



**FACULTE DES SCIENCES AGRO-VETERINAIRES**

**DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLOME DE MASTER EN SCIENCES DE LA NATURE  
ET DE LA VIE**

Spécialité :

**BIOSIGNALISATION CELLULAIRE ET MOLECULAIRE, IMMUNOLOGIE**

**THEME**

**Etude de la virulence de souches cliniques de  
*Klebsiella pneumoniae* responsables d'infections  
urinaires.**

Présenté par

**Dahnoun Malik**

Thèse soutenue le : 15/12/2011

Devant le jury composé de :

Mme KEBASE S.	Maitre assistante classe B	U.S.D.B	Présidente
Mme EL FERTAS-AISSANI.R	Maitre assistante classe B	U.S.D.B	Promotrice
Mme CHERRALLAH.A	Maitre assistante classe B	U.S.D.B	Examinatrice
Mr KHALED H	Maitre assistant classe A	U.S.D.B	Examineur

**Promotion : 2010-2011**

## Résumé

*K. pneumoniae* est un bacille à Gram négatif appartenant à la famille des entérobacteriaceae, c'est une bactérie commensale qui peut être responsable d'infections communautaires et nosocomiales chez les malades hospitalisés. Son pouvoir pathogène s'exprime à travers une multitude de facteurs de virulence qui déterminent le type et la sévérité de l'infection.

Notre travail a consisté en la recherche phénotypique et génotypique par PCR (Polymerase Chain Reaction) de facteurs de virulence chez 18 souches cliniques *K. pneumoniae* responsables d'infections urinaires. Les gènes *fimH* et *mrkD* codant les adhésines des fimbriae de type 1 et 3 respectivement, ont été retrouvés chez toutes les souches, à l'exception d'une seule qui a été *fimH*<sup>-</sup> et *mrkD*<sup>-</sup>. Deux autres gènes *kpn* et *ycfM*, codant respectivement une adhésine *FimH*-like et une protéine putative de liaison à la fibronectine, ont été aussi présents chez nos souches (9/18 sont *kpn*<sup>+</sup> et 16/18 sont *ycfM*<sup>+</sup>). La quasi totalité des souches ont été résistantes à l'effet bactéricide du sérum (16/18), d'où l'intérêt de rechercher d'autres facteurs qui pourraient être impliqués dans cette résistance et qui sont ; La capsule qui était présente chez toutes les souches contrairement au phénotype d'hypermucoviscosité qui n'a caractérisé que deux souches.

Cette étude a révélé une virulence potentielle de ces souches.

**Mots-clés :** *Klebsiella pneumoniae*, facteurs de virulence, infections.

# Dédicaces

**Je dédie ce modeste travail :**

A Ceux que personne ne peut compenser les sacrifices qu'ils ont consentis pour mon éducation et mon bien être qui n'ont jamais cessé de me soutenir matériellement et moralement pour que je puisse finir mes études et avoir une bonne formation et surtout être le meilleur et à qui je voudrais exprimer mon affection et mes gratitude . Un grand merci à mes parents,

**A Mes chers frères que j'aime**

Amine, Zoheir, Hakim, Hassen et Mohamed

**A mes chers amis**

Amine Kitani, Chawki, Raouf, Samy, Rafik, Redha, Mohamed, Amine Sinpei, Hani L'ours, Hanayo. Qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance, j'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance.

**A tous mes amis en particulier**

Ahlem, Yesmine que je considère comme mes meilleures amies, a Hanane que j'oublierai jamais. A Imene, Aya, Sarah, Wahiba, Sabrina, Mira, Rima, Mehdi, Sid ali, Alilou qui m'ont fait vivre tout simplement des moments inoubliables et toute personne qui m'aime

**Ainsi A toute ma promotion de biologie moléculaire et cellulaire**

(Nora, Rym ,Houda, Sabrina, Samia, Djazia, Wissem, Lila, Fatima, Khalida, Meriem, Amel, Annissa, Wahab et Mahdi)

**A mon neveu WASSIM que DIEU le garde inchallah et mes belle sœurs**

# Remerciements

Je remercie DIEU le tout puissant de m'avoir donné le courage, la volonté, la patience et la santé durant toutes ces années d'étude et que grâce à DIEU ce modeste travail a pu être réalisé.

Mes plus vifs remerciements et ma gratitude à ma promotrice : Mme EL FERRAS AISSANI RADIA, qui grâce à ses efforts, son orientation, sa patience, sa confiance en moi, ses précieux conseils et son soutien et surtout son sérieux rendu possible ce travail effectif.

Je remercie aussi le Pr GUITARNI D., responsable du laboratoire de Microbiologie de la Faculté des sciences agrovétérinaires département de Biologie ainsi que tous les personnels et les stagiaires de m'avoir accueillie chaleureusement et mis à ma disposition tous les moyens nécessaires à la mise en œuvre de ce travail.

Je tiens à remercier particulièrement les membres de jury qui ont bien voulu examiner mon travail (Mme CHERRALLAH.A , Mme KEBASE S, Mr HAMZA.K ).

Je ne terminerai pas sans adresser un immense merci à mes chers parents pour tout ce qu'ils ont fait, pour le soutien qu'ils m'ont apporté durant toutes mes études, et à qui je dois vraiment tout.

Merci à toi Rosa, toi qui as toujours su te montrer patiente, attentive et présente à n'importe quel moment, de jour comme de nuit, prête à faire tout ce qui est de ton possible pour m'aider, tu as suivi pas à pas l'évolution de ce travail tout en y montrant un grand intérêt.

## Liste des figures et des tableaux

Figure 1: Principaux facteurs de virulence exprimés par <i>Klebsiella pneumoniae</i>	6
Figure 2 : Organisation du cluster de gènes <i>fim</i> chez <i>E. coli</i>	6
Figure 3 : Structures des Fimbriae de type 1 chez <i>E. coli</i>	6
Figure 4 : Organisation des gènes <i>mrk</i> de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	9
Figure 5 : Stratégies d'approvisionnement en fer chez les bactéries	9
Figure 6 : Réaction inflammatoire induite suite à l'adhésion de la bactérie au niveau de l'épithélium tubulaire du système urinaire	13
Figure 7 : Recrutement des leucocytes au niveau du site infectieux lors d'une réaction inflammatoire	13
Figure 8 : Consommation de l'oxygène par les phagocytes et production de dérivés oxygénés bactéricides	14
Figure 9: Voies d'activation du système du complément	17
Figure 10 : Anatomie d'activation des lymphocytes	18
Figure 11 : Marqueur de taille des produits d'amplification par PCR	21
Figure 12 : Détection du gène <i>fimH</i> par PCR	29
Figure 13 : Détection du gène <i>mrkD</i> par PCR	29
Figure 14 : Détection du gène <i>kpn</i> par PCR	30
Figure 15 : Détection du gène <i>ycfM</i> par PCR	30
Figure 16: Résultat de l'analyse de l'effet bactéricide du sérum humain sur deux souches cliniques de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	31
Figure 17 : Phénotype de d'hypermucoviscosité	31
Tableau I: Souches cliniques de <i>K.pneumoniae</i>	20
Tableau II : Solutions utilisées dans l'étude phénotypique et génotypique	21
Tableau III : Liste des amorces utilisées dans l'amplification par PCR des gènes des adhésines.	23
Tableau IV : Lecture des tests d'hémagglutination	25
Tableau V : Résultats de l'étude génotypique et phénotypique des souches de <i>K.pneumoniae</i>	31

# Sommaire

## Sommaire

<b><u>INTRODUCTION</u></b>	<b>1</b>
<b><u>RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</u></b>	<b>3</b>
<b>I/ INFECTIONS NOSOCOMIALES</b>	<b>3</b>
<b>II/ INFECTIONS A KLEBSIELLES</b>	<b>3</b>
<b>III/ FACTEUR DE VIRULENCE</b>	<b>4</b>
III.1/ Adhésine	4
III.1.1/ Fimbriae de type 1	5
III.1.2/ Fimbriae de type 3	7
III.2/ Capsule	7
III.3/ Production de sidérophores	7
III.4/ Production de toxines	10
III.4.1/ Hémolysine $\alpha$	10
III.4.2/ Hémolysine $\beta$	10
<b>IV/ IMMUNITE ANTIBACTERIENNE</b>	<b>11</b>
IV.1/ Réponse immunitaire innée	11
IV.1.1/ Réaction inflammatoire	11
IV.1.2/ Phagocytose	12
IV.1.3/ Système du complément	12
IV.2/ Réponse immunitaire adaptative	16
<b><u>MATERIEL ET METHODES</u></b>	<b>19</b>
<b>I/ MATERIEL</b>	<b>20</b>
I.1/ Matériel biologique	20
I.1.1/ Souches sauvages	20
I.1.2/ Souches de références	20
I.1.3/ Sang et sérum	20
I.2/ Matériel non biologique	20
I.2.1/ Appareillage et matériels consommable	20
I.2.2/ Solutions utilisées	20
I.3/ Autres matériels	21
I.3.1/ Marqueurs de taille	21
I.3.2/ Amorces spécifiques	22

<b>II/ METHODES</b>	<b>22</b>
II.1/ Recherche génotypique	22
II.1.1/ Extraction d'ADN pour la PCR	22
II.1.2/Réaction PCR	23
II.1.3/ Electrophorèse sur gel d'agarose	24
II.2/ Recherche phénotypique des adhesines	24
II.2.1/ Préparation des érythrocytes	24
II.2.2/ Hémagglutination	25
II.2.3/ Sensibilité à l'effet bactéricide du sérum	26
II.2.4/ Mise en évidence de la capsule	25
II.2.5/ Mesure de l'hypermucoviscosité	26
<b><u>RESULTATS</u></b>	<b>27</b>
<b><u>DISCUSSION</u></b>	<b>32</b>
<b><u>CONCLUSION</u></b>	<b>37</b>
<b><u>BIBLIOGRAPHIE</u></b>	<b>38</b>
<b><u>ANNEXES</u></b>	

### INTRODUCTION

Les infections nosocomiales sont diverses, de localisation variée (infections pulmonaires, urinaires, intra-abdominales, septicémiques et chirurgicales) et se développent chez les individus immunodéprimés.

Les infections urinaires sont les plus répandues en milieu hospitalier. Ces dernières sont diagnostiquées au laboratoire par la présence d'une bactériurie significative (>100 000 bactéries/ml) à partir d'une urine fraîchement prélevée. Les germes identifiés suite à un ECBU (examen cyto bactériologique urinaire) sont principalement des bacilles à Gram négatif dont la majorité sont des entérobactéries (*Escherichia coli*, *proteus sp.*, *klebsiella pneumoniae*...). Ces germes proviennent, le plus souvent, de la flore intestinale endogène du malade, plus rarement de l'environnement (manipulation, liquides d'irrigation contaminés...) (Berche et al., 1991).

*Klebsiella pneumoniae* est un pathogène opportuniste à l'origine de nombreuses infections nosocomiales, pulmonaires, urinaires, septicémiques... chez les individus immunodéprimés. Elle est aussi impliquée dans les infections communautaires, fréquemment de type extra intestinales chez l'homme. Cette espèce est responsable de 10% des infections nosocomiales ; elle arrive en troisième position après *Escherichia coli* (20%) et *Staphylococcus aureus* (16.5%) (Vincent, 2004 ; Braithe et al., 2005 ; Schembri et al., 2005).

*Klebsiella pneumoniae* est caractérisée par un important pouvoir de résistance aux antibiotiques qui expliquent le fort potentiel de propagation de cette espèce dans les unités de soin. Elle est aussi caractérisée par l'expression de facteurs de virulence qu'ils lui permettent d'effectuer diverses étapes dans sa relation avec l'hôte en s'assurant contre les mécanismes de défense mis en place.

Le développement de nouveaux mécanismes de résistance aux antibiotiques par *Klebsiella pneumoniae* (en plus d'une résistance naturelle aux pénicillines : amoxicilline, ticarcilline) a restreint considérablement l'arsenal thérapeutique disponible dans le traitement des infections sévères. En effet, cette espèce s'est vue acquérir au fil des années des gènes de résistance aux nouvelles molécules  $\beta$ -lactames comme les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (mobilisés via des plasmides) ; c'est de cette façon qu'on a émergé des souches dites BLSE car productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (Rampal et Ambrose, 2006).

La résistance des bactéries, dont *Klebsiella pneumoniae*, aux différentes familles d'antibiotiques utilisés en thérapie est devenue un réel problème de santé publique. Ceci amène la communauté scientifique à réfléchir à un moyen thérapeutique plus efficace qui

# Introduction

## INTRODUCTION

---

se substituerait aux antibiotiques. Pour se faire, il serait intéressant d'identifier les facteurs de virulence, à l'origine de la pathogénicité des bactéries, de maîtriser leur mode d'action et de comprendre la régulation de leur expression, afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces et mieux ciblées.

Dans ce modeste travail, nous nous proposons de nous initier à l'étude de la virulence chez des souches cliniques de *Klebsiella pneumoniae*, responsables d'infections urinaires. Nous avons tenté d'identifier certains facteurs de virulence, qui semblent être indispensables à l'établissement de l'infection à hauteur des épithéliums urinaires. Cette étude a été effectuée sur le plan génotypique et phénotypique par :

- ✓ la recherche par PCR des gènes codant des adhésines fimbriaires. L'hémagglutination a été effectuée dans le but de mettre en évidence le produit de ces gènes.
- ✓ l'estimation de l'effet bactéricide du sérum humain sur ces souches, une étude qui nous a amené à rechercher la capsule ainsi que le phénotype d'hypermucoviscosité.

# Rappels

## Bibliographiques

### RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

#### I. INFECTIONS NOSOCOMIALES

Par définition, une infection nosocomiale est une infection qui n'est pas présente ou en incubation lors de l'admission. Par convention, on admet qu'une infection survenant plus de 48h après l'admission, ou directement liée à un acte de soin (quelle que soit sa date de survenue), est nosocomiale (Paterson et al., 2004).

Les infections nosocomiales peuvent être directement liées aux soins dispensés au patient ou simplement survenir lors de l'hospitalisation, indépendamment de tout acte médical. Il existe plusieurs types d'infections nosocomiales relevant de modes de transmission différents (Paterson et al., 2004) :

- **Les infections d'origine "endogène"** : le malade s'infecte avec ses propres micro-organismes, à la faveur d'un acte invasif et/ou en raison d'une fragilité particulière.
- **Les infections d'origine "exogène"** : les micro-organismes ont pour origine les autres malades, le personnel ou la contamination de l'environnement hospitalier.

Quel que soit son mode de transmission, la survenue d'une infection nosocomiale est favorisée par la situation médicale du patient qui dépend de : l'âge et la pathologie, certains traitements, la réalisation d'actes invasifs nécessaires au traitement du patient.

Les infections nosocomiales sont causées principalement par des bactéries à Gram positif (staphylocoque doré) suivie des bactéries à Gram négatif. Parmi les entérobactéries responsables d'infections nosocomiales, *Escherichia coli* est en tête de liste suivie de *Klebsiella pneumoniae*. Ces bactéries sont souvent caractérisées par leur multirésistance aux antibiotiques (Lasme-Guillao et al., 2008).

#### II. INFECTIONS A KLEBSIELLES

Les infections à Klebsielles précisément *Klebsiella pneumoniae* productrices de bêta lactamases à spectre élargi (BLSE) représentent une cause importante de mortalité en milieu hospitalier. Cette bactérie se propage manifestement de manière épidémique et est responsable d'infections nosocomiales sévères et difficiles à traiter telle que les infections urinaires, pulmonaires, septicémiques... La fréquence des infections nosocomiales causées par *Klebsiella pneumoniae* varie entre 3% à 17%, ce qui la classe parmi les huit agents pathogènes les plus pertinents dans les hôpitaux (Sahly et al., 2000 ; Dabernat et al., 2004 ; Heggman et al., 2004).

Les souches d'origine clinique de *Klebsiella pneumoniae* ont développé différents mécanismes de résistance aux antibiotiques. Cette résistance acquise est la résultante d'une modification des gènes chromosomiques ou de la mobilisation de gènes de résistance véhiculés via des plasmides, transposons... aboutissant à l'activation de plusieurs mécanismes. Cette résistance traduit, en clinique, un échec thérapeutique de plus en plus inquiétant (Messai, 2007).

### III. FACTEURS DE VIRULENCE

En plus de la résistance aux antibiotiques, *Klebsiella pneumoniae*, a acquis au cours de l'évolution des propriétés qui la rendent capable d'induire des dommages dans les tissus de l'hôte. De telles propriétés sont la conséquence de l'expression de facteurs de virulence qui permettent à la bactérie d'effectuer diverses étapes dans sa relation avec l'hôte au cours de l'infection. Ces étapes correspondent à :

- La colonisation des surfaces muqueuses qui permet aux bactéries de s'établir de manière stable dans les tissus de l'hôte.
- Le franchissement des muqueuses qui permet aux bactéries d'y adhérer et de se multiplier à leurs surfaces.
- La résistance aux défenses internes de l'organisme.
- La production d'un effet toxique.

Chaque étape est caractérisée par l'expression d'un ou de plusieurs facteurs de virulence. Les gènes de ces derniers sont soumis à une régulation stricte conditionnée par l'environnement à savoir les organes atteints à chaque étape (Mainil, 2003).

Les souches pathogènes de *Klebsiella pneumoniae* possèdent de nombreux gènes chromosomiques, plasmidiques ou encore intégrés dans des îlots de pathogénicité, codants pour des facteurs de virulence. Les plus importants sont : la capsule, la production d'adhésines, de sidérophores, ainsi que la résistance au sérum (Figure 1) (podschun et Ullmann, 1998).

#### III.1. Adhésines

L'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales des muqueuses est une première étape cruciale dans le processus infectieux. En effet, les bactéries doivent se rapprocher autant que possible des surfaces muqueuses et surtout maintenir cette proximité en s'attachant à la cellule hôte. L'attachement est médié par des structures bactériennes dites « adhésines » et des récepteurs exprimés à la surface des cellules hôte. Il existe deux grandes familles d'adhésines : les adhésines « fimbriaires » et « afimbriaires » (Mainil, 2005).

Les adhésines sont mises en évidence principalement par leur capacité à agglutiner les érythrocytes de différentes espèces animales. Elles sont dites « mannose sensibles » si la réaction est inhibée par l'ajout du  $\alpha$ -D-mannose non métabolisable dans le milieu. Au contraire, elles sont dites « mannose résistantes » si la réaction n'est pas inhibée par le  $\alpha$ -D-mannose (Ottow, 1975).

Les entérobactéries expriment principalement les adhésines fimbriaires. La plupart des souches de *K. pneumoniae* produisent les fimbriae de type 1 et de type 3, qui sont des appendices pouvant atteindre 2 $\mu$ m de longueur. Les fimbriae sont de structure cylindrique, creuse, rigide, fine (type 1) ou épaisse (type 3 de 2 à 4 nm de diamètre) (Tarkkanen et al., 1990 ; Klemm et Schembri, 2000).

### III.1.1. Fimbriae de type 1

Les fimbriae de type 1 ont été bien caractérisés, ils sont présents dans de nombreuses espèces d'entérobactéries dont *Klebsiella pneumoniae*. Ils sont responsables de l'adhésion aux structures contenant le mannose (Sturve et al., 2008).

Les gènes codant les fimbriae de type 1 chez *klebsiella pneumoniae* sont organisés en opérons groupés généralement sur le chromosome (parfois dans un îlot de phatogénicité) et rarement sur un plasmide (Sauer et al., 2000 ; Mainil, 2005).

La figure 2 représente l'organisation du cluster de gènes *fim* d'*E. coli* qui est similaire à celui retrouvé chez *K. pneumoniae* : *fimA* code pour la sous unité majeure. Les constituants mineurs sont codés par les gènes *fimF* et *fimG*. Le gène *fimH* code pour l'adhésine proprement dite responsable de l'attachement aux cellules de l'hôte. *fimC* et *fimD* sont impliqués dans le transport et la localisation à la surface bactérienne des fimbriae de type 1, et *fimI* code pour une protéine homologue à *FimA*. Les produits des gènes *fimB* et *fimE* interviennent dans le phénomène de variation de phase qui régule l'expression des fimbriae (Krogfelt et al., 1990). La figure 3 représente l'assemblage des produits des gènes précédemment cités.

Chez les entérobactéries, en particulier *klebsiella pneumoniae*, l'expression des gènes des fimbriae est caractérisée par le phénomène de variation de phase qui permet au bactéries d'exprimer ces adhésines qu'en cas de nécessité, comme dans le cas de l'étape de franchissement de la muqueuses ; une fois ces barrière franchies, les bactéries cessent de les exprimer pour éviter toute interaction avec les résidus mannose des récepteurs des phagocytes et échapper donc à la lectinophagocytose (Podschun et Ullman, 2000).

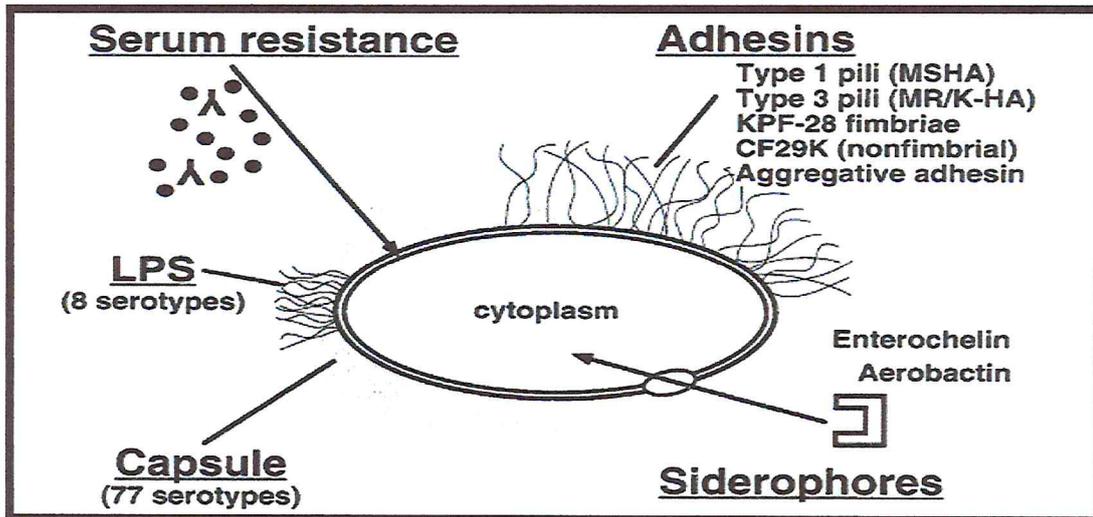


Figure 1: Principaux facteurs de virulence exprimés par *Klebsiella pneumoniae* (Podschn et Ullmann, 1998)

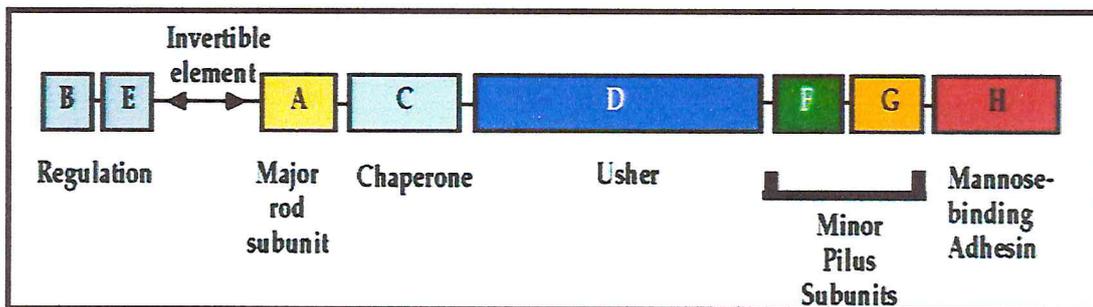


Figure 2 : Organisation du cluster de gènes *fim* chez *E. coli* (Sansonetti, 2011)

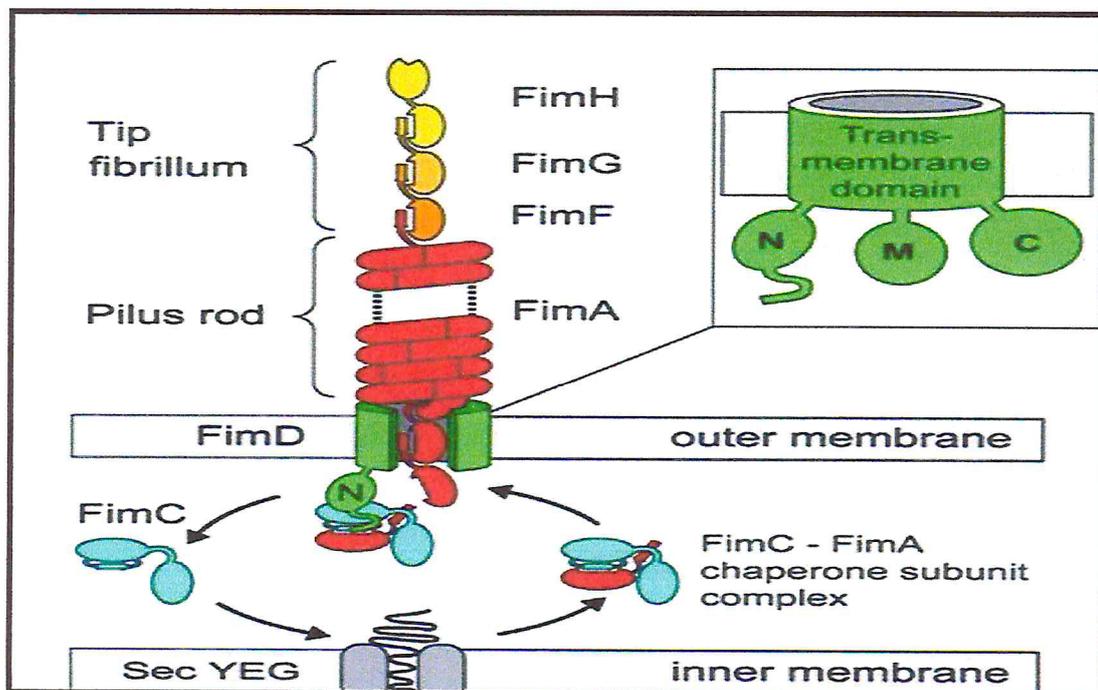


Figure 3 : Structures des Fimbriae de type 1 chez *E. coli* (Sansonetti, 2011)

### III.1.2. Fimbriae de type 3

Les fimbriae de type 3 agglutinent seuls les érythrocytes qui ont été traités avec du tannin. Malgré son nom, le mannose-résistant, Klebsiella-like hémagglutination (MR/K-HA), implique que ce type fimbriale est synthétisé seulement par *Klebsiella*, des études ultérieures ont démontré que les pili de type 3 sont produits dans de nombreux genres entériques. Par ailleurs, ces pili, ne sont pas identiques dans tous les genres d'entérobactéries, puisque des études sérologiques ont montré une diversité antigénique considérable.

Ces pili sont capables de se lier aux différentes cellules humaines. Les souches de *Klebsiella pneumoniae* exprimant les pili de type 3 adhèrent aux cellules endothéliales, les épithéliums des voies respiratoires, et les cellules uroépithéliales. Dans les reins, l'adhérence bactérienne aux membranes basales tubulaires des capsules de Bowman, et des vaisseaux rénaux est médié par les pili de type 3 (Tarkkanen et al., 1990 ; Hornick et al., 1991 ; Hornick et al., 1995).

Les fimbriae de type 3 sont codées par le cluster de gènes *mrk* qui fut cloné à partir d'une souche de *Klebsiella pneumoniae* (figure 4). Ce cluster comporte six gènes (Allen et al., 1991).

### III.2. Capsule

Le genre *Klebsiella* développe habituellement des capsules composées de complexes polysaccharidiques acides. Les sous-unités capsulaires répétées sont formées de polysaccharides capsulaires et très souvent d'acides uroniques (composants chargés négativement). Ce matériel forme d'épais faisceaux de structures fibreuses couvrant la surface bactérienne.

La capsule est un important facteur de virulence chez *Klebsiella*, elle protège cette bactérie de la phagocytose par les polynucléaires granulocytes, d'une part, et lui permet d'échapper à l'action bactéricide du système du complément, d'autre part. *Klebsiella* possède 77 sérotypes dont certains sont plus virulents que d'autres. En effet, il a été démontré que les souches exprimant les antigènes capsulaires K1 et K2 sont les virulentes à l'origine d'infections profondes et très graves (Kauffmann, 1949 ; Mizuta et al., 1983 ; Podschun et Ullmann., 1992).

### III.3. Production de sidérophores

Les concentrations en fer libre dans les fluides corporels diminuent jusqu'à des valeurs extrêmement basses ( $10^{-18}$  molaire); du à sa liaison à des protéines intracellulaires (l'hème, l'hémosidérine, la ferritine) ou extracellulaires (la transferrine

et la lactoferrine). Une immunité nutritionnelle s'établit alors dans l'organisme hôte pour limiter la croissance bactérienne. En effet, le fer est un oligoélément indispensable à la croissance bactérienne ; il joue un rôle déterminant dans divers processus biochimiques comme la synthèse d'ATP, d'ADN et la régulation des gènes (Neilands, 1995 ; Pierre et Lescoat, 2003 ; Mainil, 2005).

Les bactéries pathogènes peuvent s'approvisionner en fer selon différentes stratégies ; la production de sidérophores en est le moyen le plus efficace. Les sidérophores sont des composés de faible poids moléculaire ayant de très grandes affinités pour le fer et dont la synthèse est induite suite à une déficience de ce dernier ; ce sont donc des chélateurs. Ils sont excrétés dans le milieu extérieur, fixent l'ion ferrique  $Fe^{3+}$  et sont soit transportés directement dans le cytoplasme bactérien, soit se fixent eux-mêmes sur un récepteur membranaire spécifique pour enfin libérer le fer à l'état ferreux  $Fe^{2+}$  (Griffiths, 1997 ; Dover, 2000) (Figure 5).

Les entérobactéries peuvent exprimer trois principaux systèmes de sidérophores (Mainil, 2003 ; Lawlor et al., 2007) :

- **L'entérobactine** : C'est un catéchol isolé en 1970 par deux équipes ; celle de Pollack et Neilands, à partir de *Salmonella typhimurium* et celle d'O'Brien et Gibson, à partir d'*Escherichia coli*. Ils les nommèrent respectivement entérobactine et entérocheline (O'Brien et Gibson, 1970 ; Pollack et Neilands, 1970). L'entérobactine est le sidérophore le plus répandu chez les entérobactéries ; il a été retrouvé chez d'autres membres de cette famille dont *Klebsiella*. Le caractère ubiquitaire de ce système est dû à une localisation généralement chromosomique du cluster de gène codant ce système (Podschun et Ullmann, 1998 ; Koczura et Kaznowski, 2003 ; Raymond et al., 2003 ; Lawlor et al., 2007).
- **L'aérobactine** : C'est un hydroxamate dont la constante d'affinité pour le fer est plus faible ( $10^{25}$ ) que celle de l'entérobactine. Cependant ce système est plus efficace du fait de sa plus grande stabilité et de sa meilleure solubilité ainsi que de son recyclage (Podschun et Ullmann, 1998 ; Mainil, 2003). L'aérobactine a été initialement isolée à partir d'*Enterobacter aerogenes*, et a été détectée comme un produit du plasmide pColV-K30, communément retrouvé chez les souches cliniques d'*Escherichia coli* (Gibson et Magrath, 1969). Ce système a subi un important transfert vers différents genres d'entérobactéries notamment certaines souches de *Salmonella*, *Shigella* et *Klebsiella* (McDouGall et Neilands, 1984 ; Nassif et Sansonetti, 1986 ; Vokes et al., 1999).

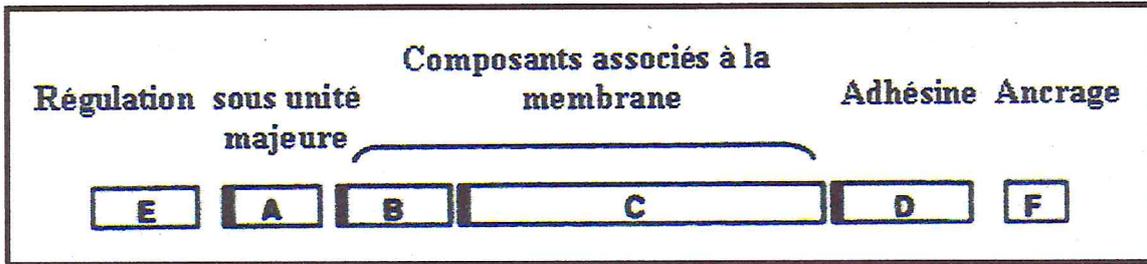


Figure 4 : Organisation des gènes *mrk* de *Klebsiella pneumoniae* (Allen et al., 1991)

*mrkA* code pour la sous unité majeure ; *mrkB* code pour une protéine chaperon ; *mrkC* code pour une protéine d'assemblage ; *mrkD* code pour l'adhésine ; *mrkF* code pour une protéine d'ancrage (identifiée récemment comme une sous-unité mineure fimbriare) ; *mrkE* pour une protéine régulatrice.

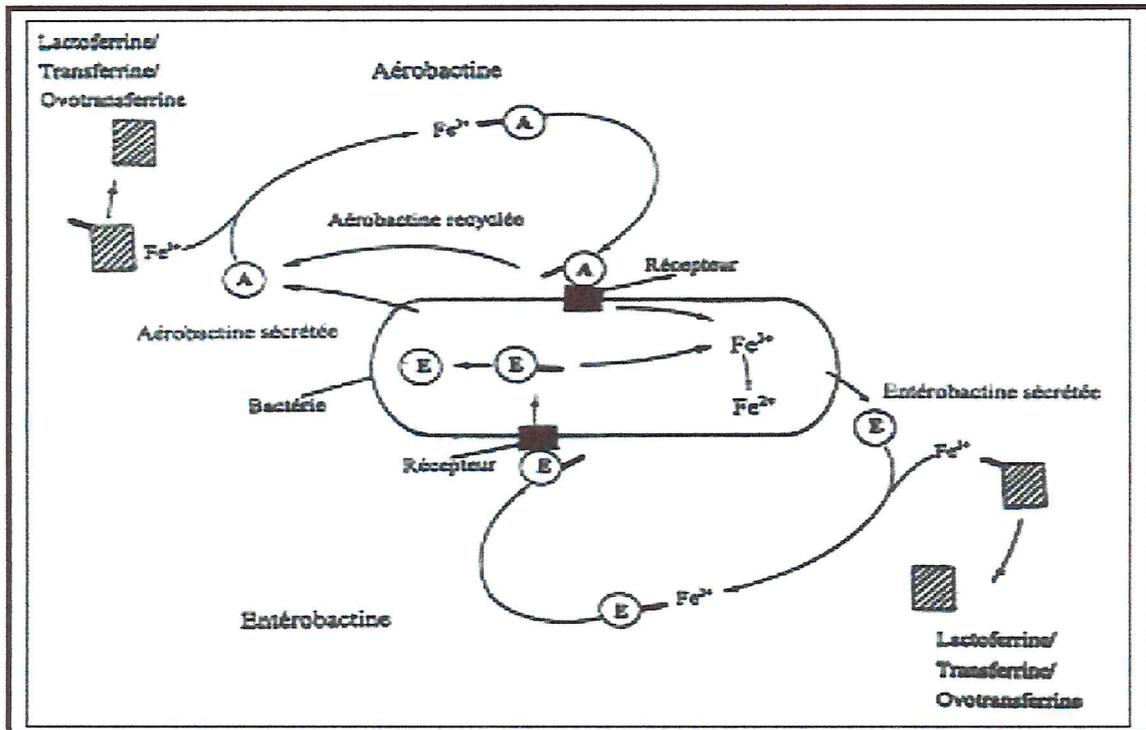


Figure 5 : Stratégies d'approvisionnement en fer chez les bactéries (Mainil, 2005).

Le caractère transférable des gènes de ce système est conforté par les données montrant que l'opéron de l'aérobactine est flanqué par deux éléments transposables, IS630 et IS3, et les séquences tRNA<sup>Lys</sup> et tRNA<sup>Trp</sup> de *E. coli* K12 qui semblent jouer un rôle dans le transfert horizontal des îlots de pathogénicité parmi les bactéries pathogènes (Hou, 1999).

- **La yersiniabactine** : C'est un phénolate décrit à l'origine dans un îlot de pathogénicité « High- Pathogenicity Island » (HPI) présent chez des souches hautement pathogènes du genre *Yersinia*. Cette îlot semble se transféré par transfert horizontal parmi les différentes espèces d'entérobactéries dont *Klebsiella pneumoniae* (Pelludat et al., 1998 ; Schubert et al., 2000 ; Koczura et Kaznowski, 2003).

### III.4. Production de toxines

Les toxines ou exotoxines sont des enzymes extracellulaires qui pourraient jouer un rôle dans la pathogénicité des souches de *klebsiella pneumoniae* en déjouant les mécanismes de défense de l'hôte. Les hémolysines sont des toxines qui permettent la lyse des érythrocytes et la digestion de l'hémoglobine. Les bactéries utilisent les produits de dégradation issus de cette digestion comme source de fer, les bactéries qui produisent des hémolysines sont dites hémolytiques. Il existe deux types d'hémolysines :  $\alpha$  et  $\beta$  (Cavalieri et al., 1984 ; Mainil, 2003).

- **Hémolysine  $\alpha$**

L'hémolysine  $\alpha$  (HlyA) est une toxine sécrétée qu'on retrouve dans le surnageant des cultures bactérienne. Elle est codée par le gène *hlyA* appartenant à l'opéron *hly*. Cet opéron est essentiellement localisé sur des plasmides dans les souches porcines et canines, tandis qu'ils le sont sur le chromosome bactérien dans les souches humaines et chez d'autres souches animales. Sur le chromosome bactérien, cet opéron fait souvent parti d'îlots de pathogénicité, seul ou en compagnie des gènes qui codent pour les adhesines (Gyles, 1994 ; Ludwig et Goebel, 1997 ; Nagy et Fekete, 1999).

- **Hémolysine  $\beta$**

L'hémolysine  $\beta$  (HlyB) est moins bien caractérisée. Contrairement à l'hémolysine  $\alpha$ , Hly $\beta$  n'est pas sécrétée par les bactéries. Deux hypothèses ont été proposées quant à l'origine de cette forme non sécrétée (Van bost et Mainil, 2003).

selon la première hypothèse, suggérée au début, Hly $\beta$  est une forme de HlyA qui reste attachée à la cellule bactérienne, probablement suite à des mutations qui sont survenus dans l'opéron *hly*. Il avait aussi été montré que la délétion de la séquence qui code pour

les 37 acides aminés carboxyterminaux de HlyA ne modifie pas son activité hémolytique, mais prévient sa sécrétion dans le milieu extérieur.

La deuxième hypothèse considère que les deux toxines sont codées par deux gènes différents. En effet, il a été démontré, d'une part, que l'activité de Hly $\beta$  n'est pas neutralisée par des anticorps dirigés contre Hly $\alpha$  ; d'autre part, certaines souches d'*E. coli* produisent à la fois Hly $\alpha$  et Hly $\beta$ . Les résultats de clonage des gènes qui codent pour Hly $\beta$  ont cependant confirmé l'absence de relation entre Hly $\alpha$  et Hly $\beta$ .

### IV. IMMUNITÉ ANTIBACTÉRIENNE

Il existe schématiquement deux types de réponse immunitaire lors d'une infection bactérienne. La réponse innée est similaire dans ses mécanismes quel que soit l'agent infectieux, et détermine en grande partie le degré de résistance innée d'un individu aux infections. La réponse immunitaire adaptative est dirigée contre un micro-organisme donné ; elle est dite humorale dans le cas de la mise en jeu des lymphocytes B et cellulaire dans le cas de l'activation des lymphocytes T (Berche et al., 1991).

#### IV.1. Réponse immunitaire innée

En franchissant des épithéliums muqueux (intestinal, urinaire), les bactéries virulentes, dont *Klebsiella pneumoniae*, induisent une réaction inflammatoire qui tend à limiter l'invasion tissulaire en les détruisant. Cette réaction inflammatoire déclenche des mécanismes bactéricides qui font intervenir principalement les phagocytes et le système du complément (Bienenstock, 1986) (Figure 6).

##### IV.1.1. Réaction inflammatoire

La réaction inflammatoire est caractérisée par la survenue lors de l'infection des signes cliniques : douleur, chaleur, rougeur. En effet, les lésions tissulaires entraînées par l'envahissement bactérien induisent un brutal changement dans la microcirculation tissulaire. La vasodilatation qui en résulte est déclenchée par le relargage de médiateurs chimiques (histamine, sérotonine, kinines ...) secrétés à partir de cellules stimulées non spécifiquement (mastocytes, polynucléaires basophiles, plaquettes). Cette réaction s'accompagne d'une importante extravasation de protéines sanguines (protéines du système du complément, fibronogène, C-reactive protéine ...) (Berche et al., 1991).

Très rapidement survient un afflux massif de leucocytes qui infiltrent le foyer infectieux. L'endothélium vasculaire devient en effet adhérent et les leucocytes sanguins peuvent le franchir par diapédèse, entrant ainsi en contact direct avec les germes. La diapédèse est favorisée à la fois par certaines substances d'origine

bactérienne et par la production locale de substance chimiotactiques d'origine cellulaire (chimiokines...) ou humorales (produits de dégradation du complément ...) (Figure 7).

Ainsi à la porte d'entrée de l'infection puis dans tous les tissus où les bactéries ont pu se propager, se constituent des foyers infectieux où les mécanismes cellulaires (phagocytes) et humoraux (complément...) jouent un rôle essentiel pour éliminer l'agent infectieux. (Mc Nabb et al., 1981)

### IV.1.2. Phagocytose

La phagocytose est un processus énergétique (actif) qui permet aux macrophages et aux polynucléaires neutrophiles d'ingérer de grosses particules (0.5 $\mu$ m de diamètre) telles que les bactéries. Ces dernières adhèrent aux cellules phagocytaires qui les entourent et les internalisent dans des vésicules appelées phagosomes. Ces derniers fusionnent avec un lysosome. Dans le phagosolysosome, les bactéries sont soumises aux mécanismes bactéricides des phagocytes (Abul et al., 2007).

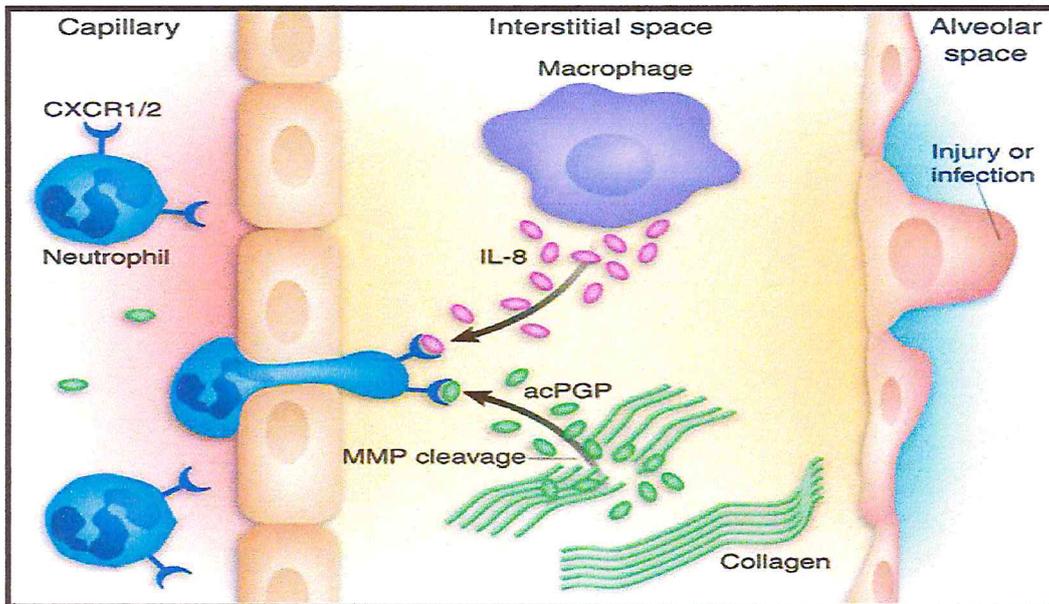
La consommation d'oxygène par les phagocytes augmente et s'accompagne d'une production d'ions superoxydes (burst oxydatif ou flambée oxydative) par action d'une oxydase membranaire (NADPH). Ces ions superoxydes sont transformés par une superoxyde-dismutase en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> très bactéricide qui est détoxifié par une catalase, une myéloperoxydase et une glutathion peroxydase. Le système le plus important dans les polynucléaires neutrophiles est celui de la myéloperoxydase produisant de l'hypochlorite ClO<sup>-</sup>. L'effet bactéricide serait obtenu par plusieurs mécanismes : décarboxylation des acides aminés par les ions ClO<sup>-</sup> et clivage des ponts peptidiques entraînant la perte de l'intégrité pariétale ; production de chloramines à partir des ions ClO<sup>-</sup>, capable d'oxyder les groupes SH libres, entraînant la mort bactérienne (Berche et al 1991) (Figure 8).

De façon concomitante à la flambée oxydative, survient la fusion phagolysosomiales avec déversement du contenu des lysosomes dans le phagosome. Une première fusion survient avec les granules primaires riches en myéloperoxydase, hydrolase acide, lysozyme dégradant le mucopeptide, protéines cationiques bactéricides agissant sur la perméabilité de la membrane externe des bacilles à Gram négatif. Les granules secondaires fusionnent après cette première vague pour compléter l'étape de digestion en produisant notamment de la phospholipase A, du lysozyme, des protéines chélatrices de la vitamine B<sub>12</sub> et du fer (lactoferrine) (Berche et al., 1991).

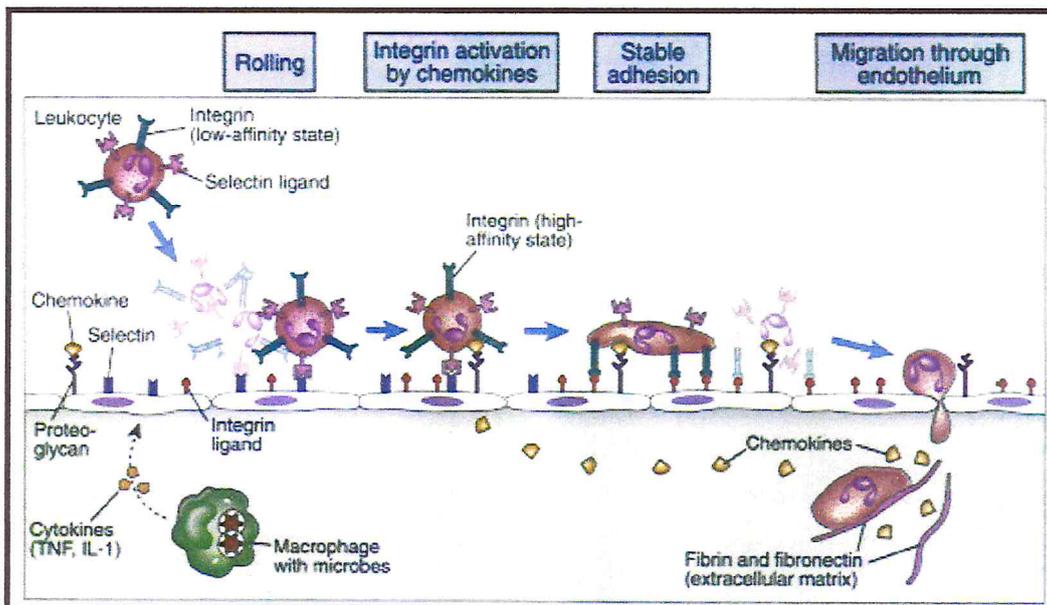
### IV.1.3. Système du complément

Le complément représente un ensemble de protéines sériques qui, suite à leur activation, forment un complexe d'attaque membranaire (*Membrane attack complex* ou

MAC) qui s'insère dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif, ce qui entraîne leur mort et leur cytolyse.



**Figure 6 :** Réaction inflammatoire induite suite à l'adhésion de la bactérie au niveau de l'épithélium tubulaire du système urinaire (Song (Song et al., 2007).



**Figure 7 :** Recrutement des leucocytes au niveau du site infectieux lors d'une réaction inflammatoire (Abul et al., 2007).

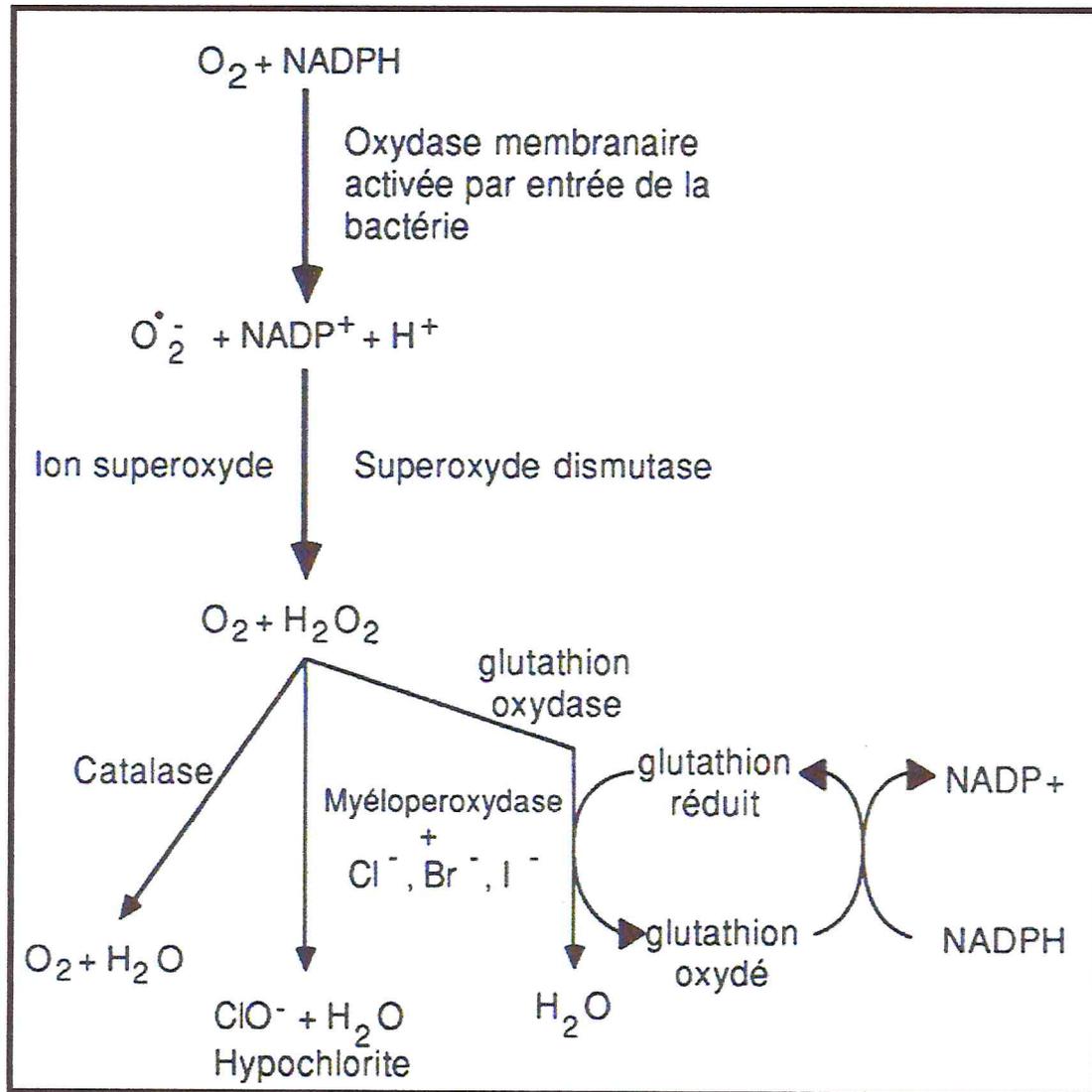


Figure 8 : Consommation de l'oxygène par les phagocytes et production de dérivés oxygénés bactericides (Berch et al., 1991).

## RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

---

L'activation du système du complément conduit entre autre à l'attraction des phagocytes et à l'opsonisation des bactéries (Taylor, 1983 ; Salyers et Whitt, 1994 ; 2002 ; Mainil, 2005).

L'effet bactéricide du sérum sur les bactéries à Gram négatif dont *klebsiella pneumoniae* met en jeu deux principales voies d'activation du complément. La voie alterne, indépendante des anticorps, est activée par les polysaccharides de surface dont l'antigène O du LPS. La voie classique est activée suite à l'interaction des anticorps avec des antigènes de la surface bactérienne. Cette voie peut aussi être activée directement par l'interaction du composant C1 avec le lipide A ou les antigènes O du LPS (Vukajlovich et al., 1987)

L'activation par la voie classique fait intervenir un complexe macromoléculaire composé de trois protéines : la protéine de reconnaissance, C1q, qui est associée à deux sérines estérases C1r et C1s. Le C1q se fixe à un de ses ligands dont les plus importants sont les domaines CH2 du fragment Fc des immunoglobulines IgG1, IgG2, et IgG3 et le domaine CH4 des IgM. Cette fixation entraîne l'auto-activation de C1r, qui clive et active ainsi C1s. Le composant C1s activé clive alors le composant C4 présent dans le plasma en un petit fragment C4a, libéré en phase fluide, et un fragment majeur C4b, qui se fixe alors de façon covalente à la surface-cible de l'activation. Le composant C2, circulant dans le plasma, peut alors s'associer au C4b et être clivé à son tour par C1s en un fragment C2a, qui reste associé à C4b, et un fragment C2b libéré en phase fluide. Ainsi se trouve formé sur la surface activatrice le complexe C4b2a, appelé C3 convertase classique car il a la capacité de cliver C3 (Brostoff et al., 2007).

La voie alterne est activée par des substances d'origine bactérienne telles que le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram négatives, par des bactéries Gram positives, des virus ou des cellules infectées ou transformées. Les interactions des protéines de la voie alterne aboutissent à la formation de la C3 convertase alterne. L'assemblage de la C3 convertase alterne commence avec l'association d'une molécule de C3b avec le Facteur B. Cette association permet au facteur B d'être clivé par une sérine protéase circulant sous forme active dans le plasma, le Facteur D, produisant les fragments Ba et Bb. Le fragment Ba s'exclut du complexe tandis que le fragment Bb reste associé à C3b et acquiert une activité enzymatique. Le complexe C3bBb est la C3 convertase de la voie alterne capable de catalyser le clivage de C3 en C3b de façon absolument identique au clivage réalisé par le complexe C4b2a. La C3 convertase alterne est un complexe enzymatique très labile qui peut être stabilisé en s'associant avec la Properdine (Brostoff et al., 2007).

Le premier dépôt covalent de C3b se fait de façon aléatoire mais cette voie d'activation est capable d'une auto-amplification qui est très importante pour la reconnaissance et l'élimination des pathogènes en l'absence d'anticorps spécifiques (Brostoff et al., 2007).

A l'issue des 2 voies d'activation, deux C3 convertases (C4b2a, la C3 convertase classique et C3bBb, la C3 convertase alterne) peuvent être formées. Ces deux complexes moléculaires ont une même activité enzymatique qui assure le clivage de la protéine C3 en C3a et C3b. C3a est une petite molécule libérée en phase fluide, possédant des activités biologiques importantes dans la réaction inflammatoire, qui fait partie des anaphylatoxines. Par ailleurs, le C3b se fixe de façon covalente sur un résidu thioester de la surface activatrice à proximité de la C3 convertase. L'association des C3 convertases avec des molécules supplémentaires de C3b peut changer leur affinité pour leur substrat et leur conférer une activité dite « C5 convertase ». En effet, la protéine C5 peut alors se lier aux complexes (C4b2a)C3b ou (C3bBb)C3b et être soumise à leur activité enzymatique. La protéolyse de C5 (par les sous-unités C2a ou Bb des complexes) détache un petit peptide, le C5a, qui est une autre anaphylatoxine libérée en phase fluide. Le fragment restant est la molécule C5b. Ce dernier peut s'associer aux composants C6, C7, C8 et C9 pour former le complexe d'attaque membranaire. Le C5b s'associe d'abord au C6, puis C7 et le C8 qui commencera un ancrage dans la membrane plasmique de la cellule cible. Le complexe dit « sublytique » C5b8 s'associe alors à plusieurs molécules de C9 qui en se polymérisant créent un véritable pore transmembranaire. Ainsi le complexe d'attaque membranaire (appelé mC5b9) permet une lyse osmotique de la cible (microorganisme, cellule transformée) (Figure 9) (Brostoff et al., 2007).

### I.2. Réponse immunitaire adaptative

Les bactéries virulentes qui surmontent les défenses non spécifiques se heurtent à la réponse immunitaire adaptative ou spécifique par laquelle elles peuvent être éliminées. Les mécanismes de la virulence déterminent pour une large part la nature humorale (lymphocyte B) ou cellulaire (lymphocytes T) de la protection conférée par cette réponse. Il est pratique de distinguer d'une part les bactéries sécrétant des toxines qui diffusent dans l'organisme et déterminent les signes cliniques de la maladie (bactéries toxigènes), et d'autre part celle qui envahissent et se propagent dans les tissus (bactéries invasives) (Mimms, 1982).

En règle générale les infections dues à des bactéries toxigènes ou à la multiplication extracellulaire induisent une immunité de type humorale. Les anticorps neutralisants ou protecteurs jouent alors un rôle déterminant dans la guérison et dans la résistance

## RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

acquise. A l'opposé, les bactéries à multiplication intracellulaire mettent en œuvre des macrophages recrutés et activés par les lymphocytes T (immunité cellulaire T). Bien entendu, cette distinction n'exclut pas une participation à un degré variable et de façon synergique des deux types d'immunité lors de nombreux processus infectieux (Figure 10) (Mimms, 1982).

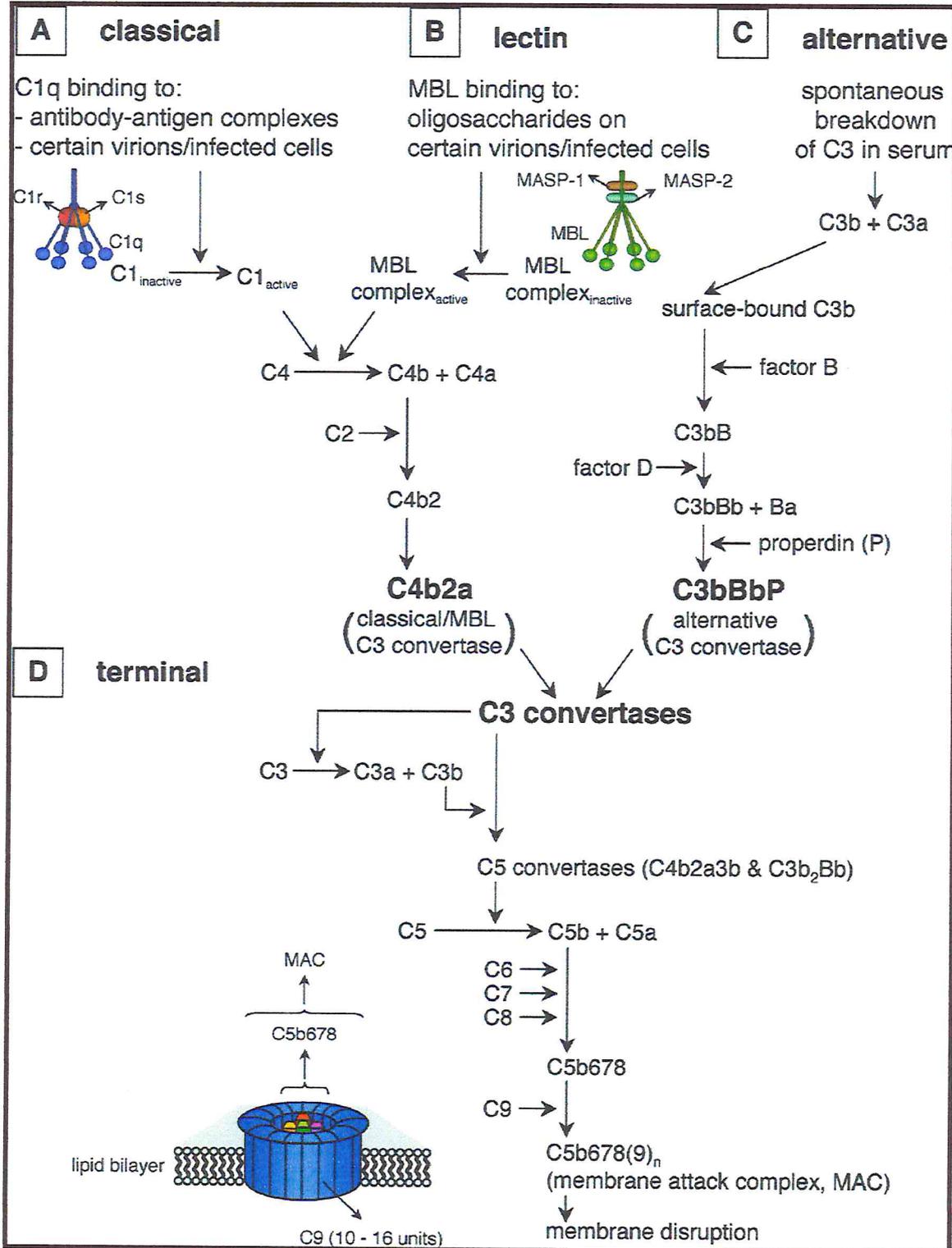


Figure 9: Voies d'activation du système du complément (Herman et al., 2003)

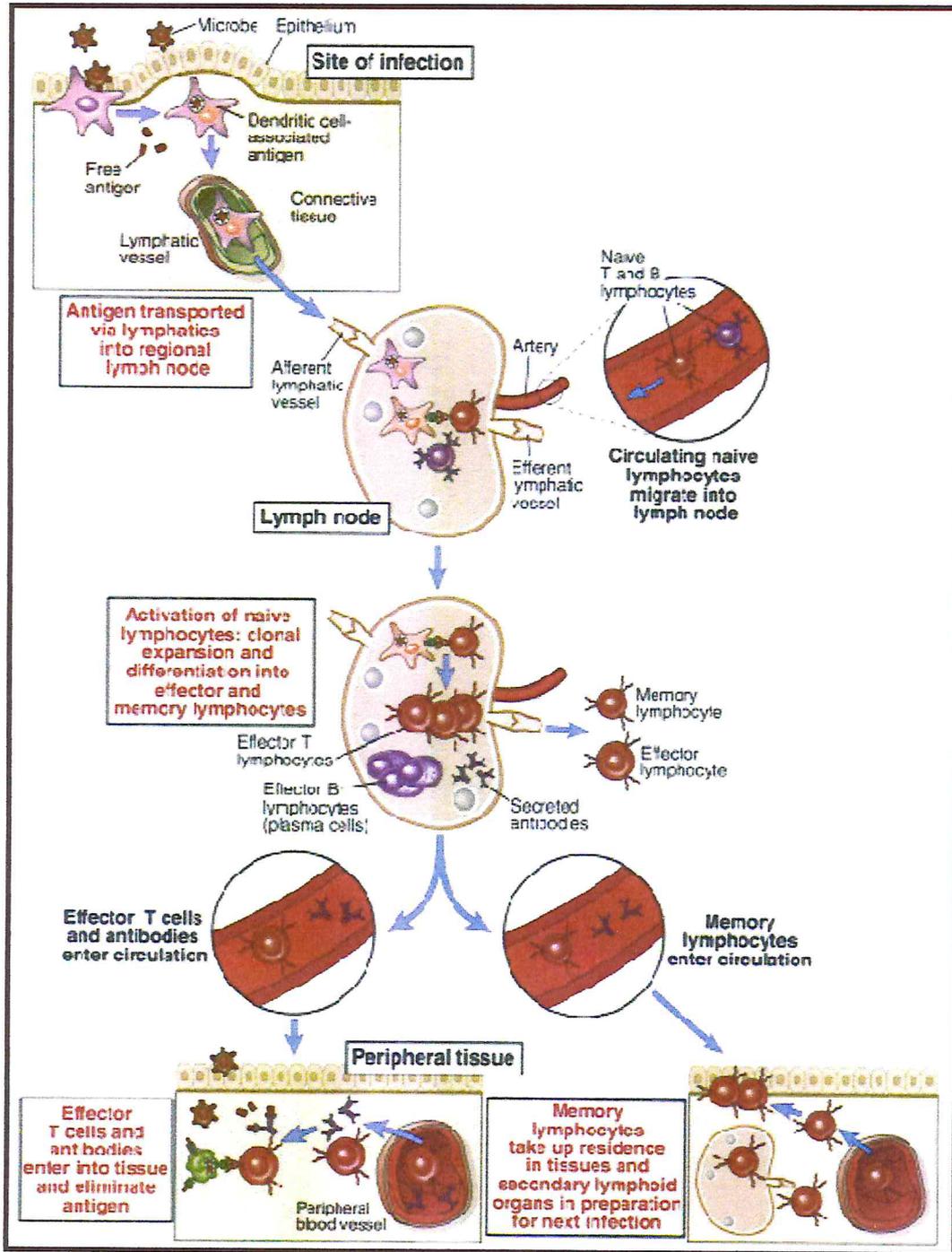


Figure 10 : Anatomie d'activation des lymphocytes (Abul et al., 2007)

Les lymphocytes T et B naïfs, dérivant respectivement du thymus et de la moelle osseuse, migrent vers les organes lymphoïdes secondaires où ils sont activés par des antigènes. Une fois activés, ils se différencient en cellules effectrices et mémoires, qui peuvent migrer au niveau des tissus, siège de l'infection.

### MATERIEL ET METHODES

#### Historique / Problématique

L'étude que nous avons réalisée a été effectuée dans le but de compléter un travail antérieur, qui rentre dans le cadre d'un projet de recherche, effectué au laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire (LBCM), équipe de Génétique, au niveau de la faculté des Sciences Biologique (FSB) de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumedienne (USTHB).

Une collection de 67 souches de *Klebsiella pneumoniae* a été obtenue par l'analyse de prélèvements biologiques de diverses origines (urines, sang, poumons, pus, liquide céphalo-rachidien, liquide d'ascite). Ces prélèvements proviennent de 4 hôpitaux d'Alger.

L'étude avait pour but d'estimer le pouvoir pathogène des souches isolées, en recherchant divers facteurs de virulence sur le plan phénotypique et génotypique.

Le présent travail s'inscrit dans le même cadre ; nous avons tenté de compléter cette analyse sur 18 souches cliniques de *Klebsiella pneumoniae* responsables d'infections urinaire nosocomiales.

Les facteurs de virulence que nous avons recherchés interviennent dans des étapes clé de l'établissement de l'infection, notamment la colonisation des muqueuses et la résistance aux différents mécanismes de défenses de l'organisme hôte.

Notre travail s'est articulé sur deux plans :

- **Sur le plan génotypique:** par la recherche de 4 gènes codant 4 adhésines différentes. Cette partie a été effectuée au niveau du laboratoire de Génétique (LBCM/FSB/USTHB).
- **Sur le plan phénotypique :** par l'analyse de l'effet bactéricide du sérum humain, la recherche des adhésines, la capsule ainsi que l'hypermucoviscosité. Cette partie a été effectuée au laboratoire de Microbiologie de la Faculté des sciences agrovétérinaires département de Biologie.

# Matériel Et Méthodes

## I. MATERIEL

### I.1. Matériel biologique

#### I.1.1. Souches sauvages

Notre travail a porté sur 18 souches cliniques de *Klebsiella pneumoniae* isolées de l'hôpital Bab ElOued d'Alger. Ces souches ont été isolées de prélèvements urinaires (ECBU).

Tableau I: Souches cliniques de *K.pneumoniae*

<u>Souches</u>	<u>Origine hospitalière</u>
KS1	
KS4	
KS13	
KS20	
KS21	
KS23	
KS29	
KS34	Bab Eloued
KS35	
KS47	
k554	
KS56	
KS69	
KS70	
KS73	
KS82	
KS89	
KZ29	

#### I.1.2. souches de références

Des souches de références témoins positifs de la PCR ont été utilisées dans cette étude. Ce sont deux espèces de *Klebsiella pneumoniae* productrices d'une  $\beta$ -lactamase à spectre élargie dont le génotype est le suivant: *FimH+*, *mrkD+*, *kpn+*; *ycfm+*, *iutA+*, *iroN+*, *entB+*, *irp1+*, *irp2+*, *fyuA+*, *ybtS+*, *rmpA+*.

*Escherichia coli* K12 est une souche de référence qui a été utilisée pour le test de l'effet bactéricide du sérum humain dont elle est sensible.

## MATERIEL ET METHODES

### I.1.3. Sang et sérum

Le test d'hémagglutination a nécessité l'utilisation de sang humain frais de groupe O Rh+, prélevé dans des tubes citratés. Concernant l'effet bactéricide du sérum humain, du sérum sain humain fut utilisé.

### I.2. Matériel non biologique

#### I.2.1. Appareillage et matériels consommables

Tout le matériel consommable ainsi que les appareils utilisés pour la réalisation de ce travail sont résumés dans l'annexe (i).

#### I.2.2. Solutions utilisées

Les différentes solutions utilisées dans l'étude phénotypique et génotypique sont résumées dans le tableau II. La composition de ces solutions est résumée dans l'annexe (i).

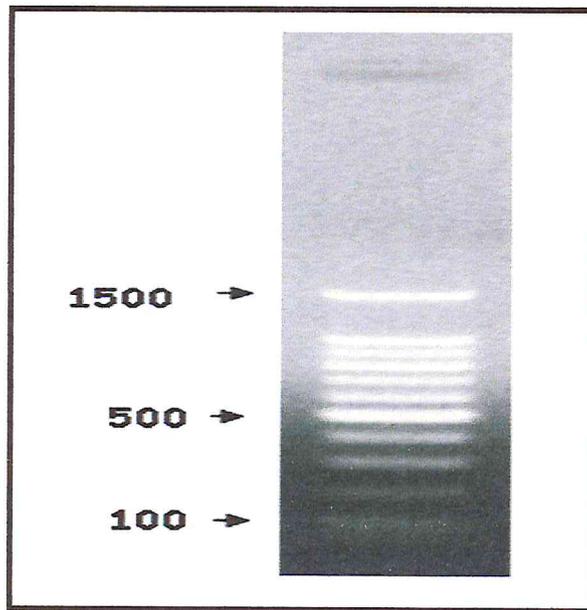
Tableau II : Solutions utilisées dans l'étude phénotypique et génotypique

Solution	Technique	Composition
Tampon TBE Tampon de dépôt	Electrophorèse sur gel d'agarose	
Luria broth (LB) Brain heart infusion (BHIB)	Culture bactérienne	voir annexe (i)
PBS	Préparation des érythrocytes	

### I.3. Autres matériels

#### I.3.1. Marqueur de taille

Nous avons utilisé le marqueur de taille 100 bp DNA Ladder (Proméga) au cours des électrophorèses des différents produits PCR.



**Figure 11** : Marqueur de taille des produits d'amplification par PCR

Mp, 100bp DNA Ladder ; la taille des marqueurs est indiquée en pb

### I.3.2. Amorces spécifiques

L'étude génotypique des adhésines par PCR a nécessité l'utilisation d'amorces spécifiques aux gènes codant les adhésines des fimbriae de type 1 et 3, d'une protéine FimH-like ainsi que d'une protéine putative de liaison à la fibronectine. La liste des amorces utilisées est indiquée dans le **tableau III**.

## II. METHODES

### 1. Etude génotypique

#### 1.1. Extraction d'ADN pour la PCR

Les réactions PCR peuvent être réalisées en utilisant comme sources d'ADN un lysat cellulaire obtenu par chauffage à 100°C pendant 10min (Feria *et al.*, 2002).

Plusieurs colonies bactériennes sur gélose sont mises en suspension dans 200µl d'eau distillée. Après agitation, les microtubes sont incubés dans un bain Marie de 100°C pendant 10 minutes. Les suspensions bactériennes sont centrifugées, 2 minutes à 120000 tours/min. Après 5 minutes d'incubation à une température ambiante, Les débris

cellulaires sont éliminés et le surnageant contenant l'ADN est récupéré dans des microtubes stériles.

### 1.2. Réaction PCR

Des réactions PCR ont été effectuées dans le but de rechercher 4 gènes codant des adhésines (Tableau III):

- *fimH* : codant pour l'adhésine de type 1.
- *mrkD* : codant pour l'adhésine de type 3.
- *Kpn* : codant pour une protéine FimH-like.
- *ycfM* : codant pour une protéine de liaison à la fibronectine.

Les réactions PCR sont réalisées dans un volume de 12,5µl ; les concentrations finales utilisées sont : Tampon PCR 1X, MgCl<sub>2</sub> : 1.5mM, dNTPs : 200 µM, Amorce sens et reverse : 0.5µM chacune, Taq polymérase : 1.5 unités.

Les conditions utilisées pour tous les gènes explorés par PCR simplex sont : 1 cycle de 94°C/5 min, 30 cycles de 94°C/30 sec, Température d'hybridation (Tableau II) /40 sec, 72°C/1 min et, un cycle final de 72°C/7 min.

Deux souches de références possédant les gènes de virulences ont été utilisés comme témoins positifs.

Tableau III : Liste des amorces utilisées dans l'amplification par PCR des gènes des adhésines.

Gènes codant les adhésines	Séquences d'amorces	Température d'hybridation (°C)	Taille de produit d'amplification (pb)	Références
<i>fimH</i>	*	55	688	*
<i>mrkD</i>	*	52	240	*
<i>Kpn</i>	*	55	626	*
<i>ycfM</i>	*	55	160	*

\* G. Arlet (communication personnelles, non publiée)

### 1.3. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les produits d'amplification ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5% additionnée de bromure d'éthidium à 0.5µg/ml. Le bromure d'éthidium est fluorescent à la lumière UV, c'est ce qui nous permet de visualiser les produits PCR en cas d'amplification (Sambrook et al., 1989).

Les échantillons déposés au fond des puits (à raison de 6µl/puits) sont préparés comme suit :

- 12.5 µl du produit PCR (ou amplifiat)
- 3µl de tampon de dépôt. Ce dernier est constitué de bleu de Bromophénol et de glycérine.

Un marqueur de poids moléculaire (100pb) est utilisé pour déterminer la taille des amplifiats. Il est préparé comme suit :

- 7 µl de l'ADN du marqueur.
- 2 µl de tampon de bleu.

La migration électrophorétique est réalisée par l'application d'un champ électrique (voltage : 50mV, ampérage : 25mA) de part et d'autre de la cuve qui porte le gel baignant dans du tampon TBE 0.5X.

L'observation se fait par révélation des bandes d'ADN sous lumière UV dans une chambre noire. Des photos sont prises et enregistrées grâce un système d'imagerie.

## 2. Etude phénotypique

### 2.1. Recherche des adhésines

La recherche phénotypique des adhésines a été réalisée par le test d'hémagglutination : hémagglutination mannose-sensible ou MSHA « mannose-sensible hemagglutination » qui nous a permis de détecter les fimbriae de type 1 ainsi que l'hémagglutination mannose-résistant ou MR/K-HA « mannose-resistant, *Klebsiella*-like hemagglutination » pour détecter les fimbriae de type 3.

Nous avons utilisé dans ce travail des érythrocytes humains de groupe O Rh+, traités ou non avec l'acide tannique 50µg/ml (Hornick et al., 1991 ; Mishra et al., 2001).

#### ➤ Préparation des érythrocytes

Du sang frais humain prélevé dans des tubes contenant du citrate est utilisé pour récupérer les érythrocytes. Le sang est lavé 3 fois avec du tampon PBS pH 7.2. Une centrifugation à 3500 rpm pendant 15min à 4°C est effectuée après chaque lavage. Les

## MATERIEL ET METHODES

érythrocytes lavés sont resuspendus dans du tampon PBS à une concentration finale de 5% puis conservés à 4°C.

En ce qui concerne le test MR/K-HA, les érythrocytes doivent être traités avec de l'acide tannique à 50µM dans du PBS à 10%. (Belkaid *et al.*, 1982).

### ➤ Hémagglutination

Les bactéries sont cultivées dans du LB pH 7,2 puis incubées pendant 48 heures à 37°C. Après 4 passages successifs, un volume de 50µl de cette suspension (préparée dans du PBS) est réparti dans des puits d'une microplaque de 96 puits.

Un volume de 100µl de la suspension d'érythrocytes (5% dans du PBS, PH 7,2) traités ou non avec l'acide tannique, en présence et en absence de mannose (5%) est ajoutée dans chaque puits.

Nous avons utilisé dans chaque cas un témoin négatif, qui correspond à 50µl de LB stérile, additionné de 100µl d'érythrocytes à 5% traités ou non.

La lecture des résultats se fait après plusieurs incubations à température ambiante et à 4°C. La réaction est positive ou négative selon que les érythrocytes sédimentent respectivement sous forme d'un filet très serré ou sous forme d'un culot au fond des puits (Sturve *et al.*, 2008) (Tableau IV).

Tableau IV : Lecture des tests d'hémagglutination

	MSHA (Erythrocytes non traités)		MR/KHA (Erythrocytes traités)	
	Sans	Avec	Sans	Avec
<b>α-méthyl- D mannoside (3%)</b>				
<b>Réaction</b>	+	-	+	+
<b>Résultat</b>	Présence de fimbriae de type 1		Présence de fimbriae de type 3	
	+ : hémagglutination ; - : absence d' hémagglutination			

### 2.2. Sensibilité à l'effet bactéricide du sérum

L'effet bactéricide du sérum humain par activation du complément a été étudié par la méthode d'inoculation en « spot » sur milieu solide de *Fierrer et al.* (1972).

Cette méthode consiste à ensemencer par étalement, 100 $\mu$ l d'une culture bactérienne (en bouillon) en phase exponentielle de croissance diluée au 1/500 sur boîtes de gélose Mueller-Hinton. Après absorption 15 min à température ambiante, 50  $\mu$ l de sérum sont déposés au centre de la boîte. Après 24 heures d'incubation à 37°C, si une croissance bactérienne à l'endroit du dépôt du sérum est observée, ceci témoigne d'une résistance de la souche testée au sérum (*Fierrer et al.*, 1972).

Le sérum utilisé est préparé à partir du sang humain. Celui-ci est récupéré de quatre individus sains et laissé coaguler à température ambiante pendant 2 à 4 heures. Après centrifugation à 4000 rpm pendant 15 min, le sérum est stérilisé par passage dans des microfiltres de 0.45 $\mu$ m puis aliquoté et conservé à -20°C.

### 2.3. Mise en évidence de la capsule

La mise en évidence de la capsule est réalisée grâce un test très facile à l'aide d'encre de Chine. En effet, ce dernier, ajouté à une suspension bactérienne est retenu par la capsule ; le cytoplasme apparaitra claire.

A partir d'une culture fraîche, une colonie bactérienne est déposée sur une lame et diluée par l'ajout d'une goutte d'eau physiologique. Après avoir déposé la lamelle, l'encre de Chine est additionné de part et d'autre (Laisser diffuser l'encre 2 minutes), s'en suit une observation au microscope photonique à l'objectif 10 puis au 40 puis au 100 (Il est préférable de se placer dans la zone où l'encre de chine est légèrement diluée) (*Petra et al.*, 1990).

### 2.4. Mesure de l'hypermucoviscosité (String test)

Les souches sont cultivées dans du BHIB une nuit à 37°C puis ensemencés dans de la gélose Mueller Hinton. Après incubation une nuit à 37°C, nous évaluons approximativement l'étendu en verticale d'une seule colonie à l'aide d'une anse de platine. Si la hauteur  $H > 5$  mm : il s'agit d'un phénotype d'hypermucoviscosité (HMV+). Si  $H < 1$  mm : il ne s'agit pas d'un phénotype d'hypermucoviscosité (HMV-) (*Brandt et al.*, 2008).

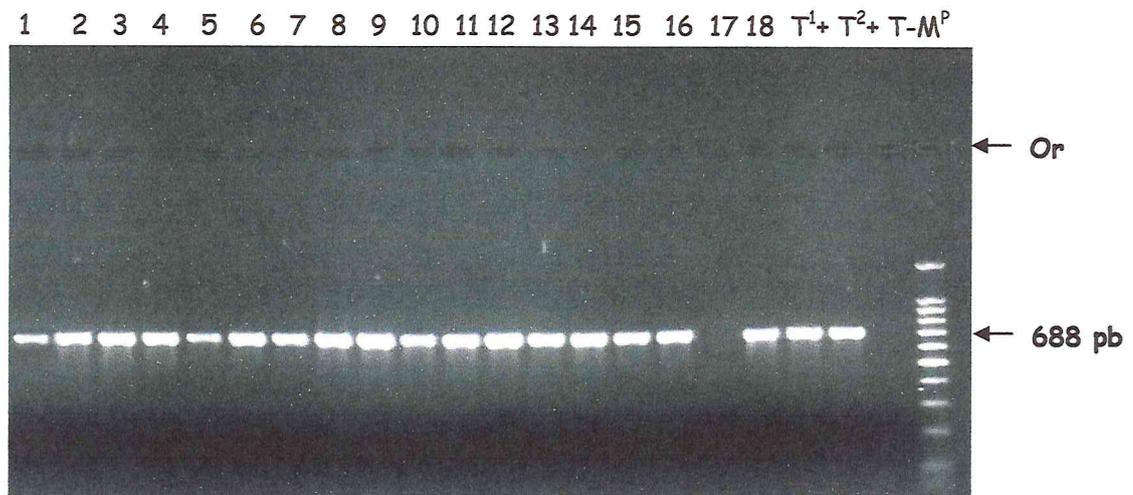
# Résultats

**RESULTATS**

**I. ETUDE GENOTYPIQUE**

L'étude génotypique a consisté en la recherche, par PCR, de gènes codant quatre adhésines décrites chez *klebsiella pneumoniae*. Les résultats obtenus sont les suivants :

- Les gènes *fimH* et *mrkD* codant respectivement pour l'adhésine des fimbriae de type 1 et l'adhésine des fimbriae de type 3 étaient présents chez la quasi-totalité des souches (17/18) à l'exception d'une seule (*fimH*<sup>-</sup>, *mrkD*<sup>-</sup>) comme le montre les résultats de la PCR (Figure 12 et 13).



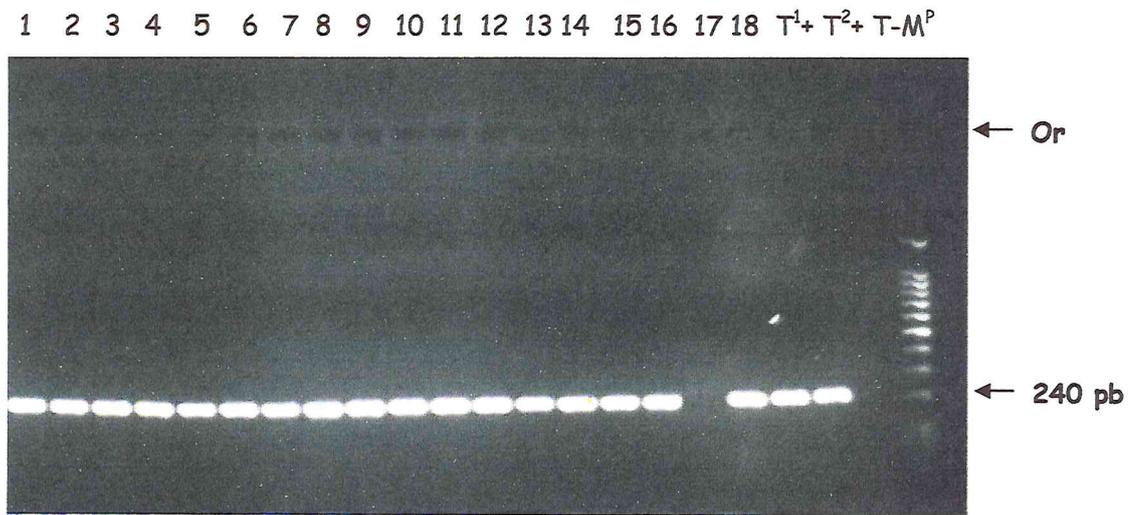
**Figure 12 : Détection du gène *fimH* par PCR**

**1 à 16, 18** : KS1, KS4, KS13, KS20, KS21, KS23, KS29, KS34, KS35, KS47, KS54, KS56, KS69, KS70, KS73, KS82, KZ29 : souches *fimH*<sup>+</sup>.

**17** : KS89 souche *fimH*<sup>-</sup>.

**T<sup>1+</sup> et T<sup>2+</sup>** : K4, KS88 : souches témoins positifs ; **T-** : témoin négatif de la PCR ; **M<sup>P</sup>** : marqueur de taille 100pb DNA Ladder ; **Or** : Origine de migration.

## RESULTATS



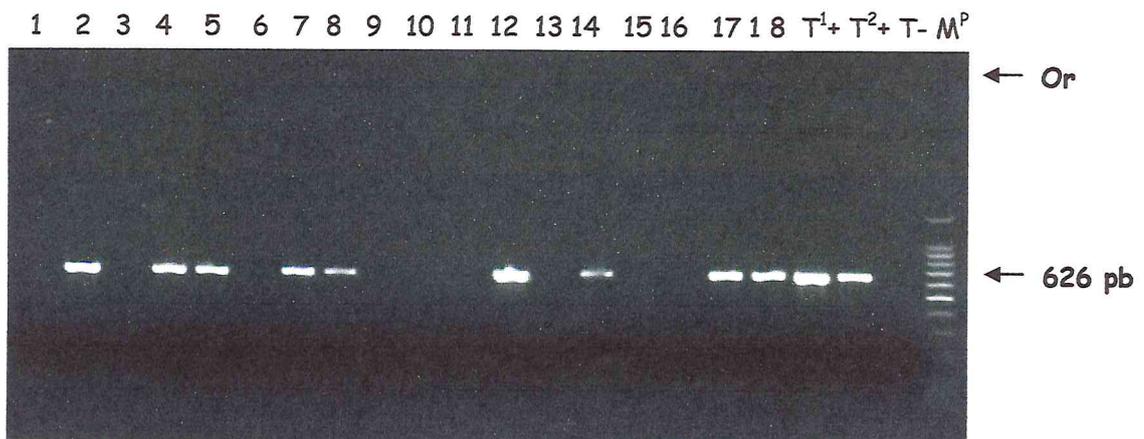
**Figure 13** : Détection du gène *mrkD* par PCR

1 à 16, 18 : KS1, KS4, KS13, KS20, KS21, KS23, KS29, KS34, KS35, KS47, KS54, KS56, KS69, KS70, KS73, KS82, KZ29 : souches *mrkD*<sup>+</sup>.

17 : KS89 souche *mrkD*<sup>-</sup>.

T<sup>1+</sup> et T<sup>2+</sup> : K4, KS88 : souche témoin positif ; T<sup>-</sup> : témoin négatif de la PCR ; MP : marqueur de taille 100pb DNA Ladder ; Or : Origine de migration.

- Le gène *kpn* codant une protéine FimH-Like était présent chez 9 souches (9/18) comme le montre le résultat de la PCR (Figure 14).



**Figure 14** : Détection du gène *kpn* par PCR.

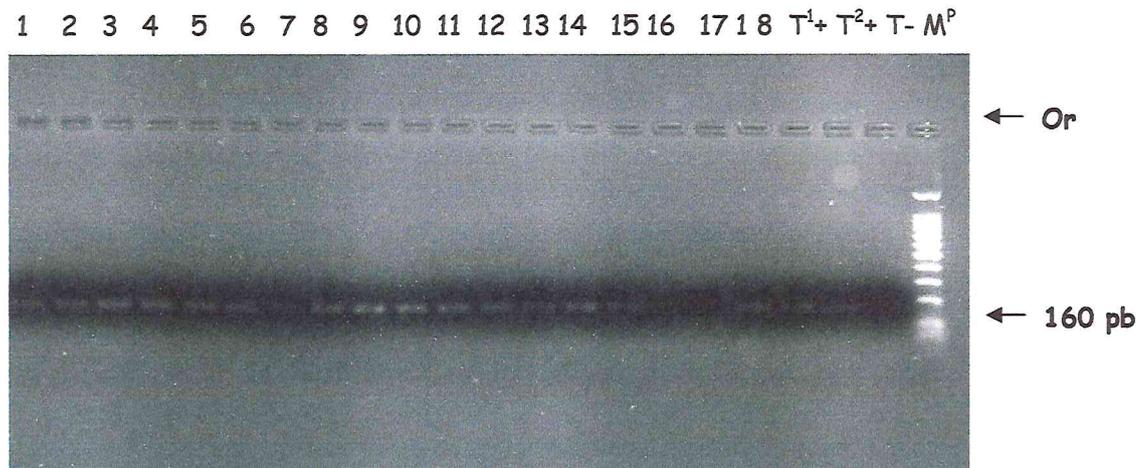
2, 4, 5, 7, 8, 12, 14, 17, 18 : KS4, KS13, KS21, KS23, KS35, KS47, KS69, KS70, KS73 souches *kpn*<sup>+</sup> ;

1, 3, 6, 9, 10, 11, 13, 15, 16 : KS1, KS20, KS29, KS34, KS54, KS56, KS82, KS89, KZ29 souches *kpn*<sup>-</sup>.

T<sup>1+</sup> et T<sup>2+</sup> : K4, KS88 : souche témoin positif ; T<sup>-</sup> : témoin négatif de la PCR ; MP : marqueur de taille 100pb DNA Ladder ; Or : Origine de migration

## RESULTATS

- Le gène *ycfM* codant une protéine putative de liaison à la fibronectine est présent 16 souches (16/18) (Figure 15).



**Figure 15** : Détection du gène *ycfM* par PCR.

**1 à 15, 18** : KS1, KS4, KS13, KS20, KS21, KS23, KS29, KS34, KS35, KS47, KS54, KS56, KS69, KS70, KS73, KZ29 : souches *ycfM*<sup>+</sup>.

**16, 17** : KS82, KS89 : souches *ycfM*<sup>-</sup>.

T<sup>1+</sup> et T<sup>2+</sup> : K4, KS88 : souche témoin positif ; T- : témoin négatif de la PCR ; MP : marqueur de taille 100pb DNA Ladder ; Or : Origine de migration.

## II. Etude phénotypique

L'étude phénotypique a consisté à mettre en évidence différents facteurs de virulence dont les résultats sont les suivants :

- Adhésines**

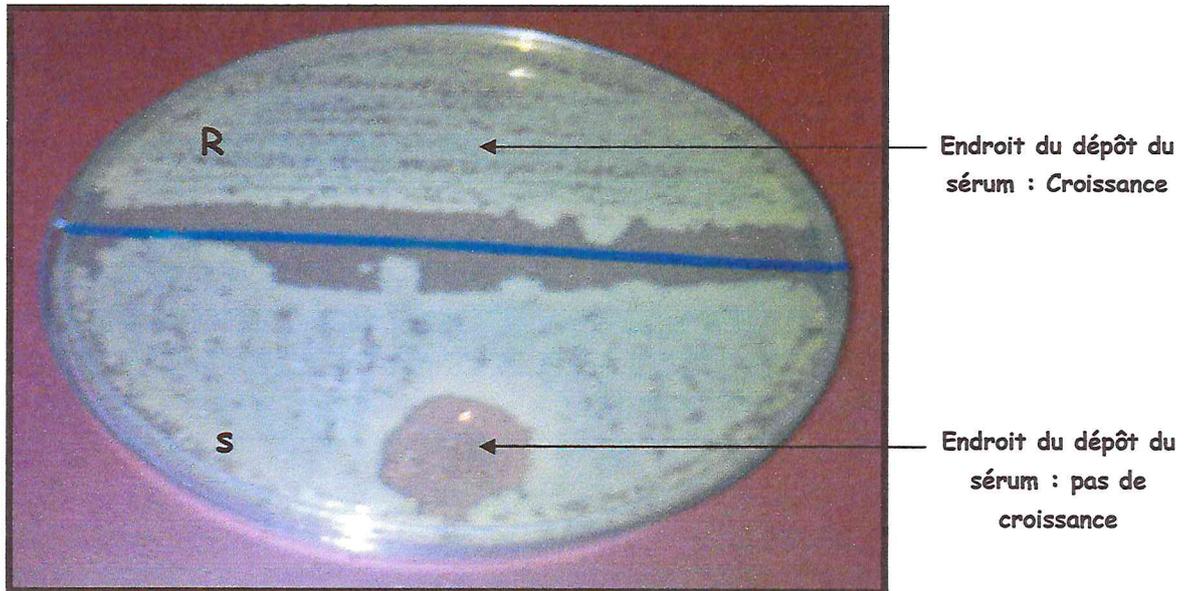
La recherche des fimbriae de type 1 par le test MSHA a été positive chez quasiment toutes les souches *fimH*<sup>+</sup> (16/17) en absence d' $\alpha$ -méthyl-D mannoside à l'exception d'une souche. En présence d' $\alpha$ -méthyl-D mannoside, aucune souche n'a agglutiné les érythrocytes.

La recherche des fimbriae de types 3 par le test MR/K-HA a montré que 14/16 souches *mrkD*<sup>+</sup> en sont productrices en présence et en absence du  $\alpha$ -méthyl-D mannoside.

## RESULTATS

- Résistance au système du complément

L'étude de l'effet bactéricide du sérum humain par la méthode d'inoculation en « spot » sur milieu solide nous a permis de classer les souches en deux phénotypes : Le phénotype résistant représenté par 16 souches parmi 18 et le phénotype sensible où seules deux souches sont retrouvées (Figure 16). Ces résultats nous ont conduit à rechercher les éventuels facteurs impliqués dans cette résistance notamment la capsule et l'hypermucoviscosité.



**Figure 16:** Résultat de l'analyse de l'effet bactéricide du sérum humain sur deux souches cliniques de *Klebsiella pneumoniae*.

R : souches résistante au sérum ; S : souches sensible au sérum

- Capsule

La recherche de la capsule par coloration à l'encre de chine a démontré que toutes les souches que nous avons étudié était pourvue d'une capsule.

- Hypermucoviscosité

Le caractère de l'hypermucoviscosité n'a été observé que chez deux souches seulement (Figure 17).

## RESULTATS

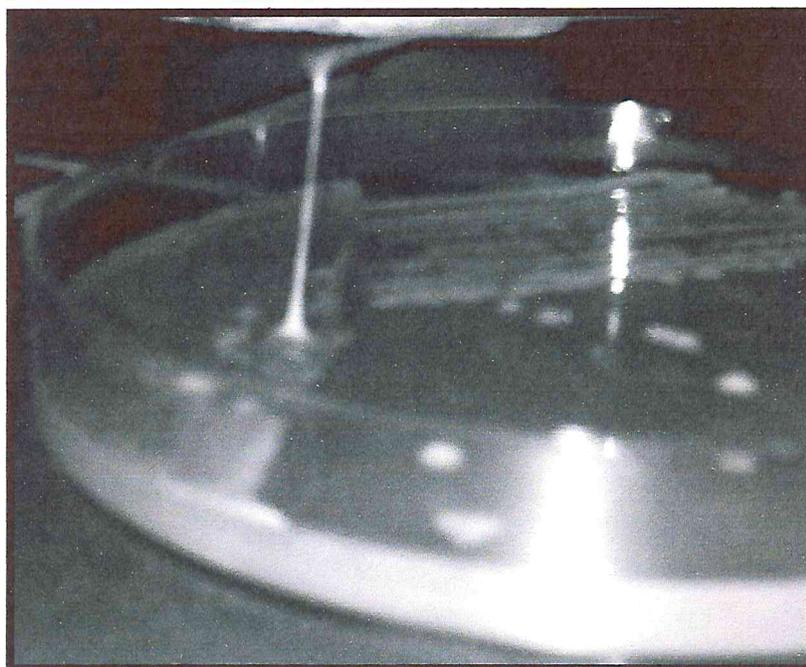


Figure 17 : Phénotype de d'hypermucoviscosité

Tableau V : Résultats de l'étude génotypique et phénotypique des souches de *K. pneumoniae*

souches	Teste phénotypique						Test génotypique				
	capsule	HMV	Resistance Au sérum	MSHA		MR/K-HA		fimH	mrkD	kpn	ycfM
Ks1	+	-	R	+	-	-	-	+	+	-	+
Ks4	+	-	R	+	-	+	-	+	+	+	+
Ks13	+	-	R	+	-	+	+	+	+	+	+
Ks20	+	-	R	+	-	+	+	+	+	-	+
Ks21	+	-	R	+	-	+	+	+	+	+	+
Ks23	+	-	R	+	-	+	+	+	+	+	+
Ks29	+	-	R	+	-	+	+	+	+	-	+
Ks34	+	-	R	+	-	+	+	+	+	-	+
Ks35	+	+	R	+	-	+	+	+	+	+	+
Ks47	+	-	R	+	-	+	+	+	+	+	+
Ks54	+	-	R	+	-	+	+	+	+	-	+
Ks56	+	-	R	+	-	+	+	+	+	-	+
Ks69	+	+	S	+	-	+	-	+	+	+	+
Ks70	+	-	S	+	-	+	+	+	+	+	+
Ks73	+	-	R	+	-	+	+	+	+	+	+
Ks82	+	-	R	+	-	+	+	+	+	-	-
Ks89	+	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-
Kz29	+	-	R	-	-	+	+	+	+	-	+

# Discussion

### DISCUSSION

Les infections bactériennes, notamment celles des voies urinaires, sont initiées par une étape clé du processus infectieux ; la colonisation de tissus spécifiques est donc la première étape qu'effectue une bactérie dans sa relation avec l'hôte. Ce tropisme spécifique à chaque espèce ainsi que la capacité des bactéries à dépasser les barrières muqueuses pour envahir l'organisme, sont d'importantes caractéristiques qui distinguent les bactéries pathogènes des commensales (Ofek et Sharon, 1990 ; Geme, 1997 ; Jenkinson et Lamont, 1997).

La colonisation du tractus urinaire par les bactéries pathogènes nécessite l'attachement de ces dernières aux épithéliums. Cette propriété est la conséquence de l'expression d'adhésines fimbriaires (ou pili) chez les Gram négatif, dont l'espèce *K. pneumoniae*. Cette dernière exprime, principalement, les pili de type 1 (ou communs) et de type 3 (Podschun et al., 1987).

La quasi-totalité des souches cliniques de *K. pneumoniae* (responsables d'infections urinaires), que nous avons étudiées, possèdent le gène *fimH* codant l'adhésine des fimbriae de type 1, comme le montrent les résultats d'amplification de ce gène. L'adhésine FimH est une protéine hautement conservée qui se lie au  $\alpha$ -D-mannoside des récepteurs des cellules hôtes (Maurer et Orndorff, 1987 ; Hanson et Brinton, 1988). Le rôle dans la virulence bactérienne de cette adhésine, commune aux entérobactéries, a été clairement démontré ; elle permet l'adhésion des bactéries au mucus ou aux cellules épithéliales des voies urogénitales, respiratoires et intestinales (Duguid et Old, 1980 ; Podschun et al., 1993 ; Connell et al., 1997).

La présence des fimbriae de type 1 a été directement corrélée à l'uro-virulence. En effet, des études ont démontré, dans un modèle murin de cystite, que la neutralisation de l'adhésin FimH, par des anticorps spécifiques, bloque l'attachement d'*E. coli* aux cellules de la vessie, empêche la colonisation du tractus urinaire et atténue la virulence de ces souches. Ce tropisme prononcé pour les tissus rénaux et de la vessie traduit une importante spécificité d'interaction entre l'adhésines FimH et ces cellules (Roberts, 1996 ; Langermann et al., 1997 ; Palaszynski, 1998).

Les mêmes résultats ont été obtenus concernant le gène *mrkD*, ce qui est en accord avec ce qui est décrit dans la littérature quant à l'ubiquité des fimbriae de type 3 parmi les souches de *Klebsiella*. Ces adhésines sont capables de se lier aux différentes cellules de l'organisme humain ainsi qu'aux protéines de la matrice extracellulaire. En effet, les souches de *Klebsiella pneumoniae* exprimant les fimbriae de type 3 adhèrent aux cellules endothéliales, aux épithéliums des voies respiratoires,

(au niveau des reins) ainsi qu'au collagène V de la matrice extracellulaire (Tarkkanen et al., 1990 ; Hornick et al., 1991 ; Hornick et al., 1995 ; Schurtz Sebghati et al., 1998). Cette diversité du type d'interaction est due à l'existence de plusieurs variantes du gène *mrkD*. Ce dernier est peu conservé parmi ces souches, il peut être de localisation chromosomique ou plasmidique (Schurtz et al., 1994, Hornick et al., 1995)

Les résultats de l'étude phénotypique des adhésines ne sont pas en corrélation avec ceux de l'étude génotypique. L'absence d'agglutination des érythrocytes chez les souches possédant les gènes *fimH* et *mrkD* pourrait être expliquée par la production d'une capsule polysaccharidique ou par le mode d'expression des gènes et les conditions de culture.

Schembri et al., (2005) ; Huang et al., (2008) ont montré que la capsule polysaccharidique pouvait interférer physiquement avec la fonction des fimbriae ; celle-ci agirait en cassant ou masquant ces structures ou en inhibant leur flexibilité indispensable à l'adhésion cellulaire.

Chez *K. pneumoniae*, comme chez *E. coli*, un phénomène de variation de phase permet à la bactérie de contrôler l'expression des gènes des fimbriae en fonction du milieu environnant. Ce phénomène est contrôlé par deux types de recombinases codées par les gènes *fimB* et *fimE* qui catalysent l'inversion du promoteur et donc changent le profil d'expression du gène en passant de « Switch ON » vers « Switch OF » et vice versa. C'est un mécanisme de régulation, très ingénieux mis en place par les bactéries, pour leur permettre de n'exprimer les adhésines qu'en cas de besoin, en se protégeant ainsi des mécanismes de défense de l'organisme hôte qui cible les adhésines tel que la lectinophagocytose (Gerlach et al., 1989 ; Gally et al., 1996 ; Podschun et Ullman, 2000).

La présence des gènes *kpn* et *ycfM* chez la plupart des souches laissent suggérer leur capacité à produire deux adhésines récemment séquencées, sans que l'on connaisse précisément leurs rôles. La première, produit du gène *kpn* est similaire à la protéine FimH ; la seconde, codée par le gène *ycfM*, est une protéine putative de liaison à la fibronectine. Cette liaison permettrait à la bactérie la colonisation des biomatériaux et donc la formation de biofilm sur les surfaces inertes ou l'infection est augmentée (McClelland et al., 2006 ; Struve et al., 2008 ; Ong et al., 2008).

## DISCUSSION

---

Les bactéries responsables d'infections urinaires expriment des facteurs de virulence qui leur permettent d'échapper aux nombreux mécanismes de défense du tractus urinaire (flux urinaire, acidité de l'urine, système immunitaire...). Cependant, il existe différentes combinaisons de facteurs qui caractérisent chaque étape de l'infection urinaire, allant de la cystite à la pyélonéphrite. Le trait commun entre toutes ces affections est l'adhésion indispensable aux cellules uro-épithéliales (il n'y a pas de pathogénicité sans phénotype adhésif). La présente étude nous permet de croire que les souches de *Klebsiella pneumoniae*, de la même manière, ont utilisé ces adhésines pour coloniser le tractus urinaire.

Certaines bactéries pathogènes s'arrêtent à cette étape de colonisation en produisant un effet toxique local ou systémique. D'autres poursuivent plus en profondeur leurs relations avec les muqueuses en traversant l'épithélium pour atteindre les tissus sous-muqueux, les ganglions régionaux ou l'organisme dans sa totalité via la circulation sanguine (bactériémie ou septicémie) (Mainil, 2005).

Les mécanismes moléculaires qui président au passage des bactéries à travers l'épithélium rénal ne sont pas bien connus comparé à ceux concernant le franchissement de la muqueuse intestinale. Des études ont montré que les souches uropathogènes d'*E. coli* (UPEC) ainsi que des souches pathogènes de *Klebsiella pneumoniae* traversent l'épithélium vésical, suite à une adhésion via FimH suivie d'une internalisation, par endocytose, dans des vésicules, exocytées par la suite dans la lumière vésicale. Ces vésicules sont le siège d'une importante multiplication bactérienne formant des biofilms intracellulaires. Au sein des biofilms, les bactéries expriment d'autres facteurs de virulence via le Quorum Sensing et atténuent certains d'entre eux (Bishop et al., 2007 ; Wright et al., 2007 ; Eto et al., 2008 ; Rosen et al., 2008 ; Pichon et al., 2009).

Les facteurs de virulence, nouvellement synthétisés, permettent aux bactéries pathogènes invasives de se multiplier dans le sang et de se distribuer dans l'ensemble des organes internes. Pour ce faire, elles doivent surmonter diverses défenses internes de l'hôte dont le système du complément et la phagocytose, conduisant à une destruction des bactéries et la possibilité d'induction du système immunitaire par les cellules présentatrices d'antigènes.

L'étude de l'effet bactéricide du complément sur nos souches a montré qu'elles en sont pratiquement toutes résistantes (16/18). Ces résultats suggèrent une éventuelle persistance de ces souches dans le sang après leur translocation. Des résultats qui nous

## DISCUSSION

---

ont amené à nous poser des questions quant aux moyens utilisés par ces bactéries pour résister au système du complément avec ses activités inflammatoire, opsonisante et lytique.

Pour essayer de répondre à ces interrogations, nous avons recherché d'éventuels facteurs impliqués dans cette résistance notamment la capsule et le phénotype d'hypermucoviscosité (HMV). La capsule était présente chez toutes les souches contrairement au phénotype HMV qui n'a caractérisé que deux souches.

L'expression d'une capsule polysaccharidique est l'une des caractéristiques phénotypiques principales de l'espèce *Klebsiella pneumoniae*, elle est présente chez la majorité d'entre elles. Plusieurs études ont rapporté le rôle déterminant de la capsule dans la virulence de cette bactérie en la protégeant contre l'effet bactéricide du complément et la phagocytose (Ehrenwort et Baer, 1956 ; Domenico et al., 1982 ; Williams et al., 1983 ; Cryz et al., 1984 ; Highsmith et Jarvis, 1985 ; Wooldridge et Williams, 1993). Des études menées par Merino et al. (1992) et Alvarez et al. (2000) indiquent que les activateurs du complément, décrits chez *K. pneumoniae*, à savoir les porines et le LPS sont masqués par la présence d'une capsule c'est ce qui explique l'inhibition de l'activation de ce système par la voie classique ou alterne. Cependant, ce n'est pas tous les sérotypes capsulaires qui sont considérés comme virulents.

Le degré de virulence conféré par un antigène K particulier pourrait être lié à la teneur en mannose de la capsule. Les sérotypes capsulaires à faible virulence, tels que l'antigène K7 ou K21 (Podschun et Ullmann, 1992 ; Ofek et al., 1993), contiennent des séquences répétées de mannose- $\alpha$ -2/3-mannose ou L-rhamnose- $\alpha$ -2/3-L-rhamnose reconnues par une lectine à la surface des macrophages et conduisant à la lectinophagocytosis (Athamna et al., 1991). Cette dernière peut aussi être médiée par des lectines présentes à la surface bactérienne tels que les fimbriae. En revanche, les souches hautement virulentes telles que le sérotype K2 qui ne possèdent pas ces structures ne sont pas reconnues par les macrophages (Ofek et al., 1993 ; Kabha et al., 1995).

La surproduction de la capsule, chez les souches bactérienne encapsulée, se traduit phénotypiquement par une viscosité très marquée des cultures en milieu liquide et un aspect hypermuqueux des colonies sur milieu solide. L'hypermucoviscosité (HMV) est un important facteur de virulence caractéristique des souches *K. pneumoniae* cliniques, responsables d'infections invasives telle que les abcès hépatique, bactériémie, endophtalmies (Wiskur et al., 2008) Elle est généralement associée à la présence des

## DISCUSSION

---

gènes *magA* (mucoviscosityassociated gene A) et *rmpA* (regulator of mucoid phenotype A).

Les résultats du string test, qui met en évidence ce caractère, montrent que seules deux souches présentaient une viscosité très élevée. Cette faible fréquence est retrouvée dans une étude sur des souches de la même collection où seules 5 étaient HMV+ parmi 54. Cette fréquence reste très faible comparée à d'autres études qui rapportent des taux très élevés de souches *K. pneumoniae* HMV+ (Wiskur et al., 2008). Toute fois, il est important de noter que ces taux sont généralement relatifs aux souches *K. pneumoniae* de sérotype K1 et K2 possédant les gènes *rmpA* et *magA* (Wiskur et al., 2008).

A ce stade de l'infection, tout semble possible à ces bactéries. Avec l'expression d'autres facteurs de virulence, elles serraient capables d'induire une septicémie, dont les conséquences serraient très graves...Et dire qu'elles avaient commencé au plus bas de l'échelle !!!

# Conclusion

### CONCLUSION

L'étude génotypique et phénotypique que nous avons effectuée nous a permis d'identifier au moins trois facteurs de virulence chez des souches clinique de *K. pneumoniae* responsables d'infection urinaires nosocomiales.

La production d'une capsule polysaccharidique, d'adhésine et la résistance au système du complément semblent être un trait de virulence commun à ces souches. Ce trait pourrait expliquer le ou les mécanisme(s) par lesquels ces bactéries ont pu persister dans le tractus urinaire, malgré l'existence de nombreux moyens de défense, et suggérer un éventuel passage dans le sang en cas d'évolution de l'infection vers une pyélonéphrite. Ces résultats ont révélé une virulence potentielle de ces souches.

L'étude de la virulence a pris un important essor, suite aux grands progrès technologiques effectués ces 20 dernières années, précisément en génomique par le développement du séquençage.

Le séquençage des génomes des procaryotes, en particulier celui des bactéries pathogènes, responsables de graves infections chez l'homme, a permis une meilleure compréhension de l'évolution de ces microorganismes et de leurs interactions avec l'hôte et donc les mécanismes de la pathogénèse.

Cette prouesse technique, qui a révolutionné l'ère de la génomique, nous a facilité l'identification des gènes de virulence, des cibles de différents antibiotiques et a permis le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques (vaccinales).

Toujours est-t-il qu'il reste beaucoup à faire dans le domaine de la virulence bactérienne. Les mécanismes de régulation de l'expression des gènes de virulence sont très complexes et pas totalement clarifiés pour nombre d'espèces pathogènes.

Il est important de comprendre le fonctionnement des systèmes de control et des voies de signalisation bactériennes, particulièrement, le « Quorum Sensing », dans le but de développer de meilleurs moyens thérapeutiques pour traiter les infections. Des moyens plus efficaces que les antibiotiques.....et qui sait, aussi paradoxal que ca puisse l'être, la virulence est peut être la solution...

# Bibliographie

## BIBLIOGRAPHIE

---

- **Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai (2007)** . Cellular and molecular immunology.
- **Allen, B. L., F. G. Gerlach et S. Clegg (1991)**. Nucleotide sequence and functions of mrk determinants necessary for expression of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **173**: 916-920.
- **Alvarez, D., S. Merino, J. M. Tomas, V. J. Benedi et S. Alberti (2000)**. Capsular polysaccharide is a major complement resistance factor in lipopolysaccharide O side chain-deficient *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Infect. Immun.* **68**: 953-955.
- **Athamna, A., I. Ofek, Y. Keisari, S. Markowitz, D. G. G. S., and N. Sharon (1991)**. Lectinophagocytosis of encapsulated *Klebsiella pneumoniae* mediated by surface lectins of guinea pig alveolar macrophages and human monocyte- derived macrophages. *Infect. Immun.* **59**:1673-1682.
- **Bach J.F (1985)**. immunologie. Paris, Flammarion Médecine-sciences, 1985.
- **Belkaid, M., B. Hamrioui, O. Tabet-Derraz (1982)**. Hémagglutination passive dans le diagnostic immunologique de l'hydatidose. OPU. Page 15.
- **Berche Patrick, jean-louis gaillard, Michel simonet (1991)**,les bacteries des infections humaines,bacteriologie, 1991 ;66-67.
- **Bienenstock, J (1986)**. immunological protection mechanisms in the airways. *Eur. J. Respir. Dis.*, 1986, 69, 62-71
- **Braiteh Fadi, Marjorie P. Golden (2005)**. Cryptogenic invasive *Klebsiella pneumoniae* liver abscess syndrome.
- **Brandt J. Wiskur, Jonathan J. Hunt, and Michelle C. Callegan (2008)**. Hypermucoviscosity as a Virulence Factor in Experimental *Klebsiella pneumoniae* Endophthalmitis. Vol. 49, No. 11
- **Brandt J. Wiskur, Jonathan J. Hunt, and Michelle C. Callegan (2008)**. Hypermucoviscosity as a Virulence Factor in Experimental *Klebsiella pneumoniae* Endophthalmitis. 2008;49:4931-4938
- **Canto'n R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, et al (2008)**. Prevalence and spread of extended-spectrum b-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:144-53.
- **Cavaliere, S. J., G. A. Bohach et I. S. Snyder (1984)**. *Escherichia coli*  $\alpha$ -hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. *Microbiol. Rev.* **48**: 326-343.
- **Connell, H., M. Hedlund, W. Agace et C. Svanborg (1997)**. Bacterial attachment to
- **Coque TM, Baquero F, Canton R (2008)**. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill* 2008;13-23.

## BIBLIOGRAPHIE

- Cryz, S. J., E. Fu"rer, and R. Germanier. (1984). Experimental *Klebsiella pneumoniae* burn wound sepsis: role of capsular polysaccharide. *Infect. Immun.* 43:440-441.
- Domenico, P., W. G. Johanson, and D. C. Straus. (1982). Lobar pneumonia in rats produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 37:327-335.
- Ehrenwort, L., and H. Baer (1956). The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae* for mice: the relationship to the quantity and rate of production of type-specific capsular polysaccharide. *J. Bacteriol.* 72:713-717.
- Fadi Braiteh, Marjorie P. Golden (2005). Cryptogenic invasive *Klebsiella pneumoniae* liver abscess syndrome.
- Feria, C., E. Ferreira, J. D. Correia, J. Gonçaves et M. Caniça (2002). Patterns and mechanisms of resistance to  $\beta$ -lactams and  $\beta$ -lactamase inhibitors in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* 49: 77-85.
- Fierrer, J., F. Finlay et A. I. Braune (1972). A plaque assay on agar for detection of Gram-negative bacilli sensitive to complement. *J. Immunol.* 109: 1156-1158.
- Gally, D. L., J. Leathart et I. C. Blomfield (1996). Interaction of FimB and FimE with the fim switch that controls the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 21: 725-738.
- Gerlach, G. F., S. Clegg et B. L. Allen (1989). Identification and characterization of the genes encoding the Type 3 and Type 1 fimbrial adhesins of *klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 171: 1262-1270.
- Gibson, F. et D. J. Magrath (1969) in Neilands, J. B. (1995). Siderophores : Structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* 270: 26723-26726.
- Gyles, C. L. (1994). *Escherichia coli* verotoxines and other cytotoxin in Gyles, C.L. (ED) *Escherichia coli* in domestic animals and human. CAB International: Wallingford: 365-398.
- Hanson MS, Brinton CC Jr (1988). Identification and characterization of the *Escherichia coli* type 1 pilus adhesin protein. *Nature* 1988;322:265-8.
- Hawkey PM. Prevalence and clonality of extended-spectrum b-lactamases in Asia. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:159-65.
- Highsmith, A. K., and W. R. Jarvis. (1985). *Klebsiella pneumoniae*: selected virulence factors that contribute to pathogenicity. *Infect. Control* 6:75-77.
- Hornick, D. B., B. L. Allen, M. A. Horn et S. Clegg (1991). Fimbrial types among respiratory isolates belonging to the family *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* 29: 1795-1800.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Hornick, D. B., J. Thommandru, W. Smits et S. Clegg (1995). Adherence properties of an *mrkD*-negative mutant of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* **63**:2026-2032.
- Hou, Y. M. (1999). Transfer RNAs and pathogenicity islands. *TIBS.* **24**: 295-298.
- Huang, Y.J., H.W. Liao, C.C. Wu et H.L. Peng (2008). *mrkF* is a component of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. *Res Microbiol.* **160**(1) :71-9.
- Jenkinson HF, Lamont RJ (1997). Streptococcal adhesion and colonization. *Crit Rev Oral Biol Med* **1997**;8:175-200.
- Kabha, K., L. Nissimov, A. Athamna, Y. Keisari, H. Parolis, L. A. S. Parolis, R. M. Grue, J. Schlepper-Shafer, A. R. B. Ezekowitz, D. E. Ohman, and I. Ofek. (1995). Relationships among capsular structure, phagocytosis, and mouse virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* **63**:847-852.
- Kauffmann, F. (1949). On the serology of the *Klebsiella* group. *Acta Pathol. Scand.* **26**:381-406.
- Klemm, P. et M. A. Schembri (2000). Fimbrial surface display systems in bacteria: from vaccines to random libraries. *Microbiol.* **146**: 3025-3032.
- Koczura, R. et A. Kaznowski (2003). Occurrence of the *Yersinia* high-pathogenicity island and iron uptake systems in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microb. Pathog.* **35**: 197-202.
- Koo, F. C. W., and M. D. Stein. (1986). Detection of an extracellular toxin produced by burn isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Curr. Microbiol.* **13**:23-27.
- Krogfelt, K. A., H. Bergmans et P. Klemmn (1990). Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Infect.Immun.* **58**: 1995-1998.
- Langermann S (1997). New approaches to mucosal immunization. *Semin Gastrointest Dis* **1996**;7:12-8.
- Lasmé-Guillao BE, Amon-Tanoh-Dick F, Faye-Kette H, Akaffou E, Kangah-Diekouadio F (2008). Micro-organismes et infections nosocomiales néonatales. *Afr Biomed* **2008**;13(4):17–23.
- Lawlor, M.S., C. O'Connor et V.L. Miller (2007). Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection. *Infect. Immun.* **75**:1463-1472.
- Ludwig, A., W. Goebel. (1997). Haemolysins of *Escherichia coli*. In : Sussman M. (Ed.), *Escherichia coli : mechanisms of virulence*. Cambridge university press : Cambridge, 281-329.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Mainil, J. (2003a).facteurs de virulence et proprietés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* :franchissement des muqueuses et propriéts invasives. *Ann. Med. Vet.* **147** : 159-171.
- Mainil, J. (2003b).facteurs de virulence et proprietés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* :franchissement des muqueuses et propriéts invasives. *Ann. Med. Vet.* **47** : 159-171
- Mainil, J. (2005). Bacteriologie generale.[www2.ulg.ac.be/fmv/bacterio3c02.doc](http://www2.ulg.ac.be/fmv/bacterio3c02.doc)
- Maurer L, Orndorff P (1987). Identification and characterization of genes determining receptor binding and pilus length of *Escherichia coli* type 1 pili. *J Bacteriol* 1987;169:640-5.
- Mc Nabb (P), Tomasi (T.B). Host defense mechanism at mucosal surface. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1981, 35,35, 477-496.
- McClelland, M., E. K. Sanderson, J. Spieth, W. S. Clifton, P. Latreille, A. Sabo, K. Pepin, V. Bhonagiri, S. Porwollik, J. Ali et R. K. Wilson (2006). The *Klebsiella pneumoniae* Genome Sequencing Project. EMBL/GenBank/DDBJ databases.
- McDougall, S. et J. B. Neilands (1984). Plasmid and chromosome-coded aerobactin synthesis in enteric bacteria: insertion sequences flank operon in plasmid mediated systems. *J. Bacteriol.* **159**: 300-305.
- Merino, S., S. Camprubi', S. Alberti', V. J. Benedi', and J. M. Toma's. (1992). Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. *Infect. Immun.* **60**:2529-2535.
- Messai, Y. (2007). Prévalence et caractérisation de la résistance aux B-lactaminres chez *Salmonella enterica* serotype *Brunei*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*, dans les hôpitaux d'Alger. Thèse de Doctorat d'Etat (USTHB).
- Mishra, M., Y. S. Thakar et A. A. Pathak (2001). Hemagglutination, hemolysin production and serum resistance of *Proteus* and related species isolated from clinical sources. *IJMM.* **19**: 5-11.
- Mizuta, K., M. Ohta, M. Mori, T. Hasegawa, I. Nakashima, and N. Kato. (1983). Virulence for mice of *Klebsiella* strains belonging to the O1 group: relationship to their capsule (K) types. *Infect. Immun.* **40**:56-61.
- Nassif, X. et P. J. Sansonetti (1986). Correlation of the Virulence of *Klebsiella pneumoniae* KI and K2 with the Presence of a Plasmid Encoding Aerobactin. *Infect. Immun.* **54**: 603-608.
- Neilands, J.B (1995). Siderophores : Structure and function of microbiol iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* **270**: 26723-26726.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- O'Brian, I. G et F. Gibson (1970) in Raymond, K. N., E. A. Dertz et S. S. Kim (2003). Enterobactin : an archetype for microbial iron transport. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100: 3584-3588.
- Ofek I, Sharon N (1990). Adhesins as lectins: specificity and role in infection. Curr Top Microbiol Immunol ;151:91-113.
- Ofek, I., K. Kabha, A. Athamna, G. Frankel, D. J. Wozniak, D. L. Hasty, and D. E. Ohman. (1993). Genetic exchange of determinants for capsular polysaccharide biosynthesis between *Klebsiella pneumoniae* strains expressing serotypes K2 and K21a. Infect. Immun. 61:4208-4216.
- Ottow, J. C. G. (1975). Ecology, physiology, and genetics of fimbriae and pili. Annu. Rev. Microbiol. 29: 79-108.
- Palaszynski S, Pinkner J, Leath S, Barren P, Auguste CG, Burlein J, et al (1998). Systemic immunization with conserved pilus-associated adhesins protects against mucosal infections. Dev Biol Stand 1998;92:117-22.
- Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, et al(2004). International prospective study of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in nosocomial infections. Ann Int Med 2004;140:26-32.
- Pelludat, C., A. Rakin, C. A. Jacobi, S. Schubert et J. Heesemann (1998). The Yersiniabactin biosynthetic gene cluster of *Yersinia enterocolitica*: organization and siderophore-dependent regulation. J. Bacteriol. 180: 538-546.
- Petra c . F. Oyston and Pauline s. Handley (1990). Surface structures, haemagglutination and cell surface hydrophobicity of *Bacteroides fragilis* strains. *Journal of General Microbiology*, 136, 941-948.
- Pierre, J-L, G. Lescoat (2003). Une santé de fer. Pathologie humaine et thérapeutique chélatrices : quel rôle pour les chimistes ? l'actualité chimique. 123-127.
- Podschun, R. et U. Ullmann (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin. Microbiol.Rev.11: 589-603.
- podschun, R. et Ullmann (1998) *klebsiella* spp. As nosocomial pathogens : epidemiology, taxonomy, tyïng methods and pathogenicity factors. Clin. Microb. Rev. 11 : 589-603
- Podschun, R., A. Fisher et U. Ullmann (2000). Expression of putative virulence factors by clinical isolates of *Klebsiella planticola*. J. Med. Microbiol. 49: 115-119.
- Podschun, R., A. Fisher et U. Ullmann (2000). Expression of putative virulence factors by clinical isolates of *Klebsiella planticola*. J. Med. Microbiol. 49: 115-119.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Podschun, R., and U. Ullmann (1993). Bacteriocin typing of environmental *Klebsiella* isolates. *Zentbl. Hyg. Umweltmed.* 195:22-26.
- Podschun, R., and U. Ullmann. (1992). Isolation of *Klebsiella terrigena* from clinical specimens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11:349-352.
- Podschun, R., and U. Ullmann. (1992). *Klebsiella* capsular type K7 in relation to toxicity, susceptibility to phagocytosis and resistance to serum. *J. Med. Microbiol.* 36:250-254.
- Pollack, J. R et Neilands (1970) in Raymond, K. N., E. A. Dertz et S. S. Kim (2003). Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 3584-3588.
- Ramphal R, Ambrose PG (2006). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and clinical outcomes: current data. *Clin Infect Dis* 2006;42:164-72.
- Raymond, K. N., E. A. Dertz et S. S. Kim (2003). Enterobactin : an archetype for microbial iron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 3584-3588.
- Roberts JA (1996). Tropism in bacterial infections: urinary tract infections. *J Urol* 1996;156:1552-9.
- Ross, G. D., Immunobiology of the complement system, New York; Academic press. éd 1986.
- Sahly, H., H. Aucken, V. J. Benedí, C. Forestier, V. Füssing, D. S. Hansen, I. Ofek, R. Podschun, D. Sirot, J. M. Toma's, D. Sandvang, et U. Ullmann (2004). Increased serum resistance in *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 48: 3477-3482.
- Sahly, H., R. Podschun, T. A. Oelschlaeger, M. Greiwe, H. Parolis, D. Hastly, J. Orn Kekow, Uwe Ullmann, I. Ofek et S. Sel (2000). Capsule impedes adhesion to and invasion of epithelial cells by *klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity*, Vol. 68, No. 12: 6744-6749
- Sambrook, J., E. F. Fritsch et T. Maniatis (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold spring Harbor Laboratory Press. Cold spring Harbor. N.Y.
- Sauer, F. G. M. Barnhart, D. Choudhury, S. D. Knight, G. Waksman et S. J. Hultgren (2000). Chaperon-assisted pilus assembly and bacterial attachment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10: 548-556.
- Schembri, M. A., J. Blom, K. A. Krogfelt et P. Klemm (2005). Capsule and fimbria interaction in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 73: 4626-4633.
- Schembri, M. A., J. Blom, K. A. Krogfelt et P. Klemm (2005). Capsule and fimbria interaction in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 73: 4626-4633.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- **St Geme JW III** (1997). Bacterial adhesins: determinants of microbial colonization and pathogenicity. *Adv Pediatr* ;44:43-72.
- **Struve, C., M. Bojer, et K. A. Krogfelt** (2008). Characterization of *klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infection and immunity*, Vol. 76, No. 9: 4055-4065.
- **Tarkkanen, A. M., B. L. Allen, B. Westerlund, H. Holthofer, P. Kuusela, L. Risteli, S. Clegg et T. K. Korhonen** (1990). Type V collagen as the target for type-3 fimbriae, enterobacterial adherence organelles. *Mol. Microbiol.* 4: 353-1361.
- **Taylor, P.W.** (1983). Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against Gramnegative bacteria. *Microbiol. Rev.* 47: 46-83. uro-epithelial cells: mechanisms and consequences. *Adv. Dent. Res.* 11: 50-58.
- **Van Bost, S., J. Mainil** (2003). Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* : Production de toxines. *Ann. Méd. Vét.* 147 :327-342.
- **Villegas MV, Kattan JN, Quinteros MG, Casellas JM** (2008). Prevalence of extended spectrum b-lactamases in South America. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:154-8.
- **Vincent, W. F.** (2004). Infections caused by members of the genus *Klebsiella*. *Medical News.* 11: 28-33.
- **Vokes, S. A., S. A. Reeves, A. G. Torres et S. M. Payne** (1999). The aerobactin iron transport system genes in *Shigella flexneri* are present within a pathogenicity island. *Mol. Microbiol.* 33: 63-73.
- **Vukajlovich, S. W., J. Hoffman et D. C. Morrison** (1987). Activation of human serum complement by bacterial polysaccharides: Structural requirements for antibody independent activation of these classical and alternative pathway. *Mol. Immunol.*24:319-331.
- **Williams, P., P. A. Lambert, M. R. W. Brown, and R. J. Jones.** (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.
- **Wooldridge, K. G., and P. H. Williams** (1993). Iron uptake mechanisms of bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12:325-348.

# Annexes

## ANNEXES

### Appareillage et matériels consommables

<u>Appareillage</u>	<u>matériels consommables</u>
Générateur	Pipettes pasteurs
Thermocycleur	Boite de pétri
Centrifugeuse	Microtube eppendorff
Microcentrifugeuse	Microtube à PCR
Bain marie	Embout jaune et bleu
Microscope photonique	Microfiltres
Agitateur magnétique	Microplaque de 96 puits
Etuve	

### Solutions utilisées dans l'étude phénotypique et génotypique

➤ Tampon TBE : 10X (PH : 8,3, autoclavé)

890mM de tris base ; 890mM d'acide borique ; 19mM d'EDTA

➤ Tampon de dépôt : (aliquoté et conservé à 4°C)

3ml de glycérol ou ficoll, 75mg de bleu de bromophénol, 7ml d'eau distillé stérile.

➤ Luria broth (LB): (PH: 7,2, 1 litre) :

- 5g d'extrait de levure
- 10g de triptone
- 10g de NaCl

PBS (PH : 7,2) :

140mM NaCl ; 2,7mM Kcl ; 8mM Na<sub>2</sub>Hpo<sub>4</sub> ; 1,5mM KH<sub>2</sub>Po<sub>4</sub>.

## ملخص

*Klebsiella pneumoniae* بكتريا مؤاكلة مسؤولة عن عداوى اجتماعية و انتهازية خطيرة عند المرضى بالمستشفى. تعبر قوتها الإمراضية من خلال عوامل خبيثة عديدة. التي تحدد نوع و خطورة العدوى. تضمن عملنا في البحث عن النمط الظاهري و الباطني لعوامل الخبث عند *Klebsiella pneumoniae* تمت الدراسة باستعمال 18 سلالة في النمط الطني تم إيجاد *fimH* و *mrkD* المبرمجة للفمبيري من النمط 1 و 3 على التوالي. عند جميع السلالات باستثناء سلالة واحدة. كانا حاضرين أيضا جينان *kpn* و *ycfM* المبرجان عن التوالي للأدزين *fimH-like* و بروتين الربط بالفبرونكتين عند أغلبية السلالات. و بالنسبة للنمط الظاهري، تقريبا جميع السلالات كانت مقاومة ضد فعل المصل المبيد للبكتيريا. لهذا قمنا بالبحث عن الخصائص إضافية كالكبسولة أو الهيبرميكوفيسكوزيتي.

وكشفت هذه الدراسة الفوعة المحتملة لهذه السلالات. الكلمات الرئيسية : الكلبسيلا الرئوية، وعوامل الفوعة، والالتهابات.

## Abstract

*K. pneumoniae* is a commensal bacteria that may be responsible for nosocomial and community infections in hospitalized patients. Its pathogenicity is expressed through a multitude of virulence factors that determines the type and severity of infection.

Our work consisted in the search for phenotypic and genotypic virulence factors in 18 clinical strains *K. pneumoniae* responsible for urinary tract infections. The genes encoding the *FimH* adhesins *mrkD* and fimbriae type 1 and 3, respectively, were found in all strains, except one that was- and *fimH- mrkD-*, Two other genes *kpn* and *ycfM*, encoding an adhesin *FimH-like* and a putative protein binding fibronectin, respectively, were also present in our strains (9 / 18 and 16/18 are *kpn+* are *ycfM+*). Almost all strains were resistant to the bactericidal effect of serum (16/18), which led us to search for other factors that may be involved in this resistance and are ; The capsule was present in all strains in contrast to the hypermucoviscosité phenotype that has characterized two strains.

This study revealed a potential virulence of these strains.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, virulence factors, infections.