among Isolates of Enterobacteriaceae in French Extra-hospital practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23: 185-193.
- Rahal J. (2000). Extended-spectrum β -lactamases: how big is the problem? *J Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 6 (Suppl 2): 2-6.
- Rahal, K., Belouni, R., and Benslimani, A. 2005. Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale. *Rec de L'OMS.* 4^{ème} édition. Algérie. 46-52.

- Rebuck J., Olsen K., Fey P., Langnas A. and Rupp M. (2000). Characterization of an outbreak due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric intensive care unit transplant population. *J Clin Infect Dis* 31: 1386-1372.
- Reddy M., Gupta S., Jacob M., Khan S. and Ferreir D. (2007) Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. *Planta. Medica.* 73 :461–467
- Reseau Algerien de surveillance de la resistance des bacteries aux Antibiotiques (AARN).(2016). Surveillance de la resistance des bacteries aux antibiotiques.. vol. 15. 44-49
- Rice L., Carias L. and Hujer A. (2000). High-level expression of chromosomally encoded SHV-1 beta-lactamase and an outer membrane protein change confer resistance to ceftazidime and piperacillin-tazobactam in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy* 44: 362-5.
- Richards A. (1943). Statement released by the Committee on Medical Research. *J Am Med Assoc.* 122.
- Robert J., Cambau E., Grenet K., Trystman D., Péan Y., Fievet M. and Jariler V. (2001). Trends in quinolons susceptibility of enterobacteriaceae among inpatients of a large university hospital: 1992-98. *Clin Microbiol infect* 7: 553-561.
- Rodriguez-Bano J., Lopez-Cerero L., Navarro M.D., Diaz de Alba P. and Pascual A. (2008b). Faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: prevalence, risk factors and molecular epidemiology. *J Antimicrob Chemother.* 62(5): 1142– 1149
- Rodriguez-Villalobos H. and Struelens M. (2006). Résistance bactérienne par β -lactamases à spectre étendu: implications pour le réanimateur. *Rev Réanimation* 15. (3): 205–213
- Rowe-Magnus D. and Mazel D. (2002). The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *Int. J. Med. Microbiol.* 292: 115–125.
- Rupp M. and Fey P. (2003). Extended spectrum β -lactamase (ESBL)producing Enterobacteriaceae: considerations for diagnosis, prevention, and drug treatment. *Drugs;* 63:353-65.

Ruppé E. (2010). Epidemiology of expanded-spectrum β -lactamases: the rise of CTX-M. *Antibiotiques* 12, 3–16.

Sadeghian A., Ghorbani A., Mohamadi-Nejad A. and Rakhshandeh H. (2011). Antimicrobial activity of aqueous and methanolic extracts of pomegranate fruit skin. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. 1(2): 67-73.

Safdar N. and Maki D. (2002) The commonality of risk factors for nosocomial colonization and infection with antimicrobial-resistant *Staphylococcus aureus*, enterococcus, gramnegative bacilli, *Clostridium difficile*, and *Candida*. *Ann Intern Med*; 136:834-44.

Sahly H., Ancken H., Benedi V., Forestier C., Fussing V., Hansen D., Ofek I. and Podshun R. (2004). Impairment of Respiratory Burst in polymorphonuclear Leukocytes by Extended-Spectrum Beta-lactamase-Producing Strains of *Klebsiella pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23: 20-26

Schiappa D., Hayden M., Matushek M. (2001). Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* bloodstream Menashe G, Borer A, Yagupsky P, et al. Clinical significance and impact on mortality of extended-spectrum β lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates in nosocomial bacteremia. *Scand J Infect Dis*;33: 188-93.

Schumacher H., Scheibel J., Moller J. (2000). Cross-resistance patterns among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* with decreased susceptibility to cefuroxime. *J Antimicrobiol Chemotherapy* 46 (2): 215-221.

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 de Doctorat

Sen A and Batra A. (2012). Evaluation of antimicrobial activity of different solvent extracts of medicinal plant: *Melia azedarach* L. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*. 4(2): 67-73.

Shahab Q. 2015. *Klebsiella* Infections. *Medscape*.; <http://emedicine.medscape.com/article/219907-overview>. Accessed 20/03/2015.

Shahidi F. and Naczk M. (2004). Phenolic compounds in fruits and vegetables. In: Shahidi, F., and M. Naczk (eds). Phenolics in Foods and Nutraceuticals. CRC Press. pp: 131-239.

Sher A. (2009). Antimicrobial activity of natural products from medicinal plants. Gomal Journal of Medical Sciences. 7(1): 72-78.

Sherris C., Ryan J., Ray G., Champoux J., Neidhardt C., Drew L., Plorde J., Marchalonis J., Falkow S. and Robinovitch M.. (2004). Sherris Medical Microbiology, An Introduction to Infectious Diseases, Gourth Edition, McGRAW-HILL Medical Publishing Division

Shristi R., Shishir G. et Bipin A. (2015) Prevalence of Extended Spectrum Beta-Lactamases among Escherichia coli and Klebsiella spp isolates in Manipal Teaching Hospital, Pokhara, Nepal. Journal of Microbiology and Infectious Diseases: 5 (2): 69-75

Silver L. (2003). Novel inhibitors of bacterial cell wall synthesis, Curr. Opin. Microbiol.; 6: 431-438

Somers, T. and M. E. Evans. (1986). Evolution of red wines I. Ambient influences on color composition during early maturation. Vitis, 25: 31-39.

Spratt, B. (1975). Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of Escherichia coli K12. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:2999–3003.

Spratt, B. (1977). Properties of the penicillin-binding proteins of Escherichia coli K12. Eur. J. Biochem. 72:341–352.

Spratt, B. (1994). Resistance to antibiotics mediated by target alterations. Science 264: 388-393
Stock, I. Sherwood, K.J. and Wiedemann, B. (2003). Natural antibiotic susceptibility of Ewingella americana strains. J. Chemother. 15: 428–441

Stahl J., Pavese P., Epaulard O., Blanc M., and Brion T. (2004). Le traitement empirique des bactériémies. J Med et maladies infectieuses 34: S55-S56.

Stale T., (2015) Extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Norway. A dissertation for the degree of Philosophiae Doctor: University Hospital of North Norway.

Stock I. and Wiedemann B. (2003). Natural antimicrobial susceptibilities and biochemical profiles of *Yersinia enterocolitica*-like strains: *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii* and *Y. rohdei*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 38: 139–152.

Stockholm Eckert C., Gautier M., Saladin-Allard M., Hidri N., Verdet C., Ould-Houcine Z., Barnaud G., Delisle F., Phillipon A. and Arlet G. (2004). Dissemination of CTX-M Type β -lactamases among Clinical Isolates of Enterobacteriaceae in Paris, France. *J Microbiol Agents Chemotherapy* Apr:1249-1255

Stone W., Gupta A., Loughrey R.N., Della-Latt, P.H., Cimiotti R.N., Larson E., Rubenstein D. and Saiman L. (2003). Attributable Coast And Length Of Stay Of An Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Outbreak In A Neonatal Intensive Care Unit. 24: 601-606

Sturenbur, E. and Mack D. (2003). Extended-spectrum β -lactamase: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy and infection control. *J Infect* 2003; 47: 273-95.

Takafumi S., Takafumi H., Tsukasa H., Sachi K., Takahiro Y. et Hideki M. (2015). Mechanism of resistance and antibacterial susceptibility in extended-spectrum β -lactamase phenotype *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* isolated between 2000 and 2010 in Japan. 64: 538-543.

Talon D. (1999). The role of the hospital environment in the epidemiology of multiresistance bacteria. *J Hospital Infection* 43: 13-17.

Tigaud S. (2000). Mécanismes de résistance aux antibiotiques. [http://Lyon-Sud.univLyon1.fr/bacterio.Collège/olrbo.html](http://Lyon-Sud.univLyon1.fr/bacterio/Collège/olrbo.html)

Tolun V., Kuçukbasmaci O., Torumkuneş-Akbulut D., Catal C., Ang-Kuçuker M., Ang O. (2004). Relationship between ciprofloxacin resistance and extended-spectrum β -lactamase production in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Clin Microbiology and Infection* 10: 70-83.

Tomasz A. (1980). On the mechanisms of the irreversible antimicrobial effects of β -lactams. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* 289:303–308

Touati A., Medboual C., Touati D., Denine R., Brasme L. and De Champs C. (2012) CTX-M-15-producing Enterobacteriaceae isolates causing bloodstream infections at the Beni-Messous hospital in Algiers (Algeria). *International Research Journal of Microbiology (IRJM)* (ISSN: 2141-5463) Vol. 3(5) pp. 181-185.

Tumbarello M., Spanu T., Sanguinetti M., Citton R., Montuori E., Leone F., Fadda G. and Cauda R. (2006). Bloodstream Infections Caused by Extended-Spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Risk Factors, molecular Epidemiology, and Clinical outcome. *J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy* 50: 498-504

Tzouvelekis L. and Bonomo A. (1999). SHV-type beta-lactamase. *Curr Phar Des* 5: 847-64.

Urban C. and Rahal J. (2004): mechanisms and detection of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii*. *J Med Microbiol* 15: 63-72

Valverde A., Coque T., Garcia-San Miguel L., Baquero F. and Cantòn, R. (2008). Complex molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: a long-term perspective from a single institution in Madrid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61: 64-72

Villegas V., Correa A., Perez F., Zuluaga T., Radice M., Gutkind G., Casellas J., Ayala J. and Quinn J. (2004). CTX-M-12 β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolate in Colombia. *J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy* 48 (2): 629-631.

Voravuthikunchai S., Sririrak T., Limsuwan S., Supawita T., Iida T. and Honda T (2005) Inhibitory effects of active compounds from *Punica granatum* pericarp on verocytotoxin production by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Health Sci.* 51:590–596

Wang M., Sahm D., Jacoby G., Zhang Y. and Hooper D. (2004a). Activities of newer Quinolones against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* containing the plasmid-mediated quinolone Resistance Determinant qnr. *Antimicrobiol Agents and Chemotherapy* Apr: 1400-1401.

Warren J. (2001) Catheter-associated urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents.* 17(4):299-303

- White-Antony R., Kaye C., Poupard J., Pypstra R., Woodnutt G., and Wyne B. (2004). Augmentin (amoxicillin/clavulanate) in the treatment of community-acquired respiratory tract infection: a review of the continuing development of an innovative antimicrobial agent. *J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy* 53(Suppl 1): i3-i20
- Wilke M., Lovering A. and Strynadka, N. (2005). Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol.* 8: 525-533.
- Willey G. Linda M., Christopher J. et Joanne M. (2008). Prescott, Harley, and Klein's microbiology .Sherwood,. Woolverton. — 7th ed
- Williams P., and Tomas J (1990). The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*. *Rev. Med. Microbiol.* 1:196–204
- Williams P., Lambert P. Brown M. and Jones R. (1983). The role of the O and K antigens in determining the resistance of *Klebsiella aerogenes* to serum killing and phagocytosis. *J. Gen. Microbiol.* 129:2181–2191.
- Winokur P., Canton R., Casselas J. and Legakis N. (2001). Variation in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas and the Western Pacific region. *J Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 32(Suppl 2): S94-S103
- Winokur P., Eidelstein M., Stesiouk O., Pfaller M. and Jones R. (2000). Russian *Klebsiella pneumoniae* isolates that express extended-spectrum β lactamases. *J Clin Microbiol Infect* 6: 103-108.
- World Health Organization.(WHO), (2009). WHO monographs on selected medicinal plants. VOL. 4
- Yang Y. Wu P. and Livermore D. (1990). Biochemical characterization of a β -lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:755–758.
- Yigit H., Queenan A., Anderson A., Domenechsanchez G., Biddle A. and Steward C. (2001). Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy* 45: 1151-61.

Zaouia K., Segni L., Noureddine G. and Redha O. (2010). Antimicrobial activity of nine medicinal plants growing in the south of Algeria. *Annals of Biological Research*. 1(4): 145-147.

Zingg W. (2008). Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) chez les enfants en suisse. *J Swiss Paediatric Surveillance Unit*. 7: 4-8.

Zwet W., Parlevliet G., Savelkoul P., Stoof J., Kaiser A., Koeleman J., Vandenbroucke-Grauls C. (1999). Nosocomial outbreak of gentamicin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit controlled by a change in antibiotic policy. 42: 295-302.

Annexe

Annexe I

Tableau 9 : Matériel pour analyse microbiologique

Appareillage	Etuve Bain marie Refridgerateur
Matériels et vérries	Bec bunsen Boite pétri Pince stérile Tube à éssai Portoir Pipette Pasteur Ecouvion Micropipette a 400ul
Réactifs et additives	Eau physiologique sterile Additive hektoen
Milieu de culture	Gélose nutritive Milieu Hektoen Milieu SFB (bouillon au sélénite de sodium cystéine) Gélose Mueller Hinton

Tableau 10: les compositions des milieux de culture

Milieu de culture	Composition de milieu de culture
Bouillon au sélénite de sodium cystéine	Peptone pancréatique de caséine Lactose Monohydrogenoselenite de sodium 1-Cystéine Eau distille
Gélose Hektoen	Protéose peptone12g Extrait de levure.....3g Sels biliaires9g Lactose 12g Saccharose.....12g Salicine2g Chlorure de sodium..... 5g Thiosulfate de sodium5g Citrate de fer ammoniacal1.5g Bleu de bromothymol0.065g Fuschine acide..... 0.04g Agar14g pH7.5
Gélose nutritive	Extrait de viande Extrait de levure Peptone Chlorure de sodium Agar pH.....7
Gélose Mueller Hinton	Infusion de viande de bœuf.....300g Hydrolysat de caséine.....17.5g Amidon.....1.5g Agar.....17g pH.....7.4

Annexe II

Tableau 11: La Repartition de prelevement selon la sexe et service d'hospitalisation

Service	Selles		Eau usée	Urine	
	F	M		F	M
pneumonie	28	9	5	10	5
diabétique	19	11	5	14	6

F – Femme M – Male

Tableau 12: La repartion de prelevement selon l'origine

	Selles		Urine	
	F	M	F	M
Externe	16	10	10	4
Hospitalisé	47	20	30	5

Annexe III

Table 13: The profile 5215773 for *Klebsiella pneumoniae*

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	UREE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	
+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
5			2			1			5			7			7			3		

Table 14: The profile 5205773 for *Klebsiella pneumoniae*

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	UREE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	
+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
5			2			0			5			7			7			3		

Table 15: The profile 5205573 for *Klebsiella pneumoniae*

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	UREE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	
+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	
5			2			0			5			5			7			3		

Table 16: The profile 5255773 for *Klebsiella oxytoca*

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	UREE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5			2			5			5			7			7			3	

Table 17: The profile 5257773 for *Klebsiella oxytoca*

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	UREE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5			2			5			7			7			7			3	

Table 18: The profile 5357773 for *Klebsiella ornithinolytica*

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	UREE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5			3			5			7			7			7			3	

Table 19: The profile 5355773 for *Klebsiella ornithinolytica*

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	UREE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5			3			5			5			7			7			3	

Annexe IV

Table 20: Les fréquences des différent espèces/genre isolées

Genus and /or species	No.of strains isolated	% of species among the number of samples
<i>Escherichia coli</i>	58	38.16 %
<i>Serratia spp.</i>	29	19.08 %
<i>Klebsiella spp.</i>	18	11.84 %
<i>Proteus spp.</i>	15	9.87 %
<i>Citrobacter spp.</i>	4	2.63 %
<i>Salmonella spp.</i>	2	1.32 %
Total	126	82.9 %

Table 21: les fréquences des échantillons

sample	N. of samples	Percentage (%)
Urine	49	32.24
Stool	93	61.18
Water	10	6.58
Total	152	100

Table 22 : La frequence des espèces de *Klebsiella* isolée dans chaque prélèvement

<i>Klebsiella</i> species	sample		
	urine	selle	eau
<i>K.pneumoniae</i>	9 (81.82 %)	2 (18.18%)	1 (9%)
<i>K. oxytoca</i>	0	1 (50%)	1(50%)
<i>K. ornithinolytica</i>	0	0	2 (100%)

Tableau 25: La fréquence de sensibilité aux antibiotiques testés

antibiotics	Fréquency (°/o)		
	S	I	R
Penicillin (P)	0	0	100
Oxacilline (OX)	0	0	100
Ampicillin (AMP)	0	0	100
Amoxicillin (AMX	0	0	100
Piperacilline (PIP)	11.11	5.56	83.33
Cefazoline (CZO)	16.67	5.56	77.78
Amoxicillin / Clavulanique acid (AMC)	38.89	11.11	50
Ceftazidime (CFM)	50	5.56	44.44
Cefotaxime (CTX)	38.89		61.11
Ceftriaxone CRO	72.22	16.67	11.11
Aztreonam (ATM)	33.33	0	66.67
Imipenem (IMP)	94.44	0	5.56
Cefoxitine	83.33	11.11	5.56
Sulfamides (SFA)	44.44	0	55.56
Sulfaméthaxazole (SXT)	22.22	11.11	66.67
Gentamicin (G)	27.78	0	72.22
Kanamycin (K)	27.78	11.11	61.11
Tobramycine (TOB)	33.33	0	66.67
Linocomycine (L)	0	0	100
Clindamycin (DA)	27.78	0	72.22
Doxycycline (DO)	22.22	0	77.78
Tétracycline (TE)	44.44	5.56	50
Norfloxacin (NOR)	50	33.33	22.22
Ofloxacin (OF)	61.11	33.33	5.56
acide nalidixique (NA)	66.67	0	33.33

Table 26: Les résultats du test de double disque

code	KBLSE strain	Diametre of inhibition in mm					
		CTX	CTX/C	CAZ	CAZ/C	CRO	CRO/C
5 ^H	<i>K.pneumoniae</i>	15	26	28	34	29	31
6 ^H	<i>K.pneumoniae</i>	29	33	15	22	30	33
8 ^N	<i>K.pneumoniae</i>	19	27	18	23	27	29
10 ^H	<i>K.pneumoniae</i>	5	12	9	19	12	22
13 ^H	<i>K.pneumoniae</i>	13	18	12	27	28	34
18 ^E	<i>K.ornithinolytica</i>	0	0	0	0	0	0

Annexe V

Table 27: Les valeurs critique des antibiotiques utilisés

Class of antibiotic	antibiotics	critical diametres (mm)	
		S	R
	Pénicillin	≥	<
Penicillins résistant to penicillinases (pénicillines M semi-synthetic)	Oxacillin	≥	<
Wide spectrum Penicillins	Ampicillin	≥ 19	<16
	Amoxicillin	≥ 21	<16
ureidopenicillines	piperacilline	≥ 24	< 22
1 st generation cephalosporin	cefazoline	≥ 15	< 17
	Amoxicilline /acide clavulanique	≥ 15	< 20
Extended-spectrum (3 rd generation cephalosporins)	Ceftazidime	≥ 26	< 21
	Cefotaxime	≥ 26	< 23
	Ceftriaxone	≥ 26	< 23
	Cefixime	≥ 25	< 22
monobactams	aztreonam	≥ 27	< 21
carbapenems	imipenem	≥ 24	< 17
cephamycins	Cefoxitin	≥ 22	< 15
	cefotetan	≥ 23	< 17
Sulfamide	Sulfamides	≥ 17	< 12
	sulfaméthaxazole	≥ 16	< 13
Aminoglycosides	Gentamycine	≥ 18	< 16
	Kanamycin	≥ 17	< 15
	Tobramycine	≥ 18	< 16
tetracyclines	Doxycycline	≥	<
	Tetracycline	≥	<
flouroquinolones	Norfloxacin	≥ 25	<22
	Ofloxacin	≥ 25	< 22
quinolones	acide nalidixique	≥ 20	< 15