

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Saad Dahlab Blida 1



Faculté des sciences de la nature et de la vie



Département de Biotechnologie

Mémoire

Pour l'obtention du Diplôme

Master

En biotechnologie microbienne

Intitulé :

Évaluation de la sensibilité de *Klebsiella*
***pneumoniae* aux antibiotiques**

Présenté par : SNI Faiza

BELGUERGUID F/Z

Devant le jury composé de :

Présidente : Dr. BOUCHNAK F.

MCA

USDB1

Examinatrice : Dr BENOUSSAID N.

MCB

USDB1

Promotrice : Mme TOUA D. Eps. BENCHABANE

MAA

USDB1

Soutenu le : 10/09/2020

Année : 2019/2020.

Sommaire

Liste des abréviations

Liste de figure

Liste de tableaux

Remerciement

Dédicaces

Résumé

Introduction 1

Chapitre I : Etude de l'espèce *Klebsiella pneumoniae*

1. Dénomination et classification.....	5
1.1. Caractères morphologiques.....	6
1.2. Caractères culturels.....	7
1.3. Caractères biochimiques.....	7
1.4. Caractères antigéniques.....	8
2. Transmission Pouvoir pathogène.....	8
3. Facteur de pathogénicité.....	8
3.1. Antigènes de surface	9
3.1.1. Lipopolysaccharide.....	9
3.1.2. La capsule.....	9
3.2. Adhésines.....	9
3.3. Sidérophores	10
3.4. Ilots de pathogénicité.....	10
3.5. Les éléments d'intégration et de conjugaison "ICE".....	10
3.6. Autre gène de virulence.....	11
3.6.1. Gènes du métabolisme de l'allantoïne	11
3.6.2. Région du système <i>kfu</i>	11
3.6.3. Gène <i>uge</i>	12

Chapitre II : *Klebsiella pneumoniae* et leur résistance aux antibiotiques

Partie I : Antibiotiques.....	14
1. Définition	14
2. Classification	14
3. Mode d'action	14
4. Les différentes familles des antibiotiques.....	15
4.1. β -lactamines.....	15
4.2. Aminosides.....	18
4.3. Quinolones.....	19
Partie II : La résistance de <i>K pneumoniae</i> aux antibiotiques.....	20
1. Notion de la résistance bactérienne.....	20
2. Type de résistance.....	20
2.1.Résistance naturelle.....	20
2.2.Résistance acquis.....	21
3. Support génétiques de la résistance	21
3.1.Mutation chromosomique.....	21
3.2. Acquisition des gènes exogènes.....	21
3.2.1. Plasmides	21
3.2.2. Les transposons	21
3.2.3. Intégrons.....	22
4. Bêta-lactamines et <i>K. pneumoniae</i>	22
4.1. Résistance de <i>K. pneumoniae</i> au bêta-lactamines.....	22
4.1.1. Résistance enzymatique.....	22
4.1.2. Résistance non enzymatique.....	24
5. Aminosides et <i>Klebsiella pneumoniae</i>	25
5.1. Résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux aminosides.....	25
5.1.1. La modification enzymatique des antibiotiques.....	25
5.1.2. Altération de la cible	25
5.1.3. Piégeage de l'antibiotique	26
5.1.4. Imperméabilité ou exportation de l'antibiotique	26

6. Quinolones et <i>K. pneumoniae</i>	27
6.1. Résistance de <i>K. pneumoniae</i> aux Quinolones	27

Matériel & méthodes

I. Procédé et lieu d'étude	29
1. Prélèvements biologiques	29
2. Techniques de prélèvements	29
2.1. Examen cyto bactériologique des urines ECBU	29
2.2. Echantillons des pus	30
2.3. Liquide céphalorachidien LCR	30
2.4. Hémoculture	30
3. Analyse des prélèvements	30
3.1. Examen bactériologique	31
3.1.1. Examen macroscopique	31
3.1.2. Examen microscopique	31
3.2. Mise en culture	31
3.3. Isolement et purification	32
4. Identification des germes bactériens	33
4.1. Examen macroscopique	33
4.2. Coloration de Gram	33
4.3. Caractérisation biochimique	33
4.3.1. Préparation de la galerie	35
4.3.2. Préparation de l'inoculum	35
4.3.3. Inoculation de la galerie	35
4.3.4. Identification bactérienne	36
5. Antibiogramme	36
5.1. Inoculum	37
5.2. Ensemencement	37
5.3. Application des disques d'antibiotiques	37

Résultats & discussion

Résultats.....	40
1. Prélèvements.....	40
2. Analyse des prélèvements.....	41
2.1.Examen macroscopique.....	41
2.2.Examen microscopique	41
2.2.1. Etat frais.....	41
2.2.2. Coloration de Gram	42
3. Identification <i>K. pneumoniae</i>	42
3.1. Identification par galerie API20E.....	42
4. Résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux antibiotiques.....	43
4.1.Profils de réponses aux tests d'antibiotiques.....	43
4.2. Réponses aux tests antibiogrammes.....	44
4.3.Analyse des données des rapports 2011 et 2016.....	45
4.3.1. Répartition des souches de <i>K. pneumoniae</i> selon les prélèvements biologiques.....	46
4.3.2. Antibiorésistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	47
4.3.3. Antibiorésistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolée d'hémocultures.....	48
4.3.4. Production de BLSE.....	52
4.3.5. Production de BLSE selon les secteurs de soins.....	53
4.3.6. Etude comparative de l'évolution de l'antibiorésistance	56
Discussion	59
Conclusion	64
Références.....	66
Annexe	

Liste des abréviations

AAC : Aminoside Acétyltransférase.

ADN : Acide DésoxyriboNucléique.

ANT : Aminoside NucléotydiTransférase.

APH : Aminoside PhospHotransférase

ARNt: Acides RiboNucléiques de Transfert

ATB : Antibiotiques.

BLSE : bêta-lactames à spectre élargi.

C1G : Céphalosporine de première génération.

C2G : Céphalosporine de deuxième génération.

C3G : Céphalosporine de troisième génération.

C4G : Céphalosporine de quatrième génération.

ECBU : Examen cycobactériologies des urines

EMB : Gélose Eosine Bleu de Méthylène

GN : Gélose nutritive

LCR : Liquide céphalo-rachidien

LPS : Lypopolisaccharide.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

PLP : Protéines de liaison aux pénicillines

Liste de figures

Figure 01 : Aspect des colonies de <i>K. pneumoniae</i> sur milieu gélosé.....	6
Figure 02 : Représentation schématique des facteurs de pathogénicité de <i>K. pneumoniae</i>	12
Figure 03 : Mode d'action des antibiotiques.....	15
Figure 04 : Site-A : la région qui porte les ARNr16S méthyltransphérase.....	26
Figure 05 : Analyse des échantillons dans les différentes phases de prélèvement.....	31
Figure 06 : la galerie API 20 E.....	34
Figure 07 : Application des disques d'antibiotiques.....	38
Figure 08 : Aspect des colonies sur milieu Hektoen (<i>K. pneumoniae</i>).....	41
Figure 09 : Aspect des colonies sur gélose nutritif (GN) (<i>K. pneumoniae</i>).....	41
Figure 10 : Résultats de l'identification d'une souche de <i>K.pneumoniae</i> par galerie API 20 ^E	42
Figure 11 : A. Souche d' <i>K. pneumoiae</i> multisensible. B. Résistance naturelle à l'ampicilline.....	43
Figure 12 : Phénotype sauvage d'une souche <i>K. pneumoniae</i>	44
Figure 13 : Souche d' <i>K. pneumoniae</i> productrice de β -lactamase.....	44
Figure 14 : Taux de l'antibiorésistance chez <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux β -lactamine.....	45
Figure 15 : Distribution des souches <i>Klebsiella pneumoniae</i> en fonction des différents produits pathologiques.....	46
Figure 16 : Pourcentage de résistance (R+I) de <i>Klebsiella pneumoniae</i> en Algérie (année 2011).....	48
Figure 17 : Sensibilité aux antibiotiques des souches cliniques de <i>K. pneumoniae</i> aux 16 antibiotiques testés.....	50
Figure 18 : Pourcentage de <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolées d'hémocultures résistantes (R + I) aux antibiotiques.....	52
Figure 19 : Pourcentage de la production de BLSE.....	53

Figure 20 : Pourcentage de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productrice de BLSE par secteur de soins.....	54
Figure 21 : Pourcentage de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productrice de BLSE isolées par laboratoire chez les patients hospitalisés.....	56
Figure 22 : Etude comparative entre les données des rapports de l'antibiorésistance 2011 et 2016 et les résultats de 2020.....	58

Liste de tableaux

Tableau 01 : Caractères biochimiques de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	7
Tableau02 : La classification des β -lactamines.....	17
Tableau 03 : les caractères cultureux sur la gélose nutritive et milieu Hektoen.....	41
Tableau 04 : Caractères des principaux tests biochimiques à partir de la galerie API 20 E...	43
Tableau 05 : Taux de l'antibiorésistance chez <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux β -lactamine.....	45
Tableau 06 : Distribution des souches de <i>K. pneumoniae</i> dans les différents produits pathologiques.....	46
Tableau 07 : Nombre et pourcentage de <i>Klebsiella pneumoniae</i> résistantes (R+I) aux antibiotiques.....	47
Tableau 08 : Nombre et pourcentage de <i>Klebsiella pneumoniae</i> résistantes (R + I) aux antibiotiques isolées d'hémocultures (année 2016).....	49
Tableau 09 : Nombre et pourcentage de <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolées d'hémocultures résistantes (R + I) aux antibiotiques.....	51
Tableau 10 : La fréquence de la production de BLSE pour chaque espèce.....	53
Tableau 11 : Nombre et pourcentage de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productrice de BLSE par secteur de soins dans douze laboratoires en Algérie.....	54
Tableau 12 : Nombre et pourcentage de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productrice de BLSE isolées par laboratoire chez les patients hospitalisés.....	55
Tableau 13 : Etude comparative entres les données des rapports de l'antibiorésistance 2011 et 2016 et les résultats de 2020.....	57

Remerciement

En tout premier lieu, nous remercions le bon Dieu, tout puissant, de nous avoir donné la force le courage et la volonté d'accomplir ce modeste travail.

Nos sincères remerciement vont à notre chef d'option

Pr BENCHABANE M. pour nous avoir guidé depuis tout au long de notre travail. Un très grand merci pour votre disponibilité, pour tous vos conseils.

Nos vifs remerciements s'adressent à Mme BENCHABANE D. notre promotrice d'avoir consacré un temps précieux et sa contribution à ce travail.

Nos sincères remerciement vont aux membres du jury :

Dr BOUCHENAK, F (Présidente)

Dr BENNOUSAID, N (Examinatrice)

Pour avoir consacré une partie de leur temps précieux pour examiner notre travail.

Nos grands remerciements sont formulés à tous les enseignants de la spécialité biotechnologie microbienne.

Enfin, tout notre travail s'est déroulé au laboratoire bactériologique de Boufariq et nous tenons à remercier tous les membres de l'équipe de ce laboratoire

Afin de n'oublier personne, nos vifs remerciements s'adressent à tous ceux qui nous ont aidé à la réalisation de ce modeste mémoire.

✧ *Dédicaces* ✧

♥ *A ma très chère mère* ♥

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait.

Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

♥ *A mon très cher père* ♥

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut... Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, Le respect, la reconnaissance...

Je te rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon infini amour. Que Dieu tout puissant te garde et te procure santé, bonheur et longue vie.

♥ *A mes très chers frères* ♥

Walid ♥ Younes

♥ *A ma très chère petite sœur* ♥

Amina

♥ *A toute ma famille : mes grands-parents oncles, tantes, cousins et cousines* ♥

♥ *A mes chères copines : Amina , Meriem et Fatima* ♥

Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur et de santé

♥ *Faiza* ♥

✧ *Dédicaces* ✧

Au nom d'Allah le plus grand merci lui revient de nous avoir guidé vers le chemin droit.

Je dédie cet humble travail à... ✍

♥ *Mes chers parents* ♥

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour .Pour leur soutien continu, leur amour et leurs paroles d'encouragement qui m'ont permis d'être ici aujourd'hui. Puisse Dieu, le tout puissant, vous garde et vous procure santé, longue vie et bonheur.

♥ *Mes très chers frères* ♥

Ayoub (Surtout mon grand frère) ♥ Mohammed ♥ Abderrahmane

♥ *Mes très chère sœurs* ♥

Hasfa (Marwa) ♥ Selma (Safa)

♥ *Et à toute ma famille : oncles, tantes, cousins et cousines* ♥

Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur et de santé

Je tiens aussi à dédier ce travail à mon binôme ♥ Faiza ♥ et sa famille.

Sans oublier mes chères amies : ♥ Amina, Khadidja, Asmaa, Khaoula,

Selma, Manel et Mm ALLAN F. ♥

Fatma Zohra

Résumé

Titre : Évaluation de la sensibilité de *Klebsiella pneumoniae* aux antibiotiques.

Klebsiella pneumoniae est un pathogène opportuniste à fort potentiel épidémique fréquemment impliqué dans des infections sévères et nosocomiales. Le phénomène de développement de souches bactériennes douées de multirésistance vis-à-vis de nombreux antibiotiques, utilisés en thérapie clinique dans les infections, prend des ampleurs alarmantes. Une attention particulière doit être vouée à cette situation, en abordant sérieusement l'estimation et la détermination des facteurs de risque pouvant davantage aggraver et mettre en péril les stratégies d'antibiothérapie. L'augmentation et la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez *K. pneumoniae*, représente un problème majeur de santé publique. Notre étude s'inscrit dans ce contexte, afin d'évaluer la sensibilité aux antibiotiques de quelques souches de *K. pneumoniae* isolées dans les différents services de soins de l'Etablissement public hospitalier de BOUFARIK. Nous avons tenté de compléter nos informations avec une analyse rétrospective, de janvier à décembre 2011 et de janvier à décembre 2016 à partir des bases de données de l'unité de bactériologie de l'hôpital de BOUFARIK et du réseau national de la surveillance de la résistance bactérienne en Algérie. Les résultats issus de cette étude ont montré une résistance élevée chez des souches de *K. pneumoniae* à la majorité des antibiotiques cliniquement utilisés particulièrement aux β lactamines, productrice de β -lactamases à spectre élargie. Le constat indique clairement une progression inquiétante du taux de souches résistance aux antibiotiques.

Mots clés : *klebsiella pneumoniae*, Infections, antibiorésistance, β -lactamases à spectre élargie, β - lactamines.

Abstract

Title : Evaluation of the sensitivity of *Klebsiella pneumoniae* to antibiotics

Klebsiella pneumoniae is an opportunistic pathogen with high epidemic potential, frequently found in severe and nosocomial infections. The phenomenon of the development of bacterial strains endowed with multidrug resistance to numerous antibiotics, used in clinical therapy for infections, is taking on alarming proportions. Particular attention should be paid to this situation, seriously addressing the assessment and identification of risk factors that may further aggravate and jeopardize antibiotic therapy strategies. The increase and dissemination of antibiotic resistance in *K. pneumoniae* represents a major public health problem. Our study is part of this context, in order to assess the sensitivity to antibiotics of some strains of *K. pneumoniae* isolated in various care services of the public hospital establishment of BOUFARIK. We tried to supplement our information with a retrospective analysis, from January 2011 to January 2020 from the databases of the bacteriology unit of the BOUFARIK hospital and the national network for the surveillance of bacterial resistance in Algeria. The results of this study showed high resistance in strains of *K. pneumoniae* to the majority of clinically used antibiotics, particularly to β -lactams, which produces ESBLs. The finding clearly indicates a worrying increase in the rate of antibiotic resistance strains.

Key words : *klebsiella pneumoniae*, Infections, antibiotic resistance, ESBL, β -lactams.

الملخص

العنوان: تقييم حساسية *K. pneumoniae* للمضادات الحيوية

Klebsiella pneumoniae هي مُمرض انتهازِي، مع إمكانية وبائية عالية ، وغالبًا ما تشارك في العدوى الشديدة والعدوى في المستشفيات. إن ظاهرة تطور السلالات البكتيرية التي تتمتع بمقاومة متعددة للأدوية للعديد من المضادات الحيوية، المستخدمة في العلاج السريري للعدوى، تتخذ أبعادًا تتذرر بالخطر. يجب إيلاء اهتمام خاص لهذه الحالة، والتعامل بجدية مع تقييم وتحديد عوامل الخطر التي قد تزيد من تفاقم وتعريض استراتيجيات العلاج بالمضادات الحيوية للخطر. تمثل زيادة مقاومة المضادات الحيوية وانتشارها في *K. pneumoniae* مشكلة صحية عامة رئيسية. تندرج دراستنا في هذا السياق، من أجل تقييم الحساسية للمضادات الحيوية لبضع سلالات من *K. pneumoniae* المعزولة في خدمات الرعاية المختلفة في مؤسسة المستشفى العام في بوفارك. حاولنا استكمال معلوماتنا عبر التحليل بأثر رجعي، من يناير 2011 إلى يناير 2020 من قواعد البيانات الخاصة بوحدة علم الجراثيم بمستشفى بوفارك والشبكة الوطنية لمراقبة المقاومة البكتيرية في الجزائر. أظهرت نتائج هذه الدراسة وجود مقاومة عالية في سلالات *K. pneumoniae* لغالبية المضادات الحيوية المستخدمة سريريًا، خاصةً المضاد الحيوي β -lactamine-، الذي ينتج β -lactamase à spectre élargie. تشير النتائج بوضوح إلى زيادة مقلقة في معدل سلالات مقاومة المضادات الحيوية.

الكلمات المفتاحية: *klebsiella pneumoniae*، العدوى، مقاومة المضادات الحيوية، β -lactamines

β -lactamase à spectre élargie.

Introduction

Les infections microbiennes, notamment celles provoquées par les bactéries, occupent actuellement la première place dans les pathologies médicales. Elles sont connues depuis longtemps, et depuis l'utilisation des antibiotiques, elle a progressivement changé de visage et les cliniciens ont été confrontés à des infections à germes autrefois réputés non pathogènes ou saprophytes. Un des exemples le plus frappant pour illustre ce propos est *Klebsiella pneumoniae* (**Kariuki et al., 2007**).

Les Klebsielles sont des bactéries très répandues dans la nature (l'eau, le sol, les végétaux, la flore fécale des animaux), sur la peau, les muqueuses et surtout les voies respiratoires supérieures de l'homme provoquant ainsi des pneumonies mortelles c'est pourquoi Friedlande les a appelés pneumobacilles (**Le Minor et Veron, 1989**).

Bien qu'étant une bactérie commensale de l'homme ; *Klebsiella* fait partie des bactéries multi résistantes (**Balkissa, 2007**).

L'augmentation et la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif, particulièrement *Klebsiella pneumoniae*, représente un problème majeur de santé publique. Les infections nosocomiales causées par ces bactéries multirésistantes conduisent à l'augmentation des coûts des soins, à des hospitalisations prolongées, à des échecs thérapeutiques et à un taux élevé de morbidité et de mortalité (**Schwaber et Carmeli, 2007**).

K. pneumoniae est un pathogène opportuniste fréquemment impliqué dans des infections sévères notamment des infections urinaires, de pneumonies et de bactériémies (**Berrazeg et al., 2013**).

De nombreuses épidémies nosocomiales causées par cette bactérie ont été décrites, notamment chez les personnes ayant un système immunitaire affaibli, comme les diabétiques et les alcooliques. Elle peut se propager rapidement entre les patients hospitalisés surtout dans des unités de soins intensifs adultes ou pédiatriques (**Maltezou et al., 2013**).

Elle résiste à la majorité des antibiotiques utilisés et rend ainsi difficile le traitement. La multirésistance aux antibiotiques chez les entérobactéries et en particulier chez *klebsiella.spp.* est en perpétuelle évolution. Depuis plus de 20 ans, la résistance des entérobactéries aux céphalosporines de troisième génération (C3G) ne cesse de se renforcer notamment par l'acquisition de bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE), récemment s'ajoute la résistance aux fluoroquinolones (**Ben Haj Khalifa et al., 2010**). *K. pneumoniae* producteur de β -lactamase à

spectre élargi engendre, partout dans le monde, des infections nosocomiales d'allure le plus souvent endémique avec des bouffées épidémiques (**Boukadida et al., 2002**). La résistance aux antibiotiques augmente de façon très inquiétante, et très peu d'antibiotiques nouveaux seront commercialisés dans les cinq prochaines années (**Carlet et al., 2012**).

Les aminosides sont souvent utilisés en synergie avec les β -lactamines pour traiter des infections graves causées par les bactéries à Gram négatif. La résistance aux aminosides a été attribuée principalement à une inactivation enzymatique par les enzymes modificatrices des aminosides (AMEs) (**Wachino et Arakawa, 2012**).

C'est dans ce contexte général que nous avons été amenés à entreprendre ce présent travail qui a pour objectifs :

- L'isolement et l'identification des souches de *Klebsiella pneumoniae* au niveau de service de microbiologie du l'hôpital Boufarik.
- L'étude de leur sensibilité aux antibiotiques dans les stratégies de thérapie des infections bactériennes fréquemment utilisés (β -lactamines, aminosides, quinolones).
- Analyse du support génétique de l'antibiorésistance.
- Etablir une étude rétrospective sur les situations de l'antibiorésistance de cette espèce bactérienne.

Partie
bibliographique

**Chapitre I : Etude de
l'espèce *Klebsiella pneumoniae***

1. Dénomination et Classification

Le genre *Klebsiella* a été nommé par Trevisan en 1887 pour honorer Klebs Edwin, un microbiologiste Allemand du 19ème siècle. L'espèce type est *Klebsiella pneumoniae*, connue autre fois sous le nom de « pneumobacille » de Friedlander qui l'a décrit comme agent de pneumonies mortelles pendant la période 1882- 1884 (**Duca et Furtunescu, 1979**). Ce dernier avait décrit cette bactérie dans les poumons d'un patient décédé d'une pneumonie (**Frenay et al., 2000**).

Selon **Bergey's Manuel, 1994** ; l'espèce *K. pneumoniae* appartient à :

Domaine : Bacteria

Embranchement : Proteobacteria

Classe : Gamma Proteobacteria

Ordre : Enterobacteriales

Famille : Enterobacteriaceae

Genre : Klebsiella

Espèce : Klebsiella pneumoniae

L'espèce *K. pneumoniae* est subdivisée en trois sous espèces (**Avril et al., 2000**) :

- *K. pneumoniae subsp pneumoniae* est surtout actuellement un agent d'infections nosocomiales (**Podschun et Ullmann, 1998**), responsable d'infections urinaires sur sonde, de bactériémies de pneumonies, d'infections de sites opératoires et d'infections néonatales (**Garcia et al., 1985**).
- *K. pneumoniae subsp ozaenae* est responsable d'une rhinite chronique atrophique décrite sous le nom d'ozène. Elle a été également isolée à partir de surinfections de bronchite chronique, de bactériémies, de méningites, d'abcès cérébraux d'otites, de mastoïdites, d'infections urinaires, de surinfections de plaies et d'ulcères de la cornée (**Lewis et al., 1979 ; McCarthy et Hubbard, 1984 ; Tang et Chen., 1994 ; Strampfer et al., 1987**).
- *K. pneumoniae subsp Rhinoscleromatis* est responsable du rhinosclérome, infection granulomateuse chronique des voies aériennes supérieures, dont

quelques cas ont été rapportés chez des patients infectés par le VIH (**Strampfer et al., 1987**).

Klebsiella ozaenae et *Klebsiella rhinoscleromatis* ne sont pratiquement isolées que de l'arbre respiratoire de l'homme (**Le Minor et Véron, 1989**).

Klebsiella pneumoniae est une bactérie commensale trouvée dans les voies gastro-intestinales et respiratoires, et sur la peau des individus. Elle est également omniprésente dans l'environnement. C'est un pathogène opportuniste capable de causer un large éventail de infections nosocomiales et contractées dans la collectivité, comme infections des voies urinaires (IVU), infections des voies respiratoires et les infections de plaies (**Podschun et Ullmann, 1998**).

L'identification phénotypique du genre *Klebsiella* repose essentiellement sur les caractères biochimiques différentiels. *Klebsiella oxytoca* se différencie de *Klebsiella pneumoniae* par la production constante d'indole. *Klebsiella ozaenae* et *Klebsiella rhinoscleromatis*, outre le caractère VP (-), sont moins glucidolytiques que les deux espèces précédentes. *Klebsiella ozaenae* n'utilise jamais le malonate et *Klebsiella rhinoscleromatis* est caractérisée par une stricte auxotrophie, l'absence de production de gaz et une activité biochimique réduite (**Freney et al., 2007**).

1.1. Caractères morphologie

Les bactéries appartenant à l'espèce *Klebsiella pneumoniae* sont des bacilles à Gram négatif, immobiles, diplobacilles ; généralement capsulées, non sporulés, anaérobies facultatifs et appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae* (**Podschun et Ullmann, 1998**).

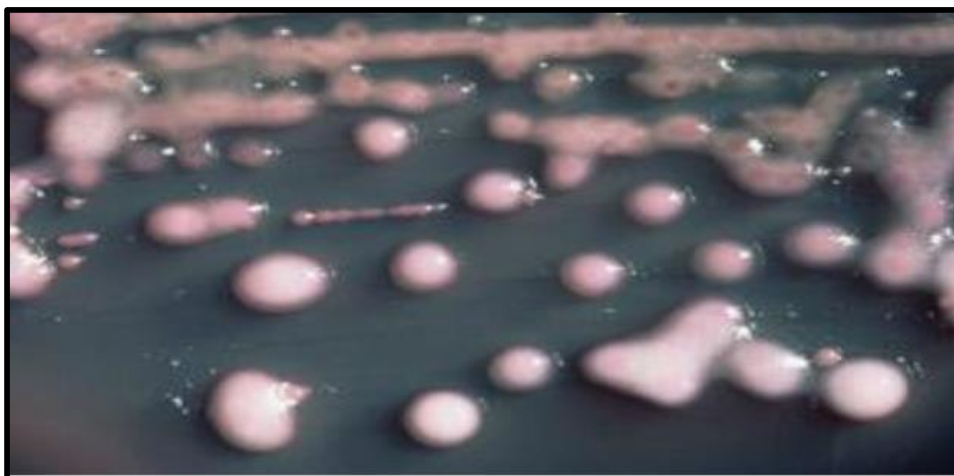


Figure 01 : Aspect des colonies de *K. pneumoniae* sur milieu gélosé (**Gueye ,2007**).

1.2. Caractères cultureux

K. pneumoniae se développe en aéro-anaérobiose. Sur les milieux classiques d'isolement pour entérobactérie (**Drigalski, Hektoen, Mac Conkey, EMB**). Après une incubation de 18 à 24 h à 30 ou à 37 °C, les colonies sont d'un diamètre de 3 à 4 mm, ronde, lisses, lactose positives, bombées, brillantes, muqueuses, parfois filantes à l'anse de platine (**Le Minor et Véron, 1989 ; Freney et al., 2000**).

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

1.3. Caractères biochimiques

K. pneumoniae présente les caractères généraux des entérobactéries : c'est une bactérie aéro-anaérobie facultative, fermentant le glucose avec production de gaz, oxydase négative, catalase positive, possède une nitrate-réductase.

Tableau 01 : Caractères biochimiques de *Klebsiella pneumoniae* (Joly et Reynaud, 2002).

Caractères biochimiques	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Mobilité	-
Indole	-
Orthonitrophényl-β-galactoside (ONPG)	+
Réaction de Voges-Proskauer (VP)	+
Tryptophan Deaminase (TDA)	-
Hydrogen Sulfide (H ₂ S)	-
Ornithine Decarboxylase (ODC)	-
Arginine dihydrolase (ADH)	-
Lysine décarboxylase (LDC)	+
Citrate	+

1.4. Caractères antigéniques

K. pneumoniae possède des antigènes communs avec ceux portés par les autres entérobactéries excepté l'antigène flagellaire du fait de son immobilité (**Freney et al., 2000**) :

- ✓ **Antigènes « O » somatiques** : la recherche des antigènes « O » présente peu d'intérêt pratique, en raison de la difficulté de leur détermination par suite du caractère thermostable des antigènes capsulaires.
- ✓ **Antigènes « K » capsulaires** : au moi 77 antigènes K ont été décrites chez *K. pneumoniae*, K1 à K72, K74, K79 à K82. Les souches les plus souvent pathogènes pour l'homme et les animaux appartiennent des types capsulaires 1 et 2, plus rarement 3 et 4.
- ✓ **Antigène d'adhérence** : appelé fimbriae, de nature protéique, porté par des pili communs.

2. Transmission pouvoir pathogène

K. pneumoniae est responsable d'infections spontanées dans 25% des cas, mais surtout d'infections nosocomiales. Dans ce dernier cas, elle est transmise par la manipulation de matériel souillé (cathéter, masque à oxygène...) et par les mains sales.

K. pneumoniae est pathogène chez l'immunodéprimé, souvent traité par les antibiotiques chez lequel elle est parfois inoculée lors de manœuvres dans un but diagnostique ou thérapeutique.

K. pneumoniae est responsable d'infections diverses : infections suppuratives, urinaires, respiratoires, biliaires, hépatiques intra-abdominales, bactériémies, septicémies, fascistes nécrosantes et elle est responsable d'environ 10% des infections nosocomiales (**Chung et al., 1992; Podschum et al., 2000; Dong et al., 2003**).

Classiquement, les Klebsielles ne sont pas considérées comme agents de toxi-infections alimentaires. Toutefois ; lors d'une toxi-infection alimentaire, une souche de *Klebsiella pneumoniae* du type capsulaire 15 et capable de produire une exotoxine de type thermolabile (LT) a été isolée de la viande et des selles des malades (**Guiraud, 1998**).

3. Facteurs de pathogénicité

Les termes facteurs de pathogénicité et facteurs de virulence sont souvent utilisés comme synonymes. Mais certains auteurs font une distinction claire entre les deux : le terme

pathogénicité définit la capacité de la bactérie à causer une maladie alors que la virulence est la mesure ou le degré de pathogénicité (**Podschun et Ullmann, 1998**).

3.1. Antigène de surfaces

Deux types d'antigènes sont exprimés à la surface de *K. pneumoniae*. Ces deux antigènes contribuent à la pathogénie de cette bactérie. Le premier est l'antigène "O" qui est composant du lipopolysaccharide et dont 9 types ont été identifiés. Le seconde est l'antigène capsulaire (K), un polysaccharide capsulaire dont 82 ont été décrits et 78 caractérisés.

3.1.1. Le lipopolysaccharide

Le LPS, est formé de plusieurs composés : le lipide A de structure oligosaccharidique, et l'antigène "O". L'antigène "O", composé le plus externe du LPS, est formé d'unités répétées de polymères d'oligosaccharides. Le lipide A correspond à l'endotoxine des bactéries à Gram négatif et participe au pouvoir pathogène. Sa libération massive dans la circulation au cours des bactériémies conduit au choc endotoxinique. Le rôle principal du LPS *in vivo* est de protéger *K. pneumoniae* du pouvoir bactéricide du sérum (**Dabernat et al., 1997**).

3.1.2. La capsule

Leur capsule a été le premier facteur de virulence décrit (**Hsieh et al., 2012 ; Hennequin et al., 2012**). Elle confère à *Klebsiella pneumoniae* un fort pouvoir invasif en protégeant les bactéries de la phagocytose. C'est une véritable enveloppe de nature polysaccharidique présentant un antigène k (**Hennequin et al., 2007**).

Parmi les 77 sérotypes capsulaires K1, K2, K21 et K55 sont associés aux souches les plus virulentes. Le lipo-polysaccharide protège la bactérie du pouvoir bactéricide du sérum (**Joly et Reynaud, 2002**).

3.2. Adhésion

Différentes adhésines ont été mises en évidence chez *K. pneumoniae*. Ces molécules jouent un rôle essentiel dans la première étape du processus infectieux. Les propriétés d'adhésion des entérobactéries sont généralement médiées par différents types de pili ou fimbriae. Ce sont des structures protéiques non flagellaires et filamenteuses formant des appendices à la surface des bactéries qui ont la capacité d'agglutiner les érythrocytes. Ils sont formés de différentes sous-unités. Les deux types de fimbriae les plus rencontrés chez *K. pneumoniae* sont le type 1 et le type 3.

- Les fimbriae de type 1 sont les mieux connus et sont présents chez la majorité des entérobactéries. Ils ont la plus grande capacité d'adhésion. Ils sont impliqués dans la colonisation des tractus respiratoire et urinaire (**Stuve et al., 2008**).
- Les propriétés des fimbriae de type 3 sont moins bien connues. Ils sont impliqués dans l'adhésion de *K. pneumoniae* à différents types cellulaires, par exemple aux épithéliums urinaire et respiratoire. Leur rôle comme facteur de virulence reste hypothétique dans plusieurs modèles d'infections (urinaire, pulmonaire). Néanmoins, du fait que ces structures semblent faciliter l'adhésion à des supports inertes et avoir un rôle dans la formation de biofilm, elles pourraient participer à la physiopathologie des infections urinaires sur sonde (**Sebghati et al., 1998**).

3.3. Sidérophores

C'est la possibilité des bactéries à capter le fer environnant grâce à des structures particulières, les sidérophores. Dans l'organisme de l'hôte, le fer n'est pas à l'état libre mais associé à des glycoprotéines telles que la transferrine et la lactoferrine. En effet la captation du fer est essentielle à la croissance et à la réplication *in vivo* des bactéries et joue un rôle dans l'installation et la progression de l'infection (**Podschun et Ullmann, 1998**).

3.4. Ilots de pathogénicité

C'est un grand fragment chromosomique d'ADN (35-45kb), il porte les gènes de virulence, en particulier le locus de la yersiniabactine indispensable à l'expression du phénotype hyper virulent de *Yersinia sp*, il s'insère au niveau de la terminaison 3' du gène de l'ARNt, le taux de G+C% est différent de celui du reste du chromosome et il est flanqué de séquences répétées. Sa fonction essentielle est de capter des molécules de fer essentielles à la croissance et à la dissémination de la bactérie (**Carniel, 1999**).

3.5. Les éléments d'intégration et de conjugaison "ICE"

Le transfert horizontal de gènes, intra-espèces et inter-espèces, joue un rôle essentiel dans l'évolution et la capacité d'adaptation des bactéries (**Fauchère et Avril, 2000 ; Ochman et al., 2000 ; Jain et al., 2002**). Trois mécanismes principaux, la transformation ; la transduction et la conjugaison (**Davison, 1999**), permettant à des populations bactériennes d'acquérir des gènes par transfert horizontal de répondre ainsi rapidement aux défis et stress environnementaux (**Hacker et Kaper., 2000**).

Des éléments qui s'excisent et s'intègrent comme des prophages et sont transférés par conjugaison comme des plasmides, ont été trouvés dans différentes bactéries. Ces éléments semblent avoir des caractéristiques très diverses telle que :

- ✓ L'utilisation de pili pour le contact de cellule à cellule, l'agrégation des cellules, le transfert de simple brin ou double brin d'ADN.
- ✓ Une spécificité faible ou élevée d'intégration.
- ✓ Des sérines ou des tyrosines recombinase.

L'ICE *K. pneumoniae*, ICE*Kp1* a récemment été décrit par **Lin et al (2008)**. En comparant la séquence complète de deux souches *K. pneumoniae*, NTUH-K2044 responsable d'abcès hépatique (**Wu et al., 2009**) et MGH78578 responsable d'infection pulmonaire (**Ogawa et al., 2005**).

3.6. Autres gènes de virulence

Deux régions chromosomiques ont récemment été identifiées chez la souche de *K. pneumoniae* NTUH-K2044 (National Taiwan University Hospital) (**Wu et al., 2009**), isolé d'un abcès hépatique associé à une méningite, alors que 'elles sont absentes du génome de la souche MGH78578 isolé d'une infection pulmonaire (**Ogawa et al., 2005**) :

3.6.1. Gènes du métabolisme de l'allantoïne

Les gènes intervenant dans le métabolisme de l'allantoïne, produit terminal d'élimination du métabolisme purique est l'une des régions identifiées chez la souche NTUH-K2044 (**Chou et al., 2004**). Cette région de 22-kb comprend 14 gènes dont le gène *allS* qui code un activateur de l'expression du régulateur allantoïne.

Par ailleurs, il a été montré que *K. pneumoniae* utilise l'allantoïne comme seule source de carbone, d'azote et d'énergie en aérobiose comme en anaérobiose.

L'augmentation de concentration d'allantoïne sérique pourrait constituer un facteur favorisant de développement des abcès (**Chou et al., 2004**).

3.6.2. Région du système *kfu*

La mise en évidence d'une région chromosomique au niveau de la souche d'environ 20 kb contenant un système de captation de fer, *kfu*, un système de phosphoénolpyruvate sucre phosphotransférase (PTS) et plusieurs gènes dont la fonction est encore inconnue. La présence de la région *kfu* apparaît également plus fréquente chez les souches invasives (**Ma et al., 2005**).

3.6.3. Gène *uge*

L'étude de **Regué et al. (2004)** a montré qu'une mutation sur le gène *uge* codant pour l'UDP galacturonate 4-épipimérase rend les souches *K. pneumoniae* dépourvues des LPS et de capsule.

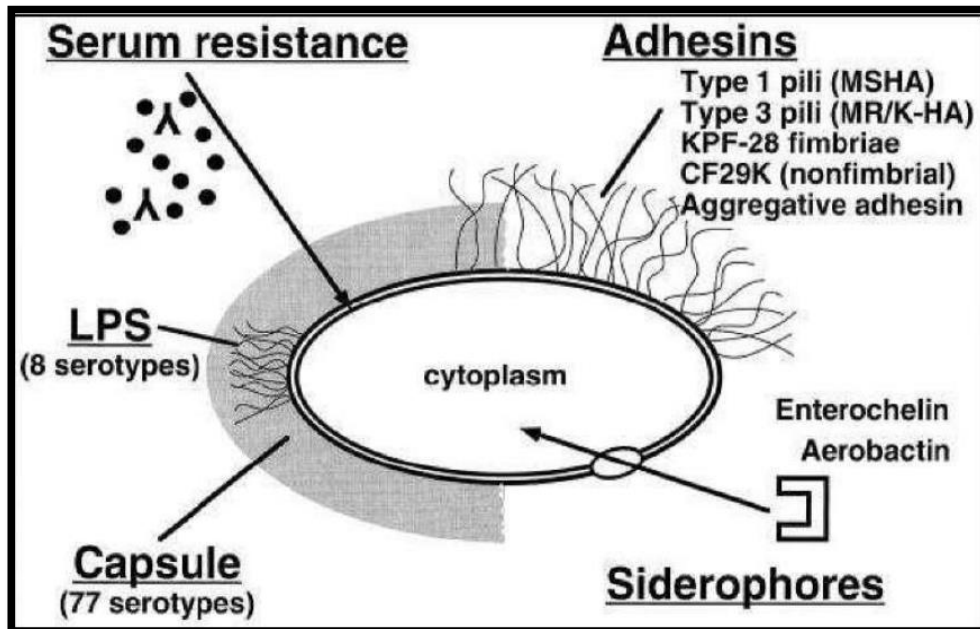


Figure 2 : Représentation schématique des facteurs de pathogénicité de *K. pneumoniae* (Podschun et Ullmann, 1998).

Chapitre II :

Klebsiella pneumoniae

et leur résistance aux

antibiotiques

Partie I : Antibiotiques

1. Définition

Agents antibactériens synthétiques et/ou semi-synthétiques. Le mot antibiotique fut créé en 1889 par Paul Vuillemin. Un antibiotique est un dérivé produit par le métabolisme de micro-organismes possédant une activité antibactérienne à faible concentration et n'ayant pas de toxicité pour l'hôte. Cette notion a été étendue aux molécules obtenues par héli synthèse (Bryskier, 1999).

Les sources principales sont les champignons, mais parfois aussi les bactéries (Vuillemin, 1890).

2. Classification

La classification des antibiotiques repose sur leur structure chimique et leurs mécanismes d'action, lesquels conditionnent leur spectre d'activité (Yala et al., 2001).

- **Mode d'action** : Les antibiotiques peuvent agir sur : la paroi, la membrane cytoplasmique, la synthèse des acides nucléiques et la synthèse des protéines.
- **Spectre d'activité** : (spectre étroit ou large).
- **Origine** : élaboré par un organisme naturel ou produit par synthèse.
- **Nature chimique** : très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (Ex : cycle β -lactamase).

3. Mode d'action

Les mode d'action des antibiotiques sont divers et peuvent affecter les structures et/ou les fonctions (Figure 03) (Yala et al., 2001) :

- 1) Action sur la paroi bactérienne (peptidoglycane).
- 2) Action sur la structure de la membrane cytoplasmique bactérienne.
- 3) Action sur la synthèse protéique bactérienne.
- 4) Action sur la synthèse de l'ADN de la bactérie.
- 5) Action sur la synthèse des folates.

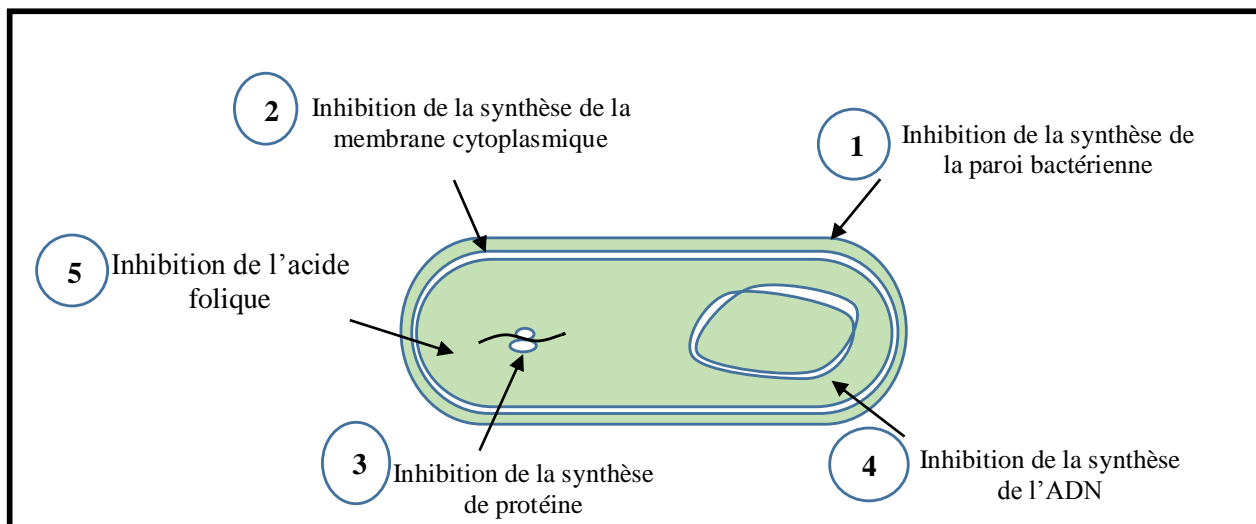


Figure 03 : Mode d'action des antibiotiques (Yala et al., 2001).

4. Les différentes familles des antibiotiques

4.1. β -lactamines

Les β -lactamines sont les antibiotiques de première ligne dans le traitement des infections causées par les entérobactéries. Cependant, dès le début de leur utilisation de masse dans les années 1940, leur efficacité a été confrontée à la production d'enzymes les inactivant : les β -lactases (**Ruppé, 2010**).

➤ Structure et classification

La structure de base des β -lactamines est le noyau azétidinone qui contient la structure carbonyle lactame indispensable à l'activité des molécules (**Bryskier, 1999**).

Sur cette structure est fixée un cycle penta-atomique saturé (pénème), insaturé (pénème) ou hexaatomique (céphèmes). Le noyau azétidinone seul (β -lactamine monocyclique) peut être substitué, et en fonction des substituants de l'atome d'azote, il est possible de distinguer les monobactames (aztréonam), les monocarbames et les monophosphatames (**Bryskier, 1999**).

❖ Les pénames (pénicillines)

La structure des pénicillines est constituée de trois parties : un noyau thiazolidine fixé sur un cycle azétidinone et d'une chaîne latérale en C-6 qui permet de les différencier.

Elles sont regroupées au sein de la classe des pénames qui comprend les pénicillines, les oxa1-pénème (ex acide clavulanique) et les carbapénames (**Bryskier, 1999**) ; les différents produits sont représentés au (**Tableau 02**).

❖ Les carbapénèmes (pénèmes)

Quatre molécules sont actuellement commercialisées : L'imipénème depuis 1986, le méropénème depuis 1997, l'ertapénème depuis 2002 et le doripénème commercialisé en France en mars 2009 (**Grall et al., 2011**). Ce sont des antibiotiques bactéricides. Possèdent un large spectre antibactérien incluant les bactéries à Gram négatif (entérobactéries) ; Gram positif, sauf les staphylocoques et les entérocoques. Les carbapénèmes se distinguent des pénicillines (pénams) par la présence d'un atome de carbone au lieu d'un soufre en position 1 et d'une liaison insaturée en C2-C3 (**Wolff et al., 2008**) ; On trouve trois générations qui sont présent au (**Tableau 02**) avec leur structure.

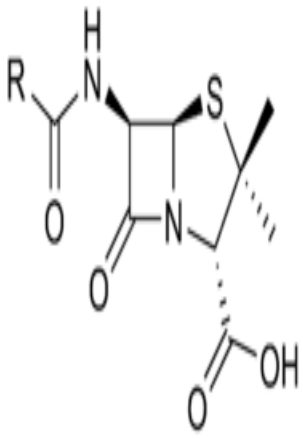
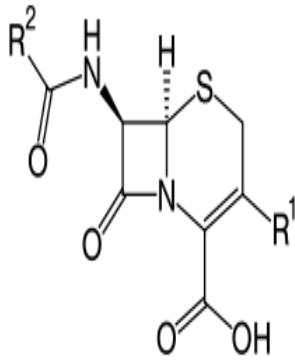
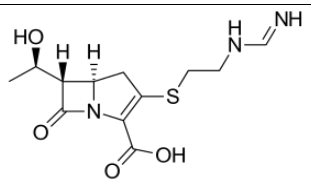
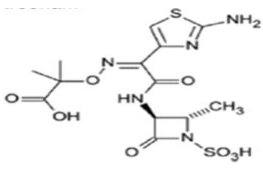
❖ Les céphèmes

Ils sont des molécules qui se distinguent des pénames par la présence d'un cycle dihydrothiazine.ils correspondent aux céphalosporines aux sens strict. Les céphalosporines sont produites par un champignon (*cephalosporium*). (**Le Minor et Véron, 1989 ; Bèrche et al.,1988 ; Nauciel,2001, Fauchère et Avril,2002 ; Boulahbal,2006**).

❖ monobactames :

Constituent le groupe le plus récent des β -lactamines, ces antibiotiques se caractérisent par une structure monocyclique (hétérocycle azétidinone) (**Bryskier, 1999**). Le tableau suivant représente la structure et la classification.

Tableau02 : La classification des β -lactamines.

Groupes	Structures	Produits
Les pénames (pénicillines)		<p>Pénicilline G : propicilline, clometocilline.</p> <p>Pénicilline V : oracilline</p> <p>Pénicilline M: meticilline, oxacilline.</p> <p>Pénicilline A : ampicilline, amoxycilline.</p> <p>Carboxypénicilline : ticarcilline.</p> <p>Uréidopénicilline : mezlocilline, pipéracilline.</p> <p>Amidinopénicilline : mécillinam, pivmécillinam.</p>
Les céphèmes (céphalosporines)		<p>C1G : céfalotine, céfazoline, céfapirine, céfadine, céfacétrile, céfalexine, céfadoxile et céfaclor.</p> <p>C2G : céfamondole, céfotiam, céfuroxime, céfoxitine et céfotétan.</p> <p>C3G : céfotaxime, cefsulodine, céfopérazone, ceftazidime, latamoxef et céfépimme.</p>
Les carbapèmes		Imipénème.
Les inhibiteurs des β – lactamases	Les produits dont le radical R_6 est un halogène (I ou Br) ou les pénicillines sulfones	L'acide clavulanique (associé à l'amoxycilline ou la ticarcilline), le sulbactam(seul ou associé à l'ampicilline), le tazobactam (associé à la pipéracilline)
Les monobactames		Aztréonam.

➤ **Mode d'action des β -lactamines :**

Les β -lactamines inhibent la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane (polymère majeur spécifique de la paroi des bactéries à Gram négatif et positif). Les cibles des β -lactamines sont des enzymes situées dans la partie externe de la membrane cytoplasmique bactérienne et appelées PLP. Ces enzymes correspondent aux transpeptidases impliquées dans la synthèse du peptidoglycane. La fixation des β -lactamines sur ces PLP est responsable de l'arrêt de la synthèse du peptidoglycane (**Cavallo et al., 2004**).

Les carbapénèmes se fixent principalement aux PLP 1 et PLP 2 contrairement aux céphalosporines et aux aminopénicillines qui se fixent à la PLP 3 (**Wolff et al., 2008**).

4.2. Aminosides

Ils sont des antibiotiques bactéricides de la famille des aminoglycosides, ils comprennent la kanamycine, l'amikacine, la gentamycine, la nétilmycine, la tobramycine (**Bryskier, 1999**). Ce sont des hétérosides naturels formés par un ou plusieurs glycosides liés à un aminocyclitol (**Yala et al., 2001**).

➤ **Classification**

Il existe plusieurs centaines de molécules naturelles et hémisynthétiques. Elles sont classées par UMEZAWA en 1979 en fonction de la structure chimique centrale en trois classes (**Bryskier, 1999**) :

- ✓ Streptamine
- ✓ 2 désoxystreptamine
- ✓ Streptidine

➤ **Mode d'action**

Le spectre d'action des aminosides est large, agissant sur les bacilles Gram négatifs aérobies notamment les entérobactéries et sur les bacilles à Gram positif (*Listeria*). Ils sont actifs sur les *Staphylococcus aureus* sécréteurs de pénicillinase, sur les cocci à Gram négatif. Ces antibiotiques sont inactifs sur les streptocoques, pneumocoques, les entérocoques et les anaérobies. Les aminosides perturbent la synthèse des protéines au niveau de la sous-unité 30S des ribosomes des bactéries entraînant la destruction bactérienne (**Yala et al., 2001**).

4.3. Quinolones

Les quinolones sont des antibiotiques synthétiques, découvertes en 1962 par Leshner qui a isolé l'acide nalidixique à partir d'une préparation de chloroquine destinée au traitement du paludisme. La fluoration de ces molécules en position 6 a permis d'étendre leur spectre d'activité selon la génération de la molécule à *Pseudomonas aeruginosa*, aux coques à Gram positif, aux bactéries intracellulaires et aux anaérobies (Meradi et al., 2009).

Ces fluoroquinolones, qui sont des quinolones de deuxième génération (norfloxacine, péfloxacin, ciprofloxacine) (Yala et al., 2001), sont largement utilisés en médecine humaine et vétérinaire, notamment dans le cas d'infections urinaires et respiratoires (Meradi et al., 2009).

➤ Mode d'action

Les fluoroquinolones ne sont pas actives sur les entérocoques, malgré leur efficacité sur les bactéries à gram négatif, leur utilisation doit être raisonnée afin de contrôler l'émergence de résistances (Botto, 2003). Les fluoroquinolones ont un spectre d'activité élargi, qui recouvre les bactéries à Gram négatif, les cocci à Gram positif dont l'activité est 100 à 1000 fois plus élevée que celles des quinolones de 1ère génération (sauf streptocoques et pneumocoques). L'ofloxacine et la Ciprofloxacine ont une activité sur *Mycobacterium tuberculosis* (Yala et al., 2001).

Les Quinolones inhibent spécifiquement la synthèse d'ADN bactérien en agissant sur les topoisomérases de type II ainsi que le topo isomérase IV. Elles se fixent sur la sous-unité A de la gyrase (cible préférentielle des bactéries à gram négatif) (Meradi et al., 2009).

Partie II : La résistance de *K pneumoniae* aux antibiotiques

1. Notion de la résistance bactérienne

Depuis l'introduction des antibiotiques en thérapeutique, on assiste à l'émergence très rapide de nombreuses souches bactériennes insensibles à un ou plusieurs antibiotiques (**Rouveix, 1990**). La résistance est actuellement un véritable problème de santé publique pour la prise en charge des malades. Les hôpitaux payent un lourd tribut aux bactéries antibiorésistantes qui génèrent le plus souvent les infections nosocomiales. Une espèce bactérienne est dite « résistante » à un antibiotique si cette dernière est capable de se multiplier et de croître en présence de concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe la croissance des autres souches de la même espèce (**Fauchère et Avril, 2002**). En effet, cette résistance se caractérise par son caractère naturel ou acquis, son mécanisme et son support génétique (**Roy, 1997**).

2. Type de résistance

L'efficacité de l'antibiotique dépend d'au moins trois facteurs : la quantité d'antibiotique au contact de la cible, l'affinité de l'antibiotique pour la cible et la production d'enzymes inactivant l'antibiotique. Ces facteurs sont responsables soit d'une résistance naturelle, et donc présents chez toutes les souches de l'espèce, soit d'une résistance acquise par certaines souches, suite à l'apparition de mutations chromosomiques ou à l'acquisition de matériel génétique tels que des plasmides, des transposons ou des intégrons (**Comité de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie, 1997**).

2.1. Résistance naturelle

K. pneumoniae possède naturellement un gène codant pour une pénicillinase chromosomique qui lui confère une résistance à bas niveau aux pénicillines. Cette pénicillinase est sensible à l'action des inhibiteurs (acide clavulanique, tazobactam). Ainsi, le phénotype sauvage de *K. pneumoniae* est sensible aux associations amoxicilline (ou ticarcilline) + acide clavulanique et pipéracilline + tazobactam ainsi qu'à l'ensemble des céphalosporines. Elle est également sensible aux céfamycines, à l'aztréonam et aux carbapénèmes. Concernant les autres antibiotiques, *K. pneumoniae* est sensible aux aminosides, aux fluoroquinolones, à la fosfomycine et au cotrimoxazole (**Courvalin et al., 2006**).

2.2.Résistance acquise

La résistance acquise est une propriété nouvelle qui apparaît au sein d'une population bactérienne théoriquement sensible en raison d'une modification génétique, cette résistance correspondant à une adaptation des bactéries aux antibiotiques (**Rouveix, 1990**).

3. Support génétiques de la résistance

Les entérobactéries sont particulièrement efficaces pour échanger de l'information génétique et la résistance aux antibiotiques de ces espèces est souvent due à l'acquisition de gènes étrangers.

Ces gènes ont été capturés à partir du chromosome d'espèces différentes. Ces mobilisations impliquent deux types différents d'éléments génétiques mobiles. Ceux qui sont capables de transférer ou de capter des gènes entre les molécules d'ADN tels d'insertion, les transposons, ou les cassettes des intégrons, et ceux qui permettent de transfert d'ADN entre cellules, tels que les plasmides conjugatifs et mobilisables ou les éléments intégratifs conjugatifs (**Singleton ,2005**).

3.1.Mutation chromosomique

Elle est la moins fréquente (10-20 %). C'est l'apparition d'une mutation, c'est-à-dire d'un nouveau caractère génétique par suite d'une modification d'un gène porté par le chromosome bactérien. Elle s'effectue de façon spontanée. Les mutations sont stables et héréditaires (**Le Minor et Véron, 1989 ; Rouveix, 1990 ; Béraud, 2001 ; Regnault, 2002**).

3.2.La résistance par acquisition des gènes exogènes

3.2.1. Plasmides

Les plasmides sont des molécules d'ADN indépendantes du chromosome et capables d'autoréplication. Un plasmide peut porter plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques conférant ainsi en bloc une multirésistance (**Ploy et al., 2005**).

3.2.2. Les transposons

Les transposons sont des séquences d'ADN capables de promouvoir leur propre transfert d'un réplicon (chromosome ou plasmide) à un autre. Les transposons peuvent s'intégrer au chromosome de la bactérie. Ces éléments mobiles peuvent servir de véhicule aux gènes de résistance et permettre leur dissémination (**Ploy et al., 2005**).

3.2.3. Intégrons

Les intégrons sont de nouveaux éléments génétiques contenant un ou plusieurs gènes de résistance sous forme de cassettes. Les cassettes sont des unités mobiles qui peuvent être facilement intégrées dans un intégrons par un mécanisme de recombinaison spécifique de site. Les intégrons ont surtout été étudiés chez les bactéries à Gram négatif mais ont aussi été mis en évidence chez des bactéries à Gram positif. Les intégrons jouent donc probablement un rôle important dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques au sein du monde bactérien (Ploy et al., 2005).

4. Bêta-lactamines et *K. pneumoniae*

Les bêta-lactamines sont les antibiotiques les plus utilisés dans le traitement des infections causées par les *K. pneumoniae* vue leur diversité, faible toxicité, activité bactéricide et large spectre d'action. Elles comprennent les dérivés de la pénicilline, les céphalosporines, les monobactames et les carbapénèmes, et ont toutes en commun le cycle β -lactame (Bryskier, 1984).

4.1. Résistance de *K. pneumoniae* aux bêta-lactamines

La résistance bactérienne aux β -lactamines est due principalement à la production d'enzyme (β -lactamases) (Arlet et Philippon, 2003).

Les β -lactamases détruisent les β -lactamines par ouverture du cycle β -lactame (par hydrolyse de la liaison amide au niveau de leur noyau β -lactame). Chaque β -lactamase a des caractéristiques physico-chimiques et enzymatiques propres (poids moléculaire, Phi, substrats préférentiels ...) (Newman, 1990).

4.1.1. Résistance enzymatique

1) Pénicillinase

➤ Phénotype pénicillinase à bas niveau

Klebsiella pneumoniae est naturellement résistante aux pénicillines des groupes G et A et à la carbénicilline sous l'effet d'une pénicillinase chromosomique appelée SHV1. Elle est sensible aux autres antibiotiques actifs sur les bacilles à Gram négatif (Joly et Reynaud, 2002).

➤ Phénotype pénicillinase à haut niveau

Chez *Klebsiella pneumoniae* le phénotype pénicillinase à haut niveau se caractérise par la résistance à très haut niveau aux amino et carboxypénicillines, et par une réduction de l'activité des urédopénicillines et des céphalosporines de première et de deuxième génération ainsi par une réduction de l'activité des pénicillines (ampicilline, ticarcilline, pipéracilline et amoxicilline) associées aux inhibiteurs de β -lactamases (**Jarlier et Nordmann, 2000**).

2) Céphalosporinase

Les gènes codant pour ces enzymes sont naturellement présents chez beaucoup d'entérobactéries (notamment les *K. pneumoniae*). Ces gènes s'expriment qu'en présence d'inducteurs qui sont presque toujours des β -lactamines (Imipénème et céfoxitine sont les plus forts inducteurs).

Ces enzymes peuvent être produites à bas niveau par les souches sauvages (céphalosporinase de bas niveau ou réprimée). Une mutation sur les gènes régulateurs aboutit à une hyperproduction de ces enzymes (céphalosporinases de haut niveau ou déprimée) (**Fauchère et Avril, 2002**).

3) Carbapénamases

Les carbapénèmes sont de plus en plus utilisés en milieu hospitalier car ce sont souvent les médicaments de dernier recours pour traiter les infections graves causées par les *K.pneumoniae* BLSE (**Bonnet, 2004**). Au cours de ce traitement, le taux élevé de *K.pneumoniae* BLSE présente un risque d'émergence de nouvelles carbapénémases.

Chez les entérobactéries, la résistance aux carbapénèmes était liée à l'association de la production de Case ou de BLSE avec une diminution de perméabilité. S'y est ajouté récemment l'apparition de nouvelles enzymes capables d'hydrolyser les carbapénèmes.

4) β -lactamase à spectre élargi (BLSE)

La production de β -lactamase à spectre élargi confère à *Klebsiella pneumoniae* une large résistance aux β -lactamines. Parmi ces dernières et selon la variété de l'enzyme, seuls l'imipénème et encore souvent les céphamycines demeurent stables vis-à-vis des β -lactamase à spectre élargi (**Boukadida et al., 2002**).

Les premières observations de BLSE sont décrites en Europe et rapidement après, aux Etats-Unis à partir de 1988 ou une nouvelle résistance à la ceftazidime et à l'aztréonam a permis

de retrouver une nouvelle β -lactamase à transmission plasmidique chez *K. pneumoniae*. Dans des études européennes précédentes il a été démontré que *K. pneumoniae* et *E. coli* étaient les espèces les plus fréquemment responsables de la sécrétion de BLSE (**Ben Haj Khalifa et al., 2010**).

Résistance aux céfotaxime *Klebsiella pneumoniae* est une souche clinique hautement résistante au céfotaxime par production d'enzyme β -lactamase de type CTX-M (**Ben Achour et al., 2008**).

Les premières souches de *Klebsiella pneumoniae* résistantes aux céphalosporines de troisième génération ont été isolées en Allemagne en 1983(**Grall, 2011**).

4.1.2. Résistance non enzymatique

2.1.L'imperméabilité

Chez les *K. pneumoniae*, la pénétration des molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de lipopolysaccharide (LPS) s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau. la sensibilité aux b-lactamines dépend du nombre de porines fonctionnelles. L'altération des porines par mutations est à l'origine de résistance acquise aux b-lactamines, soit par une modification structurale d'une porines essentielles, ce qui a été décrit chez *K.pneumoniae*, soit par une diminution quantitative des porines, qui est la situation la plus fréquente(**Cavallo et al., 2004**).

2.2.Excrétion par des systèmes d'efflux

Les systèmes d'efflux sont constitués chez *K. pneumoniae* de trois protéines (**Nikaido, 1994**) :

- Une, insérée dans la membrane cytoplasmique jouant le rôle de pompe.
- Une seconde, insérée dans la membrane externe assurant le passage au travers de la membrane externe.
- Une troisième, périplasmique, qui formerait un lien entre la pompe et la protéine de membrane externe.

La résistance par efflux est souvent couplée à une diminution de la perméabilité. L'association de ces deux mécanismes peut entraîner une résistance à haut niveau et simultanée vis-à-vis d'antibiotiques structurellement non reliés, constituant ainsi de véritables systèmes de multirésistance.

C'est le mécanisme principal de la résistance à la tétracycline, chez les bactéries Gram positives et Gram négatives (**Roy, 1997**).

2.3. Modification de PLP (La modification d'affinité de la cible PLP)

Une perte d'affinité de PLP ou une diminution de la quantité de PLP. Ce type de mécanisme de résistance reste très rare chez *K. pneumoniae* (**Nikaido, 1994**).

5. Aminosides et *Klebsiella pneumoniae*

Les aminosides ont un large spectre antibactérien qui comprend les bactéries à Gram négatif et positif. Le traitement des infections nosocomiales graves à bacilles à Gram négatif nécessite leur utilisation le plus souvent en association avec une β -lactamine ou une fluoroquinolone (**Wachino et Arakawa., 2012**).

5.1. Résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux aminosides

Comme la plupart des entérobactéries, *Klebsiella* présente une résistance aux aminosides gentamicine et à la nétilmicine alors que leur résistance à l'amikacine, ciprofloxacine est faible (**Hmamouchi et al., 2005**). La résistance acquise résulte (**Archambaud et Clave, 2008**) :

5.1.1. La modification enzymatique des antibiotiques

Lorsqu'un aminoside est modifié par des enzymes bactériennes sa fixation sur l'ARN 16S peut être affectée et se traduire par la perte de son activité. Les enzymes modificatrices des aminosides sont le mécanisme de résistance le plus courant chez les bactéries Gram négatif et positif. Elles ont été regroupées en fonction de la réaction qu'elles catalysent :

- Phosphorylation d'un groupement hydroxyle [O- phosphotransférase] (APH aminoside phosphotransférase).

- Nucléotidylation d'un groupement hydroxyle [O-nucléotidyltransférase] (ANT aminoside nucléotidyltransférase)

- Acétylation d'un groupement aminé [N- acétyltransférase] (AAC aminoside acétyltransférase) (**Ramirez et Tolmasky., 2010**).

5.1.2. Altération de la cible

Le mode d'action des aminosides laisse présager la mutation de l'ARN 16S comme moyen de résistance. Trois activités de méthylation de l'ARN 16S modifient le site A aux positions G1405 (N7), A1408 et C1407 (N5).

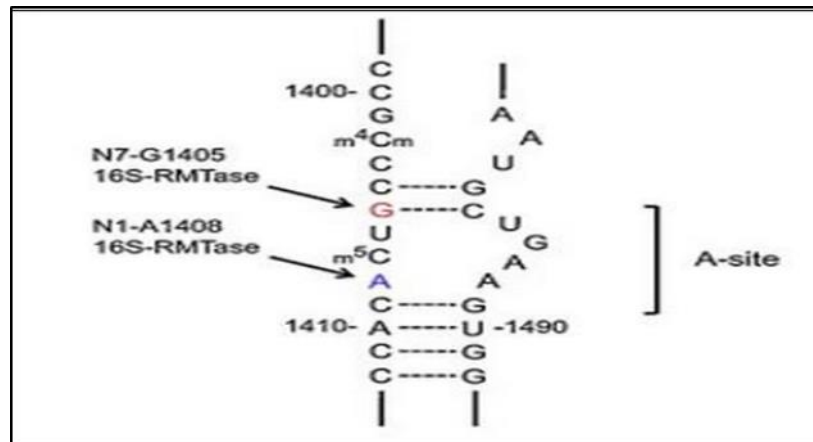


Figure 04 : Site-A : la région qui porte les ARNr16S méthyltransphérase
(Wachino *et al.*, 2012).

5.1.3. Piégeage de l'antibiotique

Une enzyme modificatrice peut parfois neutraliser l'action d'un aminoside par une liaison affine sans pour autant modifier sa structure. Le piégeage de l'antibiotique a été proposé comme mécanisme responsable du phénotype de résistance à la kanamycine et à la tobramycine alors que la gentamicine et la nétilmicine restent actives. Lorsque la bactérie produit une grande quantité de la phosphotransférase qui reconnaît la tobramycine sans la modifier celle-ci peut être piégée dans un complexe enzyme-substrat fonctionnellement inactif (Menard *et al.*, 1993).

5.1.4. Imperméabilité ou exportation de l'antibiotique

L'accès de l'aminoside à sa cible met enjeu différentes étapes. Compte tenu de leur caractère hydrophile les aminosides pénètrent la membrane externe des bactéries à Gram négatif par les porines (Hancock *et al.*, 1991).

- ❖ Le passage par la voie lipophile est associé à leur caractéristique polycationique par substitution avec le calcium ou le magnésium de la membrane externe.
- ❖ La deuxième étape consiste en la traversée de la membrane cytoplasmique hydrophobe et requiert l'énergie de la force proton motrice produite par la chaîne respiratoire (Davis, 1987).

6. Quinolones et *K. pneumoniae* :

Les quinolones sont des composés antibactériens de synthèse dont le chef de file, l'acide nalidixique, a été décrit en 1962 par Leshner et coll (**Leshner et al., 1962**).

6.1. Résistance de *K. pneumoniae* aux Quinolones

La résistance des bactéries, notamment *Klebsiella pneumoniae*, aux fluoroquinolones est devenue préoccupante tant en milieu hospitalier qu'en médecine communautaire.

Deux principaux mécanismes de résistance aux quinolones chez *K. pneumoniae* s'exercent séparément ou en combinaison et confèrent des niveaux de résistance variables. La résistance plasmidique est due à la protection de l'ADN gyrase de la fixation des quinolones. Cette résistance est décrite pour la première fois en 1998 aux USA chez une souche de *K. pneumoniae* hébergeant un plasmide portant le gène *qnrA* qui code pour une protéine Qnr A (**Jacoby et al., 2003**).

La résistance aux quinolones est principalement chromosomique, généralement due à :

- ❖ Une diminution d'affinité de l'antibiotique pour sa cible.
- ❖ Une modification de l'ADN gyrase et/ou de la topoisomérase IV par mutations ponctuelles.

La résistance des entérobactéries aux quinolones est liée non seulement à des mécanismes de résistance de support chromosomique transmissible verticalement mais aussi à des gènes de support plasmidique transférable horizontalement.

Il n'existe pas de critères phénotypiques sur un antibiogramme permettant de distinguer les mécanismes de résistance chromosomiques et plasmidiques aux quinolones. La détection de ces mécanismes repose sur des techniques de Biologie Moléculaire.

Matériel & méthodes

Matériel & méthodes

I. Procédé et lieu de l'étude

Notre travail est réalisé au niveau de l'unité de bactériologie clinique du laboratoire central de l'Etablissement Public Hospitalier (EPH) de BOUFARIK (W. Blida). Ce travail, structuré autour de la situation de l'antibiorésistance de *Klebsiella pneumoniae*, s'intéresse en premier lieu à faire le constat dans l'EPH de Boufarik par rapport aux analyses bactériologiques réalisées durant la période de notre stage. Cette dernière a été écourtée, à cause de la situation inhérente au Covid 19, nous avons tenté de compléter nos informations avec une analyse rétrospective, de janvier à décembre 2011 et de janvier à décembre 2016 à partir des bases de données de l'unité de bactériologie de l'hôpital de BOUFARIK et du réseau nationale de la surveillance de la résistance bactérienne en Algérie. (<http://www.sante.dz/aarn/documents/pdf/Rapport2016.pdf>) (<http://www.sante.dz/aarn/documents/pdf/rapport13.pdf>).

1. Prélèvements biologiques

Les prélèvements biologiques proviennent de divers services internes de l'EPH. Tous les prélèvements sont accompagnés d'une fiche de renseignement sur laquelle sont mentionnées les coordonnées relatives à chaque malade (Nom, Prénom, âge, sexe, médecin traitant, les signes cliniques ayant motivé le prélèvement et l'existence d'une éventuelle antibiothérapie en précisent la nature et la durée de l'antibiotique).

Les échantillons concernés par notre étude sont des prélèvements des urines, de sang, de pus et de liquide céphalo-rachidien (LCR) provenant de différents services d'hospitalisation.

2. Techniques de prélèvements

La réalisation d'un prélèvement dans les meilleures conditions d'asepsie est d'une importance primordiale, car la qualité de l'échantillon conditionne la valeur des résultats. Ainsi, selon la qualité, la source et la destination des prélèvements, nous nous sommes conformé aux protocoles techniques appliqués dans les unités du laboratoire, afin d'assurer le maximum en termes d'application des règles d'hygiène et d'asepsie dans le traitement des échantillons.

2.1 Etude cyto bactériologique des urines (ECBU)

Pour des analyses ECBU, le prélèvement doit être réalisé avant toute antibiothérapie, de préférence sur la première miction du matin. Si le malade est sous

traitement, une fenêtre thérapeutique de 72 heures est nécessaire avant de procéder aux prélèvements des urines destinées à l'examen cyto bactériologique.

2.2 Echantillons de Pus

Le prélèvement de pus se réalise à l'aide de seringues stériles à usage unique, ou avec des pipettes stériles, suivis immédiatement de transferts directs dans un tube stérile ou à l'écouvillon.

2.3 Liquide céphalorahcien (LCR)

Il se fait habituellement par ponction lombaire (PL) dans l'espace L4-L5 ou L5-S1 à l'aide de seringues stériles adaptées. Exceptionnellement, chez les nouveau-nés, le prélèvement peut se faire par ponction transfontanellaire ou par ponction ventriculaire (Denis *et al.*, 2007).

2.4 Hémoculture

Le prélèvement se réalise après une asepsie rigoureuse. Le système est généralement constitué d'une tubulure munie à chaque extrémité d'une aiguille ; l'une servant la ponction veineuse et l'autre l'inoculation du flacon grâce un adaptateur (Denis *et al.*, 2007).

3. Analyse des prélèvements

Etant donné que le but des analyses est d'apporter une réponse médicalement fiable aux cliniciens demandeurs des analyses, souvent les prélèvements réceptionnés, selon les conditions exigées et préétablies, doivent suivre des examens macroscopiques et microscopiques avant leur mise en culture. Cette dernière décidera de la suite à donner au cheminement des analyses attendues (**Figure 05**).

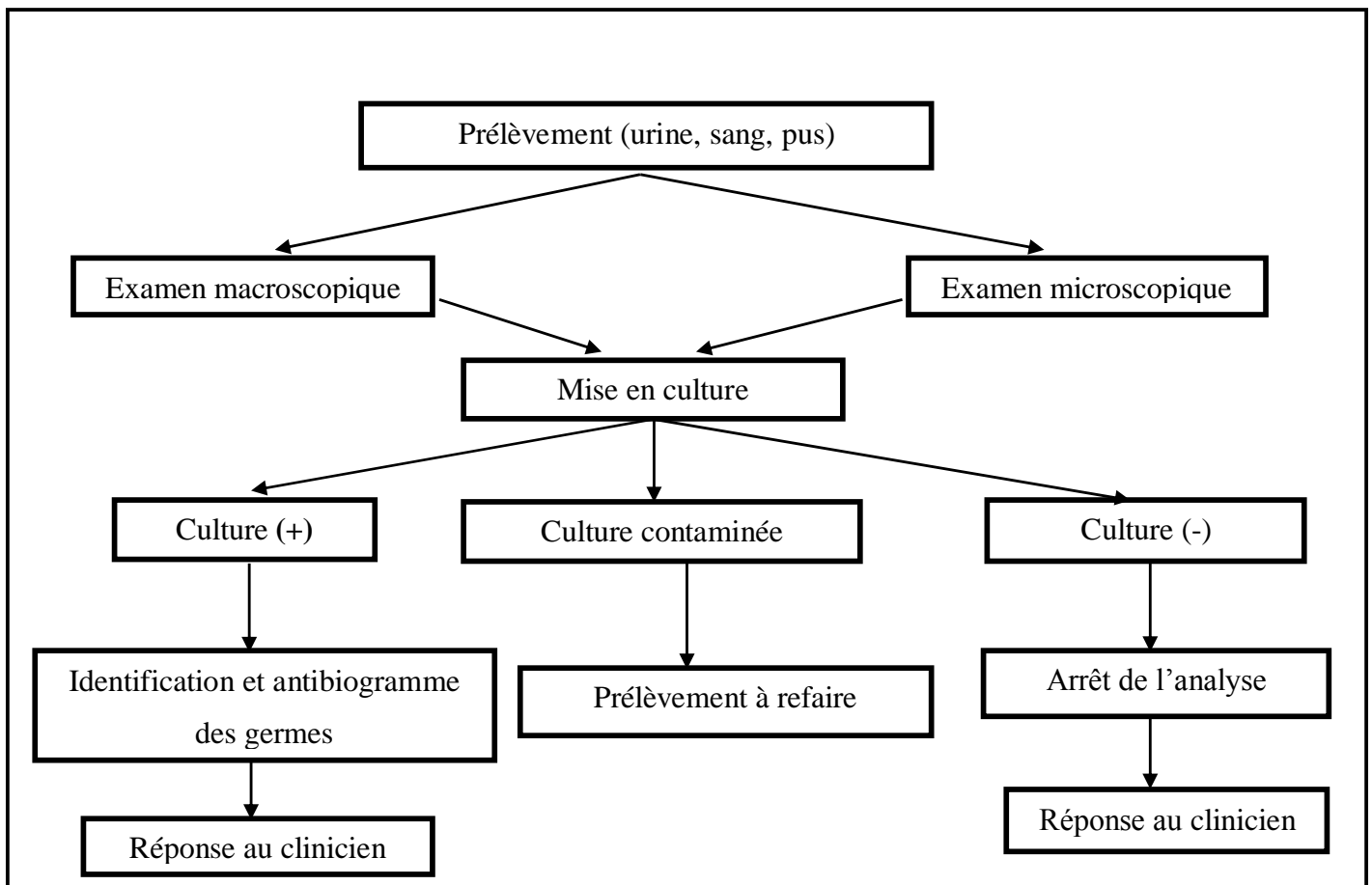


Figure 05 : Analyse des échantillons dans les différentes phases de prélèvement.

3.1. Examen bactériologique

3.1.1 Examen macroscopique

Les observations macroscopiques se réalisent à l'œil nu, minutieusement sur chaque échantillon, pour constater certains paramètres, notamment la couleur, l'odeur, la turbidité et la viscosité. Il est à signaler que ces paramètres varient d'une personne à l'autre en fonction de l'état de santé, du sexe et de son âge.

3.1.2 Examen microscopique

Une goutte de prélèvement est déposée aseptiquement entre lame et lamelle et observée au microscope optique au grossissement (Gx40x10)

Les observations visent à vérifier, entre autres :

- ✓ La présence éventuelle de bactéries (forme et mobilité)
- ✓ La présence des éléments cellulaires indique la réaction inflammatoire (Lymphocytes, Poly nucléaires altérés ou pas)
- ✓ La présence d'autres éléments cellulaires (exemple : les cristaux qui sont présents dans les urines).

3.2 Mise en culture

Après l'examen microscopique, chaque prélèvement doit être cultivé, selon les exigences des analyses et la nature de l'analyse, sur des milieux de culture appropriés.

- **Urines** : la culture est généralement effectuée sur une gélose nutritive et gélose Hektoen (**Annexe 01**).
- **Pus** : la culture est souvent réalisée sur une gélose nutritive, une gélose Hektoen, une gélose Chapman, Gélose au sang frais, Gélose au sang cuit (**Annexe 01**).
- **Hémoculture et LCR** : la culture est réalisée sur une gélose au sang cuit (**Annexe 01**).

Les opérations d'ensemencement des milieux gélosés, préparés en tube ou en boîte de Pétri, se réalisent directement, en déchargeant en stries condensées l'écouvillon de prélèvement sur toute la surface du milieu de culture gélosé. Les durées et les températures d'incubation sont fixées, selon les protocoles opératoires adoptés au laboratoire des analyses bactériologiques. Comme il s'agit de bactéries d'entérobactéries, l'incubation se réalise à 35-38°C.

3.3. Isolement et purification

Après une lecture morphologique, les différentes colonies obtenues sont ré-isolées sur le même milieu afin d'obtenir de souches pures.

Il est à signaler, qu'avant de procéder aux opérations d'isolement et de purification, le respect des démarches suivantes est obligatoire et suivi scrupuleusement :

- Ecrire le numéro de patient, la date et l'identifiant du mélange ou de la souche sur le couvercle de la boîte, et aussi pour les tubes des suspensions bactériennes.
- Prélever la suspension bactérienne à l'aide d'une anse ou d'une pipette Pasteur boutonnée stérilisée en raclant une colonie isolée ou par trempage dans la suspension.
- Ouvrir la boîte et déposer la pointe de l'anse ou de la pipette au point initial dans une zone stérile.
- Faire des stries serrées sans rayer la gélose.
- Tourner la boîte d'un quart de tour et faire des stries serrées.
- Tourner la boîte d'un quart de tour et faire des stries larges.
- Stériliser l'anse ou jeter la pipette.
- Refermer la boîte et la déposer dans l'étuve, couvercle vers le bas.

4. Identification des germes bactériens

Après obtentions d'isolats bactériens purifiés et bien distingués, les opérations de leur identification portent sur une série de tests préliminaires pour examiner des aspects macroscopiques et microscopiques.

4.1 Examen macroscopique

L'étude de la macromorphologie bactérienne est le premier acte effectué pour identifier l'isolat bactérien purifié. L'observation de la morphologie bactérienne permet une orientation préliminaire du diagnostic.

L'aspect des colonies sur le milieu solide permet d'observer et de noter la couleur, la taille, la forme et la fermentation du lactose ; l'aspect (collant, filamenteux, etc.), l'odeur, la transparence (opaque, translucide), l'allure des contours (régulier, dentelés, etc.), l'aspect de la surface (lisse ou rugueuse, etc.) (Joly et Reynaud, 2003).

4.2 Coloration de Gram

C'est la coloration de base en bactériologie et permet de rechercher l'affinité morpho-tinctoriale des bactéries, leurs morphologies et leurs modes de regroupement. Elle permet une classification des bactéries selon leur structure Elle est réalisée comme suit (Denis et al., 2007).

- Sur frottis fixé à la chaleur puis à l'alcool
- Recouvrir la lame de violet de gentiane (1 minute)
- Rincer à l'eau
- Recouvrir de lugol (1 minute)
- Décolorer à l'alcool, la lame est tenue inclinée. la durée de la décoloration à l'alcool est lorsque ce qui s'écoule en bas de la lame inclinée est devenue clair
- Stopper la décoloration par un nouveau lavage à l'eau
- Recouvrir la lame en fuchine diluée, 30 secondes à 1 minute
- Laver à l'eau
- Sécher entre deux feuilles de papier filtre, puis à la chaleur
- Examiner à l'immersion à l'objectif Gx100.

4.3 Caractérisation biochimique

Les propriétés qui définissent le genre et l'espèce doivent être mise en évidence pour affirmer que la souche est une entérobactérie.

Les caractères d'identification sont essentiellement biochimiques et utilisent des tests qui étudient ; le métabolisme protéique (présence d'uréase, production d'indole, dégradation du tryptophane), la fermentation du sucre (glucose, lactose, saccharose etc...), la capacité d'utiliser le citrate, la présence d'enzymes (décarboxylases, désaminases), la production d'hydrogène sulfuré ou la formation de gaz.

Ces caractères sont mis en évidence grâce à :

- **Galerie API 20 E** : c'est un système miniaturisé pour l'identification des bactéries.

L'identification biochimique a été réalisée avec la galerie **API20E**.

- API20E (Appareillage et Procédé d'Identification) est utilisé pour l'identification des entérobactéries et autres bacilles Gram négatif.
- La galerie API20E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés désignant des tests biochimiques spécifiques (**Figure 06**).
- Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne, incubés pendant 24h dans une étuve à 37°C.
- Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou après ajout des réactifs de révélation.



Figure 06 : la galerie API 20 E.

a) Recherche de la galactosidase : (test ONPG)

Principe : La β -galactosidase est une enzyme inductible : elle n'est synthétisée par la bactérie que lorsque celle-ci est en présence de son substrat

On utilise un substrat synthétique : l'ortho-nitro-phényl-galactoside (ONPG) incolore, pour distinguer les bactéries lactose positif, des bactéries lactose négatif.

b) Mise en évidence des carboxylases et déshydrogénases (ADH, LDC, ODC)

Principe : Ce test détecte la capacité qu'a un organisme de produire des décarboxylases et des déshydrogénases, enzymes qui décarboxylent les acides aminés à savoir l'arginine, la lysine et l'ornithine.

c) L'utilisation de citrate :

Principe : certaines bactéries, dont les entérobactéries, sont capables d'assimiler le citrate de sodium comme seule source de carbone et d'énergie du milieu.

d) La production d'H₂S

Principe : ce test est surtout utilisé pour différencier entre les groupes, genres et espèces des *Enterobacteriaceae*. Le but de ce test est de mettre en évidence la formation de sulfure d'hydrogène (H₂S) à partir d'acide aminé soufré.

e) Réaction voges-proskaur : (VP)

Le test VP a pour objectif de détecter une étape intermédiaire de la transformation de l'acide pyruvique. Cette réaction permet de mettre en évidence l'acétoïne

f) Utilisation de substrat carboné :

Principe : le but de test est de mettre en évidence la fermentation des sucres.

4.3.1 Préparation de la galerie

- Mettre de l'eau distillée sur le fond de la boîte partie alvéolée toutes les alvéoles doivent être remplies, éliminer l'excès d'eau en versant la boîte au-dessus de l'évier.
- Placer la galerie sur le fond de la boîte elle doit être manipulée avec la pince.
- Recouvrir la boîte avec son couvercle.
- Inscrive nom, référence souche, date et température d'incubation sur la languette latérale de la boîte.

4.3.2 Préparation de l'inoculum

- Ouvrir un tube d'eau distillée stérile.
- Prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé (les cellules jeunes (18 à 24 heures) sont préférentiellement utilisées).
- Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu (opacité 0,5 sur l'échelle Mc Farland).

4.3.3 Inoculation de la galerie

Selon les prescriptions exigées pour les tests API20E, nous avons appliqué les orientations indiquées :

- Pour un test souligné ou non (exemple : ONPG ou ADH), on va remplir uniquement le microtube.
- Pour un test encadré (exemple : CIT), on va remplir le microtube et la cupule.
- On ajoute l'huile de vaseline dans les tests GLU, ADH, URE, pour créer l'anaérobiose (**Annexe 06**).
- Refermer la boîte d'incubation et la place dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures.
- On ajoute les réactifs aux quelque teste (ADH, ... etc.) : Kovacs, NaOH ou KOH (VP1) (**Annexe 02**).

4.3.4. Identification bactérienne

- Avec le tableau d'identification : comparer les réactions notées sur la fiche de résultats avec celle du tableau : chaque cellule de ce tableau contient les pourcentages de positivité (**Annexe 02**).
- Avec le catalogue analytique : Les tests sont regroupés en groupe de 3, et une valeur (1, 2 ou 4) est indiquée pour chacun (**Annexe 04**).
- Additionner à l'intérieur de chaque groupe les nombres correspondants aux tests positifs (**Annexe 04**).
- On obtient un nombre à 7 chiffres qui sert de code d'identification.
- Avec un catalogue d'indentification.

5. Antibiogramme

L'antibiogramme est l'examen biologique destiné à mesurer l'interaction entre chacune des molécules antibactériennes utilisables et une souche bactérienne susceptible d'être pathogène, isolée d'un patient (**Scavizzi et al., 2000**).

Cette technique correspond à la mesure de l'activité *in vitro* des antibiotiques sur les bactéries, permettant de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de chaque antibiotique, qui s'exprime en mg/ml ou mg/l. (**Scavizzi et al.2000**).

La méthode que nous avons utilisée est l'ensemencement par écouvillonnage préconisé par NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) et recommandé par l'OMS.

- ✓ Gélose Muller-Hinton (MH) coulée en boîte de pétri.
- ✓ Les géloses sont séchées avant l'emploi.

5.1. Inoculum

L'inoculum bactérien doit être stable et conforme aux exigences des tests d'antibiogramme. Pour ce faire nous avons respecté les étapes suivantes :

- ✓ A partir d'une culture pure de 18h sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- ✓ Bien décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9%.
- ✓ Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0.5Mc Farland.
- ✓ L'ensemencement doit se faire dans les 15 mn qui suivent la préparation de l'inoculum.

5.2. Ensemencement

- ✓ Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- ✓ Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries séries.
- ✓ Répéter l'opération deux fois en tournant la boîte de 60 ° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.
- ✓ Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la gélose.

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

5.3. Application des disques d'antibiotiques

- ✓ Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotiques sur une boîte de Pétri de 90mm de diamètre. Les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24mm, centre à centre (**Figure 07**).
- ✓ Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide d'une pince bactériologique stérile pour s'assurer de son application.

Une fois on applique le disque ne doit pas être déplacé.

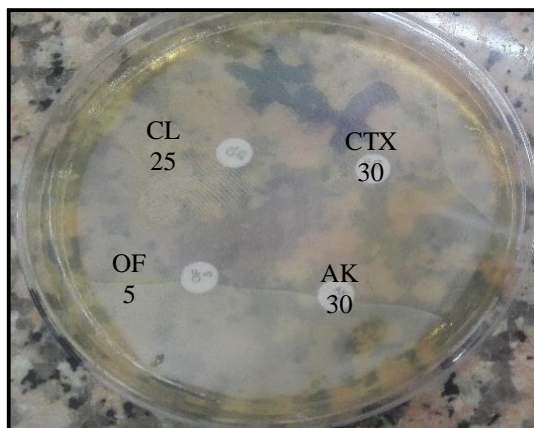


Figure 07 : Application des disques d'antibiotiques

- **Antibiotiques à testés :**
 - Pour les **β -lactamines** : Amoxicilline (AMX) (25 μ g), Amoxicilline+acide clavulanique (AMC) (30 μ g), Céfoxitine (FOX) (30 μ g), Céfotaxime (CTX) (30 μ g), Cefazoline(CZ) (30 μ g).
 - Pour les **aminosides** : Amikacine (AK) (30 μ g).
 - Pour les **quinolones** : acide nalidixique (NA) (30 μ g).
- **Incubation :**
 - ✓ 18 à 24 heures à 35°C.
- **Lecture**
 - Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur de la boîte fermé.
 - Comparer ces résultats aux valeurs critiques.
 - Classer les bactéries dans l'une des catégories : Sensible, Intermédiaire ou Résistante.
 - Le profil de résistance aide le clinicien de donner le bon traitement.

Résultats & discussion

Résultats

1. Prélèvements

Durant la période, de notre stage, qui n'a duré que 15 jours à cause de la pandémie du Covid 19, le laboratoire des analyses bactériologiques a reçu 40 prélèvements des différents services hospitaliers (infectieux, pédiatrie, médecine interne, urgence...), en plus de prélèvements de provenance externe (communautaire).

Le nombre de prélèvements quotidiennement reçu au laboratoire varie d'un jour à l'autre, mais selon les praticiens il est en moyenne de l'ordre de 30 à 50 échantillons par jour. Certes la majorité des prélèvements sont de provenance interne, des différents services hospitaliers cités précédemment, mais le laboratoire reçoit d'autres prélèvements externes communautaires.

Au regard des résultats et de la situation des prélèvements, même si en majorité nous constatons un respect relatif aux conditions de et aux techniques dans l'exécution des opérations de prélèvements et d'entretien des échantillons, il est nécessaire de surveiller l'état d'asepsie et les moyens matériels utilisés afin d'éviter les contaminations enregistrées. Ces dernières exigent une meilleure prise en charge des conditions de travail et aussi de renforcer l'équipe de praticiennes et de praticiens qui s'en occupent.

Par rapport aux prélèvements communautaires externes réceptionnés dans le laboratoire, certes les échantillons sont souvent présentés dans des flacons (tubes, bouteilles...etc) répondant aux exigences d'analyses, néanmoins les conditions de leur stockage et au moment des prélèvements ne sont pas connues, laissant des suppositions d'influence négative sur la qualité des isolements et bien-sûr sur la précision des résultats.

D'ailleurs il est clairement constaté que les contaminations qui apparaissent lors des opérations d'isolement sont fréquentes et la proportion des échantillons subissant un deuxième, voir même plusieurs fois, d'autres tests d'isolement. L'objectif étant d'en assurer le maximum de précautions dans les modes opératoires, afin de garantir les bonnes pratiques de manipulations et de manutentions des prélèvements biologiques. De telles circonstances assurent une meilleure précision dans la gestion des résultats des analyses bactériologiques visés, aussi permettent de mieux gérer économiquement les matériaux et les produits consommables utilisés lors des prélèvements et des analyses.

2. Analyse des prélèvements

2.1. Examen macroscopique

Différents caractères cultureux ont été observés après 24 heures d'incubation à 37°C sur gélose nutritive et sur le milieu Hektoen (**Tableau 03**).



Figure 08 : Aspect des colonies sur milieu Hektoen (*K. pneumoniae*).



Figure 09 : Aspect des colonies sur gélose nutritif (GN) (*K. pneumoniae*).

Tableau 03 : Les caractères cultureux sur la gélose nutritive et milieu Hektoen

Caractères cultureux	Forme	Relief	Transparence	Surface	Consistance	pigments
Milieu GN	Ronde	Bombée	Opaque	Lisse, brillante	Crémeuse	Non pigmentée
Milieu Hektoen	Ronde	Bombée	Translucide	Lisse	Muqueuse	Pigmentée

2.2. Examen microscopique

2.2.1. Etat frais

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

2.2.2. Coloration de Gram

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

3. Identification *K. pneumoniae*

Selon les étapes réalisées dans la recherche et l'identification des isolats assimilés à l'espèce recherchée, *K.pneumoniae* les résultats montrent une facilité relative dans la reconnaissance de cette espèce grâce à ses caractéristiques macro et microscopiques, appuyés par les tests biochimiques exécutées facilement à l'aide des galeries API20E.

3.1. Identification par galerie API20E

Il est possible de connaître certaines caractéristiques du métabolisme de la bactérie analysée grâce aux galeries API20E. (Figure 10) montre les résultats de la galerie biochimique de *K.pneumoniae*.

Le tableau de la lecture de la galerie miniaturisée API20E des souches étudiées est noté dans (Annexe 03 et Annexe 05).



Figure 10 : Résultats de l'identification d'une souche de *K. pneumoniae* par galerie API 20^E.

Tableau 04 : Caractères des principaux tests biochimiques à partir de la galerie API20 E.

Tests	ONPG	GLU	ARA	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND
Résultats	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-

(+) : positif

(-) : négatif

4. Résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux antibiotiques

4.1. Profils de réponses aux tests d'antibiotiques

Toutes les souches de *Klebsiella pneumoniae* ont été testées vis-à-vis des molécules antibiotiques appartenant à des familles différentes, dont les β -lactamines, les aminosides et les quinolones. Les figures ci-dessous illustrent des exemples de réponses de sensibilité ou de résistance (**Figures 11, 12, 13**).

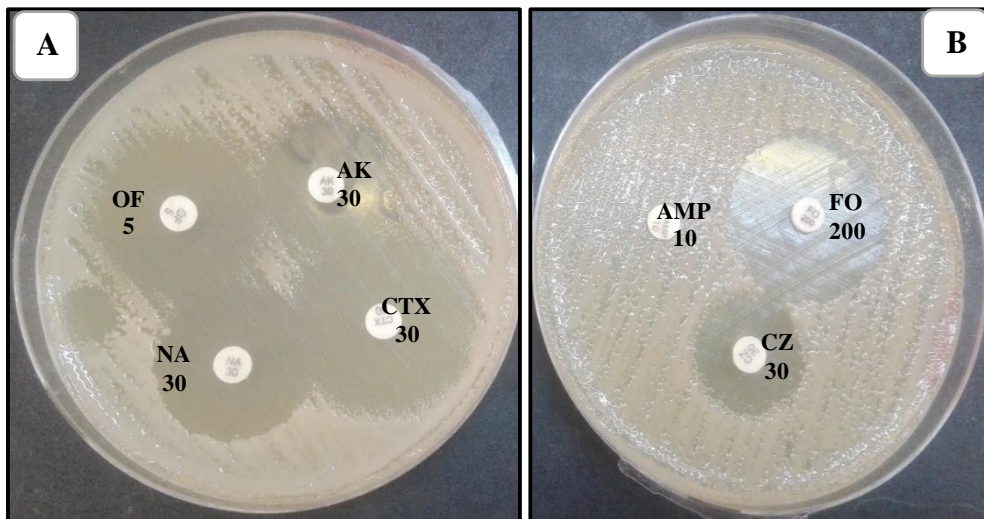


Figure 11 : A. Souche d'*K.pneumoniae* multisensible.

B. Résistance naturelle à l'ampicilline.

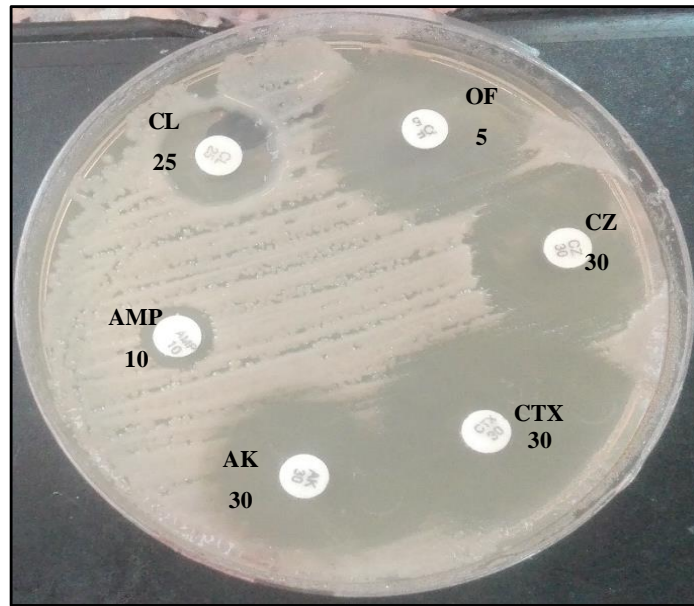


Figure 12 : Phénotype sauvage d'une souche *K.pneumoniae*.

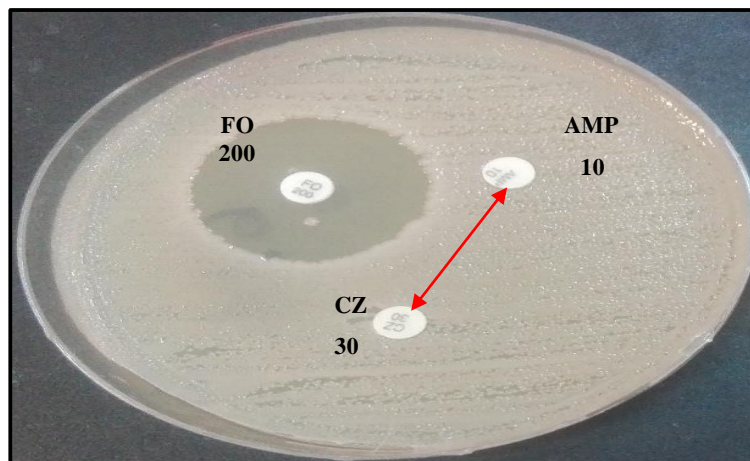


Figure 13 : Souche d' *K. pneumoniae* productrice de β -lactamase

4.2. Réponses aux tests antibiogrammes

Le profil de résistance de *klebsiella pneumoniae* montre qu'elle est sensible total (00%) au céfoxitine et imipinème. La résistance totale (100%) aux ampicillines est naturellement présente chez les entérobactéries du groupe2.chacun d'amoxicilline, céfazoline et céfotaxime ont une fréquence de résistance 73,34% qui représente une résistance importante.

Tableau 05 : Taux de l'antibiorésistance chez *Klebsiella pneumoniae* aux β -lactamine

	AMC		CTX		AMP		CZ		IMP		FOS	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Sensible	4	26.66	4	26.66	00	00	4	26.66	15	100	15	100
Résistance	11	73.34	11	73.34	15	100	11	73.34	00	00	00	00
Totale	15	100	15	100	15	100	15	100	15	100	15	100

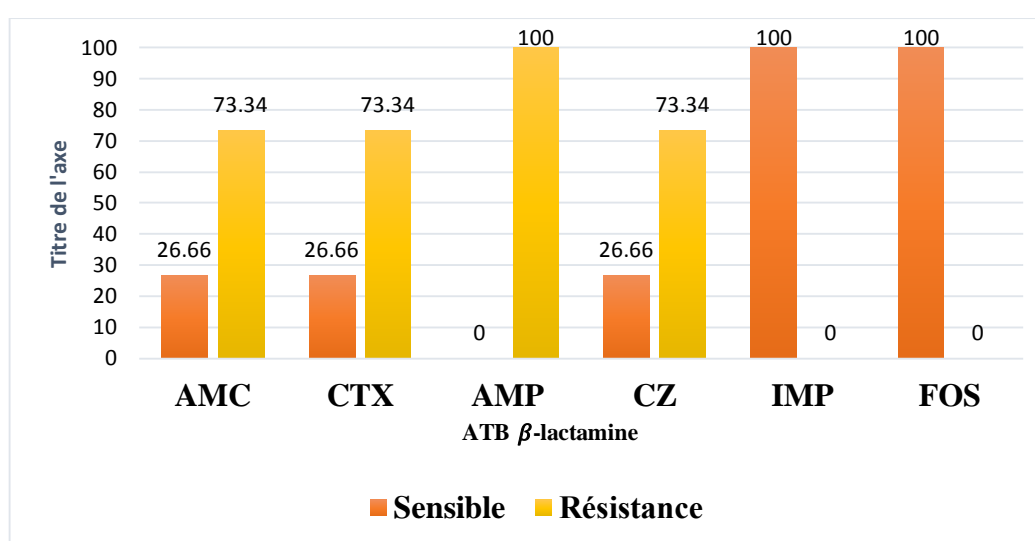


Figure 14 : Taux de l'antibiorésistance chez *Klebsiella pneumoniae* aux β -lactamine.

Dans cette partie nous nous sommes intéressées à l'analyse des données

Concernant les souches bactériennes *Klebsiella pneumoniae* isolées et leurs profils de sensibilité aux antibiotiques. Ces données ont été collectées sur la base des questionnaires transmis aux membres du réseau, et concernent la période allant de janvier à décembre 2011 et de janvier à décembre 2016.

4.3. Analyse des données des rapports 2011 et 2016

Concernant les souches bactériennes *Klebsiella pneumoniae* isolées et leurs profils de sensibilité aux antibiotiques. Ces données ont été collectées sur la base des questionnaires transmis aux membres du réseau, et concernent la période allant de janvier à décembre 2011 et de janvier à décembre 2016

Les données retenues sont celles de 12 laboratoires (**Tableau 12**), répartis sur le territoire national examinés et discutés lors des séminaires scientifique (<http://www.sante.dz/aarn/documents/pdf/Rapport2016.pdf>) ;(<http://www.sante.dz/aarn/documents/pdf/rapport13.pdf>).

4.3.1. Répartition des souches de *K. pneumoniae* selon les prélèvements biologiques

Tableau 06 : Distribution des souches de *K. pneumoniae* dans les différents produits pathologiques (**Mahrane et Tali Maamar, 2018 ; Ammari et Tali Maamar, 2018 ; Bentchouala et Benamrouche, 2018 ; Abi Ayad et Zouagui, 2018 ; Djenane et al., 2018**).

Source de prélèvement	Nombre de souches isolées	Pourcentage (%)
Urine	1777	64.12%
Hémoculture	688	24.84%
Voies respiratoire base	156	5.63%
LCR	60	2.16%
Sphère ORL	57	2.05%
Liquide synovial	26	0.95%
Liquide pleural	7	0.25%
Total	2765	100

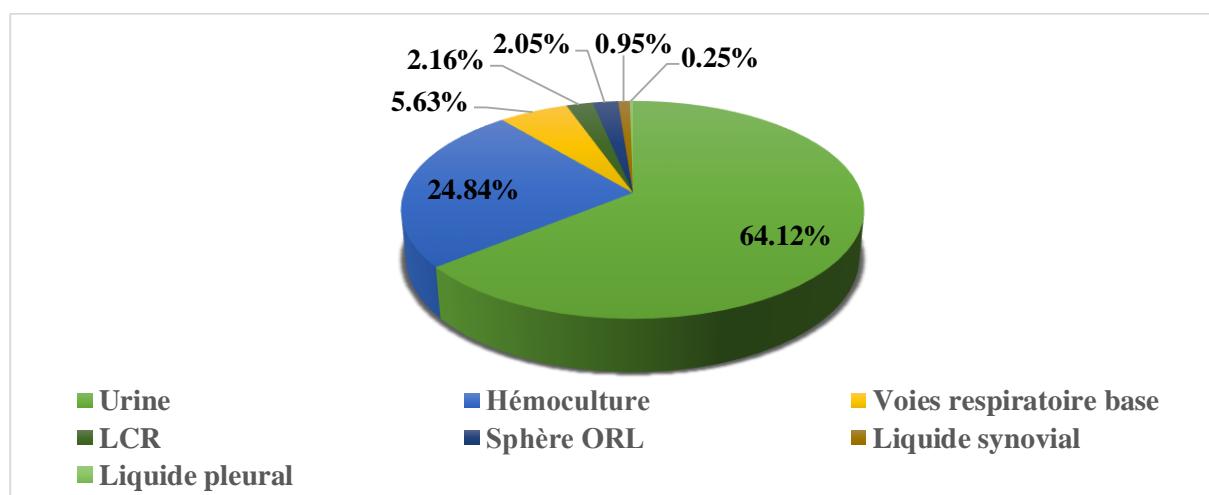


Figure 15 : Distribution des souches *Klebsiella pneumoniae* en fonction des différents produits pathologiques (**Mahrane et Tali Maamar, 2018 ; Ammari et Tali Maamar,2018 ; Bentchouala et Benamrouche,2018 ; Abi Ayad et Zouagui,2018 ; Djenane et al.,2018**).

4.3.2. Antibiorésistance de *Klebsiella pneumoniae*

On constate qu'il y a une forte résistance de *K. pneumoniae* à plupart d'antibiotique de la famille bêta-lactamine comme la céphalosporine de première génération (60,55%) ensuite l'amoxicilline associé à l'acide clavulanique (57,31%) par la production des enzymes ; et concernant à l'imipénème, on a une faible sensibilité (0,12%), par contre aux l'antibiotique gentamicine et amikacine de la famille aminoside, on note qu'il y a une résistance moyenne (44.66%) et faible (16.77%) respectivement (**Tableau 07, Figure 16**).

Tableau 07 : Nombre et pourcentage de *Klebsiella pneumoniae* résistantes (R+I) aux antibiotiques. (**Benslimani et Mahieddine,2012**).

Antibiotique	Nombres	Totaux	Pourcentage (%)
Amoxicilline+acide clavulanique (AMC)	1031	1799	57,31
Céfazoline (CZO)	1151	1901	60,55
Céfoxitine(FOX)	109	1571	6,94
Céfotaxime (CTX)	948	1834	51,69
Imipénème(IPM)	2	1717	0,12
Gentamicine (GEN)	677	1516	44,66
Amikacine (AMK)	235	1401	16,77
Chloramphénicol (CHL)	54	367	14,71
Nitrofurane (NIT)	249	761	32,72
Nalidixique(NAL)	300	681	44,05
Ciprofloxacine (CIP)	389	1030	37,77
Triméthoprime+ sulfaméthoxazole (SXT)	966	1811	53,34
Fosfomycine (FOS)	60	494	12,15

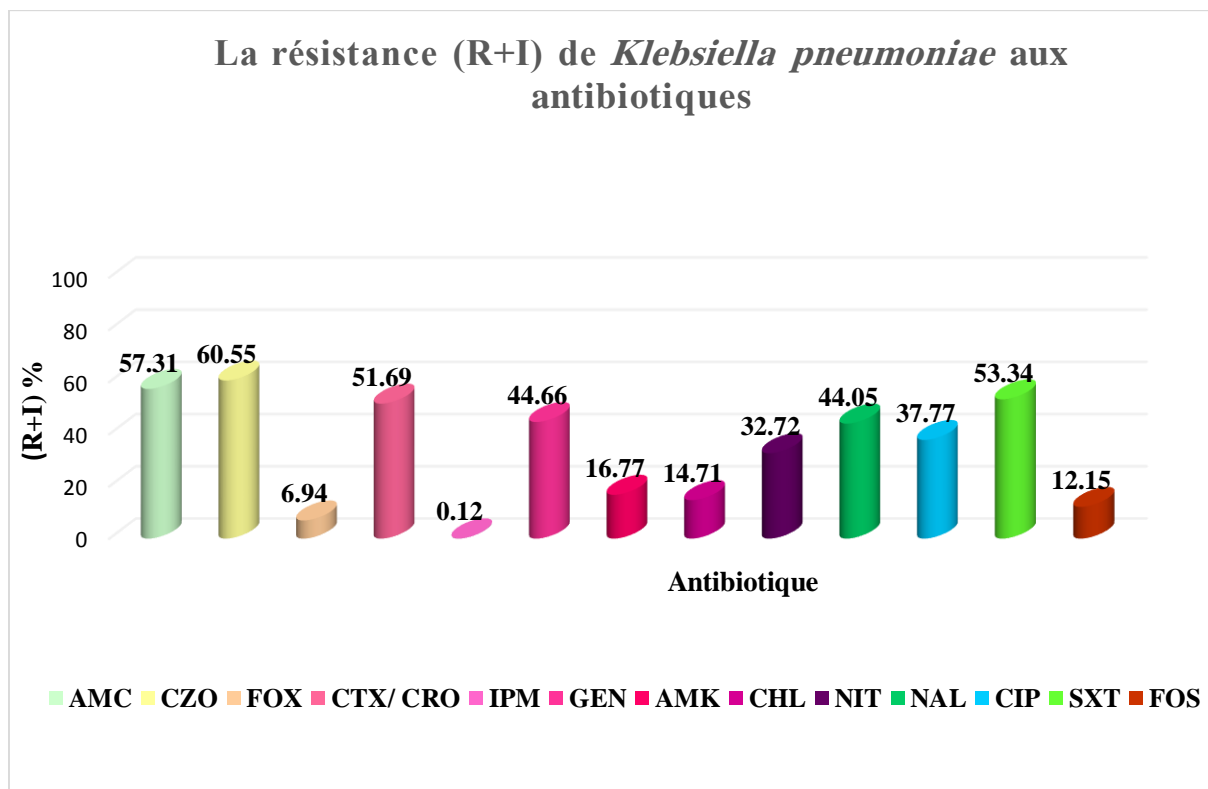


Figure 16 : Pourcentage de résistance (R+I) de *Klebsiella pneumoniae* en Algérie (année 2011) (Benslimani et Mahieddine,2012).

4.3.3. Antibiorésistance de *Klebsiella pneumoniae* isolée d'hémocultures

Les données analysées (**Tableau 08**), montrent que *K. pneumoniae* résiste naturellement à l'ampicilline et aux carbénicillines par production de pénicillinase chromosomique. En analysant les profils de résistance aux antibiotiques des souches de *K.pneumoniae* étudiées.

On note une résistance très élevée vis-à-vis des β -lactamines : l'amoxicilline associée à l'acide clavulanique à hauteur de 68.46%, de 86.2% aux céphalosporines de première génération, de 80.47% aux céphalosporines de 3ème génération et une faible résistance à la cefoxitine soit 15.02%. Et pour l'imipinène une faible résistance 5.75%. En revanche, toutes les souches (100%) étaient sensibles à la colistine. Concernant les aminosides, on observe une résistance assez marquée pour la Gentamicine de 66.66% suivi par 29.59 % pour l'amikacine. Par ailleurs, vis-à-vis des fluoroquinolones, un taux de résistance de 43.35 % a été détecté pour la ciprofloxacine ; quant aux sulfamides, ces derniers restent actifs sur 69.03% de souches étudiées (**Figure 17**).

Tableau 08 : Nombre et pourcentage de *Klebsiella pneumoniae* résistantes (R + I) aux antibiotiques isolées d'hémocultures (année 2016) (Mahrane et Tali Maamar, 2018).

Antibiotique	Nombres	Totaux	Pourcentage
Amoxicilline+acide clavulanique (AMC)	165	241	68.46
Céfazoline (CZO)	275	319	86.2
Céfoxitine (FOX)	26	173	15.02
Céfotaxime (CTX)	239	297	80.47
Ceftazidime (CAZ)	87	101	86.13
Aztréonam (ATM)	81	91	89.01
Imipénème(IPM)	18	314	05.75
Gentamicine (GEN)	168	252	66.66
Amikacine (AMK)	87	294	29.59
Chloramphénicol (CHL)	13	80	16.25
Nitrofurane (NIT)	55	13	41.35
Nalidixique (NAL)	67	187	35.82
Ciprofloxacine (CIP)	111	256	43.35
Cilistine (COL)	0	42	0

Triméthoprim+ sulfaméthoxazole (SXT)	194	281	69.03
Fosfomycine (FOS)	9	53	16.98

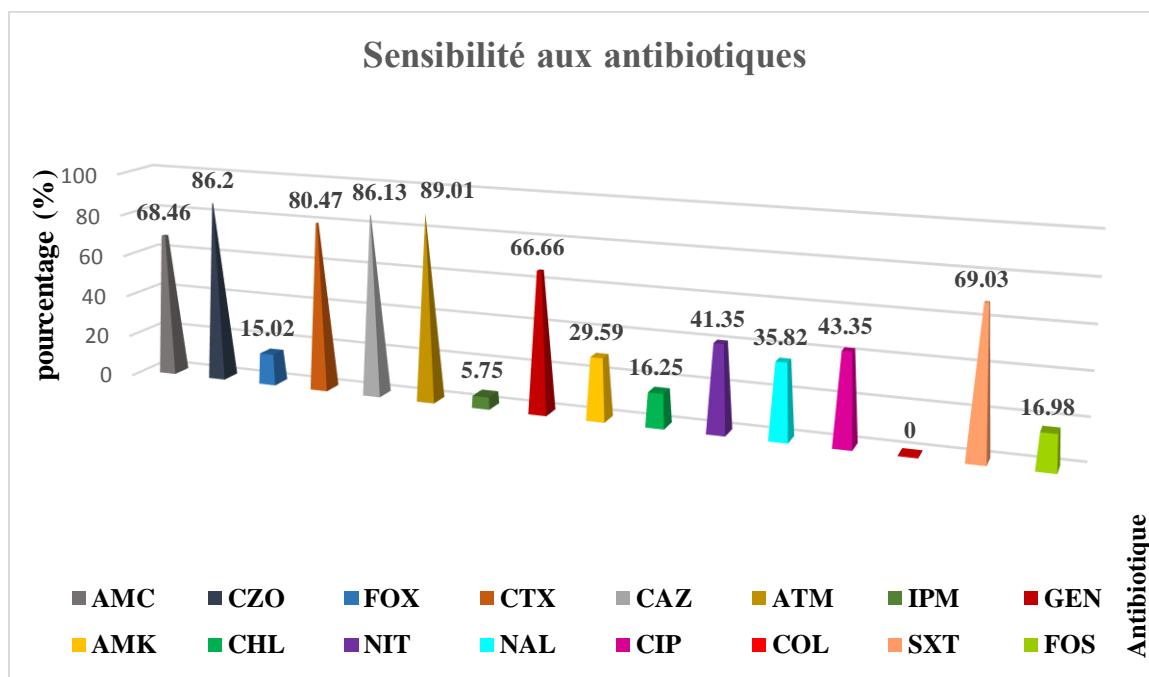


Figure 17 : Sensibilité aux antibiotiques des souches cliniques de *K. pneumoniae* aux 16 antibiotiques testés (Mahrane et Tali Maamar,2018).

Globalement, il en ressort de nos analyses que (Tableau 09, Figure 18) :

- Pour les β -lactamine le taux de résistance est très élevé, en moyenne est de 77.73% pour la Céfazoline (CZO) et une moyenne de 75.47% pour la Céfotaxime (CTX). En dehors de la Céfoxitine (FOX) et l'imipinème (IMP) qui restent très actifs.
- Pour les aminosides, la résistance à la gentamicine (GEN) monte à 70.9% et celle d'amikacine à plus de 30.23%.
- On constate une moyenne de 53.16% pour l'acide nalidixique (NAL) avec un taux important observé pour la ciprofloxacine (CIP) 52.38%.
- Très faible de résistance à la Fosfomycine (FOS) 1.69%.

- Aucune résistance n'a été observée pour la Chloramphénicol (CHL) avec 100% de souches sensibles.

Tableau 09 : Nombre et pourcentage de *Klebsiella pneumoniae* isolées d'hémocultures résistantes (R + I) aux antibiotiques (2011) (**Benslimani et Mahieddine,2012**).

Antibiotique	Nombres	Totaux	Pourcentage (%)
Céfazoline (CZO)	178	229	77,73
Céfoxitine (FOX)	9	173	5,20
Céfotaxime (CTX)	160	212	75,47
Imipénème (IPM)	1	209	0,48
Gentamicine (GEN)	134	189	70,90
Amikacine (AMK)	52	172	30,23
Chloramphénicol (CHL)	7	29	FE
Nitrofurane (NIT)	16	48	33,33
Nalidixique NAL	42	79	53,16
Ciprofloxacine (CIP)	66	126	52,38
Triméthoprime+ sulfaméthoxazole (SXT)	142	225	63,11
Fosfomycine (FOS)	1	59	1,69

FE : faible effectif (<30).

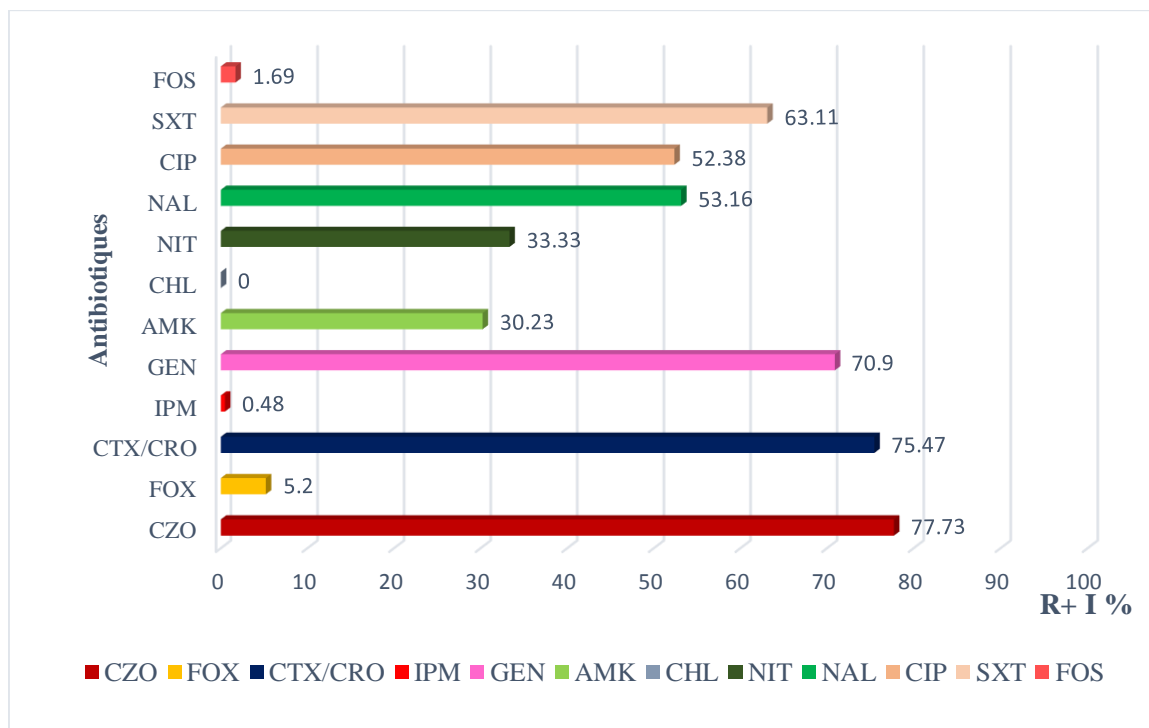


Figure 18 : Pourcentage de *Klebsiella pneumoniae* isolées d’hémocultures résistantes (R + I) aux antibiotiques (2011) (Benslimani et Mahieddine, 2012).

4.3.4. Production de BLSE

Il en ressort des rapports scientifiques que *K. pneumoniae* présente une fréquence parmi les plus élevée, en matière de production de BLSE par rapporte aux autres espèces entérobactéries (Tableau 10, Figure 19).

La fréquence d’isolement, estimée dans les hôpitaux, des souches BLSE pour chaque espèce bactérienne sont illustrés au tableau ci-dessous Il est clairement établi que l’espèce concernée par notre étude, en l’occurrence *K. pneumoniae* représente à elle seule une fréquence d’isolement dépassant le seuil de 57 %, indiquant ainsi sa quasi-dominance dans les isolements bactériens effectués dans les hôpitaux algériens (Tableau 10, Figure 19). Donc, nous pouvons dire qu’elle représente un sérieux problème dans les infections enregistrées chez les patients (Figure 19).

Tableau 10 : La fréquence de la production de BLSE pour chaque espèce. (Aboun, 2012).

Souches	Nombre	Pourcentage
<i>E.coli</i>	1981	17,31 %
<i>K.pneumoniae</i>	1240	57,66 %
<i>Enterobacter spp.</i>	607	39,87 %
<i>S.marcescens</i>	218	23,85%
<i>Proteus spp.</i>	599	13,02 %
<i>Salmonella spp.</i>	81	1,23%
Totale	4726	100%

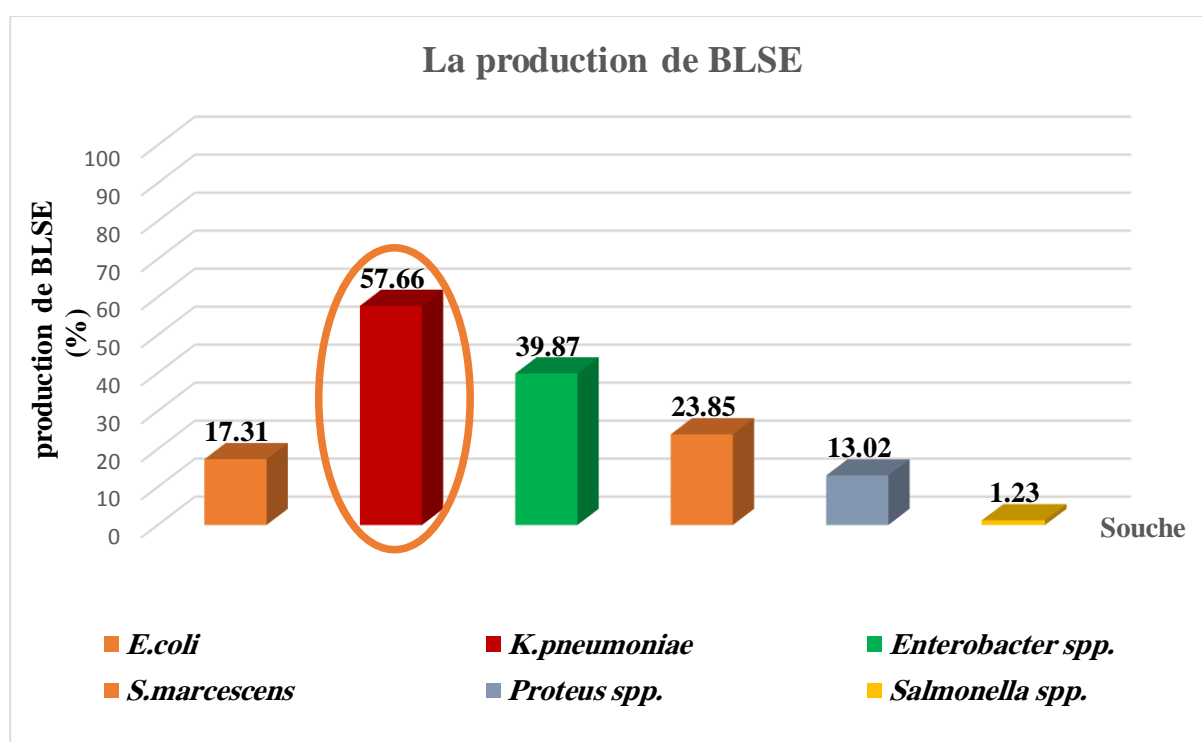


Figure 19 : Pourcentage de la production de BLSE. (Aboun, 2012)

4.3.5. Production de BLSE selon les secteurs de soins

La résistance de *K. pneumoniae* aux différents antibiotiques à créer une production de BLSE dans différents secteurs de soin. On observe qu'il y a une forte production au niveau de la réanimation (76,73%), ensuite dans la spécialité de chirurgie (62,55%). Par rapport aux autres spécialités cliniques, on observe une basse dans le secteur des urgences (28,67%) (Tableau 11, Figure 20).

Tableau 11 : Nombre et pourcentage de *Klebsiella pneumoniae* productrice de BLSE par secteur de soins dans douze laboratoires en Algérie (Benslimani et Mahieddine,2012).

Spécialités cliniques	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	Nombre	Pourcentage (%)
Réanimation	244/318	76,73
Médecine *	154/402	38,31
Chirurgie	172/275	62,55
Urgences	49/207	23,67
Pédiatrie	81/168	48,21
Totaux globaux	700/1370	51,09

* : Spécialité de médecine = cardiologie, diabétologie, pneumologie, endocrinologie et Médecine interne.

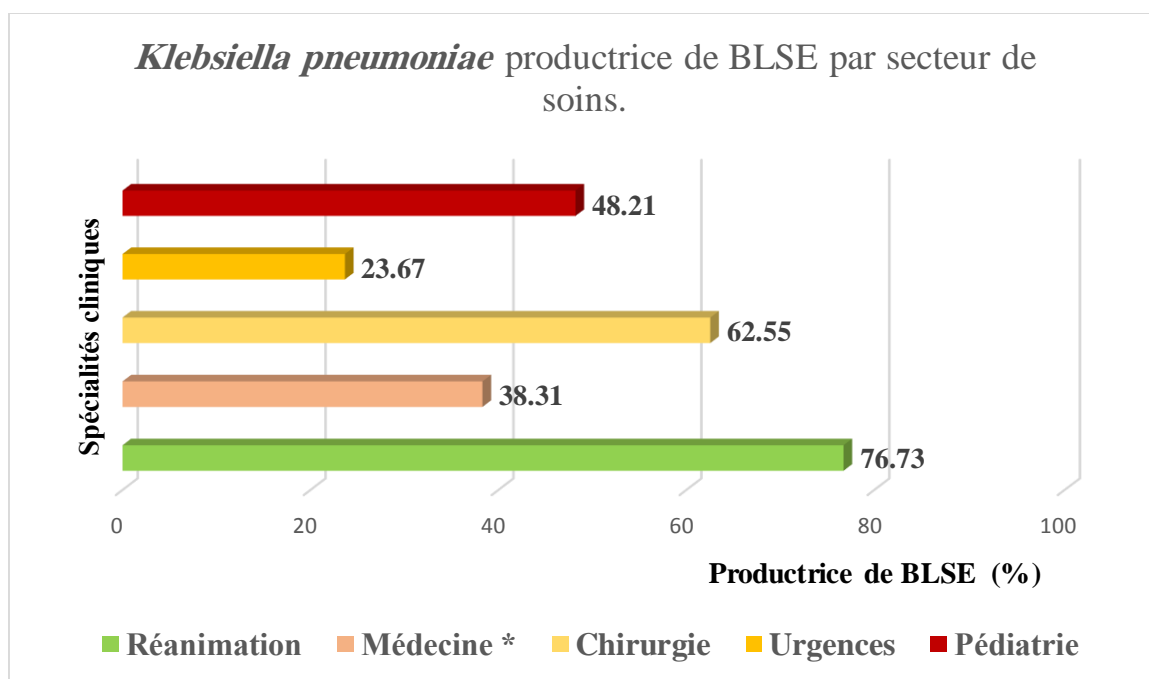


Figure 20 : Pourcentage de *Klebsiella pneumoniae* productrice de BLSE par secteur de soins. (Benslimani et Mahieddine, 2012).

La production de BLSE chez les patients hospitalisés en Algérie (12 laboratoires), on observe que la souche isolée (*Klebsiella pneumoniae*) a une résistance notée par les laboratoires d'EHU et CHU en Oran ; (79,37%), (77 ,5%) respectivement et prend la fréquence élevée par

rapport aux autres laboratoires. D'autre part la résistance est faible pour EHP Birtraria avec le taux (13,64%) et montre que la sensibilisée des souches élevées.

Semblable à Blida, on note qu'il y a une résistance à certaines souches isolées en (CHU Blida) avec une moyenne fréquence (52,83%) (**Tableau 12, Figure 21**).

Tableau 12 : Nombre et pourcentage de *Klebsiella pneumoniae* productrice de BLSE isolées par laboratoire chez les patients hospitalisés. (**Benslimani et Mahieddine, 2012**).

LABORATOIRES	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	Nombre	Pourcentage (%)
CHU Béni Messous. Labo central	24/46	52,17
CHU Béni-Messous. Labo mère et enfant	48/99	48,48
CHU Tizi Ouzou	45/148	30,41
CHU Blida	28/53	52,83
EHP Birtraria	6/44	13,64
EHS CPMC	35/63	55,56
HMUS Staoueli	16/26	61,54
HMRU Oran	22/56	39,29
CHU Oran	93/120	77,50
EHU Oran	150/189	79,37
EHS El Hadi Flici	35/57	61,40
Hôpital centrale d'armée (HCA)	213/339	62,83
Totaux globaux	715/1240	57,66

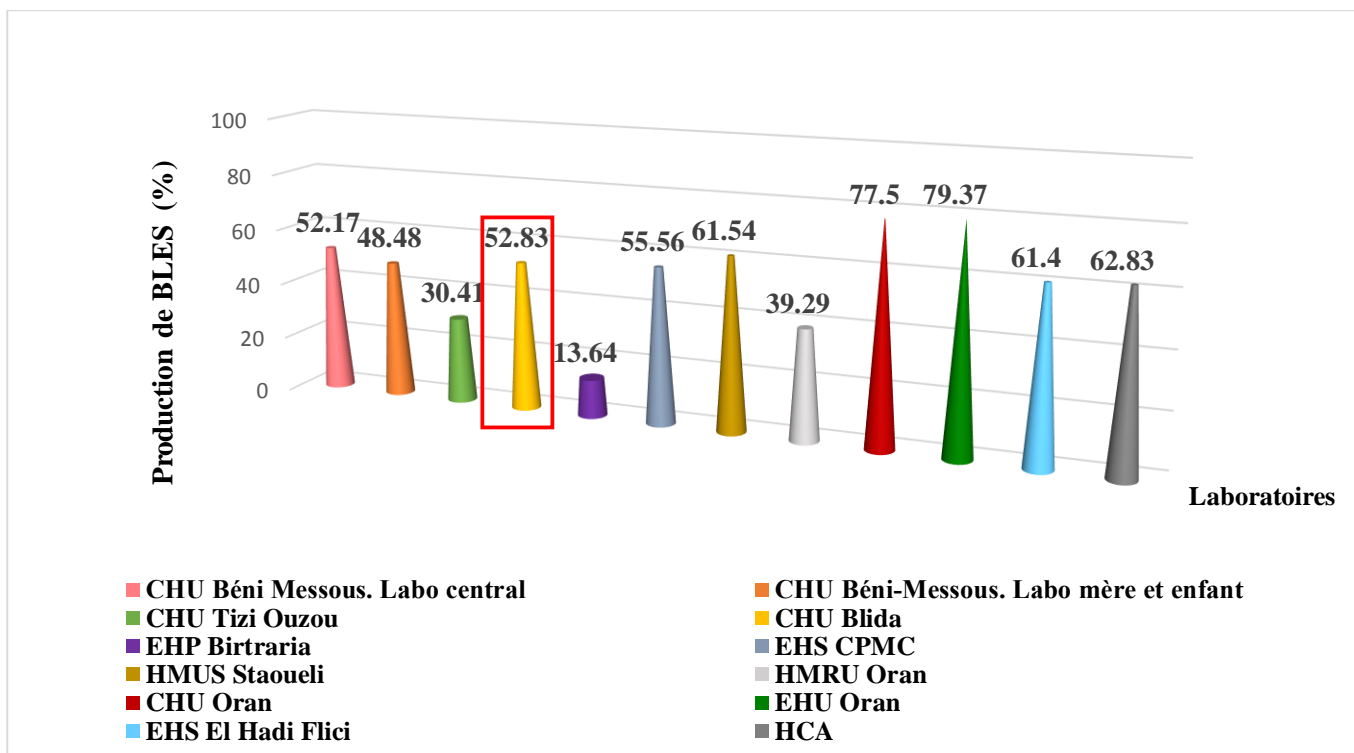


Figure 21 : Pourcentage de *Klebsiella pneumoniae* productrice de BLSE isolées par laboratoire chez les patients hospitalisés (Benslimani et Mahieddine, 2012).

4.3.6. Etude comparative de l'évolution de l'antibiorésistance

Il est à souligner que la comparaison des modestes résultats obtenus, durant notre courte période de stage, par rapports aux rapports scientifiques établis durant les périodes 2011 et 2016, qu'il y a une stabilité relative des niveaux de résistance vis-à-vis des mêmes molécules antibiotiques testées (Tableau 13, Figure 22).

Le fait remarquable et la résistance totale vis-à-vis de l'AMP, ce qui rend son utilisation inefficace, on note une résistance très élevée vis-à-vis de l'amoxicilline associée à l'acide clavulanique (AMC) à hauteur de (68.46%) (57,31%) (73.34 %) en 2011,2016, et le premier trimestre de l'année de 2020 respectivement. Le profil de résistance de *klebsiella pneumoniae* montre qu'elle est sensible à l'imipinème (IMP) avec un sensibilité total (100%) en 2020.chacun des céfazoline (CZO) et céfotaxime (CTX) ont une fréquence de résistance 73,34% qui représente une résistance importante par rapport aux années précédente. D'autres part on note une régression de résistance à la Fosfomycine (FOS) avec une sensibilité totale pendant l'année 2020.

Tableau 13 : Etude comparative entre les données des rapports de l'antibiorésistance 2011 et 2016 et les résultats de 2020.

Antibiotiques	Rapport 2011	Rapport 2016	Résultats 2020
Amoxicilline +acide clavulanique (AMC)	68.46	57,31	73.34
Céfazoline (CZO)	86.2	60,55	73.34
Céfoxitine (FOX)	15.02	6,94	
Céfotaxime (CTX)	80.47	51,69	73.34
Imipénème (IPM)	5.75	0,12	00
Gentamicine (GEN)	66.66	44,66	
Amikacine (AMK)	29.59	16,77	
Nitrofurane (NIT)	41.35	32,72	
Nalidixique (NAL)	35.82	44,05	
Ciprofloxacine (CIP)	43.35	37,77	
Ampicilline (AMP)			100
Triméthoprime+ sulfaméthoxazole (SXT)	69.03	14,71	
Fosfomycine (FOS)	16.98	12,15	00

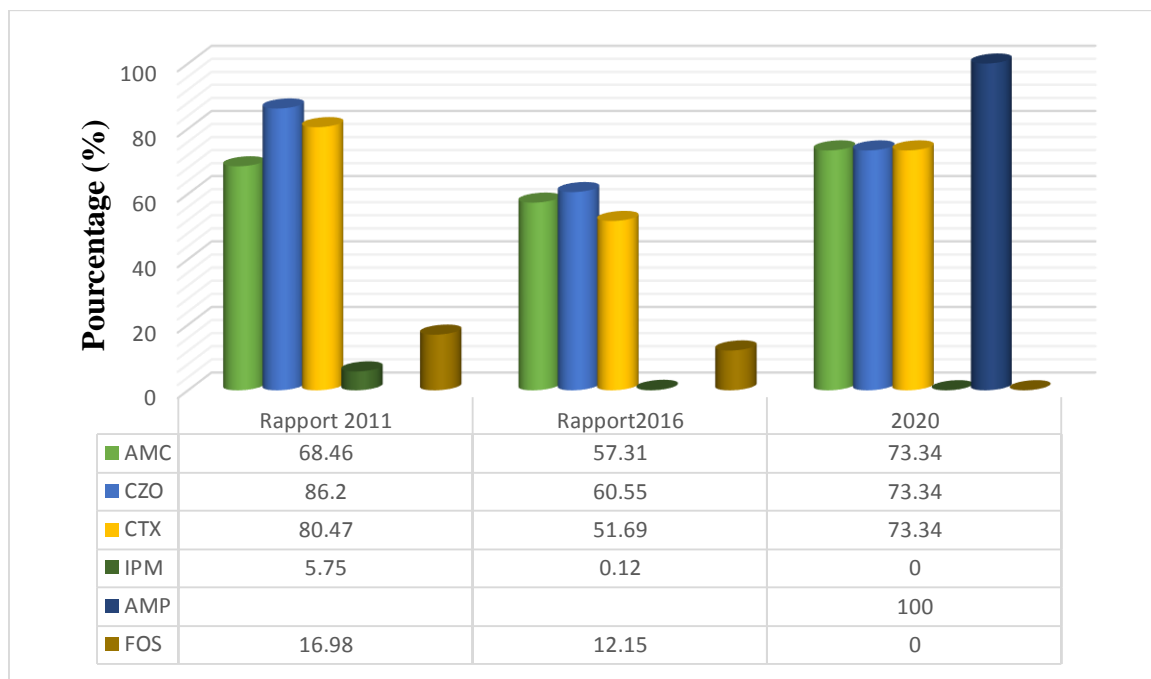


Figure 22 : Etude comparative entre les données des rapports de l'antibiorésistance 2011 et 2016 et les résultats de 2020.

Discussion générale

La fréquence des bactéries multi résistantes aux antibiotiques a atteint, partout dans le monde, des proportions inquiétantes et est devenue un problème majeur de santé publique. Depuis plusieurs décennies, *Klebsiella pneumoniae* est devenue une importante cause d'infections nosocomiales sévères et difficiles à traiter. Des épidémies sont causées par des souches résistantes à une large variété d'antibiotiques (**Arafa et al. 2009**).

Selon le rapport de l'ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) 2008, *Klebsiella spp* était responsable de 7% de l'ensemble des infections nosocomiales en Europe, classée ainsi au septième rang parmi les agents pathogènes associés à ces infections. (**Antimicrobial resistance surveillance in Europe. 2012**. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistancesurveillaneeurope-2012.pdf>).

En Tunisie, *K. pneumoniae* a été isolée des infections nosocomiales avec une fréquence de 25.8% en pédiatrie (**L'Antibio-Résistance en Tunisie. 2007**. <http://www.infectiologie.org.tn/pdf/lart/LART.pdf>).

Au Nigeria, *K. pneumoniae* était responsable de 24.8% d'infections nosocomiales en service de pédiatrie (**Amako et Takade, 1988**).

En Europe *K. pneumoniae* était responsable de 22.7% d'infections nosocomiales en service de néonatalogie et de réanimation pédiatrique (**Raymond et Aujard, 2000**).

En Chine, *K. pneumoniae* était responsable de 19.6% d'infections nosocomiales chez l'enfant (**Mai et al., 2011**).

Une méta-analyse a été réalisée par **Schwaber, et al. en 2007**, portant sur l'impact de la production de BLSE sur la mortalité, comparée aux infections à des organismes non BLSE, a montré que les infections causées par des entérobactéries produisant des BLSE sont plus virulentes et associées à des résultats cliniques indésirables, y compris l'augmentation de la mortalité, des hospitalisations prolongées et des coûts économiques plus élevés (**Schwaber et Carmeli, 2007**).

Klebsiella pneumoniae a longtemps constitué l'espèce d'entérobactérie chez laquelle la production de BLSE était la plus fréquemment enregistrée (**Colodner et al., 2004**).

Les objectifs de cette étude consistaient à évaluer le niveau de résistance aux antibiotiques de souches de *K. pneumoniae* isolées au niveau des différents hôpitaux en Algérie, de mettre en évidence la prévalence des souches productrices de BLSE, d'identifier le support génétique de la résistance aux β -lactamines, aux aminosides et aux fluoroquinolones.

Notre étude sur l'antibiorésistance de *Klebsiella pneumoniae* est subdivisée en deux parties une étude rétrospective des deux années 2011 (**Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques, 2013.**

<http://www.sante.dz/aarn/documents/pdf/rapport13.pdf>). Et de l'année 2016. (**Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques, 2016.**

<http://www.sante.dz/aarn/documents/pdf/Rapport2016.pdf>) et une étude prospective du premier trimestre de l'année 2020, permettant de constater que :

Le taux d'isolement des souches de *Klebsiella pneumoniae* en 2016 est relativement élevé. Elle occupe la deuxième position dans notre étude avec une fréquence de 17.44% après *E. coli*, soit 2775 de souches isolées parmi un total de 15911 bacilles à Gram négatif (**Ammari et Tali Maamar, 2018**).

En ce qui concerne la résistance aux bêta-lactamines : les souches *K. pneumoniae* résistent naturellement à l'ampicilline et aux carbénicillines par production de pénicillinases chromosomiques ce phénotype de résistance naturelle a été repéré dans 9% des cas. Elle résiste aux C3G surtout par production de bêtalactamase à spectre étendu dans 80% des cas et secondairement aux bêta-lactamines par production de pénicillinase de haut niveau avec une fréquence de 5%. La pénicillinase résistant aux inhibiteurs (PRI) a été produite par 2 % des souches de *K. pneumoniae*. Il est à noter que 4% des souches de *K. pneumoniae* étaient productrices de céphalosporinase plasmidiques. Par l'intermédiaire de toutes ces bêtalactamases, les souches de *K. pneumoniae* étudiées ont présenté des taux élevés de résistance vis-à-vis des molécules suivantes : la céfotaxime (C3G) 80.47% l'amoxicilline+acide clavulanique (AMC) 68.46% la cefalotine (C1G) 86.2% Et pour l'imipinène une faible résistance 5.75% (**Missoum et Ammari, 2018**).

Nous remarquons que nos taux de résistance sont généralement plus élevés que ceux rapportés par le réseau national de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques (AARN). En effet, selon le dernier rapport d'évaluation correspondant à la période (Janvier 2011 à Décembre 2011)

En Tunisie, selon le dernier rapport du réseau tunisien de surveillance, la fréquence de *K.pneumoniae* résistantes au C3G était de 51.5% en 2007 (**L'Antibio-Résistance en Tunisie. 2007.**<http://www.infectiologie.org.tn/pdf/lart/LART.pdf>).

Le rapport de l'European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-net) 2012 a montré une augmentation significative, relativement au rapport fait en 2009, du taux de résistance des souches de *K. pneumoniae* aux C3G au niveau de tous les pays européens (France 22.6%, l'Italie 47.7%, l'Allemagne 13%, la Grèce 70.9%. (**Antimicrobial resistance surveillance in Europe. 2012.** <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistancesurveillaneeurope2012.pdf>).

Concernant la résistance aux la résistance aux aminosides était assez marquée pour la gentamicine avec un pourcentage de 66.66% suivi par 29.59 % pour l'amikacine.

En Tunisie, la résistance de *K. pneumoniae* à la gentamicine et à l'amikacine était dans 44.7% et 28.5% des cas respectivement. (**L'Antibio-Résistance en Tunisie. 2007.** (<http://www.infectiologie.org.tn/pdf/lart/LART.pdf>).

Selon les données européennes de l'EARS-net 2012, ce taux de résistance trouvé à l'égard des aminosides se rapproche de celui trouvé en Grèce (62.9%), mais il reste supérieur à celui trouvé en France (23.6%), en Italie (42.2%) et en Espagne (14.1%)

(**Antimicrobial resistance surveillance in Europe. 2012.** <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillanceeurope-2012.pdf>).

Dans notre étude, la prévalence globale des souches de *Klebsiella pneumoniae* résistantes aux quinolones et fluoroquinolones a atteint des chiffres inquiétants avec 43.35 %.

La résistance acquise aux antibiotiques est un enjeu de santé publique majeur et plus que jamais d'actualité avec la diffusion massive des BLSE.

En Algérie, selon le rapport AARN publié en 2012, les souches productrices de BLSE représentent 30,28% des isolats d'entérobactéries en milieu hospitalier (N=4726), les données retenues étant celles de 12 laboratoires. L'espèce *K. pneumoniae* était en tête de liste avec une fréquence d'isolement à l'Hôpital de l'ordre de 57,66 % (**Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques.2012.** <http://www.sante.dz/aarn/documents/pdf/rapport13.pdf>).

Dans notre étude nous avons remarqué que la fréquence de production de BLSE par les souches de *K.pneumoniae* isolées au niveau du service de réanimation était de 76.73%.

Devant une telle situation, tout en profitant des données scientifiques réalisées à travers le monde, notamment dans les pays présentant des profils proches de notre population, tels que les pays voisins et les pays de la méditerranée, il devient urgent d'entamer des analyses qualitatives et quantitatives rétrospectives, sur la situation de l'antibiorésistance. En effet de telles analyses scientifiques deviennent indispensables pour d'éventuelles stratégies de thérapies à base d'antibiotiques dans les cas d'infection nosocomiales. Il est aussi important d'accompagner les protocoles thérapeutiques avec de telles orientations, qui peuvent contribuer de façon efficace dans le choix et la qualité des prescriptions thérapeutiques à recommander. Certes l'impact médical est sans discussion, mais aussi l'impact sur les aspects financiers avec des retombées positifs certaines s'il y a des choix judicieux dans l'acquisition et l'utilisation des antibiotiques appropriés.

Conclusion

Conclusion

Klebsiella pneumoniae est un pathogène opportuniste, rencontré dans diverses situations d'infectiologie dans divers produits pathologiques chez la femme et l'homme et même en pédiatrie. Selon les spécialistes du domaine, Aujourd'hui elle est le chef de file des germes responsables d'infections nosocomiales sévères et difficiles à traiter. On en parle même de situations épidémiques causées par des souches résistantes à une large variété d'antibiotiques (Boukadida et al., 2000).

Les résultats de notre étude permettent de fournir quelques données, même à l'état fragmentaire en raison de la courte durée de stage pratique engendrée par la situation pandémique de Covid 19, sur les souches de *K.pneumoniae* au niveau du service bactériologie à l'hôpital de Boufarik ainsi qu'une évaluation de la sensibilité à plusieurs antibiotiques des trois principales familles (β -lactamines, Quinolones, Aminocyclitolides).

Les espèces de la famille *Enterobacteriaceae* sont les agents pathogènes les plus isolés à partir des différents prélèvements biologiques dont *Klebsiella pneumoniae* représente la fréquence la plus élevée après *Escherichia coli*.

L'étude du profil de résistance des souches *Klebsiella pneumoniae* isolées montre une grande fréquence de résistance surtout à l'Ampicilline.

D'autre part, la fréquence des souches productrices de BLSE est redoutable chez *K. pneumoniae*.

A partir de l'antibiogramme de *Klebsiella pneumoniae*, un grand nombre de ces souches présente un fort taux de résistance à une ou plusieurs familles d'antibiotiques, en particulier les β -lactamines, les aminocyclitolides, et les quinolones. Par ailleurs l'imipénème, le ceftazidime et la colistine restent les molécules les plus actives.

L'analyse phénotypique des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées est en faveur d'une production de β -lactamase à spectre étendu (BLSE), qui a exprimé également des résistances notamment aux aminocyclitolides et aux fluoroquinolones, mais le phénotype carbapénémase n'a pas été retrouvé dans notre série.

Pour être rationnel, le traitement antibiotique probabiliste prescrit par le praticien doit tenir compte à la fois de la fréquence des germes isolés dans les principales infections communautaires et de l'incidence de la résistance aux antibiotiques. La connaissance des mécanismes de résistance aux antibiotiques permettra au clinicien de comprendre un éventuel

échec thérapeutique et d'entretenir ainsi une collaboration étroite avec le microbiologiste qui peut prescrire l'antibiogramme adéquat pour obtenir une antibiothérapie efficace.

Il est évident, qu'aujourd'hui avec l'augmentation des signalements des situations d'antibiorésistance, notamment les cas de multirésistance, de prendre des mesures urgentes afin de freiner la progression de cette situation qui peut échapper à tout contrôle. Même si les possibilités de manœuvre sont limitées par la gamme des antibiotiques couramment utilisées en stratégies thérapeutiques. Ceci trouvera application dans l'orientation qualitative et quantitative des antibiotiques à prescrire.

En recherche académique et analyses scientifiques, à la fois biologique et médicale, il est indispensable d'en profiter de la masse de données disponibles sur ce genre d'infection, à travers les études hospitalières et universitaires, pour une éventuelle utilisation dans une analyse rétrospective avec des retombées immédiates et dans le future proche. Les aspects à explorer, en plus des situations purement médicales (diagnostic, traitements...et), l'aspect épidémique revêt une importance particulière afin de cerner les causes directes et indirectes et d'éviter, ou au moins, de freiner la progression foudroyante des situations de multirésistance. D'autres aspects méritent les attentions particulières, surtout celles qui sont relatifs aux structures et supports génétiques de telles situations (épidémies et multirésistance).

Références bibliographiques

A

- **Abi Ayad R., Zouagui S.,2018.** Profils de sensibilité et de résistance des bactéries isolées des liquides synovial, pp 86-89, in Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 17ème Rapport d'évaluation (de janvier à décembre 2016), Ed 2018. Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques (AARN),137p.
- **Aboun A.,2012.** Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques.13ème Rapport d'évaluation (de janvier à décembre 2011), Ed 2012. Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques (AARN).
- **Amako, K., Y. Meno, and A. Takade. 1988.** Fine structures of the capsules of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* K1. J.Bacteriol. 170:4960-4962.
- **Ammari H., Tali Maamar H.,2018.** Profils de sensibilité et de résistance des bactéries isolées du liquide céphalo-rachidien, pp 49-62, in Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 17ème Rapport d'évaluation (de janvier à décembre 2016), ed 2018. Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques (AARN),137p.
- **Arafa N., F Smati, J M Scheftel, O Meunier.** Caractérisation phénotypique et génotypique de souches de *Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae* isolées à l'hôpital universitaire de constatine, Algerie. 25 nov 2009;(30):43-9.
- **Archambaud M., Clave D. 2008.** Fiche technique : *Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae*. Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique. Laboratoire de Bactériologie Hygiène CHU Toulouse. Fiche technique-Bactériologie 83 EN. FTBAC. 14610611.01.
- **Arlet G, Philippon A., 2003.** Les nouvelles β -lactamases à l'aube du troisième millénaire. Rev Franç Lab; 352: 41-55.
- **Avril, J.L., Dabernat, H., Denis, F., and Monteil, H. 2000.** Bactériologie clinique, Ellipses, Paris. 2ème édition : 171-211.

B

- **Balkissa I.M.**, La prévalence des infections nosocomiales au CHU du Point G, 2007, Thèse Pharm. No 07- P-52, Bamako (Mali).
- **Ben Achour N., Mercuri P.S., Power P., Belhadj C., Ben moussa M., Galleni M et Belhadj O., 2008.** First detection of CTX-M-28 in a Tunisian hospital from a cefotaximerésistant *Klebsiella pneumoniae* strain. *Pathologie Biologie* 57 (2009) 343-348.
- **Ben Haj Khalifa.A et Khedher. M. 2010.** Epidémiologie des souches de *Klebsiella* spp.uropathogènes productrices de B-lactamases à spectre élargi dans un hopital universitaire Tunisien.*pathologie Biologie* 60(2012) e1-e5.
- **Benslimani A., Mahieddine C., 2012.** Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques.13^{ème} Rapport d'évaluation (de janvier à décembre 2011), Ed 2012. Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques (AARN).
- **Bentchouala C., Benamrouche N., 2018.** Profils de sensibilité et de résistance des bactéries isolées des prélèvements des voies respiratoires basses, liquides pleural et des prélèvements oto- rhino- laryngologique(ORL), pp 63-85, in Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 17^{ème} Rapport d'évaluation (de janvier à décembre 2016), Ed 2018. Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques (AARN),137p.
- **Beraud J., 2001.**Le technicien d'analyses biologiques, éd : Tec et Doc, Paris, chapitre8, p,870-999.
- **Berrazeg, M., S. M. Diene, M. Drissi, M. Kempf, H. Richet, L. Landraud, and J. M. Rolain. 2013.** Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. *PLoS.One.* 8: e61428.
- **Bèrche P.,Gaillard(J-L),Simonet M.,1988.**Bactériologie :bactéries des infections humaines,ed :flammarion,Paris,p,575-580.
- **Bonnet R. 2004.** Growing group of beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 1-14.
- **Botto H. 2003.** Infections urinaires nosocomiales de l'adulte : conférence de consensus 2002 >, texte court. *Médecine et maladies infectieuses* 33 (2003) 370–375.

- **Boukadida J., Salem N., Hannachi N., Monastiri K., Snoussi N. 2002.** Exploration génotypique d'une bouffée épidémique nosocomiale néonatale à *Klebsiella pneumoniae* productrice de bêtalactamase à spectre étendu. *Arch Pédiatr* 2002 ; 9 :463-8.
- **Boulahbal F., 2006.** Microbiologie clinique S1, ed : OPU, Alger, p,129-135.
- **Brisse S., Duijkeren E V., 2004.** Identification and antimicrobial susceptibility of 100 *Klebsiella* animal clinical isolates. *Veterinary Microbiology* 105(2005) 307-312.
- **Bryskier A., 1999.** Antibiotiques. Agent antibactériens et antifongiques. Ellipses ; Paris.p:54- 436-445.
- **Bryskier, A., 1984.** [Classification of bêta-lactams]. *Pathol.Biol.(Paris)* 32:658-667.

C

- **Carlet J., Rambaud C., Pulcini C.,2012.** Alliance contre les bactéries multirésistantes : sauvons les antibiotiques ! Alliance against MDRO : Safeguarding antibiotics. *Annales Francaises d'Anesthésie et de Réanimation* 31(2012) 704-708.
- **Carniel, E. 1999.** The *Yersinia* high-pathogenicity island. *Int.Microbiol.* 2:161-167
- **Cavallo J-D., R. Fabre R., Jehl F., Rapp C., Garrab E. 2004.** Bêtalactamines. *EMCMaladies Infectieuses* 1 (2004) 129-202.
- **Chou HC, Lee CZ, Ma LC, Fang CT, Chang SC, Wang JT. 2004.** Isolation of a chromosomal region of *Klebsiella pneumoniae* associated with allantoin metabolism and liver infection. *Infect Immun.*72(7):3783 92.
- **Chung K.I, Lim T.H, Koh Y, Song J.H, Kim W.S, Choi J, Mand Aush Y.H. 1992.** Nosocomial pneumonialin medico-surgical intensive care unit. *J Korean Med Sci* 7: 241-251.
- **Colodner, R., R. Raz, B. Chazan, and W. Sakran. 2004.** Susceptibility pattern of extended-spectrum bêta-lactamase producing bacteria isolated from inpatients to five antimicrobial drugs in a community hospital in Northern Israel. *Int.J.Antimicrob.Agents* 24:409-410.
- **Courvalin, P., R. Leclercq, and E. Bingen. 2006.** *Antibiogramme.2* :142-162, 227-246,263-277.

D

- **Dabernat, H., O. Petitjean, and S. J. P. W. P. Schlemmer. 1997.** Infectiologie d'A à Z.354-355.
- **Davis, B. D. 1987.** Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. Microbiol.Rev. 51:341-350.
- **Davison, J. 1999.** Genetic exchange between bacteria in the environment. Plasmid 42:73- 91. Doi:10.1006/plas.1999.1421.
- **Denis F., Ploy (M-C), Martin C.,Bingen E.,Quentin R.,2007.**bactériologie :techniques usuelles,ed :Elsevier Masson,Paris,p257.
- **De la Cruz, F. and J. Davies. 2000.** Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. Trends Microbiol. 8:128-133.
- **Djenane F., Azzam A., Aggoune N.,2018.** Profils de sensibilité et de résistance des bactéries isolées des urines, pp 98-113, in Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 17ème Rapport d'évaluation (de janvier à décembre 2016), Ed 2018. Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques (AARN),137p.
- **Dong Y, Chellius M.K, Brisse S, Kozyrovska G, Triplet E.W. 2003.** Comparisons between two Klebsiella : the plant endophyt *K.pneumoniae* 342 and clinical isolate *K.pneumoniae* MGH78578. J Symbiosis 35: 247-259.
- **Duca M., Furtunescu G. 1979**Microbiologie médicale, 2e Ed. Didactique et pédagogique, Bucarest. 436p.

F

- **Fauchere (J-L), Avril(J-L),2002.** Bactériologie générale et médicale, ed: Ellipses, Paris, p,141-258.
- **Freney J, Renaud F., Hansen W, and Bollet TC. 2000.** Précis de bactériologie clinique.
- **Freney J, Renaud F, R. Leclercq, and Riegel P. 2007.** Précis de BactériologieClinique.1001-1014.649-665

G

- **Garcia, d. I. T., J. Romero-Vivas, J. Martinez-Beltran, A. Guerrero, M. Meseguer, and E. Bouza. 1985.** Klebsiella bacteremia: an analysis of 100 episodes. Rev.Infect.Dis. 7:143-150.
- **Gueye O.2007.** Utilisation des méthodes biométrique dans l'identification de quelques bacilles à Gram négatif. P 22,24-28.
- **Gueye O. 2007.** Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles à Gram négatif. P27, 28-44.
- **Guiraud J.P., 1998.** Microbiologie alimentaire. 255. Ed Dunod.
- **Grall N., Andremont A., Armand-Lefèvre L. 2011.** Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse ? ANTINF-16 ; No. Of Pages 16.

H

- **Hacker, J. and J. B. Kaper. 2000.** Pathogenicity islands and the evolution of microbes. Annu.Rev.Microbiol. 54:641-679.
- **Hammouchi B., Chakkouri K., Nejmi S E., Chlilek A. 2005.**Épidémiologie de l'infection nosocomiale en réanimation pédiatrique. Lettres à la rédaction / Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation 24 (2005) 697–700.
- **Hancock, R. E., S. W. Farmer, Z. S. Li, and K. Poole. 1991.** Interaction of aminoglycosides with the outer membranes and purified lipopolysaccharide and OmpF porin of Escherichia coli. Antimicrob.Agents Chemother. 35:1309-1314.
- **HennequinC., Forestier C. 2007.**Influence of capsule and extended-spectrum betalactamases encoding plasmids upon Klebsiella pneumoniae adhesion. Research in Microbiology 158(2007) 339-347.
- **Hennequin C., Robin F., Cabrolier N., Bonnet R., et Forestiera C. 2012.** Characterization of a DHA-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strain Involved in an Outbreak and Role of the AmpR Regulator in Virulence. 0066-4804/12/\$12.00 Antimicrobial Agents and Chemotherapy p. 288–294.

- **Hsieh P-F., Lin TL., Yang FL., Wu M-C., Pan YJ., Wu S H., Wang J T. 2012.** Lipopolysaccharide O1 Antigen Contributes to the Virulence in *Klebsiella pneumoniae* Causing Pyogenic Liver Abscess. March 2012 | Volume 7 | Issue 3 | e33155.

J

- **Jacoby G.A, Chow N, Waites K.B., 2003.** Prevalence of plasmid –mediated quinolone resistance. *J Antimicrobiol Agents and Chemotherapy* 47: 559-562.
- **Jain, R., M. C. Rivera, J. E. Moore, and J. A. Lake. 2002.** Horizontal gene transfer in microbial genome evolution. *Theor.Popul.Biol.* 61:489-495.
- **Joly B et Reynaud A. 2002.** Entérobactéries. Systématique et méthodes de diagnostic. P : 79-80-83.
- **Jarlier V et Nordmann P. 2000.** Entérobactéries et β -lactamines. *ESKA 2000-Précis de bactériologie clinique.*

K

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

L

- **Le Minor L and Véron M. 1989.** Bactériologie médicale, 2^{ème} édition, Flammarion Médecine-Sciences, Paris.2:428-432.
- **Le Minor Leon, Veron Michel.1989.** Bactériologie Médicale 2^{ème} Edition Paris, 1989, 396- 795p.
- **Leshner, G. Y., E. J. Froelich, M. D. Gruett, J. H. Bailey, and R. P. Brundage, 1962.** 1,8- naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *J.Med.Pharm.Chem.* 91:1063-1065.
- **Lewis, J. F. and J. J. Alexander. 1979.** Meningitis and septicemia due to *Klebsiella ozaenae*. *Am.J.Clin.Pathol.* 72:1033-1034.
- **Lin TL, Lee CZ, Hsieh PF, Tsai SF, Wang JT.** Characterization of

integrative and conjugative element ICEKp1-associated genomic heterogeneity in a *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from a primary liver abscess. J Bacteriol. 2008;190(2):515-26.

M

- **Ma LC, Fang CT, Lee CZ, Shun CT, Wang JT.2005.** Genomic heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* strains is associated with primary pyogenic liver abscess and metastatic infection. J Infect Dis.;192(1):117-28.
- **Mahrane S., Tali Maamar H.,2018.** *Profils de sensibilité et de résistance des bactéries isolées d'hémocultures*, pp 33-48, in Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 17ème Rapport d'évaluation (de janvier à décembre 2016), Ed 2018. Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques (AARN),137p.
- **Maltezou, H. C., E. Papacharalambous, K. Tryfinopoulou, L. Ftika, A. Maragos, G. Kyriakeli, P. Katerelos, C. Trakateli, M. Polemis, E. Roilides, A. Vatopoulos, and N. Nikolaidis. 2013.** Outbreak of pan-susceptible *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. Scand.J.Infect.Dis. 45:872-877.
- **Mai, J. Y., L. Dong, Z. L. Lin, and S. Q. Chen. 2011.** [Investigation and analysis of nosocomial infection in neonates]. Zhonghua Er.Ke.Za Zhi. 49:915-920.
- **Menard, R., C. Molinas, M. Arthur, J. Duval, P. Courvalin, and R. Leclercq. 1993.** Overproduction of 3'-aminoglycoside phosphotransferase type I confers resistance to tobramycin in *Escherichia coli*. Antimicrob.Agents Chemother. 37:78-83.
- **Meradi L., Djahoudi A., Abdi A., Bouchakour M., Perrier Gros Claude J-D., Timinouni M. 2009.** Résistance aux quinolones de types qnr, aac (60)-Ib-cr chez les entérobactéries isolées à Annaba en Algérie. Pathologie Biologie 59(2011) e73-e78.
- **McCarthy, V. P. and V. S. Hubbard. 1984.** *Klebsiella ozaenae* in a patient with cystic fibrosis. Arch.Intern.Med. 144:408-409.
- **Missoum M.K.F. et Ammari H.2018.** Profils de sensibilité et de résistance des bactéries, pp26-32, in Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 17ème Rapport d'évaluation (de janvier à décembre 2016), Ed 2018. Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques (AARN),137p.

N

- **Nauciel C.**, 2000. Bactériologie médicale, ed : Masson, Paris, p. 51-69 ,125-145.
- **Newman M.**, 1990. VADE-MECUM des antibiotiques, 5ème éd : Maloine, Paris, p13-37/219-243.
- **Nikaido, H.** 1994. Prevention of drug access to bacterial targets : permeability barriers and active efflux. Science **264**:382-388.

O

- **Ochman, H., Lawrence, J.G., and Groisman, E.A.** 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. Nature ;405 : 299-304.
- **Ogawa W, Li DW, Yu P, Begum A, Mizushima T, Kuroda T, Tsuchiya T.** 2005. **Multidrug** resistance in *klebsiella pneumoniae* MGH78578 and cloning of genes responsible for the resistance. Biol Pharm Bull. Aug ;28(8) :1505-8.

P

- **Podschun, R. and U. Ullmann.** 1998. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens : epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin. Microbiol. Rev. 11:589-603.
- **Podschun R, Fischer A, Ullman U.** 2000. Expression of putative virulence factors by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. J Med Microbiol **49**: 115-119.
- **Ploy M.-C, Gassama A., Chainier D. and Denis F.,** 2005. Integrons : an antibiotic resistance gene capture system, Rev. Immuno-analyse & Biologie spécialisée P. (20) :343-352.

R

- **Ramirez, M. S. and M. E. Tolmasky,** 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resist. Updat. 13:151-171.
- **Raymond, J. and Y. Aujard,** 2000. Nosocomial infections in pediatric patients: a European, multicenter prospective study. European Study Group. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 21:260-263.
- **Regnault (J-P),** 2002. Eléments de microbiologie et d'immunologie ; ed : Décane Editeur Inc, chapitre 30, p, 486-501.

- **Regué M, Hita B, Pique N, Izquierdo L, Merino S, Fresno S, Benedi VJ, Tomas JM.** A gene *uge*, is essential for *Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun. 2004;72(1):54-61.
- **Rouveix B., 1990.**Médicaments en pathologie infectieuse MASSO N.Paris, P42-43.
- **Roy P H. 1997.** Dissémination de la résistance aux antibiotiques : le génie génétique à l'œuvre chez les bactéries. Med Sci (Paris);13:927–33.
- **Roy Paul H.1997.** Dissémination de la résistance aux antibiotiques : le génie génétique à l'œuvre chez les bactéries. Médecine/ sciences n° 8-9, vol. 13.
- **Ruppé E. 2010.** Épidémiologie des β-lactamases à spectre élargi : l'avènement des CTX M.Doï : 10.1016/j.antib.2010.01.003. Vol 12 - N° 1. P. 3-16.

S

- **Sebghati, T. A., T. K. Korhonen, D. B. Hornick, and S. Clegg. 1998.** Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains. Infect.Immun. 66:2887-2894.
- **Scavizzi M, Labia R, Petitjean O, Elbhar A. 2000.** L'antibiogramme del'analyse des populations bactériennes à la thérapeutique. J Antibiotiques 2: 122-134.
- **Seck R. 2005.** Resistance des souches d'Escherichia coli et de *Klebsiella pneumoniae* isolées d'infections urinaires, P12-13.
- **Schwaber, M. J. and Y. Carmeli. 2007.** Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum bêta-lactamase production in *Enterobacteriaceae* bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. J.Antimicrob.Chemother. 60:913-920.
- **Singleton P, W. J. 2005.** Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies.
- **Strampfer, M. J., P. E. Schoch, and B. A. Cunha. 1987.** Cerebral abscess caused by *Klebsiella ozaenae*. J.Clin.Microbiol. 25:1553-1554
- **Struve, C., M. Bojer, and K. A. Krogfelt. 2008.** Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. Infect.Immun. 76:4055-4065.

T

- **Tang, L. M. and S. T. Chen.** 1994. *Klebsiella pneumoniae* meningitis: prognostic factors. *Scand.J.Infect.Dis.* **26**:95-102.

V

- **Vuillemin P., 1890.** Antibiose et symbiose, Association française pour l'avancement des sciences, compte rendu de la 18e session, seconde partie, Notes et mémoires, vol. 11, p. 525-543.

W

- **Wachino, J. and Y. Arakawa.** 2012. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resist.Updat.* **15**:133-148.
- **Wolff M., Joly-Guillou M-L et Pajot O.** 2008. Le point sur les carbapénèmes. *Réanimation* (2008) 17,242-25.
- **Wu KM, Li LH, Yan JJ, Tsao N, Liao TL, Tsai HC, Fung CP, Chen HJ, Liu YM, Wang JT, Fang CT, Chang SC, Shu HY, Liu TT, Chen YT, Shiau YR, Lauderdale TL, Su IJ, Kirby R, Tsai SF.** Genome sequencing and comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis. *J Bacteriol.* 2009;191(14):4492-501.

Y



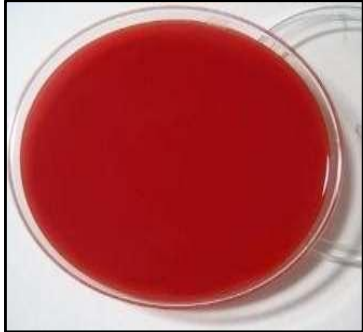
- **Yala D., Merad A.S., Mohamedi D et Ouar Korich M.N.** 2001. Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb* n°91.

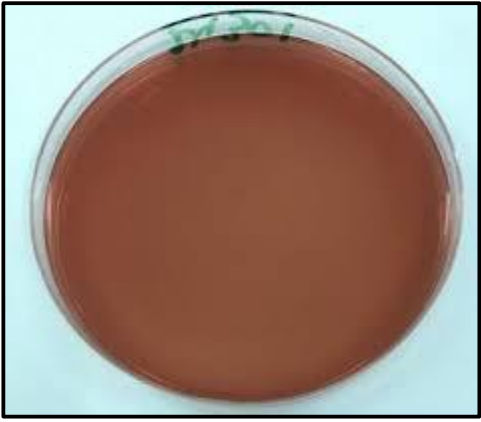
Webographie

- **L'Antiobio-Résistance en Tunisie, 2007. Source :**
<http://www.infectiologie.org.tn/pdf/lart/LART.pdf> .
- **Antimicrobial resistance surveillance in Europe,2012. Source :**
http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance_surveillance_europe2012.pdf .
- **Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques, 2012.** Surveillance de la résistance aux antibiotiques. 13ème Rapport d'évaluation (Janvier Décembre 2011). **Source :** <http://www.sante.dz/aarn/documents/pdf/rapport13.pdf> .
- **Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques, 2016.** Surveillance de la résistance aux antibiotiques. 17ème Rapport d'évaluation (Janvier Décembre 2016). **Source :**
<http://www.sante.dz/aarn/documents/pdf/Rapport2016.pdf> .
- **Comité de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie, 1997. Source :**
<http://bacterioweb.univ-fcomte.fr/bibliotheque/remic/24-Antib.pdf> .



Annexes

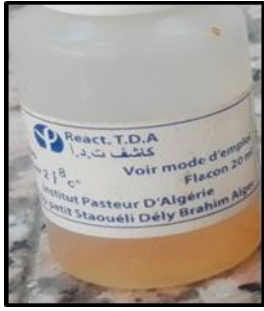

Annexe 01 : Les milieux de cultures

milieux	Composition	Utilisation
<p><u>Gélose nutritive</u></p> 	<ul style="list-style-type: none"> -Extrait de viande de bœuf 1g -Extrait de levure..... 2g -Peptone..... 5g -Chlorure de sodium..... 5g -Agar..... 15g <p style="text-align: center;">PH=7,4</p>	<p>Milieu d'isolement des germes non exigeant</p>
<p><u>Gélose Hektoen</u></p> 	<ul style="list-style-type: none"> -Extrait de levure..... 3g -Protéase de peptone..... 12g -Lactose..... 12g -Saccharose..... 2g -Salicine..... 2g -Citrate ferrique 1,5g -Fuschsine acide 0,1g -Bleu de promothymol 0,065g -Chlorure de sodium 5g -Thiosulfate de sodium 5g -Agar 13g 	<p>Isolement des entérobactéries</p>
<p><u>Gélose au sang frais</u></p> 	<ul style="list-style-type: none"> -Infusion de cœur et de muscle 375g -Bothicone 10g -Chlorure de sodium 5g -Gélose 15 g <p style="text-align: center;">PH=7,4</p>	<p>Isolement des germes exigeant</p>






















<p><u>Gélose au sang cuit</u></p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Peptone de caséine 7,5g -Peptone de viande 7,5g -Amidon de maïs 1g -Phosphate dipotassique 4g -Chlorure de sodium 5g -Hémoglobine 10g -Agar 10g <p style="text-align: center;">PH=7,2</p>	<p>Isolement des germes exigeant</p>
--	--	--------------------------------------

Annexe 02 : Les réactifs.

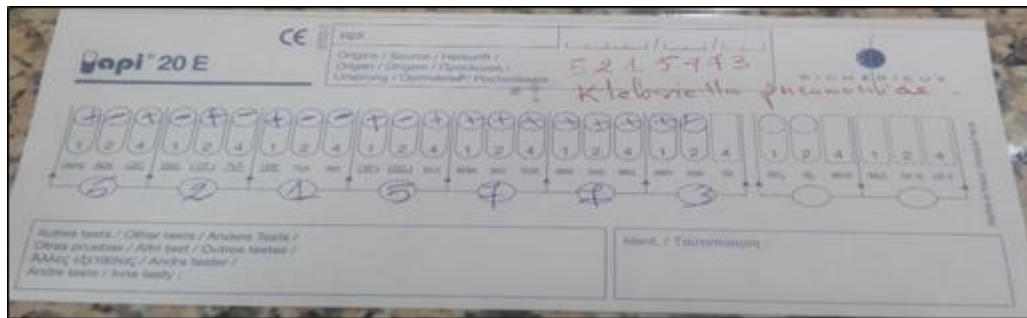
Réactifs	Composition	Utilisation
<p><u>kovacs</u></p> 	<ul style="list-style-type: none"> -Diméthyle-amino-4 benzaldéhyde.....50g -Acide chlorydrique.....250cm³ -Pentanol750 cm³ 	<p>Recherche d'indole</p>
<p><u>VPI</u></p> 	<ul style="list-style-type: none"> -Naph-1-ol.....60g -Ethanol.....1cm³ 	<p>Recherche de l'acétoïne</p>

<p><u>TDA</u></p> 	<p>-Perchlorure de fer 3,4g -Eau distilé100ml</p>	<p>Recherche de TDA</p>
<p><u>VP II</u></p> 	<p>-Solution aqueuse D'hydroxyde de potassium à 4 mol/cm³(10%)</p>	<p>Recherche de l'acétoïne</p>

Annexe 03 : Tableau de lecture de la galerie API20E

TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISEE API 20E					
Microtube	Substrat	Caractère recherché	Lecture directe ou indirecte (Test si nécessaire)	Résultat +	Résultat -
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	β -galactosidase	Lecture directe		
ADH LDC ODH	Arginine Lysine Ornithine	Arginine dihydrolase Lysine décarboxylase Ornithine décarboxylase	Lecture directe		
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Lecture directe		
URE	Urée	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fer		
IND	Tryptophane	Production d'indole	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs		
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d' α -naphthol		
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Lecture directe		
GLU à ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe		
NO ₂ / N ₂	Nitrates (NO ₃)	Nitrate réductase	Lecture indirecte dans la cupule GLU Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de la poudre zinc en cas de résultat négatif		

Annexe 04 : Fiche de lecture de résultats



Annexe 05 : Tableau de résultats galerie API20E.

Teste	Résultats	Production
ONPG (Orthonitrophényl-β-D-galactopyranoside)	+	Lactose (+) Présence de l'enzyme β-galactosidase
ADH (Arginine DiHydrolase)	-	Absence de l'enzyme qui déhydrolyse les acides aminés
LDC (Lysine décarboxylase)	+	Présence de l'enzyme Décarboxylase
ODC (Ornithine)	-	Absence de l'enzyme qui décarboxylyse les acide aminés
CIT (Citrates)	+	Utilisation du citrate comme source de carbone et de l'énergie
H2S (Sulfure d'Hydrogène)	-	Pas de formation d'hydrogène sulféré
TDA (Tryptophane DésaAminase)	-	Absence du TDA
URE (Urease)	+	Présence de l'enzyme Uréase
IND (Indole)	-	Absence d'enzyme tryptophynase qui dégrade le tryptophane en indole .

VP (Voges-Proskauer)	+	La transformation de l'acide pyruvique par la production de l'acétoïne
GEL (Gélatine)	-	Absence d'enzyme Gélatinase qui hydrolyse le collagène (gélatine) en acides aminés
GLU (<i>Glucose</i>) ; MAN (Mannitol) ; INO (Inositol) ; SOR (Sorbitol) ; RHA (Rhamnose) ; SAC (Sucrose) ; MEL (Melibiose) ; AMY (Amygdalin) ; ARA (Arabinose)	+	La fermentation des sucres par l'utilisation de substrat carboné

Annexe 06 : l'huile de vaseline pour faciliter de lecteur.

