

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

UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA 1

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE



Présenté pour l'obtention du diplôme de Master en

Sciences de la Nature et de la Vie

Option : Biologie Moléculaire Et Cellulaire

Sous le thème :

**Etude de la réponse immunitaire et des modifications
histologiques au cours d'une infection à *Klebsiella pneumoniae*,
dans un modèle murin**

Présenté par :

Amri Radhia Khaoula & Bouzid Chahinez

Devant le jury :

Zerouti K.	M.A.A	Président
Benchabane S.	M.C.A	Examineur
Aissani-El Fertas R.	M.C.B	Promoteur
Rahim I.	M.C.B	Co- promoteur

Année scolaire : 2020/2021

Remerciements

Au terme de ce travail nous tenons à exprimer notre gratitude à "Allah" pour tous ce qu'il nous a offert dans nos vie, ainsi pour qu'il nous a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce modeste travail.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire pédagogie de la FSB de l'université de Blida 1 (Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire), nous tenons à remercier l'ingénieur et toute l'équipe du laboratoire.

*Nous désirons à exprimer notre sincère reconnaissance et gratitude à notre encadreur, **Mme Aissani-El Fertas Radia** pour avoir accepté de nous encadrer et consacré autant de temps pour nous malgré ses multiples occupations, pour son suivi régulier, sa bienveillance, ses orientations. On aimerait aussi la remercier pour l'autonomie qu'elle nous a accordée, ses précieux conseils et ses critiques qui nous ont permis de mener à bien ce travail.*

*Une pensée chaleureuse à notre co-promotrice **Mme Rahim Ibtissam**. vous étiez une source de motivation et de courage. Je vous remercie pour votre disponibilité, pour vos remarques et critiques*

On voudrait également remercier les membres du jury

***Mme Zerouti.K** pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider les membres du jury de soutenance.*

***Mme Benchabane Sarah**. De nous avoir fait l'honneur d'examiner notre travail, veuillez accepter madame l'expression de notre profond respect.*

*Nos remerciements sont également adressés à notre chef département **professeur Boudjema Nouara**. Et notre chef d'option **professeur Saadi Leila**. Ainsi qu'à toute l'équipe pédagogique et tous les enseignants de la faculté de biologie Blida 1 pour leurs efforts fournis durant l'année scolaire afin d'assurer notre formation et Notre Succès.*

Enfin, dans l'impossibilité de citer tous les noms, nos remerciements vont à toutes les personnes qui de près ou de loin ont permis la réalisation de ce mémoire.

Dédicaces

Je dédie ce travail à ...

♥ *Ma chère mère **SABAH** et mon cher père **ABDERRAHMANE*** ♥

Je dédie ce mémoire à mes parents, pour l'amour qu'ils m'ont toujours donné, leurs encouragements et toute l'aide qu'ils m'ont apportée durant mes études. Aucun mot, aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération, et mon amour pour les sacrifices qu'ils ont consentis pour mon instruction et mon bien-être.

Trouvez ici, chère mère et cher père, dans ce modeste travail, le fruit de tant de dévouements et de sacrifices ainsi que l'expression de ma gratitude et de mon profond amour. Puisse Dieu leur accorder santé, bonheur, prospérité et longue vie afin que je puisse un jour combler de joie leurs vieux jours.

♥ *Mes très chers frères* ♥

RAYANE AMINE ABDELHEK

♥ *Mes petites sœurs **DJIHANE** et **SOUNDOUS*** ♥

♥ **NABILA & ZINEB** ♥

Sont présentes dans tous mes moments difficiles par son soutien moral

Un grand merci pour vous mes belles

♥ *Toute la famille **AMRI** et la famille **BOUCHMANE*** ♥

♥ *Mon cher binôme **Chahinez*** ♥

Qui m'a accompagné pendant ces 4 années, avec qui j'ai partagé mon chemin, des moments de fatigue, de travail, et de stress, mais aussi de joie, de rire et de bonheur. Je te souhaite une vie pleine de bonheur et de réussites.

♥ *Mes chères ami(e)s* ♥

HABIBA HANANE RANIA IBTISSAM BASMA

Qui m'ont aidé durant toute ma vie, et à ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.

AMRI Radhia Khaoula

Je dédie ce travail...

♥ *A mes chers parents **Fadhila et Taib*** ♥

Pour lesquels aucune dédicace, aucun mot ne pourrait exprimer réellement votre juste valeur, mon profond amour, mon respect et ma vive gratitude. Votre confiance et votre encouragement m'ont toujours donné de la force pour persévérer et continuer vers l'avant.

Puisse ce travail constituer une légère compassion pour tous les nobles sacrifices qu'ils se sont imposés pour assurer mon éducation et mes études.

♥ *A ma chère grand-mère et cher grand père qui j'aime trop* ♥

♥ *A mes chères sœurs* ♥

Asma Chorouk Nabila Imane Nour sin

Et

♥ *A mon beau-frère **Mohammed Amine*** ♥

En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous et qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

♥ *A mon cher binôme **Radhia Khaoula*** ♥

En souvenir des moments agréables que nous avons passé ensemble en réalisant ce travail. Un grand merci pour toi. Je vous souhaite une vie pleine de réussite, de santé et de bonheur.

♥ *A toute la famille **Bouزيد** et la famille **Mokhfï*** ♥

♥ *A tous mes amis* ♥

Hanane Rania Sonia Habiba Romaiissa

♥ *Mon cher ami **Riad*** ♥

Bouزيد Chahinez

Klebsiella pneumoniae est parmi les germes responsables des infections nosocomiales sévères et difficiles à traiter. D'importantes épidémies sont causées par des souches résistantes à une large variété d'antibiotiques.

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'une recherche fondamentale, concernant la pathogénicité et la réponse immunitaire au cours d'une infection par *K. pneumoniae*. Nous avons sélectionné 2 souches (Kpp2 et Kp653), isolées à partir de prélèvement de pus de patients cancéreux hospitalisés à l'hôpital Frantz-Fanon de Blida. L'identification bactérienne et les profils de résistance aux antibiotiques ont été réalisés par le service de microbiologie du même hôpital. Nous avons recherché sur le plan phénotypique la capsule, le phénotype d'hypermucoviscosité, la résistance au sérum et la formation de biofilm. Par ailleurs, nous avons réalisé un test de pathogénicité sur des souris BALB/C en utilisant une gamme de concentration bactérienne allant de 10^2 à 10^8 UFC.

Les résultats de l'antibiogramme ont révélé la production de β -lactamases à spectre étendu pour la Kpp2 (BLSE), alors que la souche Kp653 présentait le phénotype sauvage de résistance aux antibiotiques. La capsule était présente chez les 2 souches, le phénotype HMV ne concernait que la Kpp2, toutes les 2 étaient résistantes au système du complément et produisaient un biofilm sur une surface abiotique de moyenne intensité. Nous avons été dans l'incapacité de déterminer la DL50 des 2 souches sur modèle murin. La réponse immunitaire innée contre *Klebsiella pneumoniae* est caractérisée par des interactions cellulaires, mettant en jeu les monocytes/macrophages, les neutrophiles, les cellules lymphoïdes innées (ILC) et les lymphocytes T CD4+. L'efficacité de la réponse immunitaire contre *K. pneumoniae* dépend, fortement du profil de virulence et de résistance aux antibiotiques de cette bactérie.

Mots clés : *Klebsiella pneumoniae*, virulence, BLSE, macrophages, LTCD4+, IL17A

Klebsiella pneumoniae is among the germs responsible for severe and difficult to treat nosocomial infections. Major epidemics are caused by strains resistant to a wide variety of antibiotics.

Our work is part of a basic research, concerning the pathogenicity and the immune response during infection with *K. pneumoniae*. We selected 2 strains (Kpp2 and Kp653), isolated from samples of pus from cancer patients hospitalized at the Frantz-Fanon hospital in Blida. Bacterial identification and antibiotic resistance profiles were performed by the microbiology department of the same hospital. We phenotypically investigated capsule, hypermucoviscosity phenotype, serum resistance and biofilm formation. In addition, we performed a pathogenicity test on BALB / C mice using a bacterial concentration range from 10^2 to 10^8 CFU.

The results of the antibiogram revealed the production of extended spectrum β -lactamases for Kpp2 (ESBL), while the Kp653 strain exhibited the wild type antibiotic resistance phenotype. The capsule was present in both strains, the HMV phenotype concerned only Kpp2, both were resistant to the complement system and produced a biofilm on an abiotic surface of medium intensity. We were unable to determine the LD50 of the 2 strains in a mouse model. The innate immune response against *Klebsiella pneumoniae* is characterized by cellular interactions, involving monocytes / macrophages, neutrophils, innate lymphoid cells (ILC) and CD4 + T lymphocytes. The effectiveness of the immune response against *K. pneumoniae* depends heavily on the virulence and antibiotic resistance profile of this bacteria.

Key words : *Klebsiella pneumoniae*, virulence, ESBL, macrophages, LTCD4, IL17A

تعد الكلبسييلة الرئوية من بين الجراثيم المسؤولة عن عدوى المستشفيات المستعصية وصعبة العلاج. تنشأ الأوبئة الرئيسية بسبب سلالات مقاومة لمجموعة متنوعة من المضادات الحيوية.

عملنا هو جزء من بحث أساسي، يتعلق بالفوعة والاستجابة المناعية أثناء الإصابة بـ الكلبسييلة الرئوية. اخترنا سلالتين (Kpp2 و Kp653)، معزولين من عينات مرضى السرطان في مستشفى فرانتز فانون في البلدة. تم إجراء التعرف على البكتيريا وخصائص مقاومة المضادات الحيوية من قبل قسم الأحياء الدقيقة في نفس المستشفى. قمنا بفحص الكبسولة ظاهرياً، النمط الظاهري لفرط اللزوجة المفرطة، ومقاومة المصل وتشكيل الأغشية الحيوية. بالإضافة إلى ذلك، أجرينا اختبار الفوعة على الفئران BALB / C باستخدام تركيز بكتيري من 10^2 إلى 10^8

كشفت نتائج المضاد الحيوي لسلالة kpp2 عن إنتاج طيف ممتد من البيتا لكتماز ذو النطاق الواسع، بينما أظهرت سلالة Kp653 النمط الظاهري لمقاومة المضادات الحيوية من النوع البري. كانت الكبسولة موجودة في كلا السلالتين، اما النمط الظاهري HMV يتعلق فقط بـ kpp2 ، وكلاهما كان مقاوماً للنظام التكميلي وأنتج غشاء حيوي على سطح غير حيوي ذي كثافة متوسطة. لم نتمكن من تحديد LD50 من السلالتين في نموذج الماوس. تتميز الاستجابة المناعية ضد الكلبسييلة الرئوية بالتفاعلات الخلوية، بما في ذلك الخلايا الوحيدة / البالعات، والعدلات، والخلايا اللمفاوية (ILC) والخلايا اللمفاوية التائية CD4+T. فعالية الاستجابة المناعية ضد الكلبسييلة الرئوية يعتمد بشكل كبير على الفوعة ومقاومة المضادات الحيوية لهذه البكتيريا.

الكلمات المفتاحية: الكلبسييلة الرئوية، الفوعة، البيتا لكتماز ذو النطاق الواسع، البالعات ، الخلايا اللمفاوية التائية CD4+T،

Liste des tableaux

Tableau I : Les caractères biochimiques de *K.pneumoniae* **annexe 1**

Tableau II : Type de prélèvement, sexe et âge des patients chez qui les 2 souches de *Klebsiella pneumoniae* ont été obtenues15

Tableau III : Caractéristiques des souches classiques et hypervirulentes de *Klebsiella pneumoniae* **annexe 3**

Liste des figures

Figure 1 : Phénotypes de virulence de <i>K. pneumoniae</i> , classique et hypervirulente	3
Figure 2 : Rôle de la capsule chez <i>K. pneumoniae</i>	4
Figure 3 : Structure des fimbriae de type 1 et 3 chez <i>Klebsiella pneumoniae</i>	6
Figure 4 : Réponse de la cellule hôte et signalisation intracellulaire au cours d'une infection par <i>Klebsiella pneumoniae</i>	7
Figure 5 : Activation du complément par <i>K. pneumoniae</i>	9
Figure 6 : Observation de la capsule sous microscope photonique (G x 100).....	18
Figure 7 : Phénotype HMV observé chez la souche Kpp2	18
Figure 8 : Résultats de la recherche de l'effet bactéricide du sérum humain.....	19

Liste des abréviations

- ❖ **ADH** : Arginine déshydrogénase
- ❖ **AM** : Ampicilline
- ❖ **AN** : Amikacine
- ❖ **AMC** : Amoxicilline
- ❖ **AmpC** : Bêta-lactamase chromosomique
- ❖ **BLSE** : β -lactamase à spectre étendu
- ❖ **CAZ** : Ceftazidime
- ❖ **CP** : Ciprofloxacine
- ❖ **CPS** : capsule
- ❖ **CTX** : Céfotaxime
- ❖ **CZ** : Céfazoline
- ❖ **FOX** : Gène codant pour une céphalosporinase
- ❖ **HMV** : Hypermucoviscosité
- ❖ **HV** : Hypervirulente
- ❖ **H₂S** : sulfure d'hydrogène
- ❖ **IU** : Infection Urinaire
- ❖ ***K.pneumoniae*** : *Klebsiella pneumoniae*
- ❖ **LDC** : Lysine décarboxylase
- ❖ **LPS** : Lipopolysaccharide
- ❖ **MAPK** : Mitogen activated protein kinase
- ❖ **Mpb** : Millions paire de base

- ❖ **nm** : nanomètre
- ❖ **NI** : Nitrofurantoïne
- ❖ **ODC** : Ornithine décarboxylase
- ❖ **ONPG** : Orthonitrophényl-β-D-galactopyranoside
- ❖ **GM** : Gentamicine
- ❖ **MyD 88** : Myeloid differentiation factor 88
- ❖ **PR** : profil de résistance
- ❖ **PTZ** : Pipéracilline-tazobactam
- ❖ **SHV-5** : Sulfhydryl variable
- ❖ **SXT** : Co-trimoxazole
- ❖ **TDA** : Tryptophane désaminase
- ❖ **TEM** : D'après Temoniera : nom du malade chez qui la première souche a été isolée
- ❖ **VP** : Voges-Proskauer
- ❖ **µm** : micromètre

Sommaire

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction 01

Partie rappels bibliographiques

I. Généralités sur *Klebsiella pneumoniae* 02

II. Pathogénicité de *K. pneumoniae* 02

II. 1. Capsule 03

II. 2. Lipopolysaccharide 04

II. 3. Fimbriae 05

II. 3. 1. Fimbriae de type 1... 05

II. 3. 2. Fimbriae de type 3 05

III. *Klebsiella pneumoniae* et résistance aux antibiotiques 06

IV. Réponse immunitaire au cours d'une infection à *K. pneumoniae* 07

Partie matériels et méthodes

I. Matériel 10

I. 1. Matériel non biologique 10

I. 2. Matériel biologique 10

I.2.1. Souches bactériennes 10

I.2.2. Sérum humain 10

I.2.3. Animaux	11
I. Méthodes.....	11
II. 1. Identification et détermination du profil de résistance aux antibiotiques.....	11
II. 2. Etude du profil de virulence.....	12
II. 2.1. Recherche de la capsule polysaccharidique	12
II. 2.2. Recherche du phénotype d'hypermucoviscosité.....	12
II. 2.3. Recherche de l'effet bactéricide du sérum humain... ..	12
II. 2.4. Recherche de la formation de Biofilm	13
II. 3. Test de pathogénicité.....	13
II. 4. Modèle murin de sepsis à <i>Klebsiella pneumoniae</i>	14

Partie résultats et discussion

I. Propriétés microbiologique de l'agent infectieux	15
II. Propriétés de virulence de l'agent infectieux	17
III. Réponse immune au cours d'une infection à <i>Klebsiella pneumoniae</i>	21
Conclusion	23
Références bibliographiques.....	24
Annexes	

Introduction

Klebsiella pneumoniae est un pathogène opportuniste fréquemment impliqué dans des infections sévères telles que les infections urinaires, pneumonie, bactériémie et le sepsis. Elle est souvent incriminée dans les infections nosocomiales invasives, en particulier chez les patients immunodéprimés (**Berrazg et al., 2013 ; Wenzi et al., 2017**).

Au sein de l'organisme hôte et au cours du processus infectieux, *K. pneumoniae* exprime de nombreux facteurs de virulence (invasines et protectines), qui lui permettent de franchir les muqueuses de l'hôte et de se protéger contre ses mécanismes de défense. Parmi ces facteurs, nous retrouvons principalement la capsule, le lipopolysaccharide, les adhésines fimbriaires, les sidérophores et la formation de biofilm (**Zhao, 2014**).

Le traitement des infections à Klebsielles se fait essentiellement par administration *per os* ou en intraveineuse, d'antibiotiques de la famille de β -lactamines. Cependant, il existe des souches de *K. pneumoniae* multi-résistantes, productrices de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) ou de carbapénèmases (KPC). Ces clones sont largement disséminés dans l'environnement et en milieux hospitaliers. Ils sont souvent à l'origine de graves épidémies répétitives et qui constituent un réel problème de santé publique. Ces souches multi-résistantes confrontent les cliniciens à de sérieux problèmes en termes de prise en charge et de traitement des patients (**Murphy, 2016**).

Face à une évolution génétique rapide des clones hospitaliers et à l'échec cuisant de l'antibiothérapie, de nouvelles stratégies thérapeutiques doivent être pensées pour le traitement des infections graves à *K. pneumoniae*. Comprendre les mécanismes de pathogénicité de *K. pneumoniae* et la maîtrise parfaite de la réponse immune contre cette bactérie, permettra de développer des thérapies innovantes et ciblées pouvant palier l'antibiothérapie. C'est dans ce contexte que nous avons choisi de mener ce travail, en nous fixant les objectifs suivants :

- ✓ Déterminer le profil de virulence/résistance de deux souches cliniques de *Klebsiella pneumoniae*.
- ✓ Réaliser un modèle murin (souris BALB/C) d'une infection profonde à *Klebsiella pneumoniae*.
- ✓ Analyser la réponse inflammatoire et immunitaire au cours d'une infection à *K. pneumoniae*.

Rappels
Bibliographiques

I. Généralités sur *Klebsiella pneumoniae*

Le genre *Klebsiella* est nommé en honneur au microbiologiste allemand de la fin du XIXe siècle, Edwin Klebs. Les membres de ce genre sont des bacilles à Gram négatif de la famille des *Enterobacteriaceae*. L'espèce *Klebsiella pneumoniae* est l'espèce type. Elle a été décrite pour la première fois par Carl Friedlander en 1882, isolée des poumons de patients décédés d'une pneumonie, d'où son nom ; bacille de Friedländer (**Brisse et al., 2006**).

Les espèces du genre *Klebsiella* sont ubiquitaires dans la nature, y compris l'eau, le sol et les animaux. Elles sont présentes dans les milieux hospitaliers et peuvent coloniser les dispositifs médicaux. De ce fait, elles sont facilement transmises par deux sources principales : le tube digestif des patients hospitalisés ou les mains du personnel. Chez l'homme et d'autres mammifères, *K. pneumoniae*, est un saprophyte colonisant le nasopharynx, le tractus gastro-intestinal et la peau (**Podschun et Ullmann, 1998, Podschun et al., 2000**).

Klebsiella pneumoniae est un bacille non flagellée et non sporulée, de dimensions comparables à celles d'*Escherichia coli* (0,3 à 1,0 µm de diamètre sur 0,6 à 6,0 µm de longueur), généralement encapsulées, immobiles et anaérobie facultative (**Paczosa et Meccas, 2016**). Le **tableau I de l'annexes 1** résume l'essentiel des caractéristiques biochimiques de cette espèce.

Le génome typique de *K. pneumoniae* a une taille d'environ 5 à 6 Mpb, codant entre 5 000 et 6 000 gènes. Environ 1700 gènes sont conservés chez tous les membres de l'espèce (gènes de ménage), tandis que les autres sont présents de manière variable (Gènes accessoires) (**Holt et al., 2015**).

K. pneumoniae est à l'origine de plusieurs infections qu'elles soient communautaires ou nosocomiales, survenant particulièrement chez les personnes âgées, les nouveau-nés et les immunodéprimés. Parmi ces infections, nous retrouvons : la pneumonie, la septicémie, les infections urinaires, la bactériémie, la méningite et les abcès hépatiques pyogènes (**Chen et al., 2014, Magill et al., 2014**).

II. Pathogénicité de *K. pneumoniae*

La pathogénicité de *K. pneumoniae* est attribuée à plusieurs facteurs de virulence qui lui permettent de s'échapper aux mécanismes immunitaires de l'hôte. Parmi ces facteurs, nous retrouvons la capsule, le lipopolysaccharides (LPS), les adhésines, les sidérophores et la

formation de biofilm. Deux phénotypes de virulence ont été caractérisés chez *Klebsiella pneumoniae* : classique et hypervirulent (**Figure 1**) (**Paczosa et Mecsas, 2016**).

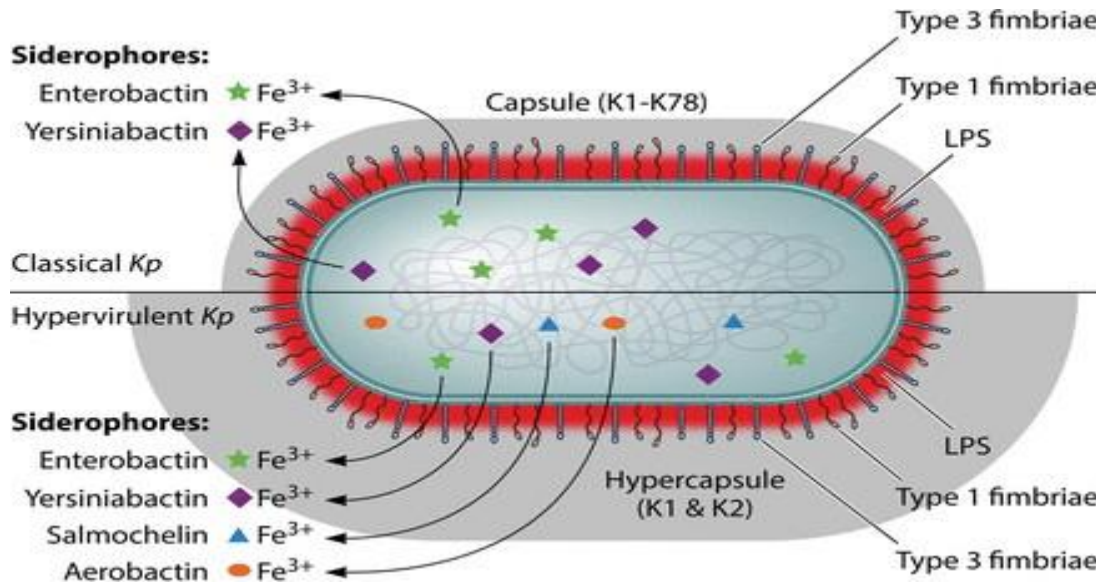


Figure 1 : Phénotypes de virulence de *K. pneumoniae*, classique et hypervirulent (**Paczosa et Mecsas, 2016**)

II. 1. Capsule

La capsule est une matrice polysaccharidique qui recouvre la cellule. Elle est sans doute le facteur de virulence le plus important et le plus étudié de *K. pneumoniae*. En effet, les souches acapsulaires de *K. pneumoniae* sont considérablement moins virulentes que les souches encapsulées isogéniques dans les modèles murins (**Podschun et al., 1998, Lawlor et al., 2006**). Il existe plus de 77 sérotypes capsulaires. Certains sont plus virulents que d'autres ; c'est le cas pour le sérotype K1 et K2. La capsule contribue à la résistance à certains mécanismes immunitaires tels que la phagocytose et le système du complément (**Figure 2**).

La capsule est codée par le locus *cps* situé sur le chromosome. Le gène *wzi* code pour une protéine de surface impliquée dans la fixation de la capsule à la membrane externe. La perte de cette protéine se traduit par des bactéries acapsulaires (**Bushell et al., 2013, Rahn et al., 2003**). Le gène *wzy* est impliqué dans la polymérisation des polysaccharides capsulaires, tandis que *wza*, *wzc*, *orf5* et *orf6* sont impliqués dans leur assemblage à la surface (**Arakawa**

et al., 1991, Rahn et al., 1999). Le phénotype d'hypermucoviscosité se traduit par une surproduction des polysaccharides capsulaires. Il est souvent associé au sérotype K1 (dont le gène *magA* est spécifique) et K2 ainsi que le gène *rmpA*. Ce dernier est porté par un plasmide en association avec les gènes du système de l'aérobactine. Il code pour un activateur transcriptionnel des gènes *cps* (Lai et al., 2003, Hsu et al., 2011).

La capsule est un facteur de virulence majeur chez *K. pneumoniae*. En effet, elle inhibe la phagocytose et l'opsonisation des bactéries par les cellules hôtes, induit la maturation des cellules dendritiques, neutralise l'action bactéricide des peptides antimicrobiens et empêche le dépôt, à la surface bactérienne, des composants du système du complément (Figure 2) (Paczosa et Meccas, 2016).

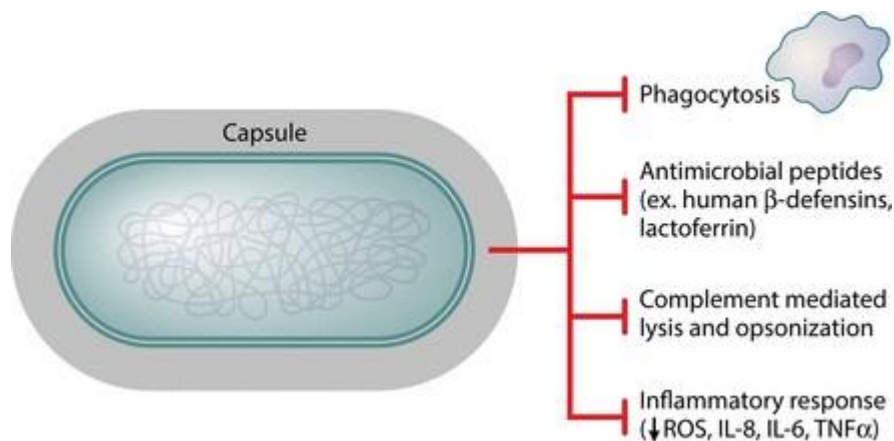


Figure 2 : Rôle de la capsule chez *K. pneumoniae* (Paczosa et Meccas, 2016)

II. 2. Lipopolysaccharide

Le LPS comprend trois parties : le lipide A hautement conservé et hydrophobe ancré dans la membrane externe ; l'antigène O hautement variable en tant que composant le plus externe du LPS ; et le polysaccharide central reliant le lipide A et l'antigène O.

Au moins neuf sérotypes de l'antigène O existe chez *K. pneumoniae* (O1, O2, O2ac, O3, O4, O5, O7, O8 et O12) (Hansen et al., 1999). La biosynthèse de l'antigène O est assurée par des enzymes codées par le cluster *wb* (*wzm*, *wzt*, *wbbM*, *glf*, *wbbN* et *wbbO*). Ce cluster présente une forte variation génétique dans les séquences codantes correspondantes, ce qui explique la forte variabilité chimique des différents sérotypes (Hansen et al., 1999, Hsieh et

al., 2012). L'antigène O contribue, entre autre, à la résistance bactérienne au système complément (Paczosa et Meccas, 2016).

II. 3. Fimbriae

Au moins quatre types de fimbriae, ont été caractérisés chez *K. pneumoniae*. Les fimbriae de type 1 et 3 sont les mieux étudiés.

II. 3. 1. Fimbriae de type 1

Les fimbriae de type 1 sont des appendices de surface. Ils sont rigides et adhésifs, en forme de fil sur la membrane externe. Ils sont principalement composés de sous-unités répétées FimA avec une molécule d'adhésine FimH au sommet de la structure (Line et al., 2010). Les fimbriae de type 1 s'étendent au-delà de la capsule et assurent l'adhésion bactérienne aux structures contenant du mannose sur les cellules hôtes ou sur les matrices extracellulaires *via* l'adhésine FimH (Figure 3) (Rosen et al., 2008).

II. 3. 2. Fimbriae de type 3

Les fimbriae de type 3 sont caractérisées par des appendices de 2 à 4 nm de large et de 0,5 à 2 µm de long. Le gène *mrkA* code la sous-unité fimbriale, qui est polymérisée pour former l'arbre fimbrial hélicoïdal. La sous-unité adhésive, capable de se lier aux molécules de collagène, est codée par le gène *mrkD* et située à l'extrémité des fimbriae (Figure 3) (Murphy et al., 2012). Les fimbriae de type 3 assurent la médiation de l'adhésion *in vitro* aux cellules épithéliales et aux tissus rénaux et pulmonaires, très probablement d'une manière résistante au mannose, et jouent un rôle majeur dans la formation du biofilm de *K. pneumoniae* (Stahlhut et al., 2012).

II. 4. Sidérophore

Le fer est essentiel à la croissance bactérienne. Cependant, il n'est pas libre dans l'organisme hôte. Il est complexé à d'autres protéines. Les bactéries ont développé différentes stratégies pour acquérir le fer, telle que la sécrétion de sidérophores. Ces derniers sont des molécules une affinité pour le fer. Ils rentrent en compétition avec que les protéines de l'hôte afin de le chélater, l'internaliser dans le cytoplasme de la bactérie puis l'utiliser (Miethke et Marahiel, 2007). Les principaux systèmes de sidérophores ayant été mis en évidence chez *K. pneumoniae* sont l'entérobactine, la salmochéline, la yersiniabactine, et l'aérobactine (Miethke et Marahiel, 2007, Bachman et al., 2012).

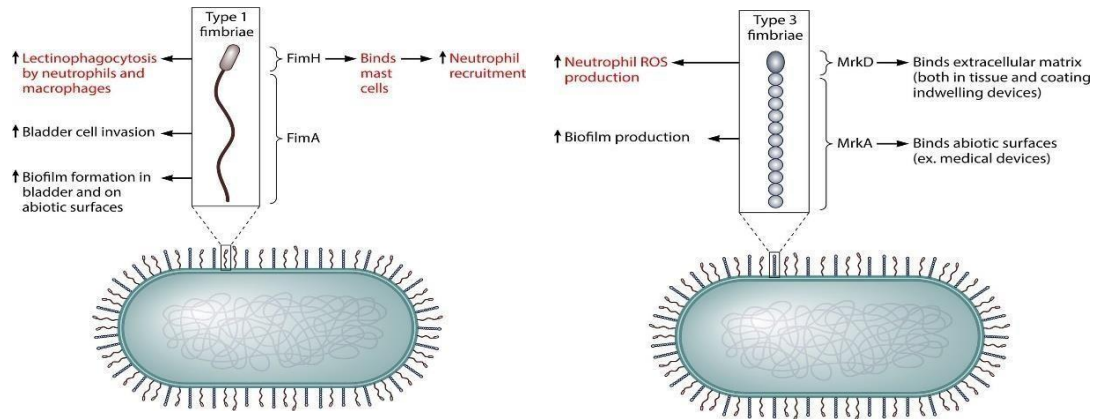


Figure 3 : Structure des fimbriae de type 1 et 3 chez *Klebsiella pneumoniae* (Paczosa et Meccas, 2016)

III. *Klebsiella pneumoniae* et résistance aux antibiotiques

K. pneumoniae est naturellement résistante aux amino-pénicillines de la famille des β -lactamines. Elle possède, dans son chromosome, un gène codant pour une pénicillinase qui lui confère une résistance à bas niveau aux pénicillines (amino-, carboxy- et uréido- 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 (Courvalin et al., 2006). Concernant les autres antibiotiques, *K. pneumoniae* est sensible aux aminosides, aux fluoroquinolones, à la fosfomycine et au cotrimoxazole.

En plus de la résistance naturelle, *K. pneumoniae* peut acquérir de nouvelles résistances par la production d'enzymes ayant un plus large spectre. Citons :

- Les β -lactamases de classe A de type IRT insensibles à l'acide clavulanique (mutants d'enzymes TEM).
- β -lactamases de classe A à spectre étendu ou BLSE et dont les gènes sont plasmidiques. La production de BLSE se traduit par des images de synergie très caractéristiques entre les céphalosporines de troisième génération et l'acide clavulanique (disque d'augmentin ou de clavantin) (Urban et Rahal, 1997).

- β -lactamases plasmidiques de classe C qui dérivent des céphalosporinases chromosomiques. On peut citer FOX-1 et MOX-1 (homologues à AmpC de *P. aeruginosa*), et LAT-1 et CMY-2 (homologues à AmpC de *Citrobacter freundii*).

IV. Réponse immunitaire au cours d'une infection à *K. pneumoniae*

Dans l'organisme hôte, *K. pneumoniae* est reconnue des récepteurs exprimés par les cellules épithéliales et immunitaires, suscitant ainsi une cascade de signalisation (**Figure 4**).

Parmi les récepteurs qui reconnaissent les PAMPs (LPS, fimbriae, ADN bactérien) de *K. pneumoniae*, nous retrouvons les Toll-like Receptor ou « TLR », dont le TLR4 et TLR2 (**Takeda et Akira, 2003**). Dans les voies respiratoires, ces interactions déclenche une voie de signalisation MyD88-dépendante et conduit à l'activation du NF- κ B et des MAPK et donc à la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines (**Cai et al., 2009**).

L'activation de l'interleukine 12 via ces voies de signalisation innées provoque l'activation en aval de l'IFN- γ , de l'interleukine 17 (IL-17), du TNF- α et de l'interleukine 1 β (IL-1 β) et conduit au recrutement des neutrophiles sur le site de l'infection de manière dépendante de la signalisation des cellules T helper de type 17, des monocytes, et d'autres cellules à l'induction des réponses immunitaires humorales et cellulaires comprennent les cellules tueuses naturelles, les macrophages et les cellules présentatrices d'antigène (**Happel et al., 2005**).

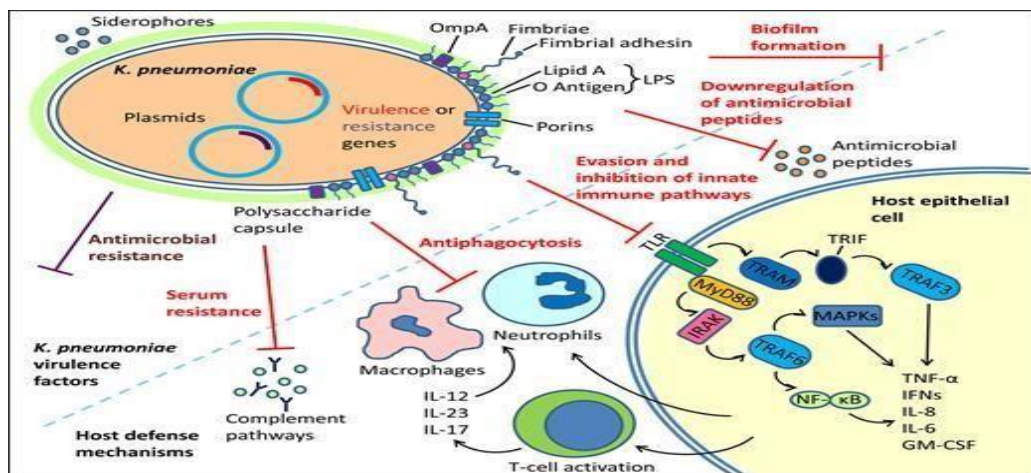


Figure 4 : Réponse de la cellule hôte et signalisation intracellulaire au cours d'une infection par *Klebsiella pneumoniae* (**Gomez et Uhlemann, 2017**)

Dans l'organisme hôte, *K. pneumoniae* peut coloniser les épithéliums muqueux et s'établir de façon stable, après qu'elle ait résisté aux défenses mécaniques et biologiques rencontrés à ce niveau. Dans le cas où les muqueuses sont franchies, *K. pneumoniae* devra résister et surmonter de nombreux mécanismes humoraux et cellulaires (**Zhang et al., 2000, Canz et al., 2002**).

Les défenses humorales consistent en un large éventail de facteurs antimicrobiens qu'ils soient opsoniques, bactéricides ou bactériostatiques. Parmi les défenses humorales, nous retrouvons le système du complément, souvent activé par les bactéries à Gram négatif en général et *K. pneumoniae* en particulier. L'activation en cascade du système du complément, quel que soit la voie (classique, alternative et lectine), conduit à la formation du Complexe d'Attaque Membranaire ou « CAM », qui s'insèrent dans les surfaces bactériennes provoquant une lyse par choc osmotique (**Merle et al., 2015**). En plus de la formation du MAC, l'activation du système du complément aboutit à la libération de molécules pro-inflammatoires hautement chimiotactiques, les anaphylatoxines (C5a, C4a, C3a) et d'opsonines responsables de l'opsonisation (**Figure 5**) (**Murphy et al., 2012**).

Les protéines de la membrane externe « OMP » et le LPS de *K. pneumoniae* sont connus pour activer la voie classique du complément (**Alberti et al., 1996**). Cette activation aboutit à la formation de la C3 convertase qui clive le C3 en C3b (opsonine). Ce dernier se lie de manière covalente aux surfaces bactériennes, ayant pour principales cibles le LPS et les OMP (**Figure 5**) (**Alberti et al., 1996, Mishra et al., 2015**).

La protéine OmpK36, abondamment exprimée chez *K. pneumoniae*, se lie aux domaines globulaires du C1q, de manière indépendante des anticorps et active la voie classique (**Alberti et al., 1996, Kojouharova et al., 2003**). Cette interaction conduit à au dépôt de C3b et C5b-9 et donc la formation du MAC.

Alors que certains sérotypes capsulaires de *K. pneumoniae* sont virulents et protègent la bactérie de la phagocytose, d'autres (ceux contenant du mannose ou du rhamnobiase) sont peuvent induire l'activation du complément *via* la voie des lectines (**Sahly et al., 2009**).

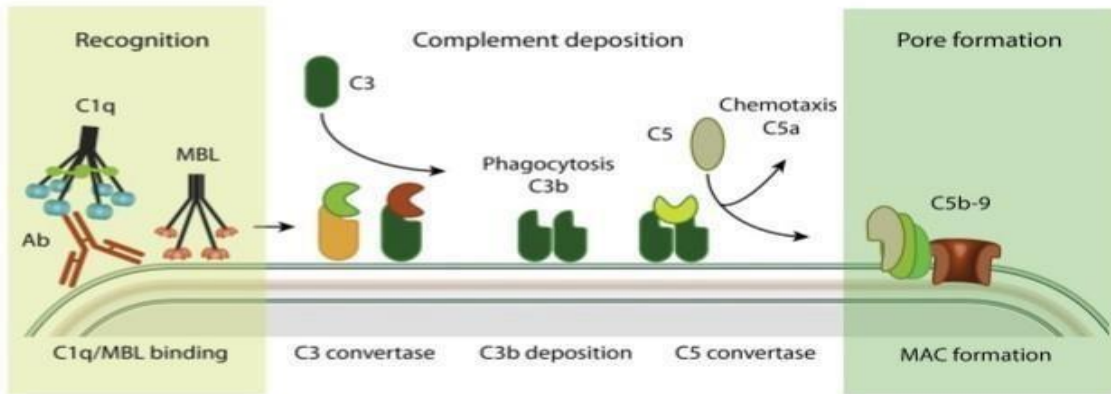


Figure 5 : Activation du complément par *K. pneumoniae* (Doorduijn et al., 2016)

Matériel
et
Méthodes

Dans le cadre de l'obtention du diplôme en Sciences de la Nature et de la Vie option Biologie cellulaire et Moléculaire, nous avons réalisé un travail de recherche concernant la pathogénicité de *Klebsiella pneumoniae* et la réponse immunitaire induite dans un modèle murin.

Notre étude a été réalisée au niveau des laboratoires de pédagogie de la FSB de l'université de Blida 1 (Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire), durant une période de 4 mois, de Mars à Juin 2021.

I. Matériel

I. 1. Matériel non biologique :

La verrerie, les appareillages, les solutions et réactifs utilisés dans cette étude sont résumés dans l'**annexe 2**.

I. 2. Matériel biologique

I. 2. 1. Souches bactériennes

Nous avons travaillé sur 2 souches cliniques de *K. pneumoniae*, issues de prélèvements biologiques (Pus et le sang) de patients atteints de cancer. Ces souches ont été obtenues suite à une collaboration avec le Dr. Azrou de l'hôpital Frantz Fanon de Blida, de Mars à juin 2019.

Les souches ont été fournies avec une fiche d'identification sur laquelle sont précisés, les détails relatifs au type de prélèvement et au profil de résistance. Ces données seront présentées dans la partie résultats et discussion.

I. 2. 2. Sérum humain

L'étude de la sensibilité au système du complément a nécessité l'utilisation de sérum humain issu d'individus sains et n'étant sous aucune thérapie. La préparation de ces composants biologiques est détaillée dans la section **II. 2. 3**.

I. 2. 3. Animaux

La virulence des 2 souches de *Klebsiella pneumoniae* a été évaluée *in vivo* sur des souris infectées par voie intra-péritonéale. Les souris utilisées ont été des mâles de type BALB/c de 20 ± 2 g provenant de l'institut Pasteur Kouba (Alger, Algérie).

Les souris ont été acclimatées à l'animalerie de l'Université Saad Dahleb de Blida 1, dans un environnement où la température moyenne était de 25 °C et l'humidité était ambiante. Le régime alimentaire se limitait à un aliment granulé (glucides 49,80% ; protéines 34.50% ; lipides 10% et complexe minéral vitaminé : 5.70%) et à de l'eau du robinet.

Toutes les expériences ont été menées conformément au Comité d'Ethique de l'Université de Blida 1.

II. Méthodes

II. 1. Identification et détermination du profil de résistance aux antibiotiques

Les souches objets de notre étude ont été assignées à l'espèce *Klebsiella pneumoniae*, sur la base d'une identification par galeries API 20E (Biomérieux), utilisées pour les entérobactéries et autres bacilles à Gram négatif, et dont le protocole détaillé est consigné en **annexe 2**.

Le profil de résistance aux antibiotiques a été obtenu par antibiogramme ou technique de diffusion sur milieu gélosé, selon les normes préconisées par le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM-2013). Le protocole détaillé est consigné en **annexe 2**.

Les résultats de l'identification et de la recherche du profil de sensibilité aux antibiotiques ont été fournis par le service de microbiologie de l'hôpital Franz Fanon. Nous les rapporterons dans la partie résultats.

II. 2. Etude du profil de virulence

Afin de déterminer le profil de virulence des 2 souches de *K. pneumoniae*, nous avons recherché plusieurs facteurs de virulence liés à la pathogénicité et donc au pouvoir infectieux de cette espèce. Nous avons recherché sur le plan phénotypique : la capsule, le phénotype d'hypermucoviscosité, l'effet bactéricide du sérum humain, la formation de biofilm.

Par ailleurs, nous avons réalisé un test de pathogénicité en déterminant la dose létale 50 dans un modèle murin.

II. 2. 1. Recherche de la capsule polysaccharidique

La présence de la capsule a été recherchée par coloration à l'encre de Chine. Sur une lame, une goutte de suspension bactérienne est mélangée à une goutte d'encre de Chine. Le résultat est obtenu après une observation au microscope photonique. Si la bactérie est encapsulée, l'encre de Chine diffuse à travers la paroi et colore le cytoplasme en noir : la capsule apparaît alors comme un halo lumineux autour de la bactérie. Si la bactérie est non encapsulée, elle apparaîtra en noir dans sa totalité (**Wiskur et al., 2008**).

II. 2. 2. Recherche du phénotype d'hypermucoviscosité

Le phénotype HMV a été recherché par le « String test » (**Wiskur et al., 2008**). L'étendue en verticale d'une seule colonie obtenue après une culture de 24 heures sur gélose BHIA est évaluée approximativement à l'aide d'une anse de platine. Une hauteur supérieure 5 mm est indicatrice du phénotype d'hypermucoviscosité (HMV+). Une hauteur inférieure 1 mm indique l'absence du phénotype d'hypermucoviscosité (HMV-).

II. 2. 3. Recherche de l'effet bactéricide du sérum humain

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

Une culture bactérienne en phase de croissance exponentielle diluée à 1/500 est ensemencée par étalement sur gélose MH. Après absorption à température ambiante pendant 15 minutes, 50 µL de sérum sont déposés au centre de la boîte de culture. La présence ou l'absence de croissance bactérienne, observée à l'endroit du dépôt du sérum après incubation toute la nuit à 37°C, témoigne de la résistance ou de la sensibilité de la souche testée. La souche *E. coli* K12-BM21 sensible au sérum est utilisée comme témoin de l'activité du sérum.

Le sérum utilisé est préparé à partir du sang humain d'individus sains. Le sang est prélevé dans des tubes secs, puis incubés à température ambiante pendant 2 à 4 heures pour permettre la coagulation. Le caillot formé est enlevé avant de centrifuger le contenu des tubes à 120 000 rpm pendant 5 minutes. Le sérum obtenu est stérilisé par passage dans des microfiltres de 0.45µm, aliquoté puis conservé à -20°C.

II. 2. 4. Recherche de la formation de Biofilm

Les biofilm sont recherchés à partir d'une culture d'une nuit à 30 ° C dans du LB. Une dilution au 1 :100 est réalisée (dans 200µl de LB), puis déposée dans une microplaque de 96 puits et incubée une nuit à 30 ° C. Les biofilms sont colorés au cristal violet (0,1%) ; Le colorant est solubilisé avec de l'acide acétique glacial (33%) et mesuré par spectrophotométrie à 570-590nm (Lin et al., 2010 ; Maldonado et al., 2006 ; Shanks et al., 2013). L'intensité du biofilm formé est lue comme suit :

- DO > 0.5 : Biofilm de forte intensité.
- 0.1 < DO < 0.5: Biofilm de moyenne intensité
- DO < 0.1 : Biofilm de faible intensité.

II. 3. Test de pathogénicité

La virulence de 2 souches cliniques de *K. pneumoniae*, une BLSE et une non-BLSE a été évaluée *in vivo* sur des souris infectées par voie intra-péritonéale. Les souris utilisées ont été des mâles de type BALB/c de 20-25g provenant de l'Institut Pasteur d'Algérie.

La culture de la souche bactérienne a été faite sur milieu LB à 30°C. Les souris ont reçu une injection de doses croissantes de bactéries en phase de croissance logarithmique, allant de 10² à 10⁸ CFU dans 0.2 ml d'eau physiologique stérile. Un lot de 4 souris a été utilisé pour chaque concentration bactérienne et un lot témoin n'a reçu aucune injection. L'observation du nombre de morts s'est faite sur 7 jours et la DL50 a été calculée selon la méthode de **Reed et Muench, (1938)**.

II. 4. Modèle murin de sepsis à *Klebsiella pneumoniae*

Les injections intraveineuses ou intrapéritonéales de bactéries vivantes, sont souvent utilisées pour induire le sepsis dans les modèles murins. *E. coli* est généralement utilisé pour mimer le sepsis à Gram négatif, alors que les Staphylocoques sont utilisés pour celui des Gram positif (**Lewis et al., 2016**).

Dans notre travail de recherche, nous avons souhaité développer un modèle infectieux à *K. pneumoniae* sur des souris BALB/C, afin d'en étudier la réponse immunitaire et les modifications histologiques induites lors de la colonisation. Ce travail n'a, malheureusement, pas pu être réalisé. En effet, nous avons été dans l'incapacité de déterminer la DL50 des 2 souches, ce qui nous a fortement limiter dans l'induction de l'infection.

Cet échec nous a amené à chercher des alternatives cohérentes et pertinentes qui pourraient enrichir notre mémoire. Nous avons opté pour une analyse d'un ensemble d'articles, traitant de la réponse immune, au cours d'une infection à *K. pneumoniae*.

Résultats
et
Discussion

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'une recherche fondamentale, concernant la pathogénicité de *K. pneumoniae* ainsi que la réponse immunitaire qu'elle suscite. Cette partie du mémoire s'articulera autour de plusieurs volets :

1. Description et analyse des profils de résistance et virulence.
2. Analyse des résultats d'articles de recherche traitant de la réponse immune, au cours d'une infection à *K. pneumoniae*.

I. Propriétés microbiologique de l'agent infectieux

Les 2 souches, objets de notre étude, ont été identifiées à partir de prélèvement biologiques de patients atteints de cancer et hospitalisés au Centre Anti-Cancer de Blida. L'identification a été réalisée par les galeries miniaturisées, les Galeries API20E, spécifiques aux membres des *Enterobacteriaceae*. Cette technique a permis aux microbiologistes, d'assigner les 2 souches à l'espèce *Klebsiella pneumoniae*.

Tableau II : Type de prélèvement, sexe et âge des patients chez qui les 2 souches de *Klebsiella pneumoniae* ont été obtenues.

Souches	Patient (Sexe)	Patient (âge)	Prélèvement
Kp653	Femme	/	Pus
Kpp2	Femme	84 ans	Pus

D'après le **tableau I**, nous constatons que les deux souches de *K.pneumoniae* ont été prélevées du pus de patients atteints de cancer. La souche Kpp2 fut isolée d'une femme âgée de 84ans. A part le sexe féminin, nous n'avons pas pu obtenir d'autres informations sur la souche Kp653.

K.pneumoniae est un agent pathogène majeur dans les infections nosocomiales sévères (pneumonie, UTIs, bactériémie, septicémie, méningite, abcès hépatiques pyogènes), particulièrement chez les immunodéprimés tels que les cancéreux (**Chenet *al.*, 2014**). Elle est responsable de plus de 10% de toutes les infections bactériennes nosocomiales (**Stahlhut *et al.*, 2011**). Selon le NHSN (National Health care Safety Network), *K. pneumoniae* est à l'origine de 7,9 % de l'ensemble des infections urinaires aux Etats-Unis. Elle est classée en cinquième position parmi tous les agents pathogènes incriminés dans les infections nosocomiales. A l'hôpital, le principal réservoir est le tractus gastro-intestinal des patients et les principaux vecteurs sont les mains du personnel soignant (**Brisse *et al.*, 2006**).

Les souches de *K. pneumoniae*, ont ensuite été soumises à un antibiogramme, dont la lecture a été faite en suivant les recommandations du Comité d'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2013). Les profils de résistance aux antibiotiques de ces souches sont les suivants :

- PR1: AM, AMC, CZ, CIP. Il s'agit de la souche nommée Kp653
- PR2: AM, AMC, CZ, CTX, SXT. Il s'agit de la souche nommée Kpp2

Le profil PR1 correspond au phénotype dit PBN. Ce phénotype dit « sauvage » est dû à la production naturelle d'une pénicillinase, dont le gène est chromosomique (*SHVI*), et qui lui permet de résister aux aminopénicillines.

Le profil PR2 correspond au phénotype dit « BLSE ». Cette souche semble produire une β -lactamase à spectre élargi, d'origine plasmidique, et qui lui permet de résister aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G). Le phénotype BLSE est probablement lié à la production d'enzymes de type CTX-M vu le profil de résistance obtenu et qui présente une résistance au céfotaxime.

Pour traiter et contrôler ces infections, un large éventail d'antibiotiques, sont utilisés dans les cas des infections à Klebsielles, principalement les β -lactamines et les aminosides. Cependant, la résistance à un nombre considérable d'antibiotiques, même ceux qui sont à large spectre, réduit de façon considérable les options thérapeutiques dans le traitement de ces infections (**Bush et Jacoby, 2010**, **Krause *et al.*, 2016**, **Hooper et Jakoby, 2016**). Ce cas de figure est souvent retrouvé en Algérie et dans le monde.

Dans une étude réalisée au niveau de centre de recherche en immunologie, Université des Sciences Médicales, Tabriz, Iran en 2019. Un total de 61 *K. pneumoniae* prélevés à partir de divers échantillons cliniques ont été confirmés génotypiquement. Tous les isolats de *K. pneumoniae* ont pu être typés dans neuf antibiotypes différents, et parmi ces profils de résistance, les profils VIII (GM , CP , AN , SXT , CAZ , CTX , PTZ , NI), avec 5 souches et III (CP, SXT , CAZ , CTX , NI) , avec 3 souches avaient les fréquences les plus élevées. Parmi les souches étudiées, 36 (59 %) se sont avérés être des producteurs de BLSE. 24 de ces souches BLSE étaient liés à des infections nosocomiales.

Durant ces dernières années, les BLSE de type CTX-M constituent les BLSE les plus communément détectées chez les entérobactéries en Algérie, (Messai *et al.*, 2008, Alouache *et al.*, 2014 ; Baba Ahmed-Kazi Tani et Arlet, 2014 ; Atmani *et al.*, 2015 ; Philippon *et al.*, 2015) ou dans le monde (Shah *et al.*, 2017 ; Andrade *et al.*, 2018 ; Liu *et al.*, 2019, Remya *et al.*, 2019), aussi bien en milieu hospitalier qu'en communauté que dans l'environnement. Leur diffusion est qualifiée de pandémique (Canton et Coque, 2006). La prédominance des BLSE de type CTX-M liée à la dissémination rapide des gènes *bla*_{CTX-M} est l'un des changements spectaculaires dans l'épidémiologie des BLSE (Zhao et Hu, 2013).

II. Propriétés de virulence de l'agent infectieux

La capsule était présente chez les 2 souches. En effet, nous avons aperçu, sous microscope photonique (grossissement x 40 et x 100), après contre coloration à l'encre de Chine un halo lumineux autour du cytoplasme ; il s'agit de la capsule (**Figure 6**).

La majorité des souches de *K. pneumoniae* produisent une capsule polysaccharidique particulièrement celles d'origine clinique. Actuellement, plus de 77 différents antigènes capsulaires ont été identifiés chez *Klebsiella* ; certains sont plus virulents que d'autres (K1 et K2) (Clegg et Murphy, 2016).

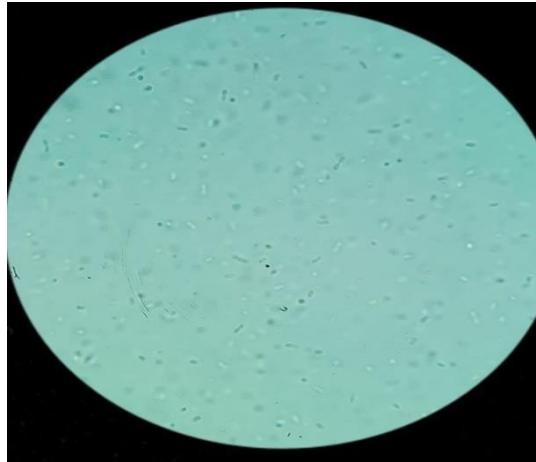


Figure 6 : Observation de la capsule sous microscope photonique (G x 100)

Au cours de l'infection à *K. pneumoniae*, la capsule protège la bactérie contre la réponse immunitaire de l'hôte par de multiples mécanismes, notamment l'inhibition de la phagocytose par les cellules immunitaires, empêchant ainsi la lyse et l'opsonisation médiées par le complément et éviter l'activation de la réponse inflammatoire (**Paczosa et Meccas, 2016**). Les souches encapsulées de *K. pneumoniae* sont significativement moins susceptibles que les souches acapsulaires d'être phagocytées par les cellules phagocytaires, avec ou sans opsonines (**Paczosa et Meccas, 2016**).

Le phénotype d'hypermucoviscosité fut observé chez la souche de phénotype Kpp2 de phénotype BLSE. Les colonies sur gélose Muller-Hinton étaient mucoïdes, très visqueuses, nous avons même du mal à les détacher de la gélose (**Figure 7**).

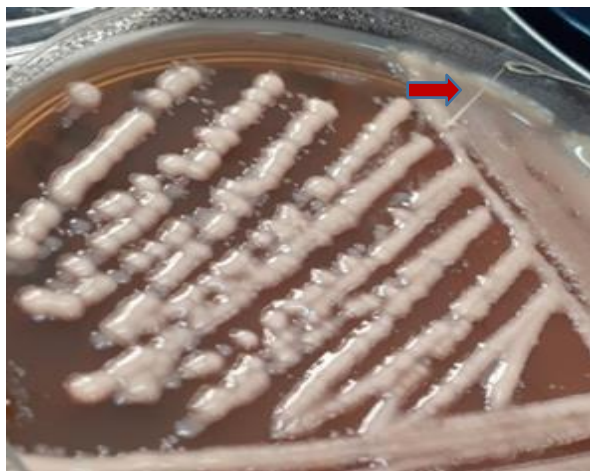


Figure 7 : Phénotype HMV observé chez la souche Kpp2.

L'hypermucoviscosité est le résultat d'une surproduction des polysaccharides capsulaire. Elle est souvent associée à la présence du gène plasmidique *rmpA*. Ce phénotype est généralement décrit chez des souches cliniques hypervirulentes hvKP (par opposition au phénotype classique cKP) de *K. pneumoniae* de sérotypes capsulaires K1 et K2. Ces souches sont à l'origine d'un syndrome invasif avec des taux de morbidité et mortalité importantes, des infections qui sont souvent d'origine communautaire et affectent les individus sains (Tsai et al., 2008). L'association de ce phénotype avec les profils de multi-résistance (BLSE ou KPC) a été mentionnée dans des rapports épidémiologiques (Liu et al., 2019). Aljanaby et alhasani (2016) et Shah et al. (2017) rapportent dans leur étude que la majorité des souches de *Klebsiella pneumoniae* présentent le phénotype d'hypermucoviscosité. Le tableau III en annexe 3 résume l'ensemble des caractéristiques des souches cKP et hvKP.

La présence d'une capsule, comme nous venons de le voir peut conférer à la bactérie, le pouvoir de résister au système du complément. L'étude de l'effet bactéricide du sérum humain, par la méthode d'inoculation en « spot » sur milieu solide, a permis de constater la résistance des 2 souches au système du complément. En effet, nous avons observé une croissance bactérienne normale à l'endroit du dépôt du sérum (Figure 8).



Figure 8 : Résultats de la recherche de l'effet bactéricide du sérum humain

L'activation du système du complément aboutit à l'élimination du germe infectieux. En effet, il permet la génération d'opsonines (C3b, C4b) et d'anaphylatoxines (C5a, C3a, C4a), facilitant la phagocytose des bactéries et la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC) aboutissant à la lyse de la cellule bactérienne. La résistance au système du complément

est l'apanage des bactéries pathogènes invasives qui causent des infections profondes. Cette résistance pourrait s'expliquer par la présence de structures bactériennes telles que la capsule, le LPS et les protéines de la membrane externe (Doorduyn *et al.*, 2016). La mise en évidence de ces souches dans notre étude est inquiétante, car elle prédispose les patients à des infections systémiques dont l'issue pourrait être fatale.

Les deux souches de *K. pneumoniae* formaient un biofilm sur une surface abiotique, dans notre cas, une plaque de 96 puits. L'intensité du biofilm fut mesurée par la méthode d'absorption du cristal violet. Le biofilm était de moyenne intensité (DO1= 0.38 DO2= 0.35).

De nombreuses études mettent l'accent sur le problème que constitue le développement d'une telle structure dans la pathogénèse des infections nosocomiales. En effet, ce mode d'organisation promeut la persistance des bactéries dans un biofilm et donc l'établissement d'infections chroniques. Au sein de ce biofilm, les bactéries sont protégées de l'action des antibiotiques et des défenses de l'hôte. Elles communiquent plus facilement par le quorum sensing afin d'induire l'expression des gènes de virulence. Chez les individus hospitalisés ou atteints de maladies lourdes, le risque lié à la formation de biofilm est plus important. En effet, ces patients sont souvent sondés, cathétérisés ou portant une prothèse ; c'est autant de surface abiotiques adhésive permettant la fixation, la colonisation et la formation de ces tissus bactériens.

A la lumière des résultats obtenus, nous constatons que les 2 souches de *K. pneumoniae*, présentaient un certain potentiel de virulence. En plus de la résistance aux antibiotiques, il semblerait aussi que ces bactéries soient capables de survivre dans le sang du fait de leur résistance au système du complément. De plus, par leur capacité à former un biofilm, ces bactéries sont protégées contre les défenses de l'hôte (déjà affaiblies chez les patients hospitalisés), elles peuvent persister et disséminer dans tout l'organisme hôte.

Ce potentiel de virulence a été mis à l'épreuve en tentant une estimation de la dose létale 50. Nous avons utilisé une large gamme de concentration allant de 10^2 à 10^8 cellules/ml. A notre grande surprise et malgré la sensibilité des souris et le potentiel de virulence de nos souches, aucune mortalité n'a été observée en 7 jours de monitoring. Les hypothèses concernant l'échec de test de pathogénicité ciblent particulièrement la concentration de l'inoculum et le choix du milieu de culture.

III. Réponse immunitaire au cours d'une infection à *Klebsiella pneumoniae*

La réponse immunitaire contre *Klebsiella pneumoniae* est caractérisée par des interactions cellulaires, mettant en jeu principalement, les monocytes/macrophages, les neutrophiles et les cellules lymphoïdes innées (ILC) et les lymphocytes T CD4+.

L'infection pulmonaire à *K. pneumoniae* a fait l'objet de nombreuses études de modèle murin utilisant la souche de référence *K. pneumoniae* 43816 adaptée aux rongeurs. Les travaux utilisant un large éventail de souris knock-out, ont constaté que les macrophages alvéolaires et les neutrophiles contribuaient à l'élimination de *K. pneumoniae* (Jeyaseelan et al., 2006 ; Roger et al., 2013). Il semblerait aussi que les souris déficientes en récepteurs de chimiokines, recrutaient faiblement les neutrophiles au niveau des poumons et avaient une sensibilité accrue à *K. pneumoniae* 43816 (Tsai et al., 1998 ; Cai et al., 2010 ; Batra et al., 2012). Dans le même ordre d'idées, les souris dépourvues de MyD88, TRIF, IL-1R, TLR4 et LTB4 avaient un recrutement réduit de neutrophiles et une résistance réduite aux infections à *K. pneumoniae* 43816, mais l'impact de ces déficiences sur les monocytes inflammatoires (Batra et al., 2012 ; Cai et al., 2009 ; Cai et al., 2012). Dans d'autres exemples de modèles murins, il a été démontré que la déficience en récepteurs type lectine-C (Clec4E et Clec4D), rendait les souris plus sensible à l'infection à *K. pneumoniae*, alors que le recrutement des neutrophiles dans les poumons augmentait (Steichen et al., 2013 ; Sharma et al., 2014). L'étude pionnière de Ye et al. (2001) indique que le déficit en IL17R augmente la sensibilité à cette bactérie et soutient en outre le rôle potentiel des neutrophiles dans la clairance bactérienne.

Les lymphocytes Th17 et à travers la libération de l'IL-17, contribuent à l'élimination de cette bactérie dans les poumons. L'IL17A favorise la phagocytose et l'élimination de *K. pneumoniae* par les monocytes/macrophages. Le recrutement rapide des monocytes inflammatoires dans les poumons améliore considérablement la réponse des ILC, qui s'engagent dans une boucle rétroactive en produisant de l'IL-17A et ainsi favoriser la clairance de *K. pneumoniae* (Xiong et al., 2016). La signalisation via le récepteur de l'IL17 (IL17R) induit la granulopoïèse, qui est essentielle à la production de facteur CSF et induit la chimokine CXC.

Dans l'étude de Ye et al. (2001), un modèle murin d'infection pulmonaire à *Klebsiella pneumoniae* a été réalisé. L'équipe a utilisé des souris Knock-out pour le gène codant l'IL-17R et des souris surexprimant l'IL-17R soluble. Les souris déficientes en IL-17R étaient

extrêmement sensibles à *K. pneumoniae*. On observait 100 % de mortalité après 48 h contre seulement 40 % de mortalité chez le lot témoins. Les souris knock-out pour l'IL-17R^{-/-} présentaient un retard significatif dans le recrutement des neutrophiles dans l'espace alvéolaire, et observaient une plus grande dissémination de *K. pneumoniae* par rapport aux souris témoins. Ce défaut était associé à une réduction significative des taux du G-CSF et de MIP-2 dans les poumons. Ces données soutiennent que la signalisation altérée de l'IL-17R, suite à une déficience en lymphocytes Th17, prédispose à la pneumonie bactérienne (Ye et al., 2001).

Il est connu que la réponse immune contre *K. pneumoniae* est dépendante du profil de virulence et de résistance aux antibiotiques de la souche. Ainsi certains sérotypes capsulaires sont plus virulents que d'autre et les souches multirésistantes causent des infections récurrentes voir chroniques chez l'homme. Ainsi, les infections causées par la souche CRKP-ST258 sont un problème difficile qui incommode les cliniciens. En effet les souches ayant ce profil sont très résistantes à une clairance immunitaire normale et provoquent souvent des infections persistantes.

Selon l'article de **Penalzoet et al. (2019)**, pendant une pneumonie causée par CRKP-ST258, il ya un recrutement précoce de cellules suppressives dérivées de monocytes myéloïdes (M-MDSC) et de neutrophiles qui produisent de l'IL-10. La production d'IL-10 par la population de MDSC recrutée, a un effet majeur sur la clairance bactérienne, la prévention des lésions pulmonaires, la modulation de la réponse immunitaire pro-inflammatoire et la survie de l'hôte, bien que l'infection persistante soit favorisée.

Cai et al. (2009), ont entrepris de caractériser le rôle de TRIF et MyD88 dans la défense pulmonaire de l'hôte contre *K. pneumoniae*. Ils ont constaté que la signalisation *via* MyD88 (et TRIF à moindre degrés) était nécessaire pour la défense de l'hôte contre les infections à *K. pneumoniae* au niveau des poumons, par l'intermédiaire des neutrophiles.

Conclusion

Notre travail avait pour objectif d'étudier la pathogénicité et la réponse immunitaire au cours d'infection par *Klebsiella pneumoniae*, à travers la sélection de deux souches cliniques (Kpp2 et Kp653), isolées à partir de prélèvement de pus de patients cancéreux hospitalisés à l'hôpital Frantz-Fanon de Blida. Les résultats de notre étude ont montré que :

- Les résultats de l'antibiogramme ont révélé la production de β -lactamases à spectre étendu pour la Kpp2 (BLSE).
- La souche Kp653 présentait le phénotype sauvage de résistance aux antibiotiques.
- Les 2 souches présentaient une capsule alors que le phénotype HMV ne concernait que kpp2.
- Toutes les 2 souches étaient résistantes au système du complément et produisaient un biofilm sur une surface abiotique de moyenne intensité.

Par ailleurs, les résultats de test de pathogénicité sur des souris BALB/C en utilisant une gamme de concentration bactérienne allant de 10^2 à 10^8 UFC sont négatifs, aucune mortalité n'a été observée en 7 jours de monitoring.

Dans l'incapacité de déterminer la DL50 des deux souches de *K.pneumoniae* sur modèle murin, nous avons analysé plusieurs articles sur la réponse immunitaire innée contre *Klebsiella pneumoniae* par des interactions cellulaires, mettant en jeu les monocytes/macrophages, les neutrophiles, les cellules lymphoïdes innées (ILC) et les lymphocytes T CD4+. L'efficacité de la réponse immunitaire contre *K. pneumoniae* dépend fortement du profil de virulence et de résistance aux antibiotiques de cette bactérie.

Malgré les avancées significatives dans la compréhension de la pathogénèse de *Klebsiella*, nous avons encore une image fragmentée de l'interaction de *K. pneumoniae* avec le système immunitaire, et il existe un manque important de connaissances sur le répertoire des facteurs de virulence permettant à *Klebsiella* de surmonter défenses à se multiplier dans les tissus. Par rapport à d'autres agents pathogènes opportunistes, *K. pneumoniae* ne sécrète pas d'inhibiteurs du complément spécifiques à l'hôte. Par conséquent, ses mécanismes de résistance au complément relativement limités peuvent également ouvrir la voie à des immunothérapies plus dirigées pour améliorer la destruction dépendante du complément de ces bactéries.

Références
Bibliographiques

- **Alberti, S., Alvares, D., Merino, S., Casado, M.T., Vivanco, F., Tomas, J.M., Benedí, V.J.**, (1996). Analysis of complement C3 deposition and degradation on *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 64, 4726–4732.
- **Alberti, S., Marqués, G., Hernández-Allés, S., Rubires, X., Tomás, J.M., Vivanco, F., Benedí, V.J.**, (1996). Interaction between complement subcomponent C1q and the *Klebsiella pneumoniae* porin OmpK36. *Infect. Immun.* 64, 4719–4725.
- **Arakawa Y, Ohta M, Wacharotayankun R, Mori M, Kido N, Ito H, Komatsu T, Sugiyama T, Kato N.** 1991. Biosynthesis of *Klebsiella* K2 capsular polysaccharide in *Escherichia coli* HB101 requires the functions of *rmpA* and the chromosomal *cps* gene cluster of the virulent strain *Klebsiella pneumoniae* Chedid (O1:K2). *Infect Immun* 59:2043–2050.
- **Bachman MA, Lenio S, Schmidt L, Oyler JE, Weiser JN.** 2012. Interaction of lipocalin 2, transferrin, and siderophores determines the replicative niche of *Klebsiella pneumoniae* during pneumonia. *mBio* 3:e00224–11.
- **Berrazg M., Seydina M. D., Drissi M., Kempf M., Richet H., Landraud L. and Rolain J.M.** (2013). Biotyping of Mullidrug Resistan *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates from France and Algeria Using MALDITOF.MS., 8:1.
- **Cai, S. ; Batra, S. ; Shen, L. ; Wakamatsu, N. ; Jeyaseelan, S.** (2009). Both TRIF- and MyD88-Dependent Signaling Contribute to Host Defense against Pulmonary *Klebsiella* Infection. *The Journal of Immunology*, 183(10), 6629–6638.
- **Chan YR, Liu JS, Pociask DA, Zheng M, Mietzner TA, Berger T, Mak TW, Clifton MC, Strong RK, Ray P, Kolls JK.** 2009. Lipocalin 2 is required for pulmonary host defense against *Klebsiella* infection. *J Immunol* .182:4947–4956.
- **Chen L, Mathema B, Chavda KD, DeLeo FR, Bonomo RA, Kreiswirth BN.** 2014. *Klebsiella pneumoniae* produisant de la carbapénémase : décodage moléculaire et génétique. *Trends Microbiol* 22: 686 - 696. doi: 10.1016.
- **Courvalin P.R., Leclercq and Bingen E.** (2006). *Antibiogramme*. 2:142-162, 227-246,263-277.
- **Doorduyn, D. J., Rooijackers, S. H. M., van Schaik, W., & Bardoel, B. W.** (2016). Complement resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae*. *Immunobiology*, 221(10), 1102–1109. doi:10.1016/j.imbio.2016.06.014

- **El Fertas-Aissani R, Messai Y, Alouache S, Bakour R.** 2013. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *Pathol Biol (Paris)* 61:209–216
- **Gomez-Simmonds, Angela; Uhlemann, Anne-Catrin** (2017). Clinical Implications of Genomic Adaptation and Evolution of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of Infectious Diseases*, 215(suppl_1), S18–S27. doi:10.1093/infdis/jiw378.
- **Happel KI, Dubin PJ, Zheng M, et al.** Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *J Exp Med* 2005; 202:761–9.
- **Hansen DS, Mestre F, Alberti S et al.** *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide O typing: revision of prototype strains and O-group distribution among clinical isolates from different sources and countries. *J. Clin. Microbiol.* 37(1), 56–62 (1999).
- **Holt, KE et coll.** Analyse génomique de la diversité, de la structure de la population, de la virulence et de la résistance aux antimicrobiens chez *Klebsiella pneumoniae*, une menace urgente pour la santé publique. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 112, E3574 à E3581 (2015)
- **Holden, Victoria I. ; Breen, Paul ; Houle, Sébastien ; Dozois, Charles M. ; Bachman, Michael A.** (2016). *Klebsiella pneumoniae*. Siderophores Induce Inflammation, Bacterial Dissemination, and HIF-1 α Stabilization during Pneumonia. *mBio*, 7(5), e01397-16–. doi:10.1128/mBio.01397-16
- **Hsu CR, Lin TL, Chen YC, Chou HC, Wang JT.** The role of *Klebsiella pneumoniae* *rmpA* in capsular polysaccharide synthesis and virulence revisited. *Microbiology* 157 (Pt 12), 3446–3457 (2011).
- **Hsieh PF, Lin TL, Yang FL et al.** (2012) L'antigène lipopolysaccharide O1 contribue à la virulence de *Klebsiella pneumoniae* provoquant un abcès hépatique pyogène. *PLoS ONE* 7 (3), e33155.
- **Ko WC, Paterson DL, Sagnimeni AJ, Hansen DS, Von Gottberg A, Mohapatra S, Casellas JM, Goossens H, Mulazimoglu L, Trenholme G, Klugman KP, McCormack JG, Yu VL.** 2002. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. *Emerg Infect Dis* 8:160–166
- **Kojouharova, M.S., Tsacheva, I.G., Tchorbadjieva, M.I., Reid, K.B.M., Kishore, U.,** 2003. Localization of ligand-binding sites on human C1q globular head region using recombinant globular head fragments and single-chain antibodies. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* 1652, 64–74, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2003.08.003>.

- **Kone K.D.** (2010). Fréquence d'isolement des klebsiella au laboratoire de bactériologie CVD du CHU Gabriel Toure de 2002 à 2017. [PG]: Faculté de Medecine de Pharmacie et OdontoStomatologie.21p.
- **Lai YC, Peng HL, Chang HY.** RmpA2, an activator of capsule biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* CG43, regulates K2 cps gene expression at the transcriptional level. *J. Bacteriol.* 185(3), 788–800 (2003).
- **Li, Bei; Zhao, Yuling; Liu, Changting; Chen, Zhenhong; Zhou, Dongsheng** (2014). Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiology*, 9(9), 1071–1081. doi:10.2217/fmb.14.48
- **Lin TL, Yang FL, Yang AS et al.** Amino acid substitutions of MagA in *Klebsiella pneumoniae* affect the biosynthesis of the capsular polysaccharide. *PLoS ONE* 7(10), e46783 (2012).
- **Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, Lynfield R, Maloney M, McAllister-Hollod L, Nadle J, Ray SM, Thompson DL, Wilson LE, Fridkin SK.** 2014. Multistate pointprevalence survey of health care-associated infections. *N Engl J Med* 370:1198–1208.
- **Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT.** 2015. Complement system part II: role in immunity. *FrontImmunol* 6:257. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2015.00257>.
- **Miethke M, Marahiel MA.** (2007). Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev* 71:413–451. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.00012-07>.
- **Mishra, M., Ressler, A., Schlesinger, L.S., Wozniak, D.J.,** 2015. Identification of OprF as a complement component C3 binding acceptor molecule on the surface of *Pseudomonas aeruginosa* infect immune.83, 3006-3014.
- **Moore, T. A.; Lau, H. Y.; Cogen, A. L.; Standiford, T. J.** (2005). Defective Innate Antibacterial Host Responses during Murine *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia: Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptor 1 Deficiency versus Therapy with Anti-TNF- . *Clinical Infectious Diseases*, 41(Supplement 3), S213–S217. doi:10.1086/430126
- **Murphy CN, Clegg S.** (2012) *Klebsiella pneumoniae* et fimbriae de type 3 : infection nosocomiale, régulation et formation de biofilm. *Future Microbiol.* 7 (8), 991 à 1002.
- **Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C.** 2012. *Janeway's immunobiology*, 8th ed. Garland Science, New York, NY.

- **Olonisakin, Tolani F.; Li, Huihua; Xiong, Zeyu; Kochman et al.** (2016). CD36 provides host protection against *Klebsiella pneumoniae* intrapulmonary infection by enhancing LPS responsiveness and macrophage phagocytosis. *Journal of Infectious Diseases*, (), jiw451–. doi:10.1093/infdis/jiw451
- **Paczosa MK, Mecsas J.**2016. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 80: 6 29-661
- **Podschun R, Ullmann U.** 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 11:589 –603.
- **Podschun R, Pietsch S, Holler C et al.** Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. *Appl Environ Microbiol* 2001 ; 67:3325–7.
- **Rahn A, Drummel-Smith J, Whitfield C.** Conserved organization in the cps gene clusters for expression of *Escherichia coli* group 1 K antigens: relationship to the colanic acid biosynthesis locus and the cps genes from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 181(7), 2307–2313 (1999).
- **Rosen DA, Pinkner JS, Walker JN, Elam JS, Jones JM, Hultgren SJ.** Molecular variations in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* FimH affect function and pathogenesis in the urinarytract. *Infect. Immun.* 76(7) ,3346–3356(2008).
- **Russo TA, Shon AS, Beanan JM, Olson R, MacDonald U, Pomakov AO, Visitacion MP.** 2011. Hypervirulent *K. pneumoniae* secretes more and more active iron-acquisition molecules than “classical” *K. pneumoniae* thereby enhancing its virulence. *PLoS One* 6:e26734.
- **Sahly H, Keisari Y, Ofek I.** 2009. Manno (rhamno) biose-containing capsular polysaccharides of *Klebsiella pneumoniae* enhance opsono- stimulation of human polymorphonuclear leukocytes. *J Innate Immun*1:136–144.
- **Sharma, A., Steichen, A. L., Jondle, C. N., Mishra, B. B., & Sharma, J.** (2013). Protective Role of Mincle in Bacterial Pneumonia by Regulation of Neutrophil Mediated Phagocytosis and Extracellular Trap Formation. *Journal of Infectious Diseases*, 209(11), 1837–1846. doi:10.1093/infdis/jit820
- **Shon AS, Bajwa RP, Russo TA.** 2013. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence* 4:107–118.

- **Stahlhut S.G., Struve C., Krogfelt K.A. and Resneir A.** (2011). Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. 351.
- **Steichen, A. L.; Binstock, B. J.; Mishra, B. B.; Sharma, J.** (2013). C-type lectin receptor Clec4d plays a protective role in resolution of Gram-negative pneumonia. *Journal of Leukocyte Biology*, 94(3), 393–398. doi:10.1189/jlb.1212622.
- **Takeda K, Akira S.** Toll receptors and pathogen resistance. *Cell Microbiol* 2003; 5:143–53.
- **Tsay RW, Siu LK, Fung CP, Chang FY.** 2002. Characteristics of bacteremia between community-acquired and nosocomial *Klebsiella pneumoniae* infection: risk factor for mortality and the impact of capsular serotypes as a herald for community-acquired infection. *Arch Intern Med* 162:1021–1027
- **Xiong, H., Keith, J. W., Samilo, D. W., Carter, R. A., Leiner, I. M., & Pamer, E. G.** (2016). Innate Lymphocyte/Ly6C hi Monocyte Crosstalk Promotes *Klebsiella pneumoniae* Clearance. *Cell*, 165(3), 679–689. doi:10.1016/j.cell.2016.03.017
- **Wenzi B.I., Haiyang L., Rhys A., Bin L., Von Vergel L. and Jianming C.** (2017) Extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* causing nosocomial bloodstream infections in China: informing therapy, and clinical outcomes. 2.
- **Ye, P.; Rodriguez, F. H.; Kanaly, S.; Stocking, K. L et al.** (2001). Requirement of Interleukin 17 Receptor Signaling for Lung Cxc Chemokine and Granulocyte Colony-Stimulating Factor Expression, Neutrophil Recruitment, and Host Defense. *Journal of Experimental Medicine*, 194(4), 519–528. doi:10.1084/jem.194.4.519
- **Yu WL, Ko WC, Cheng KC, Lee CC, Lai CC, Chuang YC.** 2008. Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 62:1–6.
- **Zhang P, Summer WR, Bagby GJ, Nelson S.** 2000. Innate immunity and pulmonary host defense. *Immunol Rev* 173:39 –51.
- **Zhang Y, Zeng J, Liu W, Zhao F, Hu Z, Zhao C, Wang Q, Wang X, Chen H, Li H, Zhang F, Li S, Cao B, Wang H.** 2015. Emergence of a hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate from clinical infections in China. *J Infect t* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2015.07.010>.

Annexes

Annexe 1 :

❖ Les caractéristiques biochimiques de *k.pneumoniae* :Tableau I. les caractères biochimiques de *K.pneumoniae* (Kone ,2010).

les caractères biochimiques	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Fermentation des sucres	Glucose +
Métabolisme du tryptophane en indole	Indole -
Production du gaz	+
VP	+
TDA	-
H ₂ S	-
ODC	-
ADH	-
LDS	+
Citrate	+
ONPG	+

Annexe 2 :

I.1. Le matériel non biologique :

Appareillage	Utilisation
Etuve	Incubation des boîtes ensemencées, flacons d'hémoculture pour les systèmes manuels, galeries API
Jarre	Incubation des boîtes ensemencées dans une atmosphère riche en CO ₂
Automate Bactec	Incubation des flacons d'hémoculture
Centrifugeuse	Centrifugation des échantillons
Spectrophotomètre	Mesure de la densité optique des suspensions
Milieux de culture	Utilisation
Gélose nutritive (GN)	Culture des germes non exigeants
(BCP)	Culture des entérobactéries
Gélose au sang cuit / Gélose au sang frais (GSC/ GSF)	Culture des germes exigeants
Bouillon cœur cerveau / Bouillon glucosé tamponné (BHIB/ BGT)	Milieux d'enrichissement
Luria Bertani LB	Milieu favorisant l'expression des facteurs de virulence
Réactifs	Utilisation
Eau oxygénée	Identification des Gram+ (catalase)
Réactif latex test	Identification des <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Oxydase	Identification des Gram-
TDA	Test TDA API20E, API20NE
JAMES	Test IND API 20E, API20NE
Autres	Utilisation
Disques d'antibiotiques	Antibiogram
Bandelettes E test	Mesure de CMI

❖ **Galerie API 20 E :**

Préparation de la galerie API 20 E :

- réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5ml d'eau physiologique dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide
- inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte
- sortir la galerie de son emballage individuel
- placer la galerie dans une boîte d'incubation

Inoculation de la galerie :

- Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même pipette pour éviter la formation de bulles au fond des tubes
- poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant :
 - pour les tests : CIT, VP, GEL remplir tube et cupule,
 - pour les autres tests, remplir uniquement les tubes (et non les cupules),
 - pour les tests : ADH, LDC, ODC, H₂S, URE créer une anaérobiose en remplissant leurs cupules d'huile de vaseline.
- Refermer la boîte d'inoculation et l'incuber à 37°C pendant 24h.

Lecture et interprétation :

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture

Noter sur la fiche le résultat des réactions spontanées et ajouter des réactifs aux autres tests

- **Test TDA** : 1goutte de réactif TDA ; une couleur marron rougeâtre indique une réaction positive
- **Test IND** : 1goutte de réactif JAMES ; une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive
- **Test VP** : Test VP : une goutte VP1 et VP2, une couleur rose attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche des résultats.

Note : le test de la recherche de production d'indole doit être réalisé en dernier, car cette réaction libère des gaz qui risquent d'altérer l'interprétation d'autres tests de la galerie. Ne pas remettre le couvercle d'incubation après l'ajout du réactif.

Les tests négatifs sont toujours codés 0 alors que le code affecté aux tests positifs varie selon la position du test dans le triplet : 1 pour le premier test, 2 pour le second, 4 pour le troisième. Les 3 résultats du triplet sont additionnés et forment un code d'au moins 7 chiffres qui correspond au profil biochimique du micro-organisme étudié sur la base des données *AP web*.

La comparaison de ce code à ceux référencés dans la base de données gérée par Biomérieux permet en général d'identifier ce micro-organisme. Si le code numérique obtenu ne figure pas dans cette base de données, il peut s'agir d'un profil ou d'un micro-organisme non référencé, un problème technique (inoculum non respecté, paraffine oubliée, réactifs périmés, etc.) ou une mutation lors du développement bactérien.

❖ **Etude du profil de résistance aux antibiotiques :**

Technique de diffusion sur milieu gélosé ou antibiogramme :

L'antibiogramme a été réalisé par la technique de diffusion sur milieu gélosé selon les normes préconisées par le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM-2013). Le principe de cette méthode consiste à tester la sensibilité d'une souche bactérienne en présence d'un gradient de concentration d'antibiotique, obtenu par diffusion à partir de disques dans un milieu gélosé.

Cette méthode consiste à préparer une suspension bactérienne dans de l'eau physiologique stérile à 0,9 %, à partir d'une culture de 24 heures sur gélose non sélective. La densité de cette suspension est ajustée entre 0,08 et 0,10 à 625 nm, ce qui correspond à 10^8 cellules/ml. La suspension est ensuite diluée à 10^7 cellules/ml etensemencée par écouvillonnage sur une gélose Mueller Hinton de 4 mm d'épaisseur. Les disques d'antibiotiques sont ensuite déposés sur la géloseensemencée, en les séparant d'un espace de 30 mm les uns des autres.

Après prédiffusion pendant 15 minutes à température ambiante, les boîtes sont incubées pendant 24 heures à 37°C.

La lecture est réalisée en mesurant les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse. Les résultats sont interprétés selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2010). Trois catégories de souches sont définies en fonction du diamètre des zones d'inhibition : Sensible (S), Intermédiaire (I) et Résistant (R).

Annexe 3 :

Tableau III : Caractéristiques des souches classiques et hypervirulentes de *Klebsiella pneumoniae* (Paczosa et Meccas, 2016)

Paramètre	Souche classique	Souche hypervirulente	Référence
Types d'infection	Pneumonie, infection urinaire, bactériémie	Abcès hépatique pyogénique ; bactériémie ; abcès des poumons, du cou et des reins ; pneumonie ; cellulite ; fasciite nécrosante ; myosite, méningite	(Ko et al., 2002)
Population(s) Sensible(s)	Immunodéprimés (diabétiques, patients atteints de tumeurs malignes)	Diabétiques, personnes en bonne santé	(Tsay et al., 2002)
Type(s) de capsules	Sérotype K1-K78	Hypercapsule sérotype K1 (93 %) ou K2	(Shon et al., 2013)

<p>Sidérophores (% de souches exprimant des sidérophores)</p>	<p>Entérobactine (100), yersiniabactine (17–46), salmochéline (2–4), aéro bactéline (6)</p>	<p>Entérobactine (100), yersiniabactine (90), salmochéline (>90), aéro bactéline (93-100)</p>	<p>(Yu et al., 2008, Hsieh et al., 2008, El Fertas-Aissani et al.,2013)</p>
<p>Concentration géographique</p>	<p>A l'échelle mondiale</p>	<p>Principalement à Taïwan et en Asie du Sud-Est</p>	<p>(Shon et al., 2013, Yu et al.,2006)</p>
<p>Type d'infection principalement acquise</p>	<p>Nosocomiale</p>	<p>Communauté acquise</p>	<p>(Russo et al., 2011)</p>
<p>Fréquence des rapports de résistance aux antibiotiques</p>	<p>Fréquent (production de BLSE et de carbapénémases)</p>	<p>Rare</p>	<p>(Chan et al., 2009, Zhang et al., 2015)</p>