

République algérienne démocratique et populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université SAAD DAHLEB- Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département De Biologie et Physiologie Cellulaire

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV

Filière Sciences Biologiques

Spécialité : Génétique.

Thème :

**Etude des aspects cellulaires et moléculaires de la pathogénicité de l'espèce
*Klebsiella pneumoniae.***

Présenté par :

Merzouk Maroua

&

Hannachi Djazia

Devant le jury :

| | | | |
|----------------------|-------------------------|-------|--------------|
| Benyahia N. | Maitre Assistant A | USDB1 | Président |
| Chalal N. | Maitre de Conférences B | USDB1 | Examinatrice |
| Aissani-El Fertas R. | Maitre de Conférences B | USDB1 | Promotrice |

Promotion 2020/2021

Remerciements :

« En premier et avant tout, Merci à **Dieu** le tout puissant de nous avoir donné le courage, la patience, et la capacité de réaliser cet humble travail. »

A l'issue de ce travail, on tient à remercier vivement notre chère promotrice **Mme Aissani Radia** pour son acceptation d'encadrement pendant notre PFE, nous la remercions pour sa disponibilité, ses pertinents conseils et pour les efforts qu'elle a consenti durant la réalisation de ce mémoire.

On remercie également tous les ingénieurs de laboratoire de pédagogie de la FSB de **l'université de Blida 1** faculté de science de la nature et de la vie.

On remercie infiniment l'enseignant **Mr Chouih Sofiane** du département de l'agronomie de notre faculté SNV pour son soutien et ces leçons de moral et pour tout ce qu'il a fait pour nous aider.

Merci aux jurys, **Mr Benyahia .N** notre président ainsi que notre examinatrice **Mme Challal**, on vous présente nos respects les plus profonds.

Enfin on exprime tous nos sincères remerciements pour ceux qui ont contribué de près ou de loin pour leur orientation et adoration de ce travail sans oublier de remercier infiniment nos **très chers parents** pour tout.

« **Merci ...** ».

Dédicaces

J'ai le grand honneur de dédier ce modeste travail

*Je dédie ce modeste travail à **mes très chers irremplaçables parents***

*Vous avez tant sacrifié et cru en moi .Merci pour votre amour, soutien,
prières et confiance continus.*

A mes deux frères Mohamed et Hicham que j'aime trop.

A toute ma famille.

A ma meilleure amie : Asma Brada.

*A mes chers amies : Nour El Houda, Khadidj , Rayene , wahiba,
Hanaa et Rihab, Nounou et Hajar ,Kaouther Nabila, Haya, Marwa,
Meriem , Lina et Habiba .*

Merci pour votre amour.

*Et une spéciale dédicace pour **Akram Madi** qui ma aider et soutenu
pendant les 5 ans.*

Maroua

Dédicaces

Je dédie cet humble travail à :

♥ *Mes très chers parents* ♥

Pour leur amour, soutien, confiance, encouragement, et qui ont œuvré pour ma réussite que dieu le tout puissant vous préserve et vous accorde une longue vie pleine de santé.

♥ *Mes chères sœurs* ♥

Ikram et mouna , Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, santé et amour

Je vous aime.

♥ *Mes chers ami(e)s et collègues* ♥

Imene , Hadjer , Hiba , Amel , sabrine , sérine , kaouther , Halim , merci pour votre présence dans les moments les plus difficiles que j'ai vécu , pour votre soutien moral , et pour vos encouragements . je vous dédie ce travail avec amour et Je vous souhaite un avenir plein de joie.

♥ *A toute ma famille* ♥

Surtout mes cousines que j'admire beaucoup.

Enfin à tous ceux qui me connaissent et tous ceux qui m'aiment.

A vous ...

DJazia ♥

Résumé

Klebsiella pneumoniae est un important pathogène opportuniste, à l'origine de diverses infections (nosocomiales ou communautaires) chez l'homme, en particulier chez les immunodéprimés.

Nous avons entrepris d'étudier la pathogénicité de cette espèce, à travers l'analyse des profils de virulence et de résistance aux antibiotiques de 14 souches cliniques. Les souches ont été obtenues du Centre anti-Cancer de l'hôpital Frantz-Fanon de Blida, à partir de prélèvements biologiques de patients cancéreux. 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.

Le phénotype BLSE concernait 10 souches de notre collection. 9 profils de résistance et 9 souches multi-résistantes (MDR) ont été mis en évidence. Nous avons réussi les essais de curage plasmidique pour 3 souches BLSE. Les souches curées ne poussaient pas en présence de céfotaxime, signe de la perte du plasmide BLSE. La capsule était présente chez toutes les souches, alors que le phénotype HMV ne concernait que 3 souches, toutes des BLSE. La quasi-totalité des souches (n =12) étaient résistantes au système du complément et toutes produisaient un biofilm sur une surface abiotique. Nous avons été dans l'incapacité de déterminer la DL50 de 2 souches sur modèle murin.

Cette étude a révélé l'existence de phénotypes potentiellement pathogènes de *K. pneumoniae* dans les unités de soins de l'hôpital de Frantz-Fanon de Blida. Ceci est d'autant plus dangereux quand les mêmes souches sont aussi productrices de BLSE et multirésistantes, des phénotypes connus pour leur diffusion rapide et à caractère pandémique. Les phénotypes que nous avons mis en évidence pourraient être de type « classique » (cKP) ou « hypervirulent » (hvKP). Seule la biologie moléculaire peut les discriminer.

Mots clés : *Klebsiella pneumoniae*, virulence, hvKP, cKP, BLSE, MDR.

Abstract

Klebsiella pneumoniae is an important opportunistic pathogen, causing various infections (nosocomial or community-acquired) in humans, especially in immunocompromised.

We set out to study the pathogenicity of this species, by analyzing the virulence and antibiotic resistance profiles of 14 clinical strains. The strains were obtained from the Anti-Cancer Center of the Frantz-Fanon Hospital in Blida, from biological samples from cancer patients. 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 ESBL phenotype concerned 10 strains from our collection. 9 resistance profiles and 9 multi-resistant strains (MDR) were demonstrated. We have passed the plasmid cure tests for 3 ESBL strains. The cured strains did not grow in the presence of cefotaxime, a sign of the loss of the ESBL plasmid. The capsule was present in all strains, while the HMV phenotype concerned only 3 strains, all ESBLs. Almost all of the strains ($n = 12$) were resistant to the complement system and all produced a biofilm on an abiotic surface. We were unable to determine the LD50 of 2 strains in a mouse model.

This study revealed the existence of potentially pathogenic *K. pneumoniae* phenotypes in the care units of Frantz-Fanon Hospital in Blida. This is all the more dangerous when the same strains are also ESBL-producing and multidrug-resistant, phenotypes known for their rapid dissemination and of a pandemic nature. The phenotypes that we have demonstrated could be of the “classic” (cKP) or “hypervirulent” (hvKP) type. Only molecular biology can discriminate them.

Key words : *Klebsiella pneumoniae*, virulence, hvKP, cKP, ESBL,MDR

ملخص

الكلبسيلة الرئوية هي مُمرض انتهازى مهم ، يسبب عدوى مختلفة (مستشفوية أو مكتسبة من المجتمع) عند البشر ، خاصة الذين يعانون من نقص المناعة.

شرعنا في دراسة الأمراض لهذا النوع من خلال تحليل الفوعة ومقاومة المضادات الحيوية لـ 14 سلالة إكلينيكية. التي تم الحصول عليها من مركز مكافحة السرطان بمستشفى فرانتس فانون بالبلدية ، من عينات بيولوجية من مرضى السرطان. تم إجراء التعرف على البكتيريا وخصائص مقاومة المضادات الحيوية من قبل قسم الأحياء الدقيقة في نفس المستشفى. قمنا بفحص الكبسولة ظاهرياً ، والنمط الظاهري لفرط اللزوجة المفرطة ، ومقاومة المصل وتشكيل الأغشية الحيوية. بالإضافة إلى ذلك ، أجرينا اختبار الأمراض على الفئران من نوع بالب ج ، باستخدام تركيز بكتيري يتراوح من 10^2 إلى 10^8 وحدة التكوينية للمستعمرة .

اشتمل النمط الظاهري الواسع الطيف بيتا لاكتاماز 10 سلالات من مجموعتنا، تم عرض 9 أشكال مقاومة و 9 سلالات متعددة المقاومة لقد اجتازنا اختبارات علاج البلازميد على 3 سلالات من واسع الطيف بيتا لاكتاماز. لم تنمو السلالات المعالجة في وجود سيفوتاكسي ، وهي علامة على فقدان بلازميد هذه السلالات . كانت الكبسولة موجودة في جميع السلالات ، بينما كان النمط الظاهري مفرط المخاطي يتعلق بثلاث سلالات فقط من واسع الطيف بيتا لاكتاماز. كانت جميع السلالات تقريباً (ن = 12) مقاومة للنظام التكميلي وأنتجت جميعها غشاءً حيويًا على سطح غير حيوي. لم نتمكن من تحديد الجرعة المميتة 50 من سلالتين في نموذج فأر.

كشفت هذه الدراسة عن وجود أنماط ظاهرية للكلبسيلة الرئوية المسببة للأمراض في وحدات الرعاية بمستشفى فرانتس فانون في البلدية. ويزداد هذا الأمر خطورة عندما تكون السلالات نفسها منتجة لبيتا لاكتاماز واسع الطيف ومقاوم للأدوية المتعددة ، وهي أنماط ظاهرية معروفة بانتشارها السريع وطبيعتها الوبائية. يمكن أن تكون الأنماط الظاهرية التي حددناها من النوع "الكلاسيكي" أو "الفائق" ، ولا يمكن تمييزها إلا عن طريق البيولوجيا الجزيئية.

الكلمات المفتاحية : الكلبسيلة الرئوية، مُمرض انتهازى، الكلاسيكي ، الفائق، متعددة المقاومة.

Liste des abréviations

B : beta

BLSE : beta lactamase a spectre étendue

cKP : *klebisella pneumoniae* classique

C3G : céphalosporine de 3eme génération

DL : dose létale

DO : densité optique

E. coli : *Escherichia coli*

HMV : phénotype d'hypermucoviscosité

Hv : hypervirulent

K.p : *klebsiella pneumoniae*

KPC : *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

LB: Luria Broth

LPS : lipopolysacharides

MAC : complexe d'attaque membranaire

MDR : multidrug-resistant

MEC : matrice extra cellulaire

MH : muller hinton

MLST: Multilocus Sequence Typing

ml : millilitre

mm: millimeter

PFGE: Pulsed-Field Gel Electrophoresis

ST: Sequence Type

XDR: extensively drug-resistant

µg: microgram

µl: microlitre

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Core-génome et génome accessoire chez le genre <i>Klebsiella</i> .. | 4 |
| Figure 2 : Facteurs de virulence des souches classiques « cKP » et hyper virulentes « hvKP » de <i>K. pneumoniae</i> .. | 7 |
| Figure 3 : Rôle de la capsule dans la virulence de <i>K. pneumoniae</i> | 9 |
| Figure 4 : Rôle du lipopolysaccharide dans la virulence de <i>K.pneumoniae</i> | 10 |
| Figure 5 : Fonctions des fimbriae de type 1 et 3 au cours de l'infection à <i>K. pneumoniae</i> ... | 11 |
| Figure 6 : Détection du phénotype BLSE | 23 |
| Figure 7 : Observation de clones curés de la souche kps1..... | 25 |
| Figure 8 : Observation de la capsule sous microscope photonique (G x 100)..... | 26 |
| Figure 9 : Phénotype HMV observée chez la souche BLSE | 27 |
| Figure 10 : Résultats de la recherche de l'effet bactéricide du sérum humain (Phénotype résistant au sérum R)..... | 29 |

Liste des tableaux

| | |
|---|-----------|
| Tableau I: Type de prélèvement, sexe et âge des patients chez qui les souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ont été obtenues (n=14)..... | 21 |
| Tableau II : Profils de résistance aux antibiotiques des souches cliniques de <i>K. pneumoniae</i> | 22 |
| Tableau III : Résultat du curage plasmidique chez 9 souches BLSE de <i>K. pneumoniae</i> ... | 24 |
| Tableau IV : Résultat de la recherche de la formation de biofilms..... | 30 |
| Tableau V : Caractéristiques expérimentales de 8 publications sur la virulence de <i>K. pneumoniae</i> | 33 |
| Tableau VI : Résultats des profils de résistance / Virulence..... | 37 |

Sommaire

| | |
|---------------------------|---|
| Introduction | 1 |
|---------------------------|---|

Rappels Bibliographiques

| | |
|---|---|
| I. Généralités sur l'espèce <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 2 |
|---|---|

| | |
|--|---|
| I. 1. Caractéristiques microbiologiques et infectieuses..... | 2 |
|--|---|

| | |
|--|---|
| I. 2. Caractéristiques du génome de <i>K. pneumoniae</i> | 3 |
|--|---|

| | |
|---|---|
| I.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i> et résistance aux antibiotiques..... | 5 |
|---|---|

| | |
|--|---|
| II. <i>K. pneumoniae</i> et pouvoir pathogène | 7 |
|--|---|

| | |
|-------------------|---|
| II.1 Capsule..... | 8 |
|-------------------|---|

| | |
|-------------------------------|---|
| II.2. Lipopolysaccharide..... | 9 |
|-------------------------------|---|

| | |
|-----------------------------------|----|
| II.3. Adhésines fimbriaires | 11 |
|-----------------------------------|----|

| | |
|--------------------------|----|
| II.4. Sidérophores | 11 |
|--------------------------|----|

| | |
|--------------------|----|
| II.5. Biofilm..... | 13 |
|--------------------|----|

Matériel et méthodes

| | |
|--------------------------|----|
| I. Matériel | 14 |
|--------------------------|----|

| | |
|------------------------------------|----|
| I.1. Matériel non biologique | 14 |
|------------------------------------|----|

| | |
|--------------------------------|----|
| I.2. Matériel biologique | 14 |
|--------------------------------|----|

| | |
|--|-----------|
| I.2.1.Souches bactériennes | 14 |
| I.2.2.Sérum humain | 15 |
| I.2.3.Animaux..... | 15 |
| II.Méthodes..... | 15 |
| II.1.Identification et détermination du profil de résistance aux antibiotiques | 15 |
| II.2.Essais de curage plasmidique | 16 |
| II.3.Etude du profil de virulence..... | 16 |
| II.3.1.Recherche de la capsule polysaccharidique | 17 |
| II.3.2.Recherche du phénotype HMV..... | 17 |
| II.3.3.Recherche de l'effet bactéricide du sérum humain | 17 |
| II.3.4.Recherche de la formation de biofilm..... | 18 |
| II.4.Test de pathogénicité..... | 18 |

Résultats et discussion

| | |
|--|-----|
| I. Résultats de l'identification bactérienne | 21. |
| II. Résultats du profil de résistance aux antibiotiques..... | 22 |
| III. Résultats du profil de virulence..... | 26 |
| IV Analyse d'articles | 32 |

Conclusion

| | |
|------------------|----|
| Conclusion | 41 |
|------------------|----|

Annexes

- **Tableau I** :Caractères biochimiques de *Klebsiella pneumoniae*
- **Tableau II** : Liste des antibiotiques à tester pour les Entérobactéries

- Galerie API 20^E
- Etude du profil de résistance aux antibiotiques

Introduction

Klebsiella pneumoniae est un pathogène opportuniste de la famille des *Enterobacteriaceae*. Cette espèce est souvent à l'origine d'infections nosocomiales et communautaires, telles que les infections pulmonaires et du tractus urinaires, les bactériémies et les abcès hépatiques. Historiquement, *K. pneumoniae* cause des infections graves principalement chez les individus immunodéprimés. L'émergence et la propagation récentes de souches hypervirulentes ont élargi le nombre de personnes sensibles aux infections pour inclure celles qui sont en bonne santé et immunosuffisantes (**Paczosa et Meccas, 2016**).

Au cours du processus infectieux, *K. pneumoniae* déploie une armada de facteurs de virulence (invasives et protectives), qui lui permettent de franchir les muqueuses de l'hôte et de se protéger contre ses mécanismes de défense. Les principaux facteurs de virulence exprimés par cette espèce sont la capsule, le LPS, les adhésines fimbriaires, les sidérophores et la formation de biofilm (**Clegg et Murphy, 2012**). En plus de ce profil de virulence remarquable, *K. pneumoniae* arbore aussi un profil de résistance aux antibiotiques inquiétant. Les clones multi-résistants, producteurs de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) ou de carbapénémases (KPC), sont souvent à l'origine de graves épidémies hospitalières. Ces épidémies répétitives sont un réel problème de santé publique. Elles confrontent les cliniciens à de sérieux problèmes en termes de prise en charge et de traitement des patients.

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*. L'étude des mécanismes de pathogénicité de cette espèce est un prélude au développement de thérapies innovantes et ciblées. Dans ce cadre, nous avons réalisé un mémoire de fin d'étude, portant sur l'étude des aspects cellulaires et moléculaires de la pathogénicité de l'espèce *Klebsiella pneumoniae*. Nous nous sommes fixés les objectifs suivant :

- ✓ Déterminer le profil de virulence des souches cliniques de *K. pneumoniae* de phénotype BLSE et non BLSE, en recherchant, sur le plan phénotypique quelques facteurs de virulence.
- ✓ Evaluer le niveau de virulence de souches BLSE et non-BLSE, en réalisant un test de pathogénicité sur un modèle murin.
- ✓ Etudier et analyser les profils génétiques de virulence /résistance de souches cliniques de *K. pneumoniae* à partir d'une petite sélection d'articles de recherche.

Rappels

Bibliographies

I. Généralités sur l'espèce *Klebsiella pneumoniae*

C'est Trevisan en 1885 qui nomma pour la première fois le genre *Klebsiella*, en l'honneur d'Edwin Klebs (1834-1913) microbiologiste allemand. Depuis, six espèces et trois sous espèces ont été découvertes, avec comme espèce type *Klebsiella pneumoniae*. L'espèce *K. pneumoniae* se subdivise en trois sous espèces : *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* et *K. rhinoscleromatis* comme c'est stipulé dans le manuel de systématique bactériologique de Bergey (**Brisse et al., 2006**).

I. 1. Caractéristiques microbiologiques et infectieuses

K. pneumoniae est une espèce ubiquitaire. Elle est présente dans l'environnement (eaux, sol, plante...), comme saprophyte et dans le tube digestif de nombreux animaux dont l'homme comme commensal. Le taux de portage digestif est plus important chez les individus hospitalisés (**Brisse et al., 2006**).

K. pneumoniae peut être l'origine d'infections communautaires où l'on décrit souvent des pneumonies nécrosantes survenant essentiellement sur terrain éthylique. Toutefois, la majorité des infections à *K. pneumoniae* surviennent en milieux hospitaliers. Ces infections, dites nosocomiales, sont diverses et peuvent toucher plusieurs organes (Poumons, reins, foie, cœur...) ou tout le système, conduisant ainsi à un sepsis grave entraînant souvent la mort (**Clegg et Murphy, 2012**).

Klebsiella pneumoniae est un bacille à Gram négatif de la famille des *Enterobacteriaceae* dont elle présente les caractères généraux. Sous microscope photonique, les bactéries sont isolées, groupées par deux ou parfois en chaînettes. Ce sont des bactéries immobiles, non sporulées et généralement capsulées (**Doorduijn et al., 2016**).

K. pneumoniae se développe en aéro-anaérobiose sur les milieux classiques d'isolement des entérobactéries, après une incubation à 30-37 °C. Les colonies sont de 3 à 4 mm de diamètre, rondes, lisses, bombées, brillantes, visqueuses, parfois filantes (**Le Minor et Véron, 1989 ; Freney et al., 2000**). Elle *K. pneumoniae* présente les caractères généraux des entérobactéries : elle fermente le glucose avec production de gaz, elle est oxydase

négative, catalase positive et possède une nitrate-réductase. Les caractéristiques biochimiques de l'espèce *K. pneumoniae* sont résumées dans le **tableau I** en **Annexe 1**.

K. pneumoniae possède des antigènes de surface tels que l'antigène somatique « O » du LPS et l'antigène capsulaire « K », tous deux impliqués dans la pathogénicité de cette bactérie. Les caractéristiques phénotypiques et génotypiques de ces antigènes seront détaillées plus loin dans cette section.

I. 2. Caractéristiques du génome de *K. pneumoniae*

Le pangénome de *K. pneumoniae* a une taille d'environ 5,5 Mpb et code pour une moyenne de 5 500 gènes. Plus de 30 000 séquences uniques ont été identifiées qui codent pour différentes protéines. Cependant, il s'agit encore d'un pangénome ouvert, dans lequel existent des gènes accessoires qui n'ont pas encore été caractérisés. Son génome central (ensemble de gènes partagés par tous les membres de l'espèce) est composé d'environ 2000 gènes présents chez plus de 95 % des souches de cette espèce. Le génome accessoire contient des gènes qui varient entre les bactéries d'une même espèce. Cela inclut à la fois les gènes codés par le chromosome et ceux situés dans les éléments génétiques mobiles. Chez *K. pneumoniae*, la majeure partie du génome est constituée de gènes accessoires, ce qui permet la classification des souches cliniques par exemple, en pathotypes, tels que les « CRE » (Carbapeneme Resistant Enterobacteria) ou « hv » (hypervirulentes) (**Figure 1**) (**Martin et Bachman, 2018 ; Wyres et Holt, 2018**).

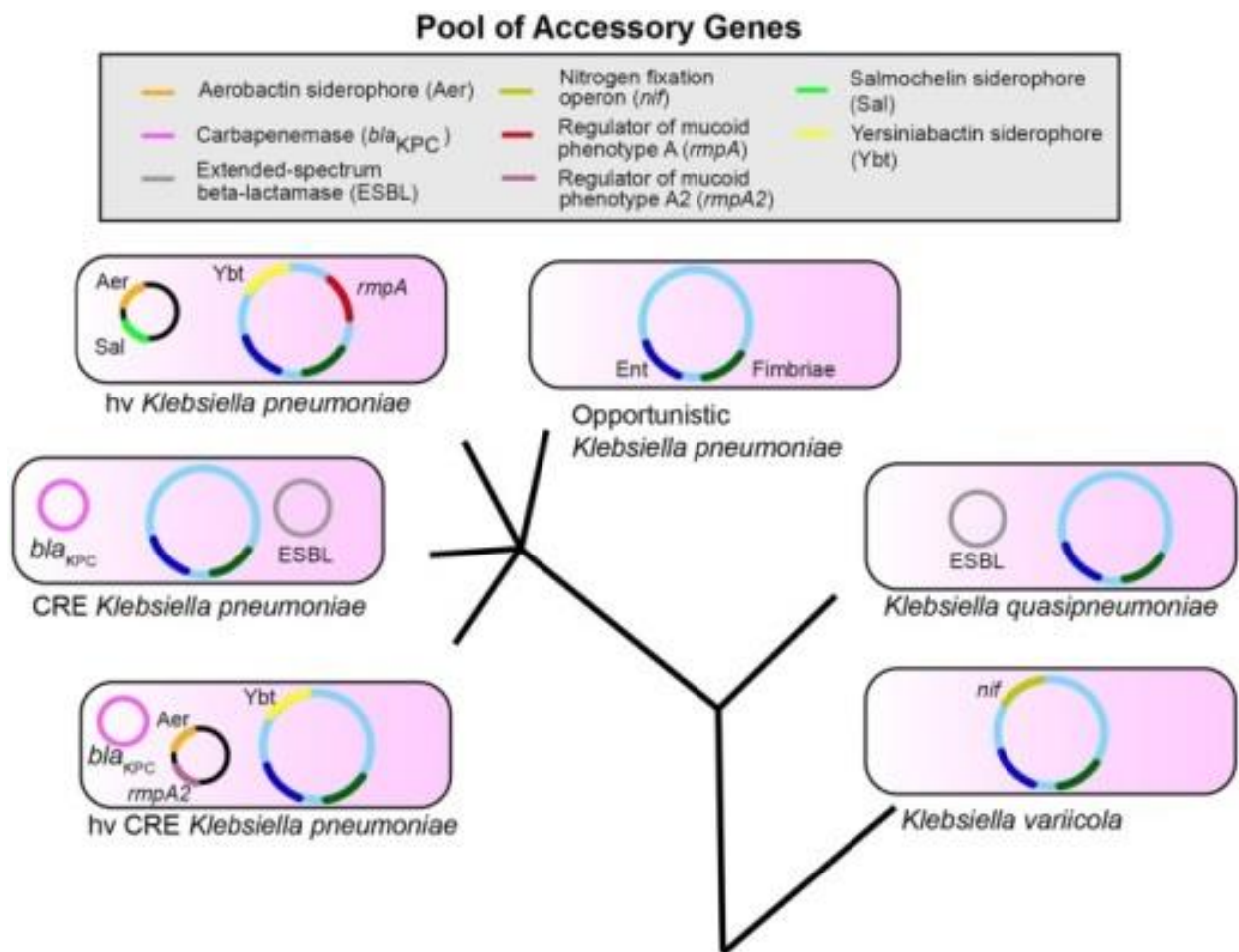


Figure 1 : Core-génoème et génoème accessoire chez le genre *Klebsiella* (Martin et Bachman, 2018). *K. pneumoniae*, *K. variicola* et *K. quasipneumoniae* sont trois espèces qui partagent un ensemble de gènes accessoires. Ent (entérobactine, bleu) et Fimbriae (vert foncé) représentent des gènes conservés. Les gènes accessoires sont présentés à titre d'exemples, ils ne constituent pas une liste définitive.

Ces gènes accessoires peuvent également être combinés pour former de nouveaux pathotypes (hvCRE). Ils peuvent aussi être transférés d'une bactérie à une autre *via* les transferts horizontaux. Ainsi, le génoème accessoire révèle la virulence d'une bactérie et son étude est essentielle pour comprendre les caractéristiques cliniques d'une maladie infectieuse. De plus, ce type de génoème peut évoluer en raison des modifications du génoème du pathogène, ou par l'acquisition de nouveaux gènes de résistance ou de variation de son expression.

I. 3. *Klebsiella pneumoniae* et résistance aux antibiotiques

Les souches de *K. pneumoniae* sont naturellement résistantes aux aminopénocillines. En effet, le gène chromosomique *SHV-1*, codant une pénicillinase, lui confère une résistance naturelle à l'ampicilline, l'amoxicilline et la ticarcilline. Cette pénicillinase est sensible à l'action de l'acide clavulanique, et du tazobactam (inhibiteurs de β -lactamases). La résistance à d'autres molécules antibiotiques survient occasionnellement, par le biais de mutations chromosomiques. Cependant, la plupart de ces résistances chez *K. pneumoniae*, résultent de l'acquisition de gènes par les transferts horizontaux, principalement *via* de grands plasmides conjugatifs (Wyres et Holt, 2018).

Les premiers gènes mobiles de résistance à l'ampicilline, identifiés chez les Gram négatif sont le gène *TEM* (présent dans les premiers plasmides décrits dans les années 1960) et le gène chromosomique *SHV-1* de *K. pneumoniae*. Ce dernier fut détecté pour la première fois dans des plasmides mobiles d'entérobactéries en 1973. Suite à l'introduction des céphalosporines de troisième génération (C3G) à usage clinique au début des années 1980, des gènes plasmidiques de β -lactamase à spectre étendu (BLSE) conférant une résistance à ces molécules sont apparus. Les premiers variant BLSE sont *SHV-2*, *TEM* (1984) (Labia et al., 1988) et *CMY* (1989) (Jacoby et Medeiros, 1991), qui ont été identifiées pour la première fois chez *K. pneumoniae*. Ils sont maintenant répandus parmi les entérobactéries, mais aussi chez les membres du genre *Acinetobacter* et *Pseudomonas* (Wyres et Holt, 2018). Le gène *bla-CTX-M* (Précisément le *CTX-M-15*) est le plus largement disséminé des gènes BLSE. Il a été détecté chez *Escherichia coli* et *K. pneumoniae* à la fin des années 1980 et début 1990, ayant été mobilisés à partir du genre *Kluyvera* (Canton et al., 2012 ; D'Andrea et al., 2013). CTX-M est maintenant associé au clone pandémique ST131 d'*E. coli* (Mathers et al., 2015) et plusieurs clones de *K. pneumoniae*, et est présent dans divers contextes plasmidiques, entraînant une large diffusion parmi les populations microbiennes hospitalières, humaines commensales et animales (Wyres et Holt, 2016).

K. pneumoniae joue un rôle majeur dans l'apparition et/ou la dissémination de nouveaux mécanismes de résistance, en particulier vis-à-vis des β -lactamines. Elle occupe une position importante dans l'émergence et la dissémination de certaines enzymes conférant la résistance aux β -lactamines, notamment ceux du groupe carbapénèmes (imipénème, méropénème, doripénème, ertapénème). Ces derniers ont un très large spectre antibactérien

et possèdent une grande stabilité vis-à-vis de la quasi-totalité des β -lactamases. La carbapénémase KPC de *K. pneumoniae* est apparue au milieu des années 90 aux États-Unis et a entraîné la propagation du clone pandémique ST258 (Wyres et Holt, 2018). Les carbapénémases des entérobactéries appartiennent aux quatre classes de β -lactamases (classes A, B, C, D de la classification de Ambler). Les plus importantes cliniquement sont, actuellement, les β -lactamases de type KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), IMP/VIM5 et OXA-48 chez les entérobactéries (Nordman, 210 ; Wyres et Holt, 2018). L'émergence de la résistance aux carbapénèmes est l'un des problèmes les plus importants posé par la résistance aux antibiotiques car il existe peu d'alternatives thérapeutiques possibles.

L'émergence des souches de *K. pneumoniae* de type MDR (multidrug-resistant) et XDR (extensively drug-resistant) est due principalement à la dissémination de clones à haut risque, constituent ainsi un réel problème de santé publique. La dissémination des gènes de β -lactamases est le résultat de la dissémination de plasmides dans des souches génétiquement différentes, ainsi que de la diffusion clonale de souches hébergeant ces plasmides de résistance. Chez *K. pneumoniae*, les clones ST11 et ST258 du groupe clonal CG258 et le clone ST14 du groupe CG15 ont été impliqués dans de nombreuses épidémies sur tous les continents (Marsh et al., 2019). Le clone ST307 est apparu récemment (Villa et al., 2017 ; Schaufler et al., 2018; Wyres et al., 2019).

Le clone ST307 est souvent porteur de gènes transférables conférant une résistance aux carbapénèmes et aux céphalosporines de nouvelle génération, tels que *bla_{KPC-3}*, *bla_{NDM-1}*, *bla_{OXA-48}* et *bla_{CTX-M-15}* (Villa et al., 2017 ; Wyres et al., 2019). De plus, une résistance à la nouvelle association ceftazidime/avibactame (Giddins et al., 2018) et à la colistine a également été rapportée (Novovic et al., 2016 ; Saavedra et al., 2017). La lignée ST307 de *K. pneumoniae* comprend une variété de déterminants supplémentaires de résistance et de virulence, d'éléments conjugatifs intégratifs et de phages. Elle ressort dans de nombreux rapports épidémiologiques en milieu clinique (Kim et al., 2017 ; Baek et al., 2020 ; Boonstra et al., 2020).

II. *K. pneumoniae* et pouvoir pathogène

La persistance et la dissémination des souches pathogènes de *K. pneumoniae* sont directement liées à son pouvoir pathogène et sa multirésistance aux antibiotiques. Son pouvoir pathogène s'accomplit par l'expression de nombreux facteurs de virulence qui lui permettent de se protéger contre le système immunitaire de l'hôte. Les principaux facteurs de virulence retrouvés chez cette bactérie sont la capsule, les adhésines fimbriales de type 1 et 3, les sidérophores et la formation de biofilm (**Figure 2**). Ces facteurs lui permettent de se stabiliser et de coloniser les tissus de l'hôte en se protégeant contre la phagocytose, le système du complément et en atténuant la réponse inflammatoire.

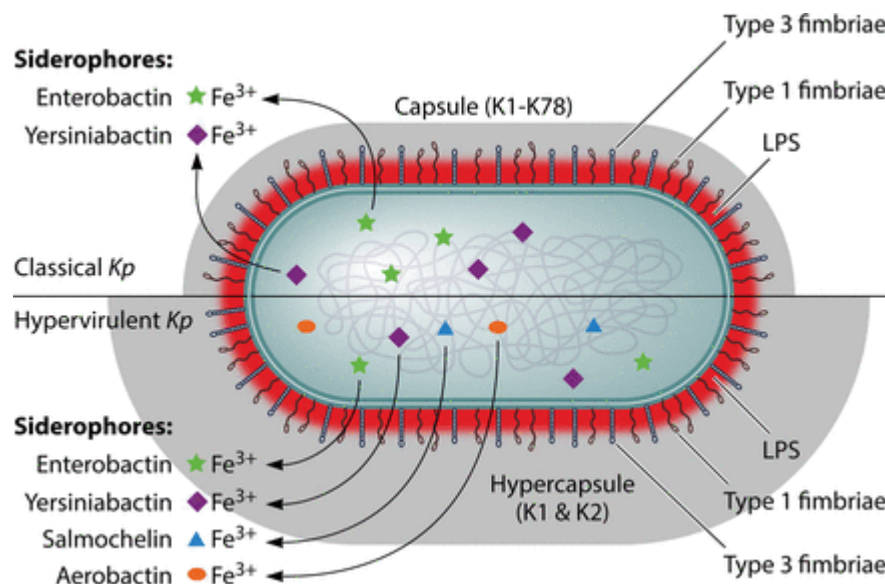


Figure 2 : Facteurs de virulence des souches classiques (cKP) et hyper virulentes (hvKP) de *K. pneumoniae* (**Paczosa et Mecsas, 2016**).

II. 1. Capsule

La plupart des souches de *K. pneumoniae* expriment une capsule polysaccharidique de sérotype varié. En effet, il existe plus de 77 types antigéniques distincts du polysaccharide capsulaire chez *Klebsiella pneumoniae*, pouvant être mis en évidence par des techniques sérologiques ou moléculaires. Les données épidémiologiques indiquent que certains sérotypes sont plus répandus que d'autres et seraient associés à une zone géographique et à un type d'infection. Par exemple, les abcès hépatiques et les endophtalmies sont fréquents en Thaïlande et sont, généralement, causées par les sérotypes les plus virulents K1 et K2.

Le cluster des gènes *cps*, codant la capsule chez *K. pneumoniae*, est composé de gènes (*wzi*, *wza*, *wzb*, *wzc*, *gnd*, *wca*, *cpsB*, *cpsG* et *galF*) présents sur le chromosome bactérien et dont l'organisation et la séquence sont conservés (**Clegg et Murphy, 2016**). 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 donne des bactéries acapsulaires. Le gène *wzy* est impliqué dans la polymérisation des polysaccharides capsulaires, alors que *wza* et *wzc* sont impliqués dans leur assemblage à la surface. Une analyse comparative des isolats cliniques de *K. pneumoniae* a montré une grande diversité dans la séquence des gènes *cps* entre les souches. Le typage moléculaire de la capsule repose sur l'analyse du locus *wzi*, commun à tous les types capsulaires mais dont la séquence varie d'un sérotype à un autre (**Paczosa et Meccas, 2016**).

Le phénotype d'hypermucoviscosité ou « Hv » est associé à une hyper production des polysaccharides capsulaires. Ce phénotype est l'apanage des souches très virulentes responsables d'infections profondes. Il est souvent associé aux gènes *rmpA* et *magA*. Ce dernier est spécifique au cluster des gènes codant la capsule de sérotype K1 (**Clegg et Murphy, 2016**). Le phénotype Hv a depuis peu émergé et a fait des ravages dans les pays asiatiques. Il s'agit d'un phénotype très agressif caractérisé par l'expression de facteurs d'invasivité à l'origine de sévères infections à caractère métastatique, particulièrement des abcès hépatiques à souches K1 et à phénotype d'hypermucoviscosité. Contrairement au phénotype « classique », le phénotype « hv » cause des infections aussi bien chez les individus fragilisés que chez les individus normaux sans aucun antécédent médical.

La capsule à un important rôle dans l'échappement aux mécanismes de défense de l'organisme hôte. Elle a la capacité d'inhiber ou d'altérer la phagocytose et de limiter l'action du système du complément. Toutefois, il est nécessaire de préciser que certains sérotypes sont plus résistants que d'autres. Par exemple, les capsules possédant les résidus Man- α -2-Man ont plus d'affinité aux récepteurs mannose et sont donc sensibles à la lectinophagocytose, une variante de la phagocytose. Les souches les plus virulentes de *K. pneumoniae* produisent une capsule ayant une faible affinité aux surfaces cellulaires et sont donc plus résistantes à la phagocytose (**Figure 3**) (Clegg et Murphy, 2016).

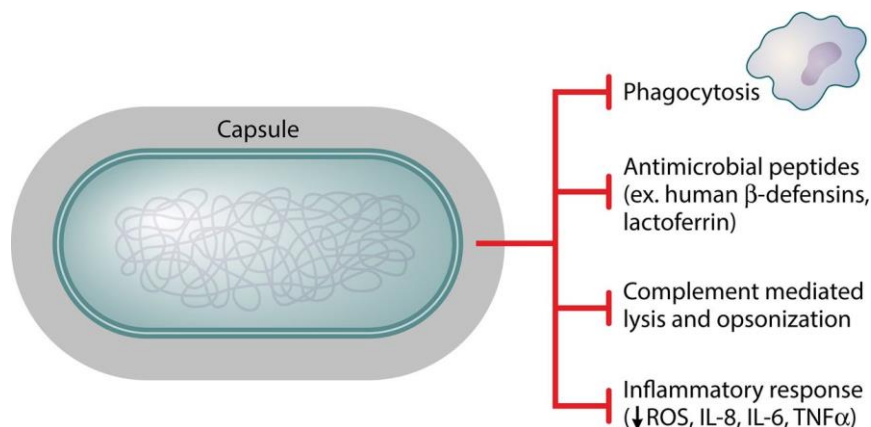


Figure 3 : Rôle de la capsule dans la virulence de *K. pneumoniae* (Paczosa et Meccas, 2016).

II. 2. Lipopolysaccharide

Le LPS comprend trois parties: le lipide A hydrophobe ancré dans la membrane externe et hautement conservé ; l'antigène O qui est le composant le plus externe du LPS et le plus variable ; et le noyau ou « corps » du polysaccharide reliant le lipide A et l'antigène O. Au moins neuf groupes d'antigènes O (O1, O2, O2ac, O3, O4, O5, O7, O8 et O12) ont été identifiés chez *K. pneumoniae*.

La biosynthèse de l'antigène O est réalisée grâce à des enzymes codées par le cluster *wb* composé de six gènes *wzm*, *wzt*, *wbbm*, *glf*, *wbbN* et *wbbO*. L'organisation génétique du cluster *wb* est conservée ; toutefois, les séquences codantes correspondantes sont caractérisées par une forte variation génétique, ce qui explique la variabilité chimique des antigènes O des différents groupes (Li et al., 2014). Le sérotype O1 est le plus commun

parmi les souches cliniques de *K. pneumoniae*, il est également le plus fréquent chez les souches de phénotype HMV (souches invasives) (Hsieh et al., 2012). En effet, l'antigène O de *K. pneumoniae* empêche l'accès des composants du complément aux activateurs de surface (porines et LPS rugueux) et contribue ainsi à la résistance bactérienne à l'effet bactéricide du complément (Figure 4) (Merino et al., 2000).

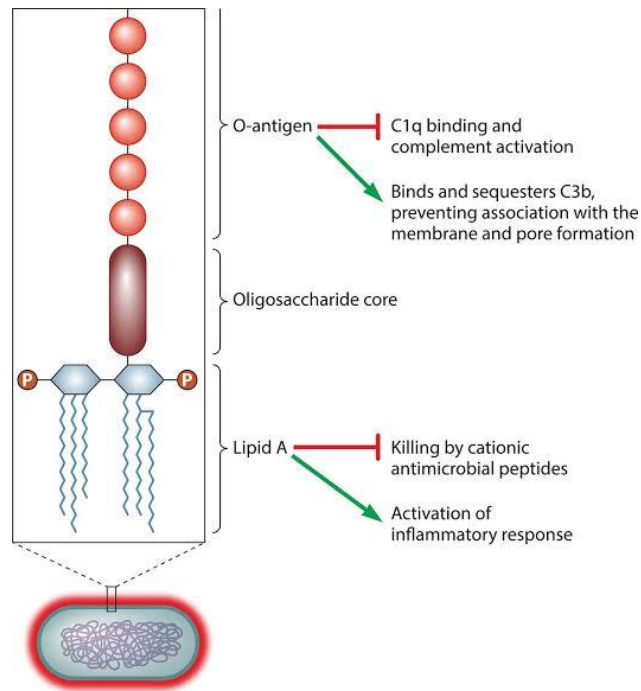


Figure 4 : Rôle du lipopolysaccharide dans la virulence de *K. pneumoniae* (Paczosa et Mecsas, 2016).

II. 3. Adhésines fimbriaires

Les adhésines fimbriaires sont des structures glycoprotéiques non flagellaires, filamenteuses, formant des appendices à la surface des bactéries. Diverses adhésines ont été décrites chez *K. pneumoniae*; les plus étudiées sont les fimbriae de type 1 et 3 (Paczosa et Mecsas, 2016). Ces adhésines sont composées d'une sous-unité fimbriale majeure, de molécules adaptatrices et d'une adhésine proprement dite (Figure 5). Leur expression au cours du processus infectieux, permet de stabiliser le tissu bactérien pour ainsi coloniser les surfaces muqueuses de l'organisme.

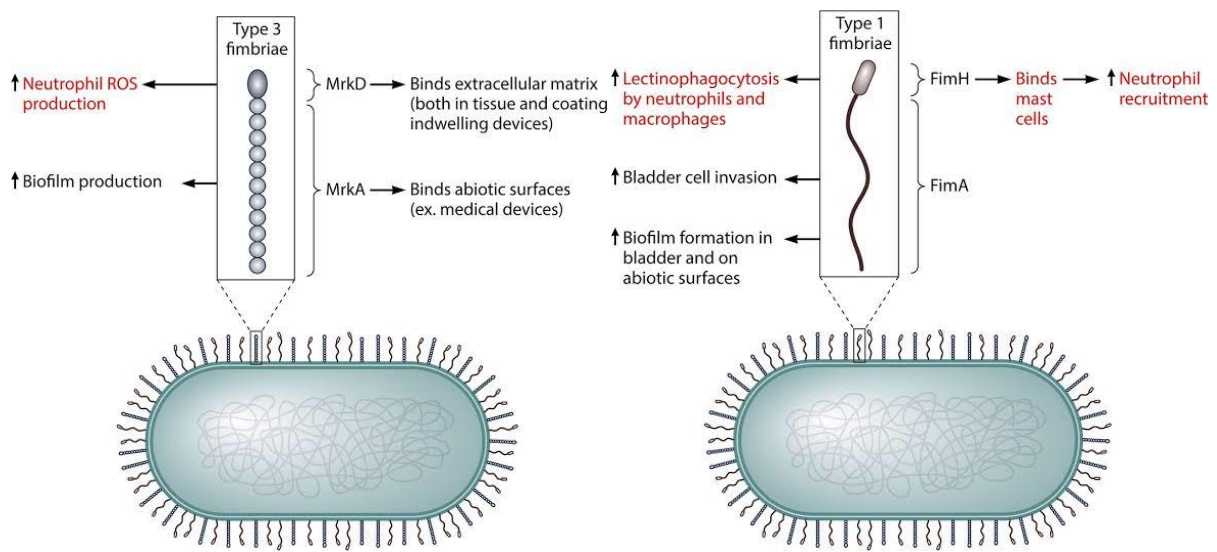


Figure 5 : Fonctions des fimbriae de type 1 et 3 au cours de l'infection à *K. pneumoniae* (Paczosa et Meccas, 2016).

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 et sont impliqués dans la colonisation des tractus respiratoire et urinaire. Les fimbriae de type 1 sont codé par le cluster *fim* chromosomique. La sous-unité majeure des fimbriae de type 1 est codée par le gène *fimA*, alors que les propriétés adhésives sont codées par le gène *fimH*. Ces structures assurent une adhésion mannose-dépendante en interagissant avec divers récepteurs cellulaires et la matrice extracellulaire (Zaho et al , 2014).

Les fimbriae de type 3 sont codés par le cluster de gènes *mrkABCDF*, présent sur le chromosome ou sur le plasmide. La sous-unité majeure est codée par le gène *mrkA*, alors que l'adhésine proprement dite est codée par le gène *mrkD*. Les fimbriae de type 3 adhèrent à différents types cellulaires tels que les cellules endothéliales et épithéliales du système respiratoire, les cellules uroépithéliales ainsi qu'aux protéines de la matrice extracellulaire (Murphy et Clegg, 2012 ; Clegg et Murphy, 2016).

II. 4. Sidérophores

Le fer est essentiel à la croissance bactérienne. Dans notre organisme, le fer ferreux (Fe^{3+}) est non soluble et toxique, il est donc complexé à des protéines de transport telles que

la transferrine la lactoferrine...Les bactéries dont *Klebsiella pneumoniae* ont développé diverses stratégies d'approvisionnement en fer, notamment la production et la libération de sidérophores. Ces derniers sont des métabolites secondaires, de faible poids moléculaire (200 et 2000 daltons) ayant une forte affinité pour le fer ferrique (Fe^{3+}). Ils ont pour rôle de solubiliser, chélater et extraire le fer ferrique de nombreux complexes minéraux ou organiques et de le rendre ainsi accessible aux microorganismes (**Andrews et al., 2003 ; Ferreira et al., 2016**). Ils ont donc la capacité de chélater le fer en entrant en compétition avec les protéines de l'hôte. L'entérobactine, l'aérobactine et la yersiniabactine sont les principaux systèmes de sidérophores mis en évidence chez les souches cliniques de *K. pneumoniae*. Leur implication dans la virulence de cette espèce a été démontrée dans plusieurs études. De plus, il fut rapporté que la production de plus d'un type de sidérophore, par une souche, peut optimiser la colonisation de différents tissus de l'hôte.

Chez *K. pneumoniae*, le cluster de gènes *entABCDEF* code pour la biosynthèse de l'entérobactine. Il est localisé sur le chromosome. Le cluster *fepABCDG* assure le transport de ce sidérophore. La salmochéline est une forme glycosylée de l'entérobactine. Cette dernière est modifiée grâce au produit du gène *iroB*, une glucosyltransférase. IroB est la seule enzyme nécessaire à la conversion de l'entérobactine en salmochélines, la délétion de son gène inhibe sa synthèse (**Bister et al., 2004 ; Lin et al., 2005 ; Garénaux et al., 2011**).

Les gènes de biosynthèse, de transport et de régulation du système de la yersiniabactine sont localisés dans un îlot de pathogénicité de 30 kb, appelé HPI « High-Pathogenicity Island » présent chez des souches hautement pathogènes de *Yersinia pestis*, *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* (**Pelludat et al., 1998**). Cet îlot de pathogénicité a aussi été retrouvé chez diverses espèces d'entérobactéries dont *Klebsiella pneumoniae* (**Xu et al., 2000 ; Schubert et al., 2000 ; Koczura et Kaznowski, 2003**).

L'aérobactine est codée par le cluster *iucABCD* alors qu'*iutA* code pour son récepteur. Ces gènes sont localisés sur le même plasmide porteur de *rmpA*. Ce dernier code pour un facteur de transcription ayant un rôle dans l'amplification de la production de la capsule. De ce fait, l'aérobactine est associée au phénotype d'hypermucoviscosité chez *K. pneumoniae* (**Paczosa et Meccas, 2016**).

II. 5. Biofilm

Les bactéries peuvent adopter deux modes de vie dans l'environnement dans lequel elles évoluent. Elles sont dites planctoniques quand elles sont en flottaison dans un milieu liquide, alors qu'elles sont sessiles et forment un biofilm en adhérant à des surfaces biotiques ou abiotiques. Le biofilm reste le mode de vie le plus courant dans la communauté microbienne puisque plus 99,9% des bactéries vivent au sein de cette structure. Un biofilm est défini comme une communauté microbienne sessile caractérisée par des cellules attachées de manière irréversible à un substrat, une interface ou tout simplement entre elles, enrobées d'une MEC qu'elles ont elles-mêmes produites et qui présentent un phénotype particulier en terme de taux de croissance et de transcription de gènes (**Donlan et Costerton, 2002**).

Le peut se former sur des surfaces naturelles telles que les roches, artificielles telles que les cathéters ou sur des tissus vivants et les muqueuses d'un organisme. Le biofilm se développent pour permettre aux bactéries de se maintenir et de résister dans une niche écologique, où elles pourraient être la cible de certains prédateurs (protozoaires, bactériophages), d'agents toxiques (biocides, antibiotiques), ou sujettes à de nombreux stress environnementaux tels qu'une carence nutritive, des variations de pH, les espèces réactives de l'oxygène et la dessiccation (**Donlan et Costerton, 2002 ; Jefferson, 2004**).

De nombreuses études mettent l'accent sur le problème que constitue le développement d'une telle structure dans la pathogénèse de *K. pneumoniae*. En effet, ce mode d'organisation promeut la persistance des bactéries dans un biofilm et donc l'établissement d'infections chroniques, et ce en les protégeant de l'action des antibiotiques et des défenses de l'hôte et en facilitant la communication bactérienne induisant l'expression de la virulence (**Lavender et al., 2003**).

La formation de biofilm par *K. pneumoniae* est un important facteur de virulence dans la colonisation du tractus gastro-intestinal (**Wu et al., 2011 ; Clegg et Murphy, 2016**). Le biofilm est aussi le point de départ d'infections causées par des dispositifs médicaux comme les cathéters (**Schroll et al., 2010**). *K. pneumoniae* est parmi les espèces communément isolées chez des patients ayant développé d'importants biofilms à la surface des cathéters et autres matériaux chirurgicaux (**Costerton et al., 1999 ; Costerton et al., 2003**).

Matériels et Méthodes

Dans le cadre de l'obtention du diplôme en Sciences de la Nature et de la Vie option Génétique, nous avons réalisé un travail de recherche concernant la pathogénicité des souches cliniques de *Klebsiella pneumoniae*.

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 3 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 une collection de souches cliniques de *K. pneumoniae* (n = 14), issues de divers prélèvements biologiques (Sang = 4, Pus = 4, prélèvement anal = 5, un non déterminé) de patients atteints de cancer. Cette collection a été obtenue 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. Toutes ces informations seront rapportées dans la partie résultats.

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.3.3.

I. 2. 3. Animaux

La virulence des souches de *Klebsiella pneumoniae*, de différents profils de résistance aux antibiotiques, 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.

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 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. Essais de curage plasmidique

Le curage plasmidique a été effectué en vue de vérifier l'origine plasmidique de la résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération, et d'obtenir des souches non productrices de β -lactamases CTX-M.

Le curage plasmidique consiste en la perte d'un ou de plusieurs plasmides d'une souche donnée. Cette perte peut être spontanée mais sa fréquence reste relativement faible de l'ordre de 1/1000. L'utilisation d'agents curants, physiques ou chimiques, augmente de façon significative la fréquence du curage, en inhibant sélectivement la réplication plasmidique. De cette façon, il est possible de vérifier la nature plasmidique d'un ou de plusieurs caractères de résistance aux antibiotiques, en corrélant la disparition de l'ADN plasmidique (par électrophorèse) avec la perte du caractère étudié.

Dans notre travail, nous avons utilisé un agent curant d'origine physique ; la température. Le curage plasmidique par élévation de la température, consiste à cultiver la bactérie à curer dans du milieu LB à 45°C, puis effectuer des passages (deux ou plus) toutes les 24 heures à la même température par dilution au 1/20 dans le même milieu.

Après ces essais de curages, un isolement sur gélose MH est réalisé. Après incubation 24 h à 37°C, on procède à une réplique de 100 clones, à l'aide de cure dents stériles, sur une gélose MH sans et avec du céfotaxime (4 μ g/ml). Un témoin sensible à cet antibiotique est aussi ensemencé sur ces boîtes.

II. 3. Etude du profil de virulence

Afin de déterminer le profil de virulence des 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, la formation de biofilm ainsi que l'effet bactéricide du sérum humain.

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

II. 3. 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. 3. 2. Recherche du phénotype HMV

Le phénotype d'hypermucoviscosité (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. 3. 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 estensemencée 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. 3. 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. 4. 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)**.

Résultats et Discussion

I. Résultats de l'identification bactérienne

Notre étude a concerné 14 souches de *K. pneumoniae* d'origine clinique. Ces souches ont été identifiées à partir de prélèvements 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 14 souches à l'espèce *Klebsiella pneumoniae*. Les souches étant toutes isolées du même service et durant la même période, il aurait été plus judicieux de recourir à l'identification moléculaire pour s'assurer de la non clonalité des souches.

Il existe différents niveaux d'identification d'une bactérie : genre, espèce, sous-espèce, clone, sous-clone... Le typage permet de différencier des souches au sein d'une même espèce, l'objectif étant de rechercher la clonalité entre des souches susceptibles d'être liées génétiquement. Le typage bactérien présente plusieurs champs d'application qu'ils soient à visée épidémiologique, diagnostic ou phylogénétique.

Les marqueurs historiques de l'identification bactérienne sont des caractères phénotypiques, aisément observables, tel que le profil morphologique et biochimique. Ces marqueurs phénotypiques ont peu à peu été abandonnés en raison d'un manque de reproductibilité, mais aussi de leur faible pouvoir discriminant et quelquefois de leur faible typabilité. Face aux performances limitées des marqueurs phénotypiques, de multiples marqueurs génotypiques ont été développés reposant soit sur des techniques de restriction de l'ADN, soit sur l'amplification de gènes. En pratique, 2 techniques sont considérées comme des méthodes de référence : l'électrophorèse en champ pulsé PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) et la technique de MLST (Multilocus Sequence Typing).

La technique de PFGE permet d'obtenir un profil de restriction de l'ensemble du génome d'un microorganisme par digestion de l'ADN grâce à des enzymes de restriction (Talon et al., 1996). La technique de MLST repose sur la séquence nucléotidique de portions de 7 gènes chromosomiques dits « de ménage » faisant partie du core-genome de l'espèce (Maiden et al., 1998). Ces gènes interviennent dans le métabolisme de base de la bactérie et sont, par conséquent, très conservés au cours de l'évolution. L'analyse des séquences est réalisée via une interface web spécifique. Les séquences des 7 gènes étudiés

sont comparées aux séquences de la base de données. Un numéro d'allèle est alors attribué à chaque séquence. La combinaison des 7 numéros obtenus détermine un « Sequence Type » (ST).

L'article de **Lu et al. (2020)**, illustre bien l'intérêt du typage moléculaire dans le cas des infections à *Klebsiella pneumoniae*. 44 souches de *K. pneumoniae* ont été isolées de 2010 à juillet 2019 à partir d'échantillons de selles, provenant de patients atteints de syndrome diarrhéique à Pékin, en Chine. Les souches ont été testées pour leur sensibilité aux antibiotiques et les relations phylogénétiques ont été étudiées par analyse de la séquence du génome entier (WGS). Les allèles de type MLST ont été extraits des données de cette séquence. L'analyse des résultats moléculaire par MLST a révélé 36 ST différents, dont des clones très virulents (ST307 et ST65 ST23) ainsi que le clone ST23 signalé cinq fois à Pékin au cours des 10 dernières années. ST4447, ST4448, ST4449, ST4450, ST4451 et ST4452 ont été observés pour la première fois dans la base de données mondiale. De plus, 3 souches BLSE ont été identifiées (ST307, ST4452 et ST17), hébergeant les gènes *bla_{CTX-M-15}* et *bla_{TEM-1B}*.

L'arbre du maximum de vraisemblance a identifié 36 allèles MLST. Les 44 souches ont été réparties en deux groupes clonaux : le groupe M1 (comportant 7 souches de *K. variicola*) et le groupe M2 (comportant 37 souches de *K. pneumoniae*). L'analyse de la séquence complète du génome des 44 souches, a révélé 3 428 gènes centraux, générant ainsi 40 différences d'allèles qui se sont regroupées dans deux groupes distincts : le groupe C1 (comportant 7 souches de *K. variicola*) et le groupe C2 (comportant 37 souches de *K. pneumoniae*) (**Liu et al., 2020**).

Cette étude insista sur l'apport des études épidémiologiques et moléculaires, dans la compréhension de la dynamique de la résistance aux antibiotiques et de la transmission des gènes de virulence, mais aussi dans la surveillance des épidémies à *K. pneumoniae*. Cette étude conclue, aussi, que l'analyse WGS fournit un pouvoir de discrimination plus élevé et des données fiables et robustes pour l'épidémiologie moléculaire.

Le tableau I résume les données épidémiologiques de la collection de souches sur laquelle nous avons travaillé.

Tableau I : Type de prélèvement, sexe et âge des patients chez qui les souches de *Klebsiella pneumoniae* ont été obtenues (n=14).

| Souches | Prélèvement | Sexe | Âge (ans) | Pathologie/Lieu |
|---------|-------------|-------|-----------|------------------|
| KPs1 | Sang | Homme | 17 | Cancer/CAC Blida |
| KPs2 | Sang | Homme | ND | Cancer/CAC Blida |
| KPs3 | Sang | Homme | 55 | Cancer/CAC Blida |
| KPp1 | Pus | Femme | A | Cancer/CAC Blida |
| KPp2 | Pus | Femme | 84 | Cancer/CAC Blida |
| KPa1 | PV anal | Homme | 44 | Cancer/CAC Blida |
| KPa2 | PV anal | Homme | 55 | Cancer/CAC Blida |
| KPa3 | PV anal | Homme | ND | Cancer/CAC Blida |
| KPa4 | PV anal | Femme | 38 | Cancer/CAC Blida |
| KPa5 | PV anal | Femme | 66 | Cancer/CAC Blida |
| Kp257 | Sang | ND | ND | Cancer/CAC Blida |
| Kp676 | Pus | ND | Femme | Cancer/CAC Blida |
| Kp679 | ND | ND | Femme | Cancer/CAC Blida |
| Kp653 | Pus | ND | Femme | Cancer/CAC Blida |

PV : prélèvement ; ND : Non déterminé ; A : Adulte

L'analyse de ce tableau montre que toutes les souches ont été prélevées chez des patients cancéreux hospitalisés au CHU Frantz-Fanon de Blida. Le sexe ratio H/F est de 1.5 (pour 10 des souches de la collection) et la moyenne d'âge de 51.3 ans (pour 7 souches de la collection). Les souches ont été isolées de divers prélèvements (sang, pus, prélèvement anal).

Chez l'homme, *Klebsiella pneumoniae* est l'un des plus redoutables pathogènes opportunistes, à l'origine de nombreuses infections (infections urinaires, broncho-pulmonaires, septicémies), particulièrement chez les immunodéprimés tels que les cancéreux. *K. pneumoniae* est généralement considérée comme un pathogène nosocomial. 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).

II. Résultats du profil de résistance aux antibiotiques

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 des 14 souches sont résumés dans le **tableau II**. L'analyse du tableau nous a permis de constater que :

- 9 de profils de résistance
- 9 (64.3%) souches étaient multi-résistantes (MDR).
- 11 (78.5%) souches étaient de phénotype BLSE (Kps1, Kps2, Kps3, Kpp2, Kpa1, Kpa2, Kpa3, Kpa4, Kpa5, Kp257, Kp679) (**Figure 6**).
- 3 (21.4%) souches étaient de phénotype Non BLSE (Kp653, Kp676, Kpp1).

Tableau II : Profils de résistance aux antibiotiques des souches cliniques de *K. pneumoniae*.

| Souche | Profils de résistance aux ATBs | Phénotype | Multirésistance |
|--------------|--|-----------|-----------------|
| KPs1 | PR1 : AMC, AM, CZ , CTX, GM , NA, CIP, SXT | BLSE | MDR |
| KPs2 | PR1 : AMC, AM, CZ, CTX, GM, NA, CIP, SXT | BLSE | MDR |
| KPs3 | PR2 : AM, CZ, CTX, GM, SXT | BLSE | MDR |
| KPp1 | PR3 : AM | NBLSE | / |
| KPp2 | PR4 : AM, AMC, CZ, CTX, SXT | BLSE | / |
| KPa1 | PR 5: AM, AMC, CZ, CTX, CIP, SXT | BLSE | MDR |
| KPa2 | PR 5: AM, AMC, CZ, CTX, CIP, SXT | BLSE | MDR |
| KPa3 | PR 6: AM, AMC, CZ, CTX, GM, CIP | BLSE | MDR |
| KPa4 | PR 7: AM, AMC, CZ, CTX, GM, CIP, SXT | BLSE | MDR |
| KPa5 | PR 5: AM, AMC, CZ, CTX, CIP, SXT | BLSE | MDR |
| Kp257 | PR 8 : AM, AMC, CZ, CTX, NA, CIP, SXT | BLSE | MDR |
| Kp676 | PR 9: AM, AMC, CZ, CIP | NBLSE | / |
| Kp679 | PR 5: AM, AMC, CZ, CTX, CIP | BLSE | / |
| Kp653 | PR 9: AM, AMC, CZ, CIP | NBLSE | / |

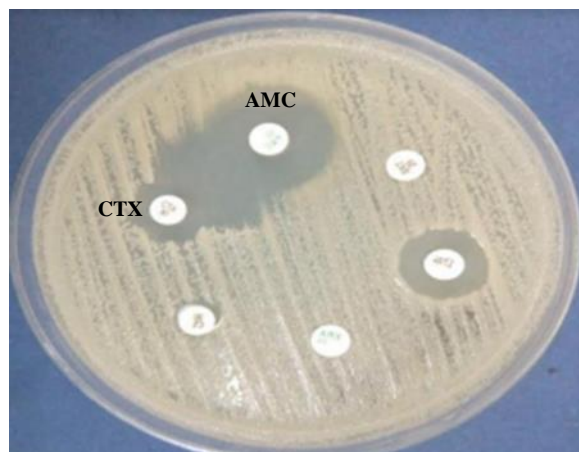


Figure 6 : Détection du phénotype BLSE.

Observation d'une image de synergie entre le disque d'AMC et de CTX

Le phénotype BLSE est probablement lié, chez nos souches, à la production d'enzymes de type CTX-M vu les profils de résistance qui ont tous en commun la résistance au céfotaxime. Notre étude révèle aussi une diversité des profils de résistance, reflétant ainsi une diversité génétiques dans les allèles des gènes correspondants.

Si l'on considère l'ensemble des antibiotiques testés, un taux de 64.3% des souches étaient de phénotype MDR (résistantes à au moins un antibiotique appartenant à trois familles différentes). Des taux de 94%, 84.3% 61% et de 55% ont été rapportés par **Lev et al. (2018)**, **Aljanaby et Alhasani (2016)**, **Li et al. (2012)** et **Chakraborty et al. (2016)** respectivement. L'incidence clinique croissante des bactéries résistantes aux antibiotiques est un problème majeur dans les unités de soins partout dans le monde, en particulier lorsque les infections sont causées par des agents pathogènes multirésistants qui imposent d'importantes charges tant pour les patients que pour les cliniciens. *K. pneumoniae* est l'une des espèces les plus dangereuses au monde du fait de sa multirésistance à pratiquement tous les antibiotiques disponibles aujourd'hui (**Kumar et al., 2011 ; Braykov et al., 2013 ; Woldu et al., 2016**).

Durant ces dernières années, les BLSE de type CTX-M constituent désormais 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 pandémie (Canton et Coque, 2006). La prédominance des phénotypes de résistance acquise aux β -lactamines, avec un taux élevé de souches productrices de BLSE, reflète le fort pouvoir d'adaptation des souches de *K. pneumoniae* en milieu hospitalier face à la pression sélective très forte des antibiotiques. 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. Différents éléments génétiques ont été retrouvés à proximité des gènes *bla*_{CTX-M}, certains d'entre eux sont responsables de leur mobilisation. Les séquences d'insertion ISEcp1-like ont été associées à la majorité des gènes des différents groupes CTX-M dont le groupe CTX-M-1 (Zhao et Hu, 2013). L'étude de l'environnement génétique de la résistance est indispensable. La lecture interprétative de l'antibiogramme seule, comme nous l'avons faite, n'est pas suffisante si l'on veut avoir des données précises concernant i) les mécanismes de résistance, ii) le potentiel de transmission à d'autres espèces et iii) la vitesse de diffusion des clones résistants.

Dans notre étude, le support plasmidique de la résistance aux C3G, a été confirmé par des essais de curage sur les souches BLSE. En effet, après culture bactérienne en plusieurs passages et incubation à des températures élevées (45°C), nous avons pu obtenir de nouvelles souches « curées » sensibles aux C3G, ayant donc perdu le caractère BLSE (Figure 7, tableau III).

Tableau III : Résultat du curage plasmidique chez 9 souches BLSE de *K. pneumoniae*.

| Souches BLSE | Clones analysés (n) | Clones curés (n, %) |
|--------------|---------------------|---------------------|
| Kpa4 | 38 | 7 (18.42) |
| Kp275 | 44 | 00 (0) |
| Kps2 | 40 | 00 (0) |
| Kpa2 | 39 | 00 (0) |
| Kps1 | 40 | 29 (72.5) |
| Kpp2 | 40 | 6 (15) |
| Kpa3 | 33 | 00 (0) |
| Kps3 | 35 | 00(0) |
| Kpa5 | 42 | 00 |

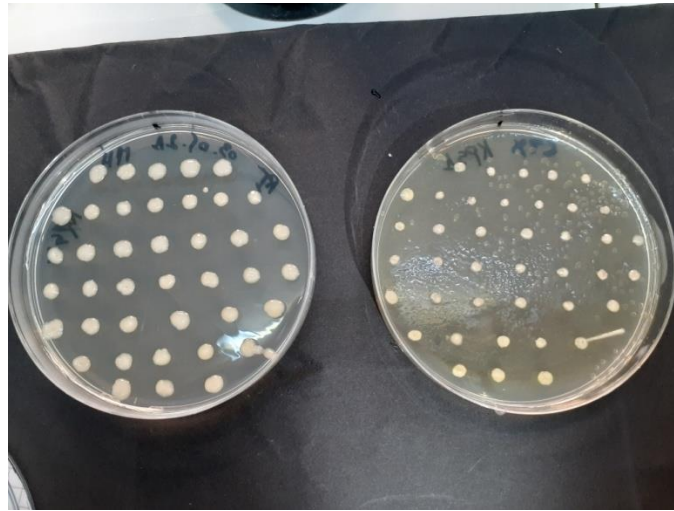


Figure 7 : Observation de clones curés de la souche kps1.

L'analyse du **tableau III** montre que sur 9 souches BLSE soumises au curage, seules 3 ont généré des souches curées dépourvues du caractère BLSE. La souche Kps1 a obtenu le taux de curage le plus important, avec 29 souches curées sur 40 analysés.

Ce nouveau phénotype « sensible aux C3G » est attribué à la perte du plasmide porteur du gène codant la BLSE en question (probablement le gène *bla_{CTX-M}*). La température élevée, lors de l'incubation, a rendu les plasmides qu'hébergent les souches, instables, ce qui a conduit à des défauts de répllication et de partition entre les cellules filles après division cellulaire.

L'instabilité plasmidique peut se définir comme la variation du nombre de plasmides dans les cellules ou leur modification. La distribution du nombre de copies de plasmides lors de la division cellulaire dépend de deux phénomènes totalement indépendants: la répllication et la partition. En effet, l'instabilité plasmidique peut être, dans certains cas, directement reliée au phénomène de partition ; Il s'agit de l'instabilité plasmidique ségrégationnelle. Elle peut également être le fait de changements physiques dans la structure de l'ADN plasmidique (insertions, délétions, réarrangements). Il s'agit de l'instabilité structurale.

L'effet de la température a été étudié par **Wouters et al. (1980)** sur la souche *E. coli* PC221 (pBR322). Ils ont montré que l'apparition de cellules dépourvues de plasmide survenait plus tôt lorsque la température de culture était plus élevée (42°C au lieu de 37°C). **Cortinho et Hjortso (1988)** ont obtenu des résultats identiques avec *E. coli* B (pECA306).

Ces auteurs ont de plus démontré que l'augmentation de l'acidité du milieu de culture contribuait à augmenter la probabilité de perte de plasmide.

III. Résultats du profil de virulence

La capsule était présente chez toutes les souches de notre collection. 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 8**). Ce résultat étaient attendus puisque la majorité des souches de *K. pneumoniae* produisent une capsule polysaccharidique particulièrement celles d'origine clinique (**Podshunn et Ulman, 1998**).

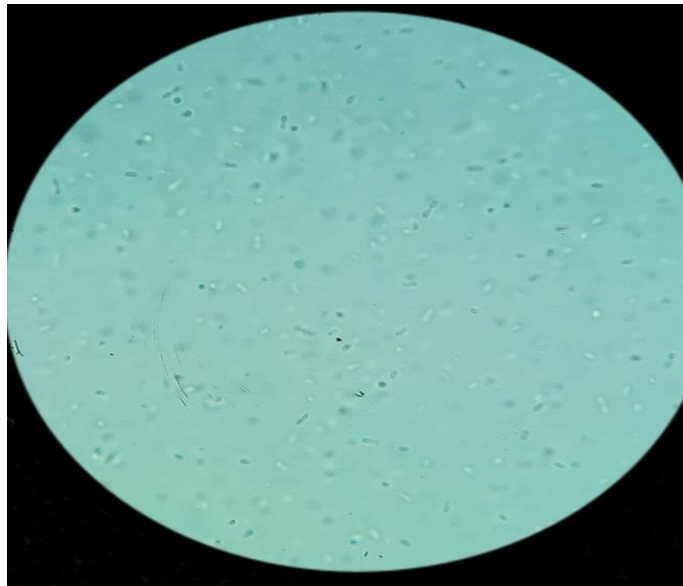


Figure 8 : Observation de la capsule sous microscope photonique (G x 100).

Nos résultats sont en accord avec ceux d'**El Fertas-Aissani et al. (2013)**. Cependant, il aurait été intéressant de réaliser un typage moléculaire de la capsule afin de connaître les sérotypes prédominant dans nos services, de prédire les interactions avec l'hôte et enfin de choisir la meilleur stratégie thérapeutique. Le typage moléculaire de la capsule cible généralement les gènes *wzy* et *wzi*, retrouvés dans tous les types capsulaires (**Pan et al., 2015**). C'est leur séquence variable d'un type à un autre qui a permis de les utiliser dans le

typage moléculaire de certains sérotypes capsulaires, notamment les plus virulents comme K1, K2, K5, K20, K54 et K57 (Turton *et al.*, 2010).

La capsule constitue un important facteur de virulence car elle protège la bactérie de la phagocytose, empêche l'activation du système du complément, en plus de l'effet anti-inflammatoire qu'elle induit. Cependant, cette virulence est l'apanage de certains sérotypes seulement. En effet, la structure et la composition capsulaire semble déterminer le niveau de virulence de la capsule (Clegg et Murphy, 2016). De cette façon, une capsule riche en résidus Man- α -2-Man (Ex : K21a) sera la cible de la lectinophagocytose (Athamna *et al.*, 1991); ces résidus étant reconnus par les récepteurs type lectine présents à la surface de la cellule phagocytaire. Le sérotype K1 et K2 sont, à ce jour, les plus virulents (Remya *et al.*, 2019).

La surproduction des polysaccharides capsulaires conduit à l'apparition du phénotype d'hypermucoviscosité HMV. Les colonies apparaissent alors mucoïdes avec un fort taux de viscosité. Nous avons recherché le phénotype HMV et les résultats montrent que 3 souches étaient (HMV+) toutes de phénotype BLSE (Figure 9). 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.

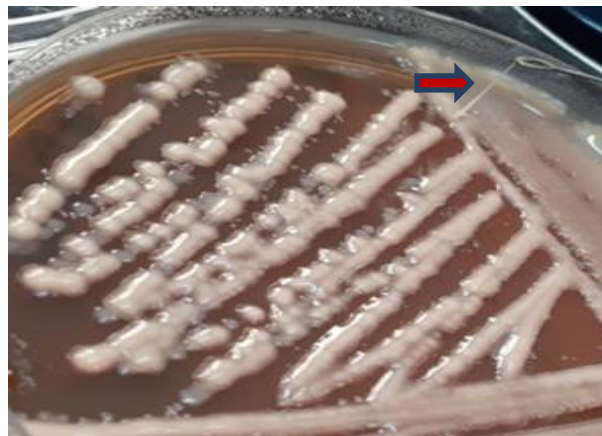


Figure 9 : Phénotype HMV observée chez la souche BLSE.

Le contrôle de l'expression des gènes *cps* fut initialement attribué à la protéine RcsB impliquée dans la biosynthèse de l'acide colique. Plus tard, la protéine RmpA a été décrite et semblait activer l'expression des gènes *cps*. Le gène *rmpA* (*regulator of the mucoid phénotype*

A) responsable du phénotype HMV a été rapporté pour la première fois par **Nassif et al. (1989)**. Trois allèles de ce gène ont été identifiés, deux d'entre eux (dont l'isoforme *rmpA2* rapporté chez une souche (CG43) de *K. pneumoniae* de sérotype K2 et partageant plus de 80% d'homologie avec *rmpA*) sont codés par un plasmide alors que le troisième est chromosomique. La distribution de ces allèles varie en fonction des sérotypes et de la région géographique où furent isolées les souches. L'excès de production de RmpA favorise le phénotype HMV et par conséquent influence positivement la virulence des souches de *K. pneumoniae* (**Clegg et Murphy, 2016**).

L'hypermucoviscosité est, généralement, décrite chez des souches cliniques hypervirulentes de *K. pneumoniae* de sérotypes K1 et K2, principalement dans le Sud-Est asiatique. Dans ces pays, ces souches sont à l'origine d'un syndrome invasif avec des taux de morbidité et mortalité importantes (**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. Les souches hypervirulentes hvKP productrices de carbapénémases, sont de plus en plus isolées dans les milieux hospitaliers. Une situation qui inquiète beaucoup les cliniciens, surtout quand il s'agit des patients immunodéprimés (**Liu et al., 2019**). Néanmoins, cette association n'est pas toujours démontrée. Les données ne sont pas encore concluantes.

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 classer les souches dans deux phénotypes : sensible (S) et résistant (**Figure 10**), sur la base de la présence ou non d'une zone d'inhibition à l'endroit du spot. Les résultats montrent que la quasi-totalité des souches étaient résistantes au sérum humain (n=12 ; 86%). Seules 2 souches en étaient sensibles, une BLSE et une non BLSE.

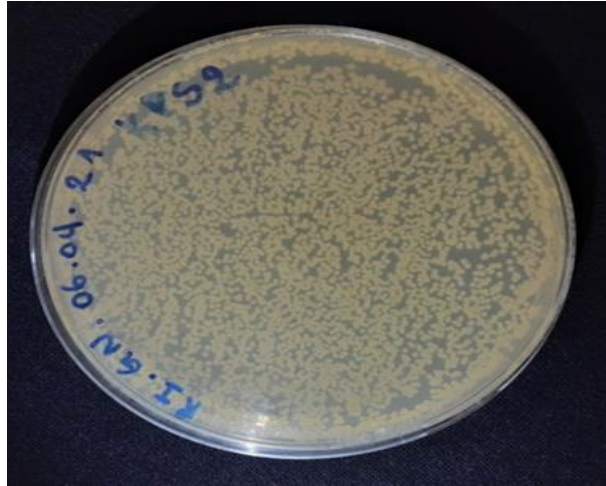


Figure 10 : Résultats de la recherche de l'effet bactéricide du sérum humain (Phénotype résistant au sérum ; R).

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 (Doorduijn 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.

Toutes les souches objets de notre étude pouvaient former un biofilm dont l'intensité fut mesurée, dans 3 expériences indépendantes, par la méthode d'absorption du cristal violet. Les résultats des densités optiques sont rapportés dans le **tableau IV**.

Tableau IV : Résultat de la recherche de la formation de biofilm.

| | Souches | DO | DO | DO | Moyenne |
|-----------------|---------|-------|-------|-------|---------|
| BLSE | Kps1 | 0.072 | 0.73 | 0.087 | 0.29 |
| | Kps2 | 0.108 | 0.193 | 0.101 | 0.13 |
| | Kpa4 | 0.236 | 0.246 | 0.289 | 0.25 |
| | Kp257 | 0.293 | 0.321 | 0.368 | 0.32 |
| | Kpa3 | 0.317 | 0.321 | 0.349 | 0.32 |
| | Kpa5 | 0.395 | 0.449 | 0.421 | 0.42 |
| | Kpa1 | 0.373 | 0.378 | 0.409 | 0.39 |
| | Kpp2 | 0.398 | 0.374 | 0.368 | 0.38 |
| | Kps3 | 0.382 | 0.354 | 0.382 | 0.37 |
| | Kpa2 | 0.370 | 0.359 | 0.319 | 0.35 |
| NON BLSE | Kp653 | 0.363 | 0.327 | 0.372 | 0.35 |
| | Kp676 | 0.393 | 0.395 | 0.343 | 0.37 |
| | Kp679 | 0.306 | 0.291 | 0.288 | 0.88 |

Il ressort de l'analyse de ce tableau que la quasi-totalité des souches, quel que soit leur profil de résistance, formaient un biofilm de moyenne intensité avec une DO évaluée entre 0.1 et 0.5. Une seule souche non BLSE (Kp679) a formé le biofilm avec une forte intensité : > 0.5 (0.8).

Nos résultats sont en accord avec les résultats d'Aljanaby et Alhasani (2016), El Ferta-Aïssani et *al.* (2013), Shon et *al.* (2012).

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 (**Tremblay et al., 2014**).

A la lumière des résultats obtenus, nous avons constaté que les souches de notre collection, présentent un potentiel de virulence. En plus de la multirésistance que nous avons observée, il semblerait aussi que ces bactéries sont 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. Les phénotypes mis en évidence pourraient être de type « classique » (cKP) ou « hypervirulent » (hvKP). Nous ne pouvons-nous avancer sur le phénotype exacte de ces souches faute de test génotypique. En effet, seule la biologie moléculaire peut les discriminer.

Ce potentiel de virulence a été mis à l'épreuve en tentant une estimation de la dose létale 50 (DL50). Le test de survie a été réalisé sur des souris BALB/C, en utilisant deux types de souches :

- Une souche BLSE, la Kpp2 exprimant tous les facteurs de virulence recherchés.
- Une souche Non-BLSE, la Kp653 exprimant tous les facteurs de virulence recherchés.

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. Nous avons refait le test une deuxième fois et le résultat était le même. Cet échec pourrait être attribué à de nombreux facteurs, dont ceux d'ordre expérimental. Parmi les facteurs expérimentaux influençant le test de survie nous citerons : La concentration de l'inoculum et le choix du milieu de culture.

IV. Analyse d'articles

Notre travail a concerné l'étude de la pathogénicité de 14 souches cliniques de *K. pneumoniae*, appartenant à deux phénotypes de résistance aux antibiotiques (BLSE et non BLSE), à travers la recherche de quelques facteurs de virulence sur le plan phénotypique. Dans l'idéal, ce travail devrait être complété par la recherche des profils moléculaires de virulence. En effet, si sur le plan phénotypique, nous mettons en évidence un facteur donné, ce même facteur peut être codé par plusieurs gènes différents, ou bien les produits de plusieurs gènes concourent à l'assemblage d'un seul facteur. De cette façon, si l'on arrive aisément à mettre en évidence, sous microscope photonique la capsule, il nous est impossible de déterminer le sérotype de cette capsule et donc son pouvoir pathogène. Les résultats que nous avons obtenus sont donc insuffisants pour avoir une idée plus précise sur la pathogénicité et la virulence de ces souches.

Il fut impossible pour nous de réaliser le volet moléculaire de cette étude, du fait de l'inexistence d'une plateforme de biologie moléculaire au sein de la station expérimentale où nous avons travaillé. Afin de pallier ce manque, nous avons analysé différents articles traitant de la pathogénicité mais aussi de la résistance aux antibiotiques de souches cliniques de *K. pneumoniae*.

Nous avons étudié 8 articles publiés entre 2016 et 2020. Les caractéristiques expérimentales de chaque article sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau V: Caractéristiques expérimentales de 8 publications sur la virulence de *K. pneumoniae*

| Références | Souches (n, origine) | Prélèvements | Identification moléculaire / clones ST | Gènes de résistance recherchés | Gènes de virulence recherchés |
|-----------------------|-----------------------|---|--|---|---|
| Albasha et al. (2020) | 60 souches cliniques. | <ul style="list-style-type: none"> - Urines : 61,7 % - Sang : 23,3% - Ecouvillonnage rectal : 8,3 - Expectorations : 6,7% | - <i>rARN16S</i> | - Résistance aux carbapénèmes : <i>bla_{oxa-48}</i> , <i>bla_{NDM}</i> , <i>bla_{IMP}</i> , <i>bla_{KPC}</i> | <ul style="list-style-type: none"> -Adhésine : <i>mrk D</i> -sidérophores : <i>entB</i> - Capsule : K1, K2 Absorption du fer : <i>kfu</i> - Facteur mucoïde : <i>rmp A</i> |
| Liu et al. (2019) | 117 souches cliniques | <ul style="list-style-type: none"> - LCR - Plaies - Urines | - ERIC-PCR | <ul style="list-style-type: none"> - Résistance aux carbapénèmes : <i>bla_{KPC}</i> et <i>bla_{NDM}</i>, <i>bla_{VIM}</i>, <i>bla_{GES}</i>, <i>bla_{DIM}</i>, <i>bla_{GIM}</i>, <i>bla_{SPM}</i> et <i>bla_{AIM}</i> - BLSE : <i>bla_{TEM}</i>, <i>bla_{SHV}</i>, <i>bla_{CTX-M}</i>, <i>bla_{CTX-M-1}</i>, <i>bla_{CTX-M-2}</i> et <i>bla_{CTX-M-9}</i> - β-lactamase AmpC : <i>bla_{DHA}</i>, <i>bla_{CMY}</i> - Résistance aux sulfamides : <i>sul1</i>, <i>sul2</i> et <i>sul3</i> - Résistance au chloramphénicol : <i>cmlA</i>, <i>floR</i> et <i>catB</i> - Résistance aux quinolones : <i>qnrA</i>, <i>qnrB</i>, <i>qnrS</i>, <i>aac (6')</i> -<i>IB-cr</i>, <i>qepA</i> et <i>oqxAB</i> | <ul style="list-style-type: none"> -la capsule : <i>rmpA</i>, <i>wcaG</i>, . phénotypeHv : <i>magA</i>, <i>rmpA</i>, <i>iutA</i> Sidérophores : <i>iroBCDE</i>, <i>entB</i>, <i>ybtS</i>. Gène de métabolisme de l'allantoïne: <i>allS</i>. Absorption du fer : <i>kfu</i> -Adhésine et fimbriae : <i>fimH</i>, <i>mrkD</i> |

Tableau V: Caractéristiques expérimentales de 8 publications sur la virulence de *K. pneumoniae* (Suite)

| Références | Souches (n, origine) | Prélèvements | Identification moléculaire / clones ST | Gènes de résistance recherchés | Gènes de virulence recherchés |
|------------------------------|------------------------|---|--|--|---|
| Remya et al. (2019) | 370 souches Cliniques. | - Urines - Echantillons exsudatifs - Sécrétions respiratoires (lavage bronchique). - Sécrétion endotrachéal , lavage broncho-alvéolaire liquide pleural - Sang. | / | - BLSE : <i>TEM</i> , <i>SHV</i> et <i>CTX-M</i> - AmpC à médiation plasmidique , beta lactamases, et carbapénémases : <i>KPC</i> , <i>IMP</i> , <i>VIM</i> , <i>NDM</i> et <i>OXA-48</i> . | -Gène A associé à la mucoviscosité: <i>magA</i> . -Gène de métabolisme de l'allantoïne : <i>allS</i> . -Absorption de fer ferrique : <i>Kfu</i> . -Gène associé à la capsule : <i>rmpA</i> , <i>K2A</i> , <i>uge</i> . -régulateur du phénotype A mucoïde : <i>rmpA</i> -Sidérophores : <i>entB</i> <i>YbtS</i> -Adhésine fimbriale <i>FimH</i> <i>uge</i> . |
| Andrade et al. (2018) | 50 souches Cliniques. | - Sang : 54 % -urine :18 % - patients hospitalisés en urologie : 47 %. | - PFGE - MLST | BLSE (CTX-M, TEM, SHV), AmpC acquis (CMY, MOX, FOX, LAT, ACT, MIR, DHA, MOR, ACC) des carbapénémases (KPC, IMP, VIM, NDM, SPM, OXA-48).. | -Capsule : <i>wzi</i> , <i>uge</i> , <i>wabG</i> , <i>rmpA</i> . -Adhésine fimbriale: <i>fimH</i> , <i>mrkD</i> . -Absorption du fer : <i>kfuBC</i> , -Phénotype mucoïde A : <i>ureA</i> , <i>rmpA</i> . -Phénotype H _v : <i>magA</i> , <i>rmpA</i> , <i>iutA</i> . -Sédérophores : <i>entB</i> , <i>ybtS</i> , -Gène de métabolisme de l'allantoïne : <i>allS</i> . |

Tableau V: caractéristiques expérimentales de 8 publications sur la virulence de *K. pneumoniae* (Suite)

| Références | Souches (n, origine) | Prélèvements | Identification moléculaire / clones ST | Gènes de résistance recherchés | Gènes de virulence recherchés |
|-----------------------------|-----------------------|---|--|---|---|
| Shah et al. (2017) | 96 souches Cliniques. | - Voies respiratoires. | / | - <i>SHV, TEM, CTX-M.</i> | - La capsule : K1,K2, <i>rmp A, uge, wzy</i> - Absorption du fer : <i>kfu</i> ,. - Adhésine fimbriale : <i>FimH-1, mrk D.</i> le gène A associé à la mucoviscosité : <i>mag A.</i> |
| Lev et al. (2018) | 148 isolats Cliniques | - Système respiratoire : 57 % - Urines : 30 % - Plaies : 5 % - LCR : 4 % - Sang : 3% - Prélèvement anal : 1% | - MLST | - <i>bla TEM, bla SHV, bla CTX-M, bla OXA-48-like, bla NDM, bla KPC, bla VIM, bla IMP, ompK36</i> | - La capsule : <i>rmpA, uge2, wabG,</i> - Absorption du fer : <i>aer, kfu</i> - Fimbriae : <i>fimH</i> - Gène de métabolisme de l'allantoïne : <i>allR.</i> |
| Aljanaby et Alhasani (2016) | 32 souches cliniques | - Urines : 13 - Brûlures : 12 - Crachats : 4 - Sang : 3 | / | - <i>TEM, SHV</i> | - La capsule : <i>rmpA, uge, wabG.</i> - Fimbriae : <i>fimH</i> - Sidérophores : <i>ycfM, entB, irp-2</i> - Absorption du fer : <i>kfu</i> |
| Derakhshan et al. (2016) | 200 isolats cliniques | - Sécrétions trachéales - Urines - Sang | - Région intergénique 16S-23S | - Intégron de classe 1 et 2 | - La capsule : <i>rmpA, wcaG</i> |

A partir des données du **tableau V** nous constatons que :

- Toutes les souches étaient d'origines cliniques. Elles ont été prélevées de services hospitaliers à partir de différents prélèvements, tout particulièrement, le sang, les urines et les expectorations.
- Les souches isolées ont été identifiées par les techniques classiques, à savoir l'identification biochimique (qu'elle soit automatisée ou semi-automatisée).
- Dans 5 publications, l'identification biochimique fut complétée par une identification moléculaire, par MLST, PFGE, ERIC-PCR ou séquençage du gène *rARN16S*. Ceci a permis aux auteurs de confirmer (parfois infirmer) les résultats de l'identification classique, de s'assurer que les souches ne sont pas clonales et enfin de déterminer les « sequence type » prédominants.
- L'environnement génétique de la résistance aux antibiotiques fut recherché en ciblant plusieurs gènes, notamment ceux codant la résistance aux C3G (*bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX}*) ainsi qu'aux carbapénèmes (*bla_{KPC}*, *bla_{oxa-48}*).
- De même que pour la résistance aux antibiotiques, de nombreux gènes de virulence furent recherchés qu'ils codent pour la capsule (*magA*), l'hypermucoviscosité (*rmpA*) le LPS, les adhésines (*fimH*, *mrkD*...), les sidérophores (*entB*, *iroN*, *iutA*...), l'urase (*ureA*).

Toutes les équipes de recherche avaient pour principaux objectifs de :

- Déterminer le profil de résistance aux antibiotiques
- Déterminer le profil de virulence.
- Analyser l'association résistance / Virulence.

L'essentiel des résultats obtenus par ces équipes de recherche est résumé dans le **tableau VI**

Tableau VI: Résultats des profils de résistance / Virulence

| Références | Clones ST | Profil moléculaire de résistance | Profils moléculaire de virulence | Association virulence / résistance |
|------------------------------|--|---|---|---|
| Albasha et al. (2020) | | BLSE : 100% | 16,7% de souches hvKP 83,3% de souches cKP | Faible association entre les gènes de virulence et résistance sauf entre <i>ent B</i> et <i>NDM</i> . |
| Liu et al. (2019) | | 24 souches BLSE : 20.51% 93 souches non BLSE : 79.49% | 20 souches cKP 4 souches hvKP | Il y a une association significative entre la virulence et la résistance. |
| Remya et al. (2019) | | 218 souches BLSE : 58.92%. 152 souches non BLSE : 41.08%. | 349 souches cKP 21 souches hvKP | Il y aucune association significative entre la mortalité et l'un des facteurs de virulence. |
| Andrade et al. (2018) | ST11, ST15, ST17, ST25, ST48, ST76, ST101, ST219, 252, ST340 | 33 souches BLSE. : (66%) 4 souches KPC (8%) 13 souches non BLSE : (26%) | | Il y a une association entre la virulence et la résistance. |
| Shah et al. (2017) | | 37 souches BLSE : (38.54%) 59 souches non BLSE : (61.46%) | 57 souches cKP . 39 souches hvKP | Il y a une association significative entre la virulence et la résistance |
| Lev et al. (2018) | ST23 (n=12), ST218 (n=7), ST86 (n=4), ST147 (n=4), ST48 (n=2), ST395 (n=2), ST20 (n=1), ST65 (n=1), ST833 (n=1), ST2280 (n=1) et ST2174 (n=1) | BLSE : 100% MDR : 94% | 15 % de souches hvKP 75% de souches cKP | / |

Tableau VI: Résultats des profils de résistance / Virulence (Suite).

| Références | Profil moléculaire de résistance | Profils moléculaire de virulence | Association virulence / résistance |
|------------------------------------|---|---|---|
| Aljanaby et Alhasani (2016) | BLSE : 62.5 % MDR : 84.3% XDR : 12.5% | 62,5%./ hvKP 37.5 % cKP | Relation positive entre la production de BLSE et les facteurs de virulences. |
| Derakhshan et al. (2016) | BLSE : 57,5 % NON BLSE : 42.2% | / | Présence de relation significative entre les gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques. |

L'analyse du **tableau VI** révèle que :

- Les souches de *K. pneumoniae* des différentes collections sont non clonales
- Deux études ont identifié des clones ST
- Le clone ST le plus fréquent chez **Andrade et al. (2018)** est le ST11 du groupe CG258. Ce clone est associé à la production des enzymes de type CTX-M2 et KPC-2 seules ou en même temps.
- Deux nouveaux clones avec un nouveau profil allélique ont été identifiés par **Lev et al. (2018)**. Il s'agit de ST2280 et ST2174.
- L'étude **Lev et al. (2018)** est la première à avoir signalé la souche *K. pneumoniae* KPB2580-14, hypervirulente, de clone ST23K1 et hébergeant des gènes plasmidiques *CTX-M-15* et *OXA-48*.
- Des souches productrices de BLSE, parfois de carbapénèmases aussi, ont été identifiées dans toutes les études et avec des proportions atteignant parfois les 100%. De plus, des souches MDR voir XDR ont été mises en évidence dans toutes les études.
- Les deux phénotypes de virulence, cKP et hvKP, de *K. pneumoniae* ont été signalées dans toutes les études. Les proportions du phénotype Khv sont parfois inquiétantes, comme nous pouvons le voir chez **Shah et al. (2017)**.
- La majorité des articles ont suspecté une association/liaison entre la virulence et la résistance aux antibiotiques chez les souches de *K. pneumoniae*. Par exemple, il a été trouvé que les souches hvKP produisant les BLSE étaient significativement associées à une forte formation de biofilm ($P < 0,05$) et fortement associé à l'effet bactéricide du sérum ($P < 0,05$) que les souches cKP non BLSE.
- Le phénotype d'hypermucoviscosité est associé aux souches les plus virulentes. Par exemple, **Lev et al. (2018)** ont introduit une mutation ponctuelle dans le gène *rmpA*. Le mutant obtenu avait perdu le phénotype d'hypermucoviscosité et sa virulence avait significativement diminuée alors que la DL50 de la souche sauvage était $\leq 10^4$.

La résistance aux antibiotiques chez les bactéries est liée à la présence de mutations chromosomiques ou à l'acquisition de gènes de résistance, souvent portés par des éléments génétiques mobiles, qui permettent à la bactérie de survivre malgré la pression sélective des antibiotiques. Ces mutations chromosomiques s'accompagnent souvent d'un coût biologique pour la bactérie, ce coût est plus faible avec l'acquisition de plasmides de résistance. Ainsi, la résistance des bactéries aux antibiotiques est associée dans la plupart des cas, directement ou indirectement, à une diminution de leur virulence et de leur compétitivité (« fitness »).

Cependant, certaines données montrent également le contraire, et il est de plus en plus évident que la relation est souvent d'un plus grand bénéfice pour l'agent pathogène, ce qui complique davantage la situation et constitue un sérieux problème de santé publique.

L'avènement de souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE s'est accompagné de taux élevés de morbidité et de mortalité (**Bennett et al., 2010**), probablement en raison d'une forte virulence de ces souches. Les premiers travaux sur la relation entre la virulence et la résistance aux antibiotiques chez *K. pneumoniae* datent des années 1990-2000, quand les BLSE de type TEM et SHV étaient prédominantes. Ces travaux ont montré que l'acquisition de BLSE augmente les capacités de virulence des souches, du fait de la localisation des gènes de BLSE sur des plasmides codant des facteurs de virulence (**Darfeuille-Michaud et al., 1992 ; Di Martino et al., 1996 ; Livrelli et al., 1996 ; Di Martino et al., 1997**). Les plasmides porteurs des gènes de BLSE peuvent aussi porter des gènes non pas de virulence mais de régulateurs transcriptionnels qui augmentent la virulence.

Conclusion

Notre travail avait pour objectif d'étudier la pathogénicité de *Klebsiella pneumoniae*, à travers l'analyse des profils de virulence et de résistance aux antibiotiques de 14 souches cliniques. Les souches ont été obtenues du Centre anti-Cancer de l'hôpital Frantz-Fanon de Blida, à partir de prélèvements biologiques de patients cancéreux. Les résultats de notre étude ont montraient que :

- 71.43 % des souches présentent le phénotype BLSE.
- 9 profils de résistance et 64.29 % des souches multi-résistantes (MDR) ont été mis en évidence.
- 21.42% des souches BLSE étaient positives pour le test de curage plasmidique.
- La totalité des souches présentaient une capsule. Alors que le phénotype HMV ne concernait que 21.43% des souches, toutes des BLSE.
- La quasi-totalité des souches (85.71%) produisaient un biofilm sur une surface abiotique.

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.

Notre étude révèle que de nombreux facteurs de virulence sont exprimés par l'ensemble des souches, ce qui suggère un certain potentiel de virulence en plus de la multirésistance. Cette situation est particulièrement dangereuse pour les patients infectés, connaissant leur fragilité et leur immunodépression, et les différentes maladies sous-jacentes associées à leur cancer. Il est donc plus qu'urgent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour traiter les infections à *K. pneumoniae*, puisque l'antibiothérapie reste, souvent, impuissante, devant des cas très sévères tels qu'une septicémie.

En perspectives à ce travail, nous pourrions caractériser sur le plan génétique la résistance et la virulence de ces souches, et ce en recherchant les gènes codant ces deux entités. Il serait aussi très intéressant de rechercher le support génétique de la résistance aux antibiotiques et de la virulence et vérifier si une association physique entre eux peut exister. Aussi, il est impératif pour nous de refaire le modèle murin d'infection à *K. pneumoniae*, en modifiant les paramètres expérimentaux.

Aljanaby and Alhasani (2016) .Virulence factors and antibiotic susceptibility patterns of multidrug resistance *Klebsiella pneumoniae* isolated from different clinical infections.

Andrade ; et al (2018) Virulence genes, capsular and plasmid types of multidrug-resistant CTX-M(-2, -8, -15) and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from four major hospitals in Brazil.

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.

Athamna A, Ofek I, Keisari Y, Markowitz S, Dutton GG, Sharon N. 1991. Lectinophagocytosis of encapsulated *Klebsiella pneumoniae* mediated by surface lectins of guinea pig alveolar macrophages and human monocyte-derived macrophages. *Infect Immun* 59:1673–1682.

Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J. 2009. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 48:1–12.

Borer A, Saidel-Odes L, Riesenberk K, Eskira S, Peled N, Nativ R, Schlaeffer F, Sherf M. 2009. Attributable mortality rate for carbapenemresistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 30:972–976.

CDC. 2015. CDC works 24/7 to protect US from health, safety and security threats. CDC, Atlanta, GA.

Clegg, S. et C. Murphy (2016) . Epidemiology and virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol ogy Spectrum*. 4: 1-17.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2011. Carbapenemresistant *Klebsiella pneumoniae* associated with a long-term-care facility —West Virginia, 2009–2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 60:1418–1420.

Chou HC, Lee CZ, Ma LC, et al. Isolation of a chromosomal region of *Klebsiella pneumoniae* associated with allantoin metabolism and liver infection. *Infect Immun* 2004;72:3783–92.

Darshan, N. et H. K. Manonmani (2015). Prodigiosin and its potential applications. *J Food Sci Technol* 52(9):5393–5407

Doorduyn, D. J., S. H.M. Rooijackers, W. Van Schaik et B. W. Bardoel (2016). Complement resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae*. *Immunobiology*.

- Feldman C, Ross S, Mahomed AG, Omar J, Smith C.** The aetiology of severe community-acquired pneumonia and its impact on initial, empiric, antimicrobial chemotherapy. *Respir. Med.* 89(3), 187–192 (1995).
- Freney J, R. F., Hansen W, and Bollet TC.** 2000. Précis de bactériologie clinique.
- Fang CT, Lai SY, Yi WC, Hsueh PR, Liu KL.** 2010. The function of wzy_K1 (magA), the serotype K1 polymerase gene in *Klebsiella pneumoniae* cps gene cluster. *J Infect Dis* 201:1268–1269.
- Gerlach GF, Allen BL, Clegg S.** 1988. Molecular characterization of the type 3 (MR/K) fimbriae of *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* 170:3547–3553.
- Gerlach GF, Clegg S, Allen BL.** 1989. Identification and characterization of the genes encoding the type 3 and type 1 fimbrial adhesins of *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* 171:1262–1270.
- Hsieh PF, Lin TL, Lee CZ, Tsai SF, Wang JT.** 2008. Serum-induced iron-acquisition systems and TonB contribute to virulence in *Klebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess. *J Infect Dis* 197: 1717–1727.
- Kline KA, Dodson KW, Caparon MG, Hultgren SJ.** A tale of two pili: assembly and function of pili in bacteria. *Trends Microbiol.* 18(5), 224–232 (2010).
- Kuehn BM.** 2013. “Nightmare” bacteria on the rise in US hospitals, long-term care facilities. *JAMA* 309:1573–1574.
- Lee KH, Hui KP, Tan WC, Lim TK.** Severe community-acquired pneumonia in Singapore. *Singapore Med. J.* 37(4), 374–377 (1996).
- Le Minor L and Véron M.** 1989. Bactériologie médicale, 2^{ème} édition , Flammarion Médecine-Sciences, Paris.2:428-432.
- Lev, Eugeny et al ;** 2018 Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in 2012-2016 that differ by antibiotic resistance genes and virulence genes profiles, *Pathogens and Global Health* .
- Laakso DH, Homonylo MK, Wilmot SJ, Whitfield C.** 1988. Transfer and expression of the genetic determinants for O and K antigen synthesis in *Escherichia coli* O9:K(A)30 and *Klebsiella* sp. O1:K20, in *Escherichia coli* K12. *Can J Microbiol* 34:987–992.
- Morrissey B, Leney AC, Rego AT et al.** The role of chaperone-subunit usher domain interactions in the mechanism of bacterial pilus biogenesis revealed by ESI-MS. *Mol.*

- Nassif X, Honore N, Vasselon T, Cole ST, Sansonetti PJ.** 1989. Positive control of colanic acid synthesis in *Escherichia coli* by *rmpA* and *rmpB*, two virulence-plasmid genes of *Klebsiella pneumoniae*. *Mol Microbiol* **3**:1349–1359.
- Nassif X, Sansonetti PJ.** 1986. Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin. *Infect Immun* **54**:603–608..
- Ofek I, Kabha K, Athamna A, Frankel G, Wozniak DJ, Hasty DL, Ohman DE.** 1993. Genetic exchange of determinants for capsular polysaccharide biosynthesis between *Klebsiella pneumoniae* strains expressing serotypes K2 and K21a. *Infect Immun* **61**:4208–4216.
- Podschun, R., Pietsch, S., Höller, C., Ullmann, U., 2001.** Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3325–3327.
- Pettit, R.K., Judd, R.C.,** 1992. Characterization of naturally elaborated blebs from serum-susceptible and serum-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol. Microbiol.* **6**, 723–728,
- Remya, et al.** 2019 : Virulence genes associated with pathogenicity in *K. pneumoniae*
- Sebghati TA, Korhonen TK, Hornick DB, Clegg S.** 1998. Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains. *Infect Immun* **66**:2887–2894.
- The Genus *Klebsiella* :** SYLVAIN BRISSE, FRANCINE GRIMONT AND PATRICK A. D. GRIMONT 2006 , 10.1007/0-387-30746-x_8
- Thanassi DG, Saulino ET, Lombardo MJ, Roth R, Heuser J, Hultgren SJ.** The PapC usher forms an oligomeric channel. implications for pilus biogenesis across the outer membrane. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**(6), 3146–3151 (1998).
- Tang HL, Chiang MK, Liou WJ, Chen YT, Peng HL, Chiou CS, Liu KS, Lu MC, Tung KC, Lai YC.** 2010. Correlation between *Klebsiella pneumoniae* carrying pLVPK-derived loci and abscess formation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **29**:689–698.
- Vital signs:** carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2013, **62**:165-70.
- Wang JH, Liu YC, Lee SS, Yen MY, Chen YS, Wang JH, et al.** Primary liver abscess due to *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Clin Infect Dis* 1998; **26**:1434-8; PMID:9636876;

Annexe 1**Tableau I:** Caractères biochimiques de *Klebsiella pneumoniae* .

| Caractères biochimiques | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
|-----------------------------------|-------------------------------------|
| ONPG, KCN | + |
| H ₂ S, désaminase, IND | - |
| VP | + |
| RM | - |
| Uréase | +,- |
| Citrate de Simmons | + |
| LDC | + |
| ODC | - |
| ADH | - |
| Rhamnose | + |
| Arabinose | + |
| Raffinose | + |
| Gélatinase | - |
| Lipase, DNase | - |

Annexe 2

❖ Galerie API 20E :

Préparation de la galerie :

- 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 : Apres 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** : 1 goutte 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 10⁸ cellules/ml. La suspension est ensuite diluée à 10⁷ 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. Les antibiotiques utilisés sont résumés dans le tableau de **l'annexe 3**.

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'une 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 II : Liste des antibiotiques à tester pour les Entérobactéries

| | |
|--|---|
| Les antibiotiques tester Pour les Entérobactéries | Ampicilline (10µg), |
| | Amoxicilline+ acide clavulanique (20/10µG), |
| | Aztréonam (30µg), |
| | Céfalotine (30µg), |
| | Céfazoline |
| | Céfoxitine (30µg), |
| | Céfotaxime (30µg), |
| | Céftazidime (30µg), |
| | Imipénème (10µg), |
| | Ertapénème (10µg), |
| | Amikacine (30µg), |
| | Gentamicine (10µg), |
| | Acide nalidixique (30µg), |
| | Ciprofloxacine (5µg), |
| | Colistine CMI |
| | Chloramphénico I (30µg), |
| | Furanes (300µg), |
| Triméthoprim+ sulfaméthoxazole (1,25/23,75µg), | |
| Fosfomycine (200µg). | |