

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique*  
*Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen*



*Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers*  
*Département de Biologie*

*Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques: Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologiques*

*Mémoire de Master en Biologie*

*Option : Contrôle du Développement Microbien*

*THEME*

*Etude de la résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux antibiotiques  
au niveau du CHU de Tlemcen*

*Présenté par*

*M<sup>lle</sup> HASSAINE Samiya*

*Devant le jury composé de*

*EXAMINATEUR*

*M<sup>r</sup> BELYAGOUBI L.*

*PRESIDENT*

*M<sup>me</sup> GHEMBAZA L.*

*PROMOTEUR*

*M<sup>r</sup> DRISSI MOURAD.*

*Année universitaire : 2012-2013*

# Remerciements

## Merci à Dieu

*« Je tiens à remercier **Dieu** le tout puissant de m'avoir donné le courage, la volonté et la patience pour achever ce travail ».*

*Ce travail a été réalisé au niveau du « Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activités Biologiques » de la faculté SNV-STU de l'université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen.*

*Je tiens avant tout à exprimer mes remerciements les plus sincères à Mr DRISSI M., maître de conférences à l'université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen pour avoir accepté de diriger ce travail, pour ses précieux conseils, son aide, ses suggestions sur la rédaction de ce mémoire ainsi que la confiance qu'il m'a témoigné tout au long de cette étude.*

*Je tiens également à remercier :*

*Mme GHEMBAZA L., maître de conférences à l'université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, pour avoir accepté de présider le jury.*

*Mr BELYAGOUBI L., Professeur à l'université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*« « Merci ..... » »*

 Dédicaces 

 *Je dédie cet humble travail ...* 

*A ma très chère mère*

*Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.*

*A mon très cher père*

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

*A la mémoire de ma tante,*

*Puisse Dieu tout puissant vous accorder sa clémence, sa miséricorde et vous accueillir dans son saint paradis.*

*A ma chère grand-mère*

*Je te dédie ce travail avec tous mes voeux de bonheur et de santé.*

*A mon très cher frère RAFIK*

*En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour toi. Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.*

*A mon très cher frère*

*KUIDER*

*Que ce travail te reflète ma profonde affection.  
Que dieu te protège et te procure bonheur, santé et prospérité.*

*À ma très chère soeur*

*FATIMA*

*En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour toi. Que Je te dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur et de santé.*

*À ma très chère soeur*

*SABAH*

*En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour toi.  
Je te dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur et longue vie.*

*À mes très chères tantes*

*NAZIHA ET FATNA et leurs familles sans exception*

*À toute ma famille: oncles, tantes, cousins et cousines*

*Avec toute mon affection et mon respect.*

*À toute la famille HASSAINE et la famille BEN MANSOUR*

*Sans oublier mes collègues et amis*

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

*Samiya*



## *Abréviations*

- ADH: Arginine dihydrolase
- ADN :Acidedésoxyribonucléique
- ACC-1:AmblerClassC
- ACT-1:AmpCType
- AMC: Amoxicilline + acide clavulanique.
- AMX: Amoxicilline
- AN: Amikacine
- ATB: Antibiotique
- ATCC:AmericanTypeCulture Collection
- ATM: Aztréonam
- BHIB:brain-heartinfusionbroth
- BLSE: Bêta- lactamase à spectre Elargi ou Etendu
- C1G: Céphalosporinede 1<sup>ère</sup>generation
- C2G: Céphalosporinede 2<sup>ème</sup>generation
- C3G: Céphalosporinede 3<sup>ème</sup>generation
- C4G: Céphalosporinede 4<sup>ème</sup>generation
- C° : Degré Celsius
- CASE:céphalosporinasehyperproduite
- CA-SFM:Comitéd'antibiogramme-sociétéfrançaisedemicrobiologie
- CAZ: Céftazidime
- CHU : Centre hospitalo-universitaire
- CIP: Ciprofloxacine
- CIT: Citrate
- CMI: Concentration minimale inhibitrice
- CMY-2:Cephameycinase-2
- CS: Colistine
- CTX: Céfotaxime

- CTX-M: Céfotaximase-Munich
- D-ala:D-alanine
- DHA:Dharhanhospital
- DO: Densité optique
- EDTA:Ethylenediamintetraaceticacid
- FOX: Céfoxitime
- FQ: fluoroquinolones
- GEL: Gélatine
- GES: GuyanaExtended-Spectrum–lactamase
- GN: Gentamicine
- H:heure
- H<sub>2</sub>S:sulfure d'hydrogène
- I: Intermédiaire
- IMP: Imipénème
- IND: Indole
- INO: Inositol
- Kp. :*Klebsiella pneumoniae*
- LB: Luria broth
- LDC: Lysine décarboxylase
- LPS:lipo-polysaccharide
- Mg: milligramme
- M H: Mueller -Hinton
- MIR-1:Miriamhospital
- mm:millimètre
- mn:minutes
- NA: Acide nalidixique
- nm:nanomètre
- ODC: Ornithine
- ONpG:Orthonitrophényl-β-D-galactopyranoside
- OXA:Oxacillinase
- PCR: Amplification en *chaîne* par polymérase
- PLP: Protéine liant les pénicillines

- R: Résistance naturelle
- S: Sensible
- SHV :SulfHydrylVariable
- SOR: Sorbitol
- Sub sp: sous espèce
- TDA: Tryptophane désaminase
- TEM :TEMoneira-nom dupatient
- TSI: Triple Sucre à Identifié
- UFC: Unité Formant colonie
- URE: Urée
- Vp: Sodium pyruvate
- µg:microgramme
- % : pourcentage



# Table de matière

Introduction .....	1
--------------------	---

## *Synthèse Bibliographique*

### *1) Généralités sur *Klebsiella pneumoniae**

1.1. Position taxonomique.....	3
1.2. Caractères bactériologiques.....	4
1.2.1. Morphologie.....	4
1.2.2. Caractères cultureux.....	4
1.3. Principaux caractères biochimiques .....	4
1.4. Habitat.....	4
1.5. Pouvoir pathogène.....	5
1.5.1. Facteurs de pathogénités.....	5
1.5.1.1. La capsule.....	5
1.5.1.2. Facteurs d'adhésion.....	5
1.5.1.3. Le fer .....	6
1.6. Réservoirs.....	6

### *2) Les antibiotiques*

2.1. Définition.....	7
2.2. Classification.....	7
2.3. Mode d'action.....	7
2.4. Les $\beta$ -laclamines.....	8
2.4.1. Définition.....	8
2.4.2. Structure et classification.....	8
2.4.2.1. Les pénicillines.....	10

2.4.2.2. Les carbapénèmes.....	10
2.4.2.3. Les céphalosporines.....	11
2.4.2.4. Les monobactames.....	11
2.4.3. Mode d'action des $\beta$ -lactamines.....	11
2.5. Les aminosides.....	12
2.5.1. Définition.....	12
2.5.2. Classification.....	12
2.5.3. Mode d'action.....	12
2.6. Les quinolones.....	12
2.6.1. Définition.....	12
2.6.2. Mode d'action.....	13

### 3) *Résistance de Klebsiella pneumoniae aux antibiotiques*

3.1. Résistance aux $\beta$ -lactamines.....	15
3.1.1. Les $\beta$ -lactamases.....	15
3.1.2. Les $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE).....	17
3.1.3. Imperméabilité par altération de porines.....	17
3.1.4. Modifications de protéines de liaison des pénicillines.....	17
3.1.5. Pompe à efflux.....	18
3.2. Résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux $\beta$ -lactamines.....	19
3.2.1. Enzymatique.....	19
3.2.1.1. Pénicillinase.....	19
3.2.1.2. Céphalosporinase de haut niveau.....	19
3.2.1.3. Carbapénémases.....	19
3.2.1.4. $\beta$ -lactamase à spectre élargi (BLSE).....	20
3.2.2. Non enzymatique.....	21
3.2.2.1. Diminution de la perméabilité.....	21
3.3. Résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux aminosides.....	21
3.4. Résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux quinolones.....	22

## *Matériel et Méthodes*

1. Matériel.....	23
1.1. Matériel Biologique.....	23
1.1.1. Souches étudiées.....	23
1.1.2. Souchesderéférences.....	23
1.2. Milieuxdeculture.....	23
1.2.1. Milieuxdeculturesolides.....	23
1.2.2. Milieuxdecultureliquides.....	23
1.3. Testsbiochimiques.....	23
1.4. Antibiotiques.....	24
1.4.1. Endisque.....	24
1.4.2. Enpoudre.....	24
2. Méthodes.....	25
2.1. Prélèvements.....	25
2.2. Isolement etpurification.....	25
2.3. Identification.....	25
2.3.1. Le testTSI(milieutriple sucres).....	25
A. Principe.....	25
B. Technique.....	25
C. Lecture.....	25
2.3.2. Galeriesd'identification.....	26
2.3.2.1. Principe.....	26
2.3.2.2. Technique.....	26
2.3.2.3. Lecture.....	27
2.4. Antibiogramme.....	27
2.4.1.Principe.....	27
2.4.2.Technique.....	27
2.4.3. Lecture.....	28
2.5. Déterminationdela CMIenmilieusolide.....	28

2.5.1. Principe.....	28
2.5.2. Technique.....	28
2.5.3. Lecture.....	29
2.6. Test deHodge.....	29
2.6.1. Principe.....	29
2.6.2. Technique.....	29
2.6.3. Lecture.....	29
2.7. Test à la cloxacilline.....	29
2.7.1. Principe.....	29
2.7.2. Technique.....	30
2.7.3. Lecture.....	30
2.8. Transfert des plasmides par conjugaison.....	30
2.8.1. Principe.....	30
2.8.2. Technique.....	30
2.8.3. Lecture.....	31
2.9. PCR.....	31

### ***Résultats et Interprétation***

1. Prélèvements.....	32
2. Identification de souches.....	33
A/ Service de Traumatologie et de Médecine Interne.....	33
B/ Service de réanimation.....	34
3. Résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux antibiotiques .....	35
3.1. Résistance des souches de <i>Kp</i> isolées au niveau de service de T et de M I.....	37
3.2. Résistance des souches de <i>Kp</i> isolées au niveau de service de réanimation.....	37
4. Phénotypes de résistance.....	39
4.1. Phénotype sauvage.....	40
4.2. Phénotypes BLSE.....	41
4.3. Phénotype céphalosporinase associé à une $\beta$ -lactamase à spectre étendu.....	41

4.4. Phénotype carbapénémase .....	42
5. Conjugaison bactérienne.....	43
6. Détection par PCR des gènes de résistance .....	43

***Discussion***45

***Conclusion*** 48

***Références bibliographiques***49

***Annexe***55



## liste des figures

<b>Figure 1.</b> Mécanisme d'action des antibiotiques.....	8
<b>Figure 2.</b> Cycle $\beta$ -lactame.....	9
<b>Figure 3.</b> Structure des différentes classes de $\beta$ -lactamines.....	9
<b>Figure 4.</b> Activité antibactérienne des quinolones.....	13
<b>Figure 5.</b> Mécanisme d'action des quinolones.....	14
<b>Figure 6.</b> Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle $\beta$ -lactame.....	15
<b>Figure 7.</b> Sites d'inactivation des aminoglycosides.....	22
<b>Figure 8.</b> Répartition de <i>Klebsiella pneumoniae</i> en fonction des services.....	33
<b>Figure 9.</b> Fréquence d'isolement de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	33
<b>Figure 10.</b> Test TSI.....	34
<b>Figure 11.</b> Identification des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> par galerie API 20E.....	35
<b>Figure 12.</b> Taux de résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux $\beta$ -lactamines.....	36
<b>Figure 13.</b> Pourcentage de résistance de <i>Kp</i> aux autres classes d'antibiotiques.....	36
<b>Figure 14.</b> Pourcentage de résistance de <i>Kp</i> aux $\beta$ -lactamines au niveau de la réanimation.....	38
<b>Figure 15.</b> Pourcentage de résistance de <i>Kp</i> aux autres classes d'antibiotiques au niveau de la réanimation.....	38
<b>Figure 16.</b> Répartition des phénotypes de résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux $\beta$ -lactamines au niveau de la réanimation.....	39
<b>Figure 17.</b> La répartition des phénotypes de résistance en fonction des services.....	40
<b>Figure 18.</b> Phénotype sauvage.....	40
<b>Figure 19.</b> Phénotype BLSE.....	41

<b>Figure 20.</b> BLSE associé a une CASE.....	41
<b>Figure 21.</b> Résultat négatif de test de Hodge.....	42
<b>Figure 22:</b> Image de la migration des produits de PCR sur le gel d'agarose pour le gène TEM.....	43
<b>Figure 23:</b> Image de la migration des produits de PCR sur le gel d'agarose pour le gène SHV.....	44



## liste des tableaux

<b>Tableau1.</b> Répartition des prélèvements selon les services et les sites de prélèvement.....	32
<b>Tableau2.</b> Résultats de l'identification des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> par le système API20 E.....	35
<b>Tableau 3.</b> CMI (en µg/ml) des souches d'entérobactéries vis-à-vis des molécules d'antibiotiques.....	42
<b>Tableau 4.</b> Caractéristiques des souches.....	44

# *Introduction*

## *Introduction*

L'introduction généralisée des antibiotiques après la seconde guerre mondiale a été l'un des progrès thérapeutiques les plus importants du XX<sup>e</sup> siècle. Les traitements antibiotiques ont fait progresser l'espérance de vie de plus de dix ans, soit plus qu'aucun autre traitement médical (**Bryskier, 1999**). L'utilisation massive des antibiotiques, et des  $\beta$ -lactamines en particulier, a modifié considérablement l'écologie bactérienne, pas uniquement dans les établissements de soins (**cavallo, 2004**). Les antibiotiques, qui ont sauvé tant de vies humaines, risquent de devenir inefficaces en raison d'une inquiétante augmentation de la résistance des bactéries à leur rencontre et de la raréfaction des nouveaux produits commercialisés (**Carlet et al, 2012**). Les résistances de plus

en plus fréquentes rencontrées chez les bactéries posent des difficultés et parfois des impasses en thérapeutique humaine (**cavallo, 2004**). Les entérobactéries sont impliquées dans les infections nosocomiales et dans les pathologies infectieuses opportunistes (**Joly et Reynaud, 2002**).

*Klebsiella pneumoniae* est une entérobactérie qui fait partie des espèces commensales (**El Fertas-Aissani et al, 2012**), elle est responsable de plus de 10% des infections nosocomiales (**Hennequin et al, 2007**). Elle est distribuée surtout dans les unités de soins intensifs (USI) (**Boukadida et al, 2002**).

La multirésistance aux antibiotiques chez les entérobactéries et en particulier chez *klebsiella.spp.* est en perpétuelle évolution. Depuis plus de 20 ans, la résistance des entérobactéries aux céphalosporines de troisième génération (C3G) ne cesse de se renforcer notamment par l'acquisition de bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE), récemment s'ajoute la résistance aux fluoroquinolones (**Ben Haj Khalifa et al, 2010**). *K. pneumoniae* producteur de  $\beta$ -lactamase à spectre élargi engendre, partout dans le monde, des infections nosocomiales d'allure le plus souvent endémique avec des bouffées épidémiques (**Boukadida et al, 2002**).

La résistance aux antibiotiques augmente de façon très inquiétante, et très peu d'antibiotiques nouveaux seront commercialisés dans les cinq prochaines années (**Carlet et al, 2012**).

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

- L'isolement et l'identification des souches de *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* au niveau des services de médecine interne et de traumatologie du CHU de Tlemcen;
- L'étude de leur sensibilité aux antibiotiques ( $\beta$ -lactamines, aminosides, quinolones et la colistine) ;
- L'étude de profil de résistance de *Klebsiella pneumoniae* , appartenant a la collection du laboratoire de microbiologie «Antibiotiques, Antifongiques: phisico-chimie, synthèse et activité biologique isolées à partir de service de réanimation du CHU de Tlemcen» ;
- Détermination des phénotypes de résistance aux antibiotiques ;
- Analyse du support génétique de l'antibiorésistance.



# *Synthèse Bibliographique*

## **1. Généralités sur *Klebsiella pneumoniae* :**

**1.1. Position taxonomique :** Selon la classification de la 2<sup>ème</sup> édition de Bergy's manuel *Klebsiella pneumoniae* appartient au :

Domaine : Bactéria ;

Phylum: Proteobacteria;

Classe: Gammaproteobacteria;

Ordre: Entérobactériale;

Famille : Enterobacteriaceae;

ozaenae

Genre : *Klebsiella pneumoniae pneumoniae*

*rhinoscleromatis*

*oxytoca*

*ornithinolytica*

*planticola*

*terrigena.*



**Classification de *Klebsiella pneumoniae* (George et al, 2004).**

## 1.2. Caractères bactériologiques:

### 1.2. 1. Morphologie :

Les bactéries appartenant à l'espèce *Klebsiella pneumoniae* sont des bacilles à Gram négatif, immobiles, non sporulés, anaérobies facultatifs et appartiennent à la famille des Enterobacteriaceae (El Fertas-Aissani et al, 2012 ; Srinivasan et al, 2012).

### 1.2. 2. Caractères cultureux :

Après 24 heures d'incubation à 37°C sur des milieux non sélectifs et des milieux sélectifs lactosés pour *Klebsiella pneumoniae* et après 48 heures pour *K. ozaenae* et *K. rhinoscleromatis* les colonies sont rondes, grandes de 3 à 4 mm de diamètre et d'aspect muqueux à cause de la présence de capsule (Joly et Reynaud, 2002).

### 1.3. Principaux caractères biochimiques :

- Fermentation des sucres : glucose+
- Métabolisme du tryptophane en indole : indole-
- ONPG +
- Production du gaz (+)
- Mobilité(-)
- VP(+)
- TDA-
- H<sub>2</sub>S(-)
- ODC(-)
- ADH(-)
- LDC(+)
- Citrate (+)(Joly et Reynaud, 2002).

### 1.4. Habitat :

*Klebsiella pneumoniae* est une espèce pathogène opportuniste (Brisse, 2004). Elle est fréquemment rencontrée dans la nature : eaux de surface, du sol, du bois et des végétaux (El Fertas-Aissani et al, 2012). Elle est présente dans le tube digestif de l'homme et des animaux, et elle est commensale des voies respiratoires (Joly et Reynaud, 2002).

### 1.5. Pouvoir pathogène:

*Klebsiella pneumoniae* est un agent classique et majeur d'infections nosocomiales en général et néonatales particulièrement (Boukadida et al, 2002).

Elle est l'une des principales espèces bactériennes impliquées dans les infections urinaires (IU) (Ben Haj Khalifa et al, 2010 ; Struve et al, 2012).

Elle fait partie du groupe KES (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*) qui est d'une grande importance en clinique hospitalière (Nedjai, 2011).

Les espèces *Klebsiella pneumoniae* sont à l'origine d'infections survenant dans les unités de soins intensifs (USI) (Carpentier et al, 2012 ; Joly et Reynaud, 2002). Elles peuvent également causer des bactériémies, d'abcès cérébral et des maladies chroniques comme la méningite (Botelho, 2007).

*Klebsiella pneumoniae subsp ozaenae* : Provoque l'ozène (une rhinite atrophique), elle est responsable d'infections variées de l'arbre respiratoire et au niveau cérébral (méningites et abcès) (Joly et Reynaud, 2002).

*Klebsiella pneumoniae subsprhinoscleromatis* : provoque le rhinosclérome, une infection granulomateuse chronique des voies respiratoires supérieures (cavité nasale) (Botelho, 2007).

## 1.5. 1. Facteurs de pathogénicités :

### 1.5.1.1. La capsule :

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

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

### 1.5.1.2. Facteurs d'adhésion :

Facteurs d'adhésion produits par la majorité des souches dont deux types ont été mis en évidence chez des souches pathogènes pour l'homme : les pili de type 1 et de type 3 qui permettent l'adhérence de la bactérie à la face baso-latérale des cellules trachéales et bronchiques et une adhésine non filamenteuse (adhésine CF 29 K) qui permet l'adhérence de la bactérie aux cellules intestinales et uro-épithéliales (Joly et Reynaud, 2002 ; Hennequin et al, 2007).

*Klebsiella pneumoniae* peut produire des fimbriae de type 1 qui semblent être impliquées dans l'attachement aux cellules ciliées de l'appareil respiratoire et aux cellules vésicales. (Hennequin et al, 2007). Elle peut également produire des fimbriae de type 3 (Stahlhut, 2012 ; Aartsen, 2012).

### 1.5.1.3. Le fer :

Les souches de *Klebsiella pneumoniae* sont aptes à synthétiser des sidérophores (systèmes de chélation du fer) de type aérobactine (hydroxamate) et entérochéline (phénolate) qui favorisent la multiplication bactérienne dans les tissus (Joly et Reynaud, 2002).

## 1.6. Réservoirs :

Les principales sources de *Klebsiella pneumoniae* sont notamment les suivantes :

- ❖ *K. pneumoniae* : présente dans tous les sites anatomiques du corps humain, le plus souvent dans les voies respiratoires et les voies urinaires;
- ❖ *K. ozaenae* : présente le plus souvent dans les écoulements nasaux; voies respiratoires, voies urinaires et sang;
- ❖ *K. rhinoscleromatis*: peut être retrouvé dans les écoulements nasaux et sang (sérum) (**Botelho, 2007**).

## **2. Les antibiotiques :**

### **2.1. Définition :**

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

### **2.2. Classification :**

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

1) Mode d'action : Les antibiotiques peuvent agir sur : la paroi, la membrane cytoplasmique, la synthèse des acides nucléiques et la synthèse des protéines.

2) Spectre d'activité : (spectre étroit ou large)

3) Origine : élaboré par un organisme naturel ou produit par synthèse 4) Nature chimique : très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (ex : cycle  $\beta$ -lactamase)(**Yala et al, 2001**).

### **2.3. Mode d'action :**

- ❖ Action sur la paroi bactérienne (peptidoglycane) ;
- ❖ Action sur la structure de la membrane cytoplasmique bactérienne ;
- ❖ Action sur la synthèse protéique bactérienne ;
- ❖ Action sur la synthèse de l'ADN de la bactérie ;
- ❖ Action sur la synthèse des folates (**Yala et al, 2001**).

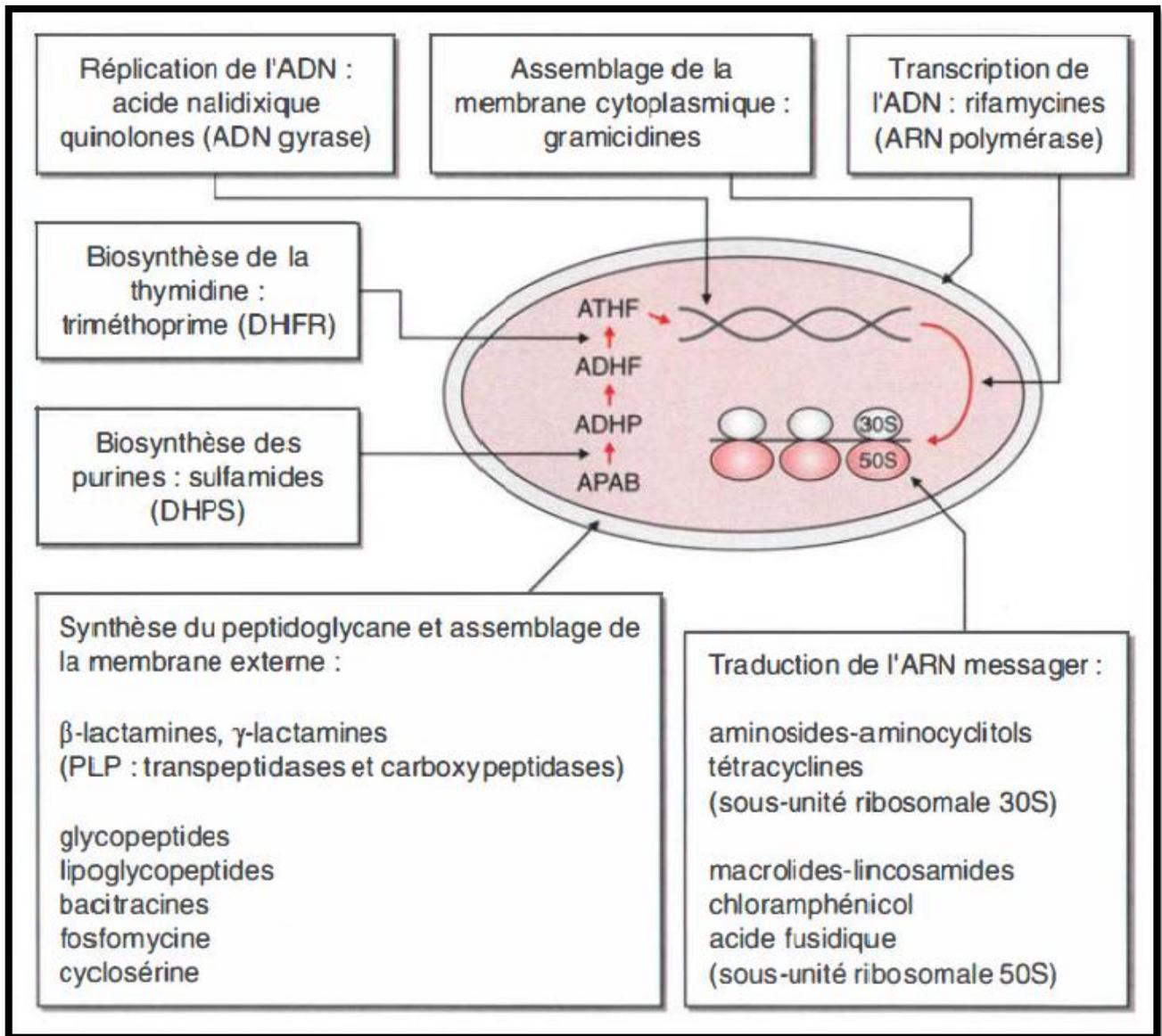


Figure 1 : Mécanisme d'action des antibiotiques(Paul H. Roy,1997).

## 2.4. Les $\beta$ -lactamines :

### 2.4.1. Définition :

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

### 2.4.2. Structure et classification :

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

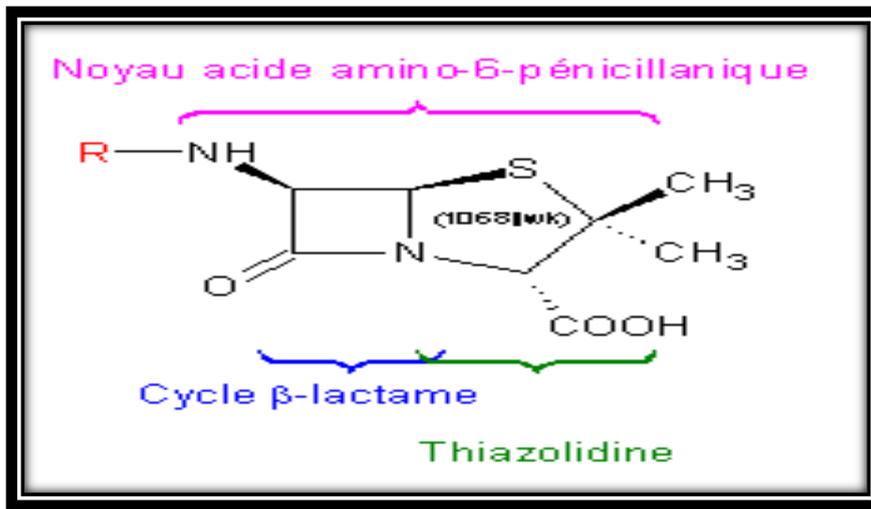


Figure 2 : Cycle  $\beta$ -lactame (Bessard, 2004).

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

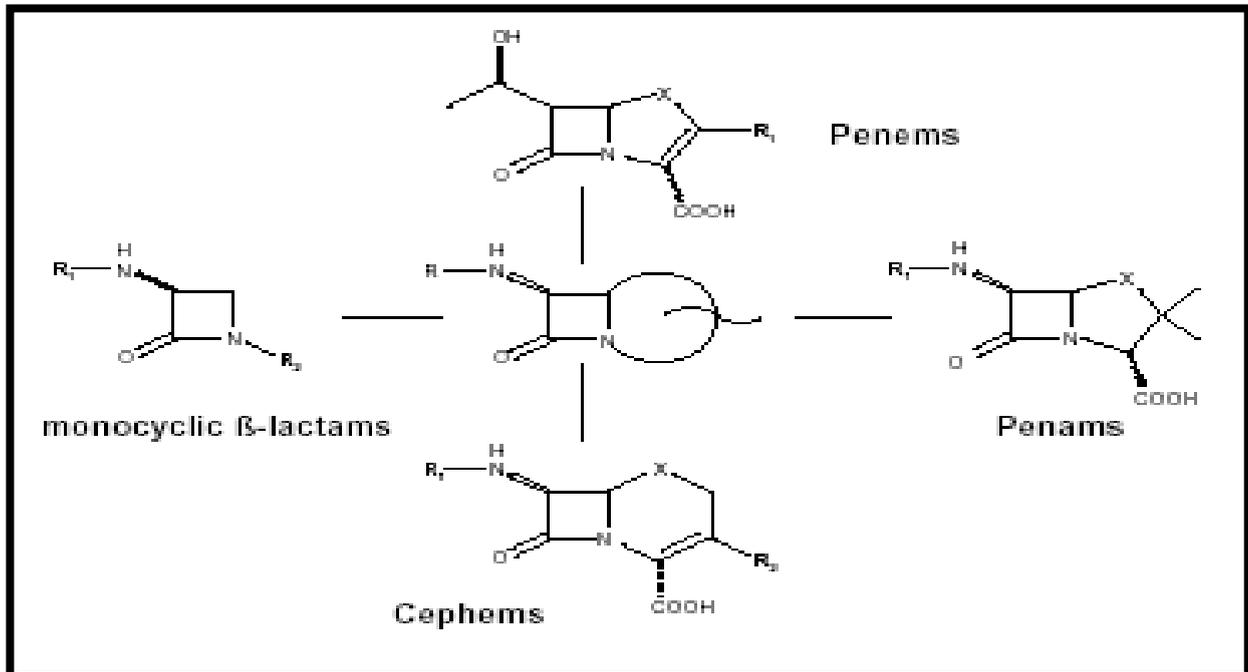


Figure 3 : Structure des différentes classes de  $\beta$ -lactamines (Bryskier, 1999).

#### 2.4.2.1. Les pénicillines (pénames) :

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

Elles sont regroupées au sein de la classe des pénames qui comprend les pénicillines, les oxa-1-pénames (ex acide clavulanique) et les carbapénames (**Bryskier, 1999**).

**Pénicilline G et V (naturelles):** Actives sur les bactéries Gram positif et les coques à Gram négatif.

**Groupe A (aminopénicillines):** Ampicilline et Amoxicilline spectre élargi, orienté sur certains bacilles à Gram négatif mais inactivées par les pénicillinases y compris celle du staphylocoque, inactives sur les bacilles à Gram négatif naturellement producteurs de céphalosporinases comme certaines entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*.

**Carboxypénicillines:** (Ticarcilline, carbénicilline) spectre élargie sur les bacilles Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa* (**Cavallo et al, 2004**).

**Uréidopénicillines:** leur spectre d'activité regroupe la plupart des souches d'entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa*(**Botto, 2002**).

**Oxapénames ou clavames :** l'amoxicilline+l'acide clavulanique : utilisés comme inhibiteur de  $\beta$ -lactamases en association avec une autre  $\beta$ -lactamine (amoxicilline ou ticarcilline+acide clavulanique)et l'acide clavulanique+ticarcilline (**cavallo et al,2004**).

#### 2.4.2.2. Les carbapénèmes (pénèmes) :

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

### 2.4.2.3. Les céphalosporines :

#### Les céphalosporines de première génération :

Céfalotine, céfazoline et la céfapirine. Elles sont hydrolysées facilement par les  $\beta$ -lactamases acquises. Leur spectre d'activité regroupe les cocci à Gram positif, essentiellement les streptocoques et les staphylocoques sensibles à la méthicilline et à quelques entérobactéries ne produisant pas de céphalosporinase inductible comme *E.coli*, les salmonelles ou *Klebsiella spp* (Cavallo et al, 2004).

#### Les céphalosporines de deuxième génération :

Elles comprennent céfamandole et céfuroxime (Jarlier et Nordmann, 2000), sont plus stables à l'hydrolyse de plusieurs types de  $\beta$ -lactamases, leur spectre d'activité regroupe les bactéries à Gram positif, à Gram négatif et les souches productrices de  $\beta$ -lactamases (Bryskier, 1999).

#### Les céphalosporines de troisième génération (C3G) :

Comprennent céfotaxime et céftriaxone (Jarlier et Nordmann, 2000). Les C3G se caractérisent par leur stabilité à la plupart des  $\beta$ -lactamases comme les pénicillinases de type TEM ou les céphalosporinases chromosomiques des entérobactéries comme *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* (Cavallo et al, 2004).

#### Les céphalosporines de quatrième génération (céfépime, céfpirome) :

Présentent une meilleure résistance à l'hydrolyse par les céphalosporines hyperproduites (Cavallo et al, 2004).

**2.4.2.4. Les monobactames :** (L'aztréonam et le carumonam), constituent le groupe le plus récent des  $\beta$ -lactamines, ces antibiotiques se caractérisent par une structure monocyclique (hétérocycle azétidinone) (Bryskier, 1999).

### 2.4.3. Mode d'action des $\beta$ -lactamines :

Les  $\beta$ -lactamines inhibent la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane (polymère majeur spécifique de la paroi des bactéries à Gram négatif et positif).

Les cibles des  $\beta$ -lactamines sont des enzymes situées dans la partie externe de la membrane cytoplasmique bactérienne et appelées PLP. Ces enzymes correspondent aux transpeptidases impliquées dans la synthèse du peptidoglycane. La fixation des  $\beta$ -lactamines sur ces PLP est responsable de l'arrêt de la synthèse du peptidoglycane (Cavallo et al, 2004).

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

## 2.5. Les aminosides :

### 2.5.1. Définition :

Sont des antibiotiques bactéricides de la famille des aminoglycosides, ils comprennent la kanamycine, l'amikacine, la gentamycine, la nétilmycine, la tobramycine (**Bryskier, 1999**).

Ce sont des hétérosides naturels formés par un ou plusieurs glycosides liés à un aminocyclitol (**yala et al, 2001**).

### 2.5.2. Classification :

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

- ✚ Streptamine
- ✚ 2 désoxystreptamine
- ✚ Streptidine (**Bryskier, 1999**).

### 2.5.3. Mode d'action :

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

## 2.6. Les Quinolones :

### 2.6.1. Définition:

Les quinolones sont des antibiotiques synthétiques, découvertes en 1962 par Lesher qui a isolé l'acide nalidixique à partir d'une préparation de chloroquine destinée au traitement du paludisme, la fluoration de ces molécules en position 6 a permis d'étendre leur spectre d'activité selon la génération de la molécule à *Pseudomonas aeruginosa*, aux coques à Gram positif, aux bactéries intracellulaires et aux anaérobies (**Meradi et al, 2009**), ces fluoroquinolones, qui sont des quinolones de deuxième génération (norfloxacin, péfloxacin, ciprofloxacine) (**Yala et al, 2001**), sont largement utilisés en médecine humaine et vétérinaire, notamment dans le cas d'infections urinaires et respiratoires (**Meradi et al, 2009**).

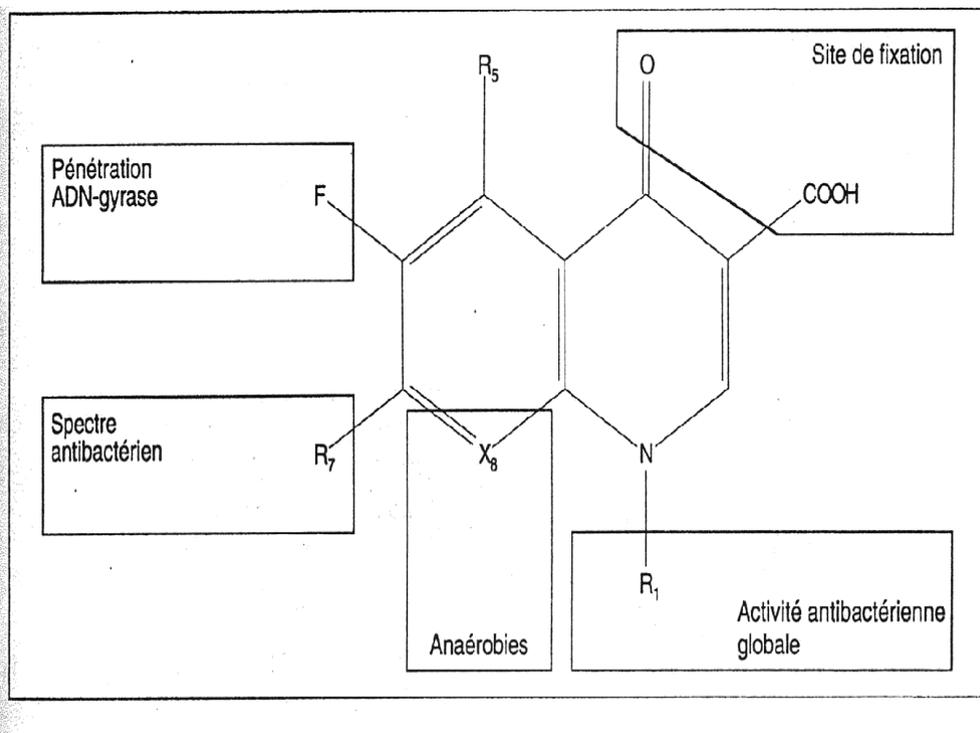


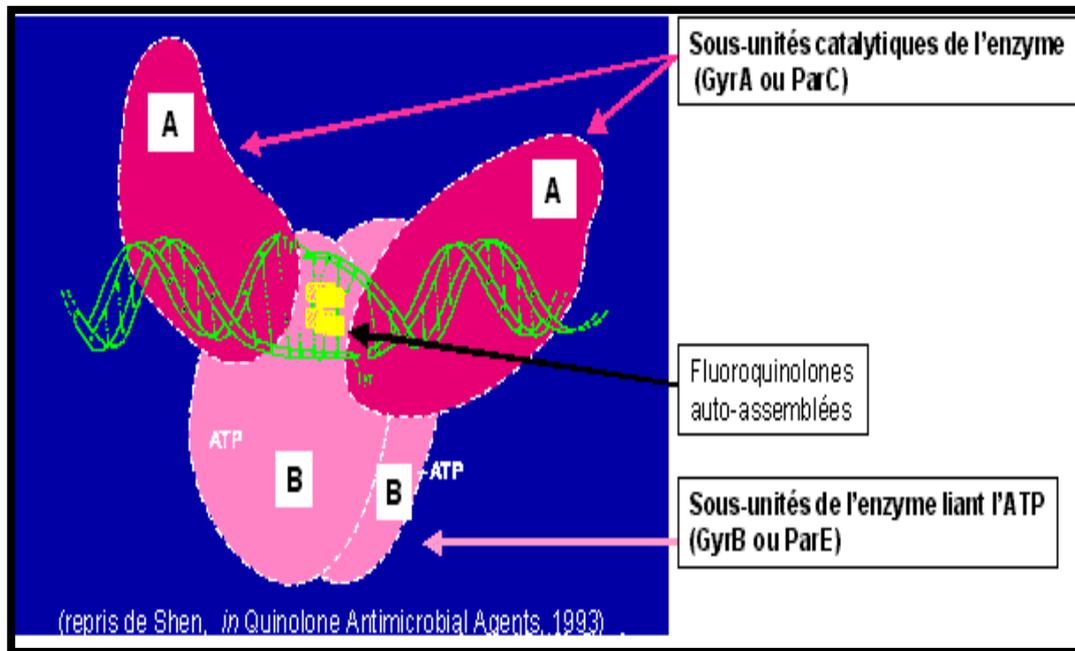
Figure 4 : Activité antibactérienne des Quinolones(Bryskier, 1999).

### 2.6.2. Mode d'action:

Les fluoroquinolones ne sont pas actives sur les entérocoques, malgré leur efficacité sur les bactéries à gram négatif, leur utilisation doit être raisonnée afin de contrôler l'émergence de résistances(Botto, 2002). Les fluoroquinolones ont un spectre d'activité élargi, qui recouvre les bactéries à Gram négatif, les cocci à Gram positif dont l'activité est 100 à 1000 fois plus élevée que celles desquinolones de 1ère génération (sauf streptocoques et pneumocoques).

L'ofloxacin et la Ciprofloxacin ont une activité sur *Mycobacterium tuberculosis* (Yala et al, 2001).

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



**Figure 5 : Mécanisme d'action des Quinolones (Claire, 2013).**

### 3. Résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux antibiotiques:

#### 3.1. Résistance aux $\beta$ -lactamines :

La résistance bactérienne aux  $\beta$ -lactamines est due principalement à la production d'enzymes ( $\beta$ -lactamases) (Arlet et Philippon, 2003).

##### 3.1.1. Les $\beta$ -lactamases :

Les  $\beta$ -lactamases constituent le mécanisme de résistance principal des bacilles à gram négatif (Philippon et Arlet, 2006).

On distingue 2 types de  $\beta$ -lactamases :

Les  $\beta$ -lactamases des classes A, C et D font partie des enzymes à sérine active, par contre la classe B inclut les métallo- $\beta$ -lactamases dont l'activité nécessite la présence d'ions métalliques (Szarecka et al, 2011).

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation hydrolysant l'anneau  $\beta$ -lactame. En 1980, seules les enzymes plasmidiques TEM-1, TEM-2 et SHV-1 étaient connues. Les  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) SHV-2 et TEM-3 ont été découvertes à cette époque chez *Klebsiella pneumoniae*, soit peu après l'introduction en clinique des céphalosporines de troisième génération (Rodriguez et al, 2006).

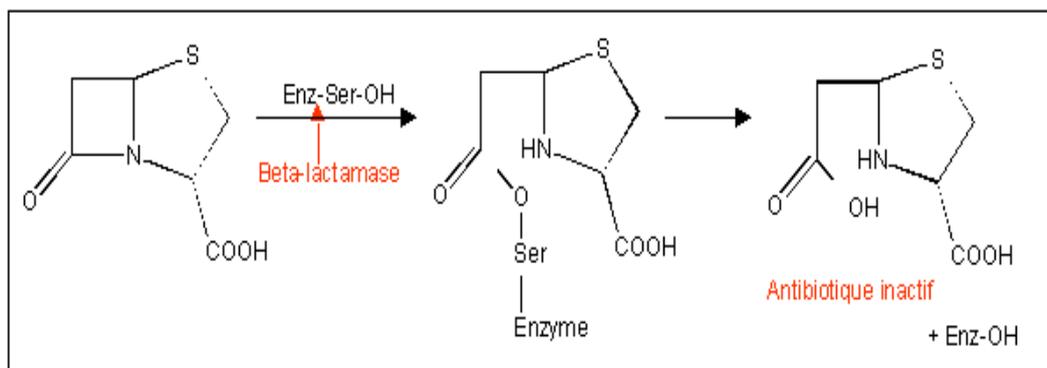


Figure 6: Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle  $\beta$ -lactame (Barrial et Scotet, 2006).

- Classification des  $\beta$ -lactamases :

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'une extrême diversité. Plus de 400  $\beta$ -lactamases dont plus de 200 BLSE sont décrites. Généralement, les  $\beta$ -lactamases sont classées suivant deux schémas : la classification moléculaire d'Ambler qui est basée sur l'homologie de séquence des acides aminés et la classification fonctionnelle de Bush-Jacoby-Mediros qui est fondé sur les propriétés fonctionnelles des enzymes (Rodriguez et al, 2006).

Ces enzymes d'inactivation d'une extrême diversité (plus de 300 répertoriées) sont distribuées au sein de 4 classes (Philippon et Arlet, 2006).

### **La classe A :**

Les principaux représentants de cette classe sont les  $\beta$ -lactamases de type TEM, SHV et CTX-M. Ces enzymes sont caractérisées par une résistance à haut niveau aux pénicillines et par une sensibilité à l'acide clavulanique et le tazobactam (inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases) (Arlet et Philippon, 2003).

### **La classe B :**

Cette classe des  $\beta$ -lactamases est composée par des métallo-enzymes (Szarecka et al, 2011), dont le site actif contient un ion zinc, résistantes à l'acide clavulanique mais inhibées par l'EDTA. Ces enzymes sont généralement actives contre les carbapénèmes et contre d'autres  $\beta$ -lactamines (Grall et al, 2011).

### **La classe C :**

Les enzymes de cette classe, peuvent être divisés en 2 groupes : les  $\beta$ -lactamases chromosomiques Amp C et les  $\beta$ -lactamases plasmidiques. Les  $\beta$ -lactamases AmpC sont capables d'hydrolyser les céphalosporines y compris les céphamycines (céfoxitine), les pénicillines, mais pas le céfépime. Ces  $\beta$ -lactamases sont résistantes aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (Rodriguez et al, 2006). Les représentants de ce groupe sont les enzymes de types AmpC, FOX, ACT, CMY (Arlet et Philippon, 2003).

Ces enzymes confèrent aux bactéries productrices une forte résistance aux céphalosporines de première génération et à un degré variable aux céphalosporines de deuxième génération (Bryskier, 1999).

### **La classe D :**

La classe D regroupe les  $\beta$ -lactamases appelées (oxacillinasés) ou OXA (Szarecka et al, 2011). Ces  $\beta$ -lactamases sont peut-être inhibées par l'acide clavulanique. Dans cette classe, on retrouve les  $\beta$ -lactamases qui hydrolysent la cloxacilline (Grall et al, 2011).

### **3.1.2. Les $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE):**

Les BLSE sont des enzymes appartenant à la classe A ou D de la classification d'Ambler qui inactivent les pénicillines, céphalosporines de première, deuxième, troisième et quatrième génération (C1G, C2G, C3G, C4G) et l'aztréonam. Elles n'hydrolysent pas les carbapénèmes et sont inhibées in vitro par les inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases. Les BLSE n'hydrolysent pas les céphamycines telles que la céfoxitine mais peuvent inactiver les C4G (céfépime ou ceftiprome) la majorité des BLSE sont dérivées de mutations ponctuelles dans la séquence génétique codant pour le site actif des  $\beta$ -lactamases TEM-1 et SHV-1. Il y a plus de 140 enzymes TEM. Ces mutations

rendent l'enzyme capable d'hydrolyser les C3G. Après TEM, le type SHV constitue celui comportant le plus grand nombre (supérieur à 70) d'enzymes BLSE. Il y'a 11 BLSE du groupe OXA (Rodriguez et al, 2006).

L'épidémiologie des BLSE au sein des entérobactéries a récemment changé avec la dissémination massive des enzymes de type CTX-M. Dans les années 1990, les principales BLSE étaient dérivées des enzymes de type TEM et SHV et diffusaient majoritairement au sein de clones hospitaliers de *Klebsiella pneumoniae* et d'*Enterobacter* sp. La diffusion de CTX-M au sein de l'espèce *Escherichia coli* a bouleversé cette situation. Récemment, les BLSE de type CTX-M ont émergé comme le type le plus courant de BLSE, avec une répartition mondiale (Ruppé, 2010).

### **3.1.3. Imperméabilité par altération de porines:**

Les porines jouent un rôle-clé dans la pénétration des  $\beta$ -lactamines (Cavallo et al, 2004). La sensibilité des BGN aux  $\beta$ -lactamines dépend en partie du nombre de porines fonctionnelles. L'altération des porines par mutation affectant la structure des porines ou diminuant la synthèse des porines (diminution quantitative des porines) est donc à l'origine de résistances acquises aux  $\beta$ -lactamines (Grall et al, 2011).

### **3.1.4. Modifications de protéines de liaison des pénicillines (PLP):**

Une perte d'affinité de PLP ou une diminution de la quantité de PLP. Chez les entérobactéries, des souches de *Proteus mirabilis* résistantes à l'imipénème et au mércillinam ont été observées suite à une perte d'affinité de la PLP2 et à une diminution de la quantité de PLP1a (Grall et al, 2011).

### **3.1.5. Pompe à efflux :**

Les bactéries produisent souvent des protéines membranaires agissant comme pompes moléculaires permettant d'expulser l'antibiotique hors de la cellule. C'est le mécanisme principal de la résistance à la tétracycline, chez les bactéries Gram positives et Gram négatives (Paul H. Roy, 1997).

### **3. 2. Résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux $\beta$ -lactamines :**

#### **3. 2. 1. Enzymatique :**

##### **3. 2. 1.1. Pénicillinase :**

###### **Phénotype pénicillinase à bas niveau :**

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

###### **Phénotype pénicillinase à haut niveau :**

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

##### **3. 2. 1. 2. Céphalosporinase de haut niveau :**

Se sont des  $\beta$ -lactamases plasmidique de classe C d'Ambler qui présentent une résistance à l'ensemble des  $\beta$ -lactamines excepté les carbapénèmes et notamment aux C3G par acquisition d'un gène plasmidique (AmpC). Cette résistance a été décrite en 1990 pour la première fois avec MIR-1 chez *Klebsiella pneumoniae* (Gueudet et al, 2009).

Les premières souches cliniques de *Klebsiella pneumoniae* ayant acquis un plasmide codant pour une  $\beta$ -lactamase de classe C sont décrites en 1988 (Cavallo et al, 2004).

##### **3. 2. 1. 3. Carbapénèmases :**

Les carbapénèmases de classe A, les plus fréquentes, sont les carbapénèmases de type KPC (KPC-2 à KPC-8). La première souche exprimant KPC-2 (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) fut identifiée dans une souche de *K. pneumoniae* en 1996, aux Etats-Unis. KPC-2 hydrolyse toutes les  $\beta$ -lactamines sauf les céfamycines et la ceftazidime (Nordmann et al, 2010). Son activité est partiellement inhibée par l'acide clavulanique ou le tazobactam. Parmi les céphalosporines de troisième génération, les KPC hydrolysent le plus efficacement le céfotaxime. (Grall et al, 2011). Les souches qui produisent KPC expriment également d'autres  $\beta$ -lactamases dont de nombreux types de BLSE (TEM, SHV, CTX-M). Les souches KPC apparaissent donc le plus souvent

multirésistantes aux  $\beta$ -lactamines, l'ertapénème étant la carbapénème dont le niveau de résistance est le plus élevé (Nordmann et al, 2010).

Les enzymes de type GES sont initialement des BLSE dont seuls quelques variant touchent les carbapénèmes. Ces carbapénémases de type GES (GES-2, 4, 5 et 6) ont été identifiées dans le monde entier de façon sporadique ou lors de petites épidémies chez *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli* et *E. cloacae* (Grall et al, 2011).

Les carbapénémases de classe B : les enzymes de type VIM (Verona Integron encoded Metallo- $\beta$ -lactamase) et IMP(Imipénémase) qui représentent la majorité des carbapénémases de classe B ont été rejointes en 2008 par une nouvelle enzyme appelée NDM-1 (New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase 1). Le cas décrit était celui d'un patient d'origine indienne ayant auparavant été hospitalisé à New Delhi. Ce type d'enzyme a été principalement isolé chez *K.pneumoniae*(Boutet-Dubois et al, 2012).

La carbapénémase de classe D, OXA-48, décrite chez *K.pneumoniae*, hydrolyse fortement les carbapénèmes et n'hydrolyse pas les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération. Son activité n'est pas inhibée par l'acide clavulanique(Nordmann et al, 2010).La première souche de *K. pneumoniae* productrice d'OXA-48 a été isolée en Turquie en 2003 (Boutet-Dubois et al, 2012).

#### 3. 2. 1. 4. $\beta$ -lactamase à spectre élargi (BLSE):

Depuis le milieu des années 1980, notamment chez *Klebsiella pneumoniae*, et presque exclusivement en milieu hospitalier, des phénotypes de résistance acquise caractérisés par une forte diminution de l'activité des pénicillines, des céphalosporines de première, deuxième et troisième générations et de l'aztréonam. Ces phénotypes se caractérisent de plus par une très forte synergie entre les  $\beta$ -lactamines inactivées et les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases de type acide clavulanique. Ces phénotypes sont la conséquence de la production de  $\beta$ -lactamases plasmidiques appelées «à spectre élargi » en raison du nombre plus élevé de substrats qu'elles sont capables d'inactiver par référence aux  $\beta$ -lactamases «à spectre élargi» classiques de type TEM-1 ou 2 ou SHV-1, dont elles dérivent par mutations ponctuelles(Jarlier et Nordmann, 2000).

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

Les premières observations de BLSE sont décrites en Europe et rapidement après, aux Etats-unis à partir de 1988 ou une nouvelle résistance à la ceftazidime et à l'aztréonam a permis de retrouver une nouvelle  $\beta$ -lactamase à transmission plasmidique chez *K. pneumoniae*. Dans des études

européennes précédentes il a été démontré que *K. pneumoniae* et *E. coli* étaient les espèces les plus fréquemment responsables de la sécrétion de BLSE (Ben Haj Khalifa et al, 2010).

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

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

### 3. 2. 2. Non enzymatique :

#### 3. 2. 2. 1. Diminution de la perméabilité :

Des mécanismes de résistance aux carbapénèmes, ont été décrits combinant une céphalosporinase plasmidique (DHA-1, cmY-2...) ou une BLSE (TEM, SHV, CTX-M...) à une imperméabilité dans des espèces d'entérobactéries qui n'expriment pas naturellement de céphalosporinases comme *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* et *Salmonella spp.* L'analyse des propriétés biochimiques de plusieurs céphalosporinas plasmidiques montre que certaines d'entre elles ont une très faible activité de carbapénémase qui pourrait entraîner un certain degré de résistance aux carbapénèmes en association avec une imperméabilité (Nordmann et al, 2010).

Les souches de *K pneumoniae* possèdent un certain degré de résistance aux céfépime et au ceftazidime par imperméabilité ainsi que les souches qui produisent KPC (Nordmann et al, 2010).

Une résistance à l'ertapénème par perte de porine chez des souches de *K pneumoniae* ou d'*E.coli* productrices de CTX-M et exposées à des concentrations croissantes d'ertapénème (Grall et al, 2011).

### 3.3. Résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux aminosides :

Comme la plupart des entérobactéries, *Klebsiella* présente une résistance aux aminosides gentamicine et à la nétilmicine alors que leur résistance à l'amikacine, ciprofloxacine est faible (Hmamouchi et al, 2005). La résistance acquise résulte d'une mauvaise pénétration de l'aminoside à l'intérieur de la cellule bactérienne ou de la modification enzymatique des antibiotiques par phosphorylation (APH aminoside phosphotransférase), nucléotidylation (ANT aminoside nucléotidyltransférase) ou acétylation (AAC aminoside acétyltransférase) (Archambaud et Clave, 2008).

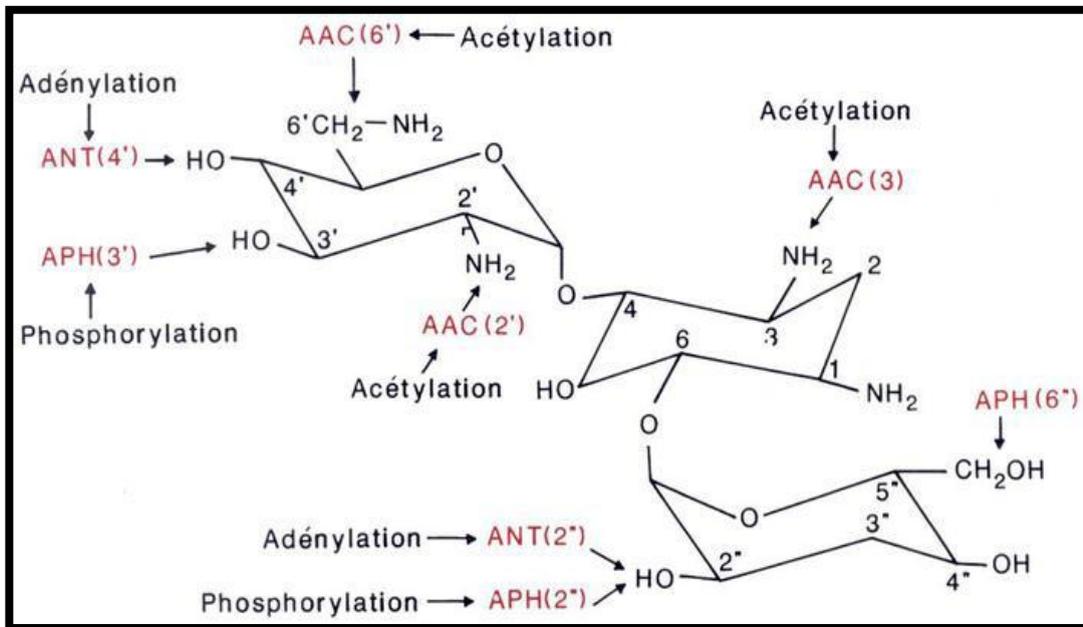


Figure 7 : sites d'inactivation des aminoglycosides(Bryskier, 1999).

### 3.4. Résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux quinolones:

La résistance des bactéries, notamment *Klebsiella pneumoniae*, aux fluoroquinolones est devenue préoccupante tant en milieu hospitalier qu'en médecine communautaire. Les déterminants de résistance plasmidique aux quinolones étaient découverts chez *K. pneumoniae*. (Ben Haj Khalifa et al, 2010). En 1998, Martinez-Martinez a découvert le premier déterminant de résistance plasmidique aux quinolones chez *K. pneumoniae*. La protéine codée par le gène de résistance (*qnr A*) a été nommée QNR A, de 218 acides aminés appartenant à la famille des protéines à motifs pentapeptidiques répétés qui protège le complexe ADN-gyrase de l'inhibition par les quinolones. Quatre autres déterminants plasmidiques également impliqués dans la résistance aux quinolones ont été rapportés (*qnr B*, *qnr S*, *qnr C* et *qnr D*), ainsi que différents variants des protéines Qnr A et Qnr B. (Meradi et al, 2009). Il existe une fréquente association entre les déterminants génétiques de type Qnr et ceux des BLSE, ce qui souligne la possibilité d'une co-sélection de ces deux mécanismes de résistance plasmidique (Ben Haj Khalifa et al, 2010).

*Matériel*

*&*

*Méthodes*

## **1. Matériel**

### **1.1. Matériel Biologique**

#### **1.1.1. Souches étudiées:**

Le present travail a pour but d'étudier 21 souches de *Klebsiella pneumoniae*, dont 14 souches isolées à partir du service de traumatologie et de médecine interne du CHU de Tlemcen et 7 souches de *Klebsiella pneumoniae*, appartenant à la collection du laboratoire de microbiologie «Antibiotiques, Antifongiques: physico-chimie, synthèse et activité biologique isolées à partir de service de réanimation du CHU de Tlemcen.

#### **1.1.2. Souches de références:**

- ATCC25922: *Escherichia coli*;
- VIM: *Pseudomonas aeruginosa* productrice de métallo- $\beta$ -lactamase VIM;
- K 12: *Escherichia coli* résistante à la rifampicine.

## **1.2. Milieux de culture:**

### **1.2.1. Milieux de cultures solides:**

- Gélose nutritive (Fluka);
- Mac Conkey (Fluka);
- Mueller Hinton (Fluka);
- TSI: Triple Sucre à Identifier.

### **1.2.2. Milieux de culture liquides:**

- Eau physiologique

## **1.3. Tests biochimiques:**

- Galerie API 20E (Bio Mérieux);
- Milieu TSI.

## 1.4. Antibiotiques:

### 1.4.1. Endisque:

- β-lactamines:** Ampicilline (10 µg), Amoxicilline (25 µg), Amoxicilline/acide clavulanique (20/10 µg), Imipénème (10 µg), Aztréonam (30 µg), Céfoxitine (30 µg), Céfotaxime (CTX) (30 µg), Ceftazidime (30 µg).
- Aminosides:** Amikacine (30 µg) et Gentamicine (15 µg).
- Quinolones:** Acidenalidixique (30 µg), Norfloxacin (µg) et Ciprofloxacine (5 µg).
- Autres:** Colistine (50 µg).

### 1.4.2. Enpoudre:

- β-lactamines:** Céfoxitine (Panpharma), Aztréonam (Sanofi- synthelabo), Céfotaxime (Aventis), Céftazidime, Céfépime (Bristol-Myers Squibb).
- Aminosides:** Amikacine (Bristol-Myers Squibb).
- Quinolones:** Ciprofloxacine (Bayer Pharma).
- Autre:** Rifampicine (Saidal).

## **2. Méthodes:**

### **2.1. Prélèvements:**

Les prélèvements ont été réalisés par écouvillonnage, puis acheminés au laboratoire (l'écouvillon est introduit dans un tube contenant du bouillon nutritif afin d'assurer la survie des souches) pour être incubés dans l'étuve à  $37^{\circ} \pm 1$  pendant 18 à 24 H.

### **2.2. Isolement et purification:**

On procède directement à une recherche de germes de *Klebsiella pneumoniae* spp *pneumoniae* et pour cela on réalise un ensemencement en stries sur toute la surface d'une gélose MacConkey pour l'isolement des bactéries à Gram négatif grâce à l'action de deux inhibiteurs présents dans le milieu. Le Cristal Violet pour l'inhibition de la flore Gram positive, et les sels biliaires pour la sélection des Entérobactéries. Ce milieu ensemencé, est incubé à  $37^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$  pendant 24 H.

### **2.3. Identification:**

L'identification a été réalisée par le test TSI puis par les galeries d'identification.

#### **2.3.1. Le test TSI (milieu triplesucres):**

##### **A. Principe:**

Ce milieu permet d'étudier la fermentation de trois sucres (glucose, lactose, saccharose), d'apprécier la production ou non de  $\text{H}_2\text{S}$  et de noter la production ou non de gaz à partir du glucose.

##### **B. Technique:**

Elle consiste à ensemencer en stries serrées la pente de la gélose puis par piqûre centrale le culot, la lecture se fait après 18 H d'incubation à  $37^{\circ} \text{C}$ .

### **C. Lecture:**

Les fermentations sucrées se traduisent par une acidification qui fait virer au jaune le rouge dephénol.

1) Lecture de la pente:

- Les germes qui fermentent le lactose et/ ou le saccharose font virer au jaune la pente du tube.

2) Lecture de glucose et du gaz au niveau du culot:

- Les germes qui fermentent uniquement le glucose font virer au jaune le culot du tube.

- La production de gaz résultant des fermentations sucrées se traduit ou bien par l'apparition de bulles ou bien par la fragmentation de la gélose.

3) Production de  $H_2S$ :

- La production de sulfure d'hydrogène se manifeste dans le culot par l'apparition d'une coloration noire de sulfure de fer qui est due à la réduction du thiosulfate en présence de citrate ferrique.

Remarque :

- Les microorganismes ne fermentant aucun des trois sucres ne modifient pas la couleur du milieu.

### **2.3.2. Galeries d'identification:**

#### **2.3.2.1. Principe:**

API 20 E BioMérieux (Appareillage et Procédé d'Identification) est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 20 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données.

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

#### **2.3.2.2. Technique:**

##### **Préparation de la galerie:**

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml de l'eau distillé 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.
- Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

### **Preparation de l'inoculum:**

- Ouvrir un tube d'eau distillée stérile
- Prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé
- Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu.

### **2.3.2.3. Lecture:**

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture (Annexe1) et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification (Annexe2)

## **2.4. Antibiogramme(CASFM,2012;Meradi et al, 2009):**

### **2.4.1.Principe:**

L'antibiogramme est l'interprétation de la sensibilité des bactéries à l'antibiotique en terme d'efficacité Clinique. Il permet de catégoriser une souche bactérienne en classes semi-quantitatives (sensible, intermédiaire ou résistante).

La technique utilisée est la méthode de diffusion des disques sur gélose Mueller-Hinton (BioRad) et interprété après mesure des diamètres d'inhibition en accord avec les recommandations du comité d'antibiogramme de la Société française de microbiologie CA-SFM 2012.

### **2.4.2.Technique:**

#### **Préparation de l'inoculum:**

Ensemencer 5 ml de bouillon BHIB avec 2 à 3 colonies de la souche à tester et incubé 3 à 5 H sous agitation à  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . La culture doit être de  $10^8$  UFC/ml soit de densité optique 0,08-0,1 lue à 625nm.

#### **Ensemencement:**

- Diluer la suspension inoculum au 1/100 ( $\approx 10^6$  UFC/ml) dans de l'eau physiologique;
- Homogénéiser au vortex;
- Ensemencer la suspension inoculum par inoculation des boîtes de Pétri coulées par 20ml de gélose Muller-Hinton;

- Rejeter l'excès puis sécher les boîtes de Pétri 20 à 30 mn à l'étuve.

### **Application des disques:**

- Déposer les disques d'antibiotiques à l'aide d'une pince stérile;

### **2.4.3. Lecture:**

Après 18 à 24 heures d'incubation, mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition, et comparer ces résultats aux valeurs critiques figurant dans l'annexe; Classer les bactéries dans l'une des catégories: Sensible, Intermédiaire ou Résistance; Interpréter les phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines.

## **2.5. Détermination de la CMI en milieu solide (CASFM, 2010):**

### **2.5.1. Principe:**

La CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) est la plus faible concentration d'antibiotique capable de provoquer une inhibition complète de la croissance d'une bactérie donnée après une période d'incubation donnée (Houssni, 2011).

### **2.5.2. Technique:**

#### **Préparation des solutions d'antibiotiques:**

Pour chacun des antibiotiques, préparer une solution mère à 5120 mg/l puis réaliser des dilutions séries de progression géométrique de raison 1/2 (Annexe 4).

#### **Préparation des boîtes:**

- Distribuer 2 ml de chaque dilution d'antibiotique dans une série de boîtes de Pétri ainsi que 2 ml d'eau distillée stérile dans une boîte de Pétri témoin;
- Ajouter 18 ml de milieu Mueller-Hinton gélosé maintenu en surfusion;
- Bien mélanger et laisser solidifier;
- Sécher les boîtes 30 mn à l'étuve à 37°C.

#### **Préparation de l'inoculum:**

- Préparer des suspensions de  $10^8$  UFC/ml pour chacune des souches à tester.

#### **Ensemencement:**

- Diluer la suspension d'inoculum au 1/10;

- Ensemencer par spot 1 à 2 µl de la suspension bactérienne, soit un inoculum de  $10^4$  UFC/spot.

### 2.5.3. Lecture:

Après 18-24 h d'incubation à 37° C.

## 2.6. Test de Hodge (Nordmann *et al*, 2009; Anderson *et al*, 2007; Boutet, 2012):

### 2.6.1. Principe:

Ce test consiste à ensemencer en culture confluyente une souche d'*Escherichia. coli* sauvage (ATCC 25922) sensible aux carbapénèmes sur une gélose Muller Hinton (MH). Ensuite, un disque d'imipénème chargé à 10 µg est déposé au centre de la boîte et chaque souche testée est ensemencée de manière radiale à partir du disque jusqu'à l'extrémité de la boîte de Pétri.

### 2.6.2. Technique:

- Préparer une suspension de *Escherichia coli* ATCC 25922 de  $10^8$  UFC/ml;
- Ensemencer par recouillonnage une gélose Mac Conkey;
- Faire une lourde strie de la souche à tester à partir d'un prélèvement de quelques colonies d'une culture sur milieu Mueller Hinton gélosé du centre de la boîte vers la périphérie;
- Sécher les boîtes 15 mn;
- Déposer un disque d'imipénème au centre (à l'extrémité de la strie);
- Incuber 18 h à  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ .

### 2.6.3. Lecture:

La présence d'une distorsion de la zone d'inhibition autour du disque d'imipénème au contact de la souche testée est interprétée comme un résultat positif après incubation pendant 18 h à 37° C.

## 2.7. Test à la cloxacilline (Naas, 2003):

### 2.7.1. Principe:

La cloxacilline (Orbénine®), est un inhibiteur des céphalosporinases de la classe C $\beta$  à action chromosomique ou plasmidique. En cas d'hyperproduction, les diamètres autour des disques de C3G très diminués peuvent masquer les images de synergies évocatrices de BLSE entre des disques de C3G et d'acide clavulanique.

### 2.7.2. Technique:

Réaliser un antibiogramme par diffusion sur gélose Mueller-Hinton contenant de la cloxacilline à une concentration finale de 250 µg/ml; il faut dissoudre 0,25 g de Cloxacilline dans 25 ml d'eau distillé pour préparer une concentration de 10000 µg/ml puis procéder à une dilution à 2500 µg/ml. Mettre 2 ml de cette concentration avec 18 ml du milieu Mueller-Hinton.

### **2.7.3. Lecture:**

La lecture se fait en comparant les boîtes de Pétri contenant une gélose Mueller-Hinton simple et celles contenant les géloses supplémentées de la cloxacilline. Le résultat positif est noté lorsqu'une augmentation des diamètres d'inhibition, d'au moins 8 mm autour des disques de céfotaxime CTX et céftazidime CAZ, est observée.

## **2.8. Transfert des plasmides par conjugaison (Touati, 2006):**

### **2.8.1. Principe:**

La conjugaison est le transfert d'un plasmide d'une cellule donatrice vers une autre réceptrice (K12). La sélection des transconjugants s'effectue en présence de 2 antibiotiques: l'un correspond à l'une des résistances transférées, l'autre à la résistance non transférable de la souche réceptrice.

### **2.8.2. Technique:**

- Ensemencer la souche réceptrice K12 et les souches donatrices en bouillon BHI et incuber 18 à 24 h à 37°C ± 1°C;
- Réaliser un mélange donatrice réceptrice dans un rapport 1:10 afin d'optimiser le contact;
- Mélanger par inversion;
- Incuber 18 à 24 h à 37°C ± 1°C;
- Préparer les boîtes de sélection; La sélection a été faite sur MacConkey (18 ml) additionné de 1 ml de céfotaxime et 1 ml de rifampicine à des concentrations finales de 16 µg/ml et de 512 µg/ml respectivement;
- Ensemencer par strie le mélange sur un milieu de sélection;
- Vérifier la sélectivité des milieux de sélection en ensemençant la souche donatrice et la souche réceptrice sur la même boîte;
- Incuber 24 h à 37°C ± 1°C.

### **2.8.3. Lecture:**

Analyser les transconjuguants en réalisant des antibiogrammes et/ou des CMI.

## **2.9. PCR:**

### **Préparation du milieu réactionnel:**

Le volume réactionnel final (25µl) est composé de : 12,5µl de quantitaq, 0,5µl d'amorce F, 0,5µl d'amorce R, 6,5µl d'eau ultra pure et 5µl d'ADN (1 colonie pure + 200 µl d'eau ultra pure).

### **Les étapes de la PCR:**

La réaction de polymérisation en chaîne a été réalisée dans un thermocycleur pendant 3 heures où se déroule en trois étapes :

- Première étape : 95°C pendant 15min
- Deuxième étape : 94°C pendant 1 min  
55°C pendant 50 secondes  
72°C pendant 1min, 30 seconde
- Troisième étape : 72°C pendant 7min  
4°C jusqu'à la fin du temps

### **Migration sur gel d'agarose :**

- Préparation du gel d'agarose avec 1g d'agarose et 100ml de TBE 0,5X et 200µl de BET ;
- mettre le gel dans la cuve pour qu'il devienne solide ;
- Charger le premier puits avec 4µl de marqueur (Bench top pGEM DNA Markers-promega) et les autres puits avec 4µl des produits PCR ;
- Les produits d'amplification ont été visualisés après migration sur gel d'agarose.

*Résultats*  
&  
*Interprétation*

## 1. Prélèvements:

Durant la période d'étude allant de 15 avril à 23 mai 2013, 83 prélèvements (patient et environnement) ont été effectués à partir de deux services. 44 prélèvements ont été réalisés au niveau du service de traumatologie et 39 au niveau du service de médecine interne (tableau 1).

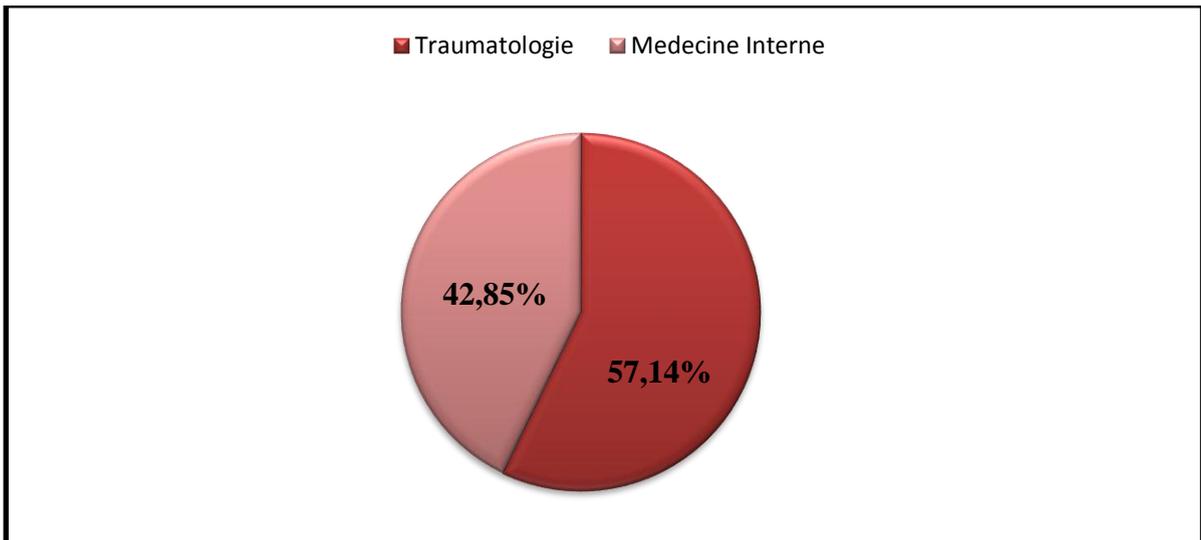
Parmi les 83 prélèvements, 52 sont issus de patients à partir de différents sites. Tandis que 31 prélèvements ont été effectués à partir de l'environnement hospitalier.

**Tableau 1. Répartition des prélèvements selon les services et les sites de prélèvement.**

Services	Nombre de prélèvements								Environnement	Total
	Patients									
	Plaie	platre	Sonde urinaire	Catheter	Divers	Pus	Nasale			
Traumatologie	11	4	5	8	0	1	1	14	44	
MI	0	0	6	4	5	3	4	17	39	
Total	11	4	11	12	5	4	5	31	83	

Divers prélèvement: rectal, peau, ongle, oroil.

57.14% de souches de *Klebsiella pneumoniae* ont été isolées au niveau du service de traumatologie, alors que le taux d'isolement atteint au niveau du service de médecine interne est de 42.85% (Figure 8).

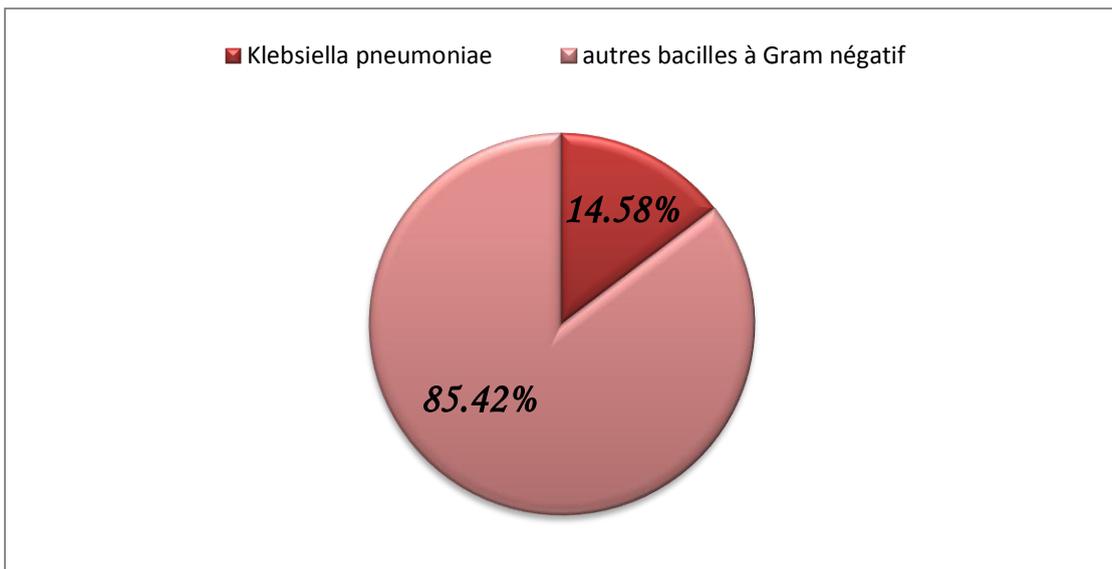


**Figure 8. Répartition de *Klebsiella pneumoniae* en fonction des services.**

## 2. Identification de souches:

### A/ Service de Traumatologie et Médecine Interne:

14 souches de *Klebsiella pneumoniae* ont été identifiées, parmi un total de 96 bacilles à Gram négatif, avec une fréquence d'isolement de 14.58% (14/96), dont 5 souches ont été isolées à partir de patients avec 9.61% (5/52) et 9 souches à partir de l'environnement soit 29.03% (9/31).

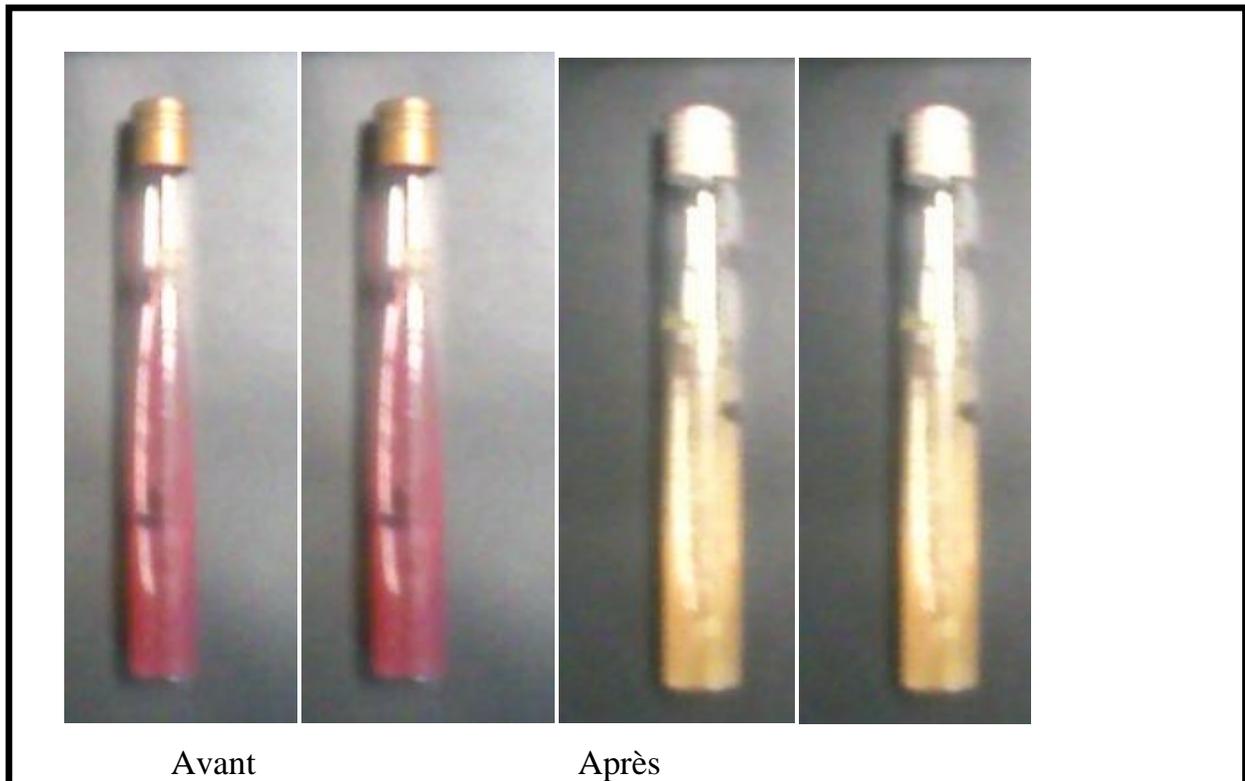


**Figure 9. Fréquence d'isolement de *Klebsiella pneumoniae*.**

## B/ Service de reanimation:

La collection contient sept souches de *Klebsiella pneumoniae*.

L'identification bactérienne est basée sur les caractères cultureux, morphologiques et biochimiques des espèces. Le milieu TSI présente une couleur jaune qui indique la fermentation du glucose, du lactose et /ou du saccharose par les bactéries, avec souvent production de gaz.



**Figure10. TestTSI (résultat positif).**

L'identification par galerie API 20E permet de mettre en évidence les caractères biochimiques.

*Klebsiella pneumoniae* se caractérise par la présence d'une uréase, l'absence d'ornithine décarboxylase et d'arginine dihydrolase et par sa capacité à utiliser un grand nombre de glucides.



**Figure 11. Identification des souches de *Klebsiella pneumoniae* par galerie API 20E.**

	OnpG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA
K.P	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+

**Tableau2. Résultats de l'identification des souches de *Klebsiella pneumoniae* par le système API20 E.**

### 3. Résistance de *Klebsiellapneumoniae* aux antibiotiques :

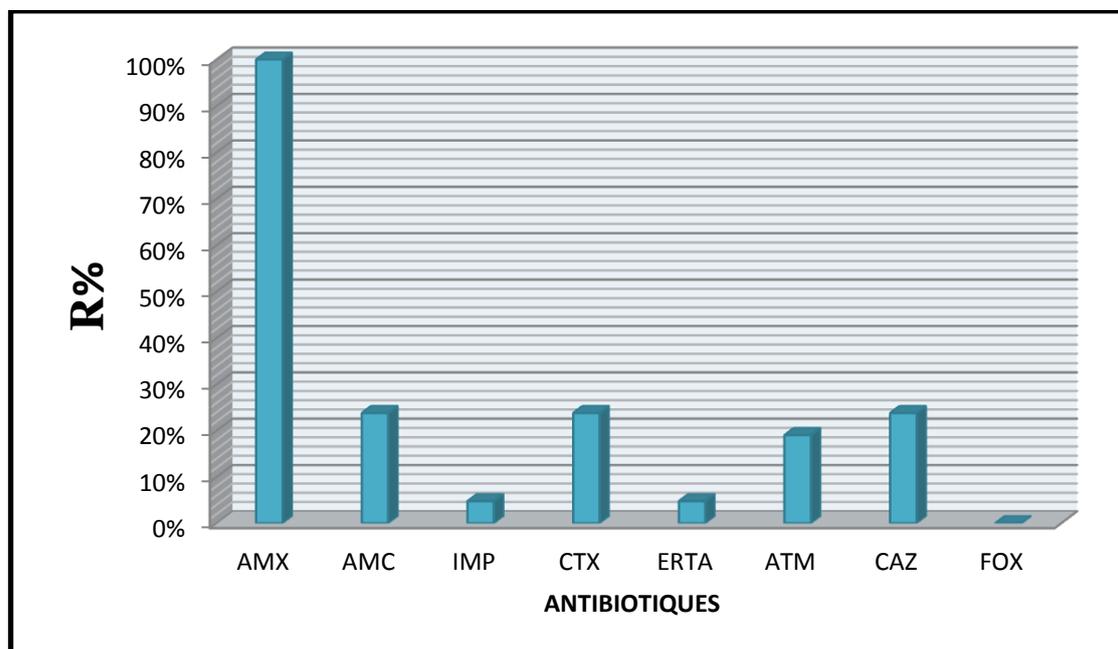
Toutes les souches de *Klebsiella pneumoniae* ont été testées vis-à-vis de 14 molécules d'antibiotiques appartenant à 4 familles différentes dont 8  $\beta$ -lactamines, 2 aminosides, 3 quinolones et la colistine.

Des faibles taux de résistance ont été obtenus pour l'aztréonam (19.04%), le céfotaxime, la ceftazidime et l'amoxicilline/acide clavulanique (23.8%).

La céfoxitine présente une bonne activité sur les souches de *Klebsiella pneumoniae* avec une sensibilité totale.

Une bonne activité de L'imipénème et l'ertapénème à été remarquée avec une résistance de 4.76%.

Contrairement à l'amoxicilline qui reste inactive avec une résistance totale (100%) due à une résistance naturelle des souches à cet antibiotique. (**Figure 12, Annexe 6**).

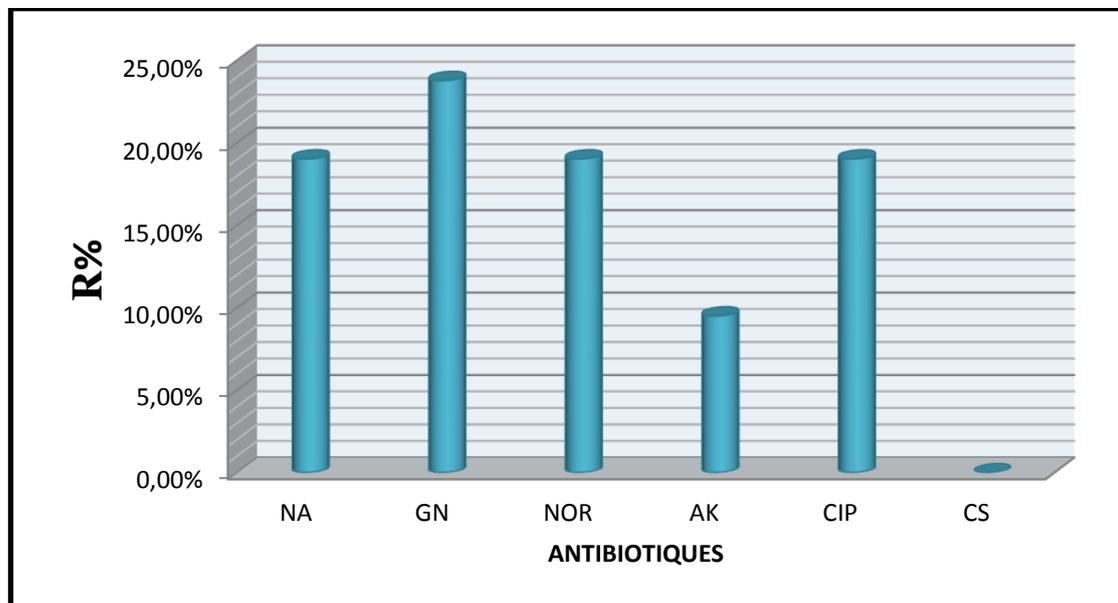


**Figure12. Taux de résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux  $\beta$ -lactamines.**

Pour les aminosides, le taux le plus important a été observé pour la gentamicine (23.8%), suivi de l'amikacine (9.52%)

Des faibles taux de résistance ont été obtenus pour norfloxacine, l'acide nalidixique et la ciprofloxacine (19.04%).

Aucune résistance n'a été observée pour la colistine avec 100% de souches sensibles.



**Figure13. Pourcentage de résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux autres classes d'antibiotiques.**

### **3.1. Résistance des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées au niveau de service de traumatologie et médecine interne:**

Les souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées au niveau du service de traumatologie et médecine interne présentent une résistance importante pour l'amoxicilline (100%), avec une sensibilité à toutes les céphalosporines de 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> génération.

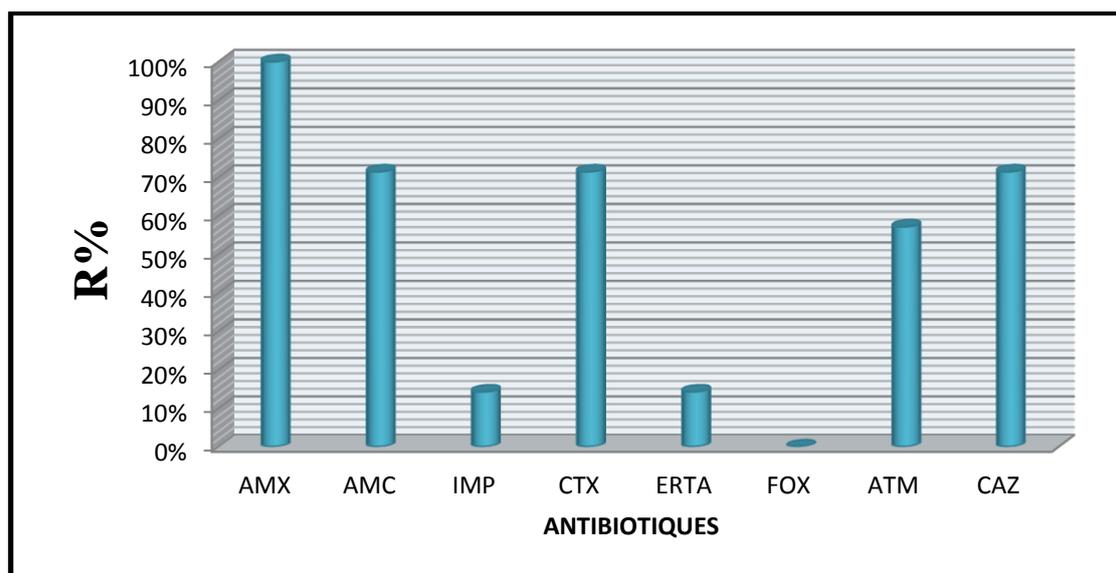
Aucune résistance n'a été observée pour les aminosides et les fluoroquinolones et la colistine avec 100% de souches sensibles.

### **3.2. Résistance des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées au niveau de service de réanimation:**

On rapporte généralement une augmentation des taux de résistance aux antibiotiques par rapport aux souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées au niveau du service de médecine interne et traumatologie.

Les souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées à partir de service d'animation du CHU de Tlemcen ont montré une résistance à de nombreuses  $\beta$ -lactamines. Les taux de résistances étaient les suivants: amoxicilline (100%), amoxicilline/acide clavulanique (71.42%), céfotaxime (71.42%), ceftazidime (71.42%), aztréonam (57.14%), Imipénème 14.28 et Ertapénème 14.28%.

Contrairement aux autres  $\beta$ -lactamines la céfoxitine présente une bonne activité sur toutes la collection des souches de *Klebsiella pneumoniae* étudiée avec (100%) de souches sensibles,

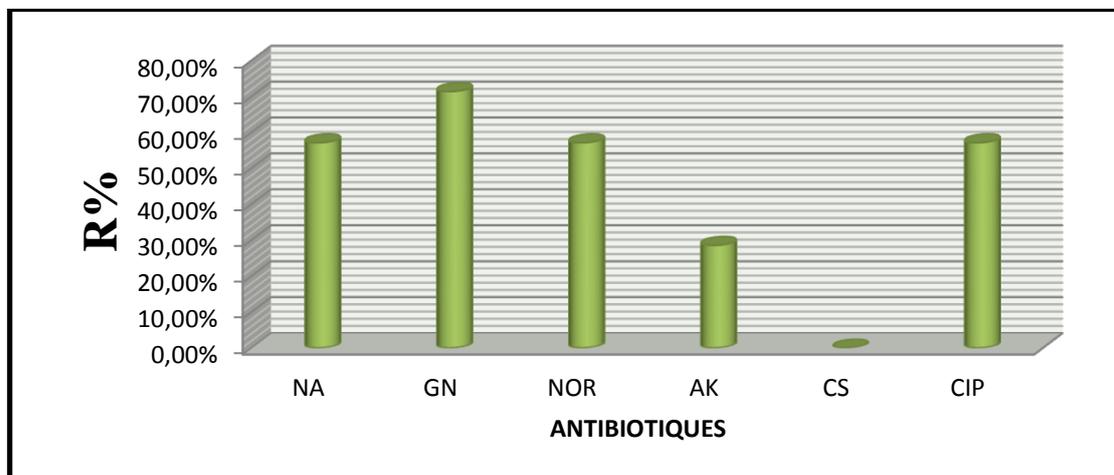


**Figure 14. Pourcentage de résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux  $\beta$ -lactamines au niveau de la réanimation.**

Pour ce qui est de la résistance aux aminosides, le taux le plus important a été observé pour la gentamicine (71.42%) suivi par l'amikacine (28.57 %).

En ce qui concerne les quinolones, un taux de résistance moyen a été obtenu pour l'acide nalidixique, norfloxacine et ciprofloxacine avec un pourcentage de 57.14%.

Pour la colistine aucune résistance n'est observée.

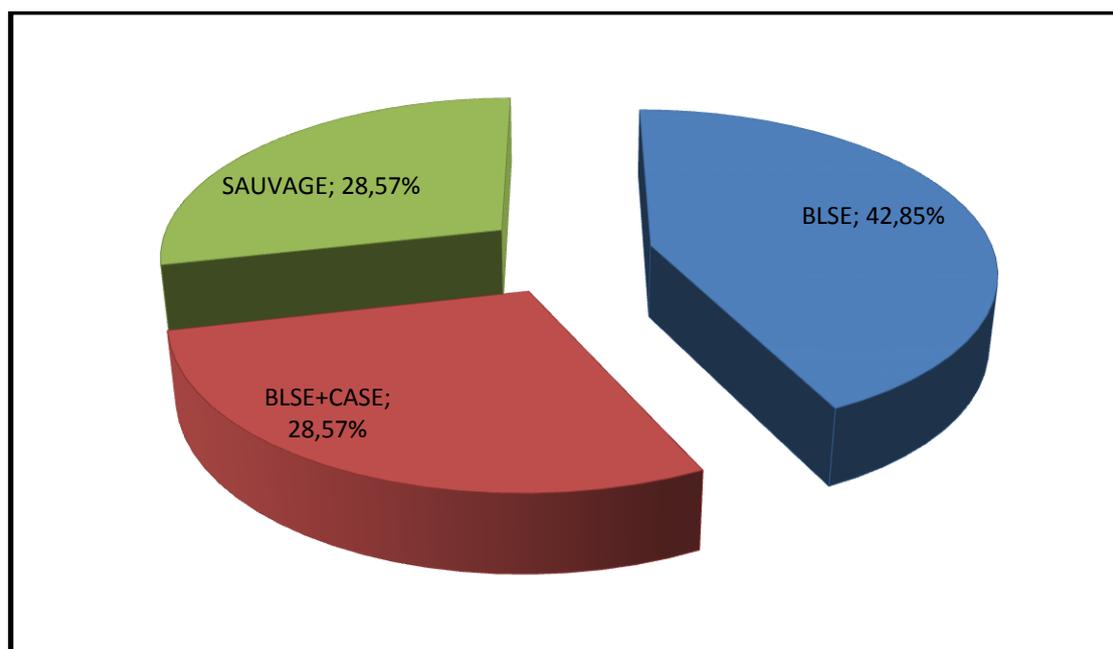


**Figure 15. Pourcentage de résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux autres classes d'antibiotiques au niveau de la réanimation.**

#### **4. Phénotypes de résistance:**

L'analyse phénotypique des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées au niveau du service de réanimation est en faveur d'une production de  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE) soit (71,42%), parmi ces souches, (28,57%) produisent également une céphalosporinase associée (BLSE + CASE).

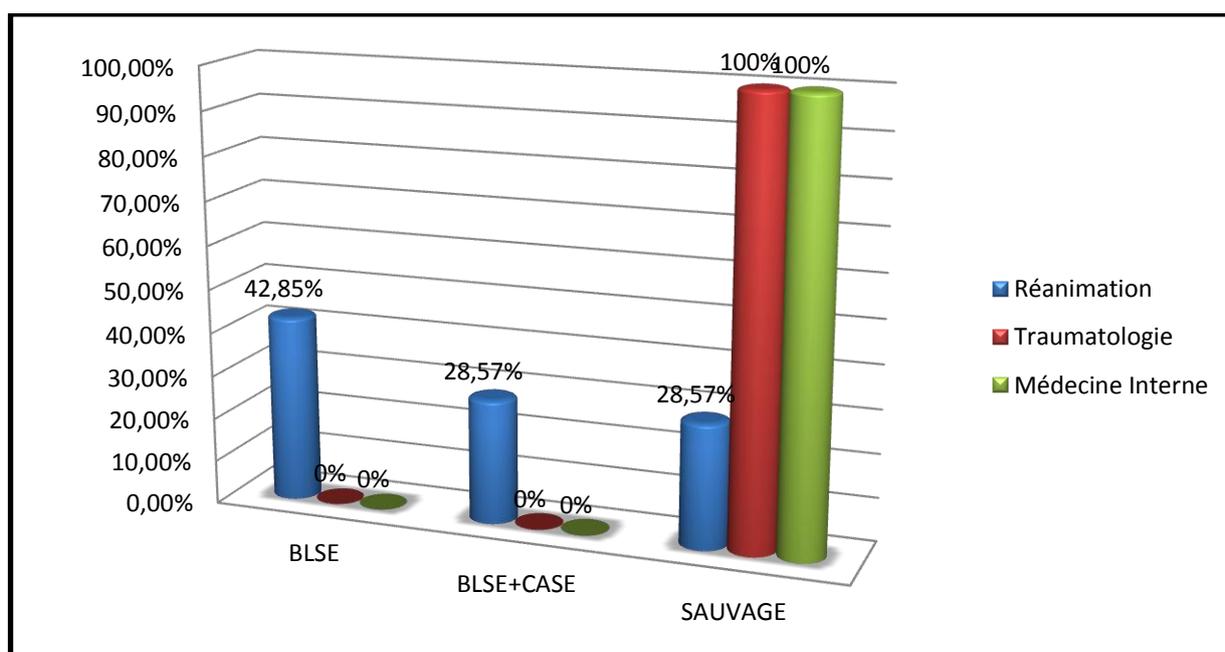
Le reste des souches (28.57%) ont présenté le phénotype sauvage.



**Figure 16. Répartition des phénotypes de résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux  $\beta$ -lactamines au niveau de la réanimation.**

CASE : Céphalosporinase, BLSE :  $\beta$ -lactamases à spectre étendu.

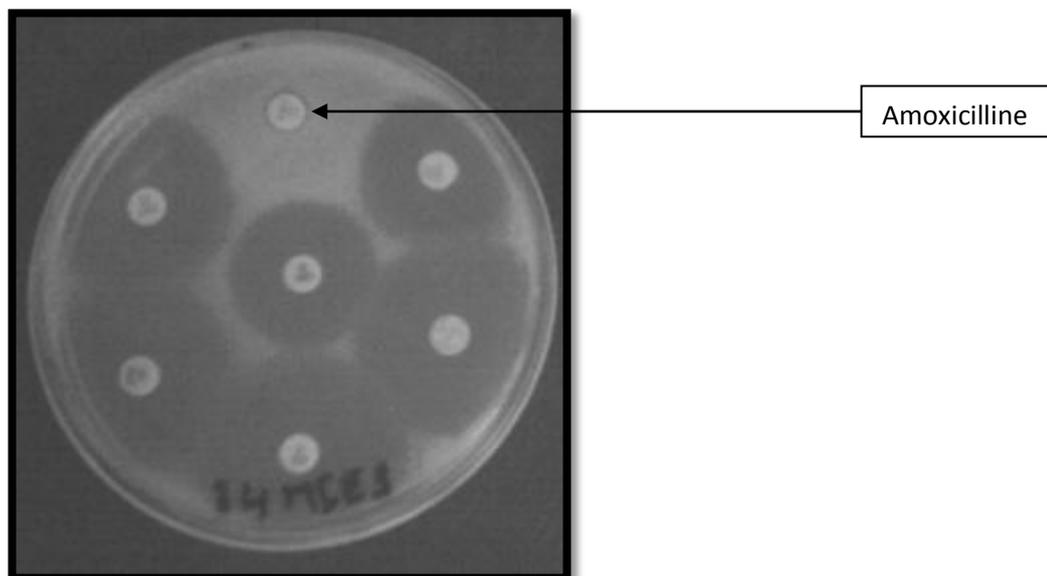
Au sein des services, la répartition des phénotypes de résistance montre une grande différence. En effet, au niveau de service de réanimation, le taux d'isolement des souches présentant le phénotype BLSE est plus important par rapport aux autres phénotypes avec un pourcentage de 71.42 %. Alors qu'au niveau des services de traumatologie et de médecine interne, toutes les souches présentent le phénotype sauvage avec un pourcentage de 100 %.



**Figure 17. La répartition des phénotypes de résistance en fonction des services.**

#### 4.1. Phénotype sauvage:

Ce phénotype est observé chez toutes les souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées au niveau du service de traumatologie et de médecine interne.



**Figure18. Phénotype sauvage.**

#### **4.2. Phénotypes BLSE:**

La présence de phénotype BLSE a été confirmée par des images de synergie caractéristiques entre l'acide clavulanique et les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération/ou l'aztréonam (figure 19).

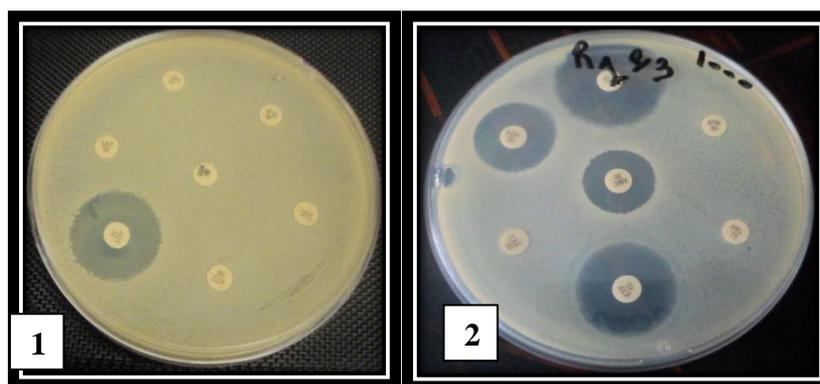


**Figure19. Phénotype BLSE.**

#### **4.3. Phénotype céphalosporinase associé a une $\beta$ -lactamase à spectre étendu:**

L'observation phénotypique des souches a laissé supposer que deux souches (Kp2, Kp3) produisaient une céphalosporinase associée à une BLSE, mais sans qu'il y est d'images de synergie (Figure 17). Cela peut être due soit a leur expression à bas niveau, soit à l'existence de

mécanisme de résistance associé pouvant masquer leur expression, avec une hyperproduction de céphalosporinase.



**Figure 20. BLSE associée a une CASE.**  
**1: Sans cloxacilline, 2 :Avec cloxacilline.**

**Tableau 3. CMI (en µg/ml) des souches d'entérobactéries vis-à-vis des molécules d'antibiotiques.**

Souches Antibiotiques	Kp1	Kp2	Kp3	Kp7
Céfoxitime	<2	8	8	4
Céfotaxime	128	≥512	≥ 512	256
Céftazidime	16	≥ 512	≥ 512	64
Céfépime	16	256	128	16
Aztréonam	256	≥ 512	≥ 512	128
Amikacine	8	64	32	8
Ciprofloxacine	64	16	8	4

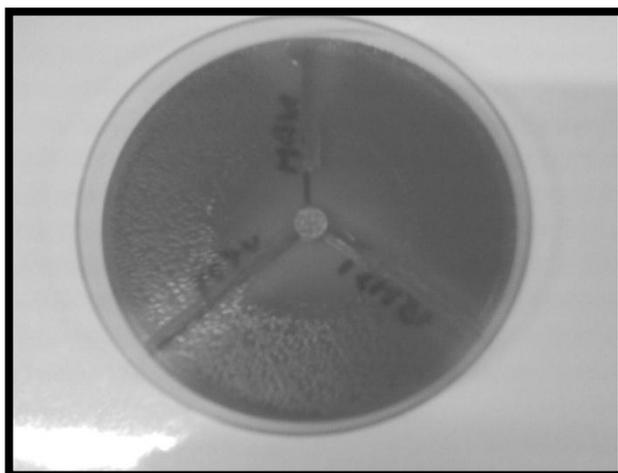
#### 4.4. Phénotype carbapénèmase :

La recherche d'enzymes ayant une activité carbapénémases a été systématique chez les souches résistantes et/ou de sensibilité réduite à l'imipénème.

##### ➤ Test de Hodge

Le test de Hodge a permis de mettre en évidence l'enzyme à activité carbapénémase pour une souche de *Klebsiella pneumoniae* (Figure 21).

Un témoin positif correspondant à une souche de *Pseudomonas aeruginosa* productrice de métallo  $\beta$ -lactamase VIM-1 a été utilisé.



**Figure 21. Résultat négatif de test de Hodge.**

### **5. Conjugaison bactérienne:**

La conjugaison a été réalisée en utilisant comme souche réceptrice la souche de référence *Escherichia coli* K 12 résistante à la rifampicine et 5 souches de *Klebsiella pneumoniae* dont 3 BLSE et 2 BLSE+CASE. Les transconjugants ont été sélectionnés sur gélose Mac Conkey contenant du céfotaxime et de la rifampicine à des concentrations finales de 16 $\mu$ g/ml et de 256  $\mu$ g/ml respectivement.

La conjugaison a été négative pour toutes les souches.

### **6. Détection par PCR des gènes de résistance :**

L'amplification par PCR en utilisant des amorces spécifiques montrent que les BLSE exprimées sont de type TEM et SHV.



**Figure 22: Image de la migration des produits de PCR sur le gel d'agarose pour le gène TEM.**

**M** : marqueur de poids moléculaire ,**1** : *Klebsiella pneumoniae* (contrôle positif)  
**2** : contrôle négatif, **3**: Kp3, **4**: contrôle négatif **5** :Kp7, **10** : contrôle négatif



**Figure 23: Image de la migration des produits de PCR sur le gel d'agarose pour le gène SHV.**

**M** : marqueur de poids moléculaire ,**1** : *Klebsiella pneumoniae* (contrôle positif)  
**2** : contrôle négatif, **3**: Kp3, **4**: contrôle négatif **5** :Kp7, **10** : contrôle négatif

**Tableau 4. Caractéristiques des souches.**

Organisme	Code	Profil de résistance antibiotique	<i>blagene</i>	
			TEM	SHV
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Kp 3	BLSE	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Kp 7	BLSE	-	+

# *Discussion*

Durant les dernières décennies, *Klebsiella pneumoniae* est devenue une importante cause d'infections nosocomiales sévères et difficiles à traiter. Des épidémies sont causées par des souches résistantes à une large variété d'antibiotiques, surtout en néonatalogie, médecine interne et soins intensifs. Le taux d'isolement des souches de *Klebsiella pneumoniae* dans notre étude est de (14.58%) 14 souches parmi un total de 96 bacilles à Gram négatif.

Cette valeur est supérieure à celle retrouvée au niveau du C.H.U de Sidi Bel Abbès (12.5%) 30 souches parmi un total de 240 bacilles à Gram négatif (**Souna, 2011**).

Globalement le profil bactériologique des isolats est marqué par une légère prédominance de *Klebsiella pneumoniae* au niveau du service de traumatologie (57.14%) par rapport au niveau du service de médecine interne (42.85%).

Les résultats de notre étude montrent que la fréquence de la résistance de *Klebsiella pneumoniae* à l'association amoxicilline-acide clavulanique était de l'ordre de 23,8 % qui correspond aux résultats obtenus par Ben Haj, Un taux beaucoup plus important a été retrouvé dans une étude marocaine (**Ben Haj khalifa et al, 2010**).

Les premières observations de BLSE sont décrites en Europe et, rapidement après, aux États-Unis à partir de 1988 où une nouvelle résistance à la ceftazidime et à l'aztréonam a permis de retrouver une nouvelle  $\beta$ -lactamase à transmission plasmidique chez une *Klebsiella pneumoniae*. (**Tlamçani et al, 2009**) Dans cette étude, Le taux de résistance à l'aztréonam et la ceftazidime soit (19.04%) et (23.8%) respectivement.

Concernant *Klebsiella pneumoniae*, la résistance au cefotaxime est associée à la production d'enzyme  $\beta$ -lactamase de type CTX-M (**Ben Achour et al, 2008**).

Dans notre étude la résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux céphalosporines de troisième génération (C3G) d'utilisation courante comme le cefotaxime est de 23.8% qui correspond aux résultats obtenus par Ben Haj (**Ben Haj khalifa et al, 2010**). Les niveaux de résistance étant considérés inférieurs à ceux observés au CHU de Constantine (**Arafa et al, 2009**).

Les BLSE sont des enzymes à large spectre, Les gènes codant pour ces enzymes sont principalement situés sur des éléments génétiques mobiles (plasmides, transposons...), expliquant la rapidité de leur diffusion. Jusqu'à la fin des années 1990, les entérobactéries productrices de BLSE étaient principalement des espèces dites «hospitalières», les souches de *K. pneumoniae*,

productrices d'enzymes de type TEM et/ou SHV et diffusant de façon clonale entre patients hospitalisés (**Grall et al, 2011**).

Les résultats de notre étude montrent que 23.8 % des souches de *Klebsiella pneumoniae* étudiées sont productrices de  $\beta$ -lactamase à spectre élargi (BLSE).

Cette valeur est nettement inférieure à celle retrouvée au niveau du C.H.U de Sidi Bel Abbès (Souna, 2011) (80%), se rapproche de celle obtenue en Espagne (20.8%) (Romero, 2007), et en Europe (23 %) mais supérieure à celle rapportée au États-Unis (8 %) et Canada (5 %) (Winokur et al, 2001).

Dans les années 1990, les principales BLSE étaient dérivées des enzymes de type TEM et SHV et diffusaient majoritairement au sein de clones hospitaliers de *Klebsiella pneumoniae* (Ruppé, 2010). Dans notre étude la détection par PCR des gènes de résistance montrent que les BLSE exprimées sont de type TEM et SHV.

Au niveau des services de traumatologie et de médecine interne toutes les souches appartenant au phénotype sauvage, donc sensibles à tous les antibiotiques utilisés à l'exception des résistances naturelles (amoxicilline). Ces résultats sont très éloignés de ceux de Constantine rapportés dans une étude par (Sekhri, 2011) qui rapportent une fréquence de 62% de *K.p* BLSE au niveau du CHU de Constantine et 21.90 % de *K.p* BLSE au niveau de service de médecine interne. Un taux de (04%) de *K.p* BLSE a été retrouvé au niveau de service de médecine interne du CHU tunisien (Elhani D et al, 2006).

Le taux d'isolement des souches présentant le phénotype BLSE dans notre étude est plus important en réanimation (71.42%) qu'en traumatologie et médecine interne. Cette valeur est supérieure à celle retrouvée au niveau de service de réanimation du C.H.U tunisien (47%) (Elhani D et al, 2006).

Le service de réanimation reste le carrefour idéal pour la propagation des *Klebsiella pneumoniae* productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE), ce qui est certainement la conséquence d'une utilisation abusive et non contrôlée des antibiotiques, ou encore le manque d'une détection rapide de ces *K.p* BLSE+, et de surcroît un manque d'hygiène, puisque la transmission est manuellement portée (Arafa et al, 2009).

Il existe une fréquente association entre les déterminants génétiques de type qnr et ceux des BLSE, ce qui souligne la possibilité d'une co-sélection de ses deux mécanismes de résistance plasmidique. Une étude menée en Espagne a évalué la prévalence des gènes Qnr chez 305 souches d'entérobactéries productrices de BLSE. Les résultats de cette étude ont révélé une prévalence de 4,9% de l'association « Qnr-BLSE » (Ben Haj khalifa et al, 2010).

Une autre étude menée en Côte d'Ivoire a évalué la prévalence des gènes Qnr chez 151 souches d'entérobactéries productrices de BLSE. La prévalence de l'association « Qnr-BLSE » au cours de cette étude était de 27 % en moyenne pour l'ensemble des entérobactéries (**Tlamçani et al, 2009**).

Dans notre étude, cinq souches multirésistantes ont été identifiées (BLSE + résistance aux FQ). Ces souches qui correspondent à 100 % (5/5) des *Klebsiellas pneumoniae* productrices de  $\beta$ -lactamase à spectre étendu étudiés sont suspectes d'être porteuses de plasmide codant pour les BLSE et pour la résistance aux fluoroquinolones.

Les carbapénèmes représentent la dernière ligne de défense dans l'armement antimicrobien contre les infections sérieuses ou invasives (**Arafa et al, 2009**). Une bonne activité de L'imipénème et l'ertapénème à été remarquée dans notre étude avec une résistance de 4.76%.

Les carbapénèmes, derniers antibiotiques de la classe des  $\beta$ -lactamines, ont un très large spectre antibactérien et possèdent une grande stabilité vis-à-vis de la quasi-totalité des  $\beta$ -lactamases (**Grall et al, 2011**).

Concernant les aminosides, on assiste à une résistance assez marquée pour la gentamicine avec 23.8%, Cette valeur est inférieure à celle retrouvée au niveau du C.H.U de Constantine (69.23%). Par contre une bonne activité est enregistrée pour les fluoroquinolones qui marquent 0% de souches résistantes pour la ciprofloxacine (**Sekhri, 2011**). Dans notre étude le taux de résistance est de 19.04% pour la ciprofloxacine.

Une excellente activité est enregistrée pour la colistine qui marque 0% de souches résistantes.

*Conclusion*

Les infections à *Klebsiella pneumoniae* subsp *pneumoniae* et surtout à *K.pneumoniae* productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) représentent une cause importante de morbidité et de mortalité en milieu hospitalier.

Le présent travail est effectué sur 21 souches de *Klebsiella pneumoniae* dont 14 souches isolées à partir du service de traumatologie et de médecine interne du CHU de Tlemcen entre 15 avril à 23 mai 2013 et 7 souches de *Klebsiella pneumoniae*, appartenant à la collection du laboratoire de microbiologie «Antibiotiques, Antifongiques: physico-chimie, synthèse et activité biologique isolées à partir de service de réanimation du CHU de Tlemcen».

La fréquence des souches multirésistantes au niveau du service de réanimation de notre CHU est importante. De plus, un grand nombre de ces souches ont présenté des phénotypes de résistance à une ou plusieurs familles d'antibiotiques en particulier les  $\beta$ -lactamines, les aminosides et les quinolones. Par ailleurs l'imipénème reste la molécule la plus active.

L'analyse phénotypique des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées au niveau de service de réanimation est en faveur d'une production de  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE) soit (71,42%), parmi ces souches, (28,57%) produisent également une céphalosporinase associée (BLSE + CASE).

D'après les résultats de notre étude, il apparaît que les  $\beta$ -lactamines, les aminosides, les quinolones et la colistine ont gardé globalement leur activité dans le traitement des infections à *Klebsiella pneumoniae* au niveau du service de traumatologie et de médecine interne. L'analyse des phénotypes de résistance à ces antibiotiques permet de mettre en évidence la prédominance du phénotype sauvage.

La comparaison des résultats des trois services: médecine interne, traumatologie et réanimation, nous permet de dire que le service de réanimation reste le carrefour idéal pour la propagation des *K.pneumoniae* productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE), ce qui est certainement la conséquence d'une utilisation abusive et non contrôlée des antibiotiques, le manque d'une détection rapide de ces souches et de surcroît un manque d'hygiène.

## A/

- **Aartsen J J., Stahlhut S G., Harrison EM., Crosatti M., Ou H-Y., Krogfelt K A., Struve C and Rajakumar K. 2012.** Characterization of a novel chaperone/usher fimbrial operon present on KpGI-5, a methionine tRNA gene-associated genomic island in *Klebsiella pneumoniae*. van Aartsen et al. BMC Microbiology 2012, 12:59.
- **Anderson K., Lonsway D.R., Rasheed J.K., Biddle J., Jensen B., McDougall L.K., et al. 2007.** Evaluation of Methods to Identify the *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. J. Clin. Microbiol; 45(8): 2723-2725.
- **Arafa N., Smati F., Scheftel JM., Meunier O. 2009.** CARACTERISATION PHENOTYPIQUE ET GENOTYPIQUE DE SOUCHES DE *Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae* ISOLEES A L'HOPITAL UNIVERSITAIRE DE CONSTANTINE, ALGERIE. Sciences & Technologie C – N°30 Décembre (2009), pp.43-49.
- **Archambaud M., Clave D. 2008.** Fiche technique : *Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae*. Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique. Laboratoire de Bactériologie Hygiène CHU Toulouse. Fiche technique-Bactériologie 83 EN.FTBAC.14610611.01.  
[www.ctcb.com/.../Fiches%20techniques/Klebsiella%20pneumoniae%20s](http://www.ctcb.com/.../Fiches%20techniques/Klebsiella%20pneumoniae%20s).
- **Arlet G., Philippon A. 2003.** Les nouvelles  $\beta$ -lactamases à l'aube du troisième millénaire. Revue Française des laboratoires, avril 2003, N°352.

## B/

- **Ben Achour N., Mercuri P.S., Power P., Belhadj C., Ben moussa M., Galleni M et Belhadj O. 2008.** First detection of CTX-M-28 in a Tunisian hospital from a cefotaxime-résistant *Klebsiella pneumoniae* strain. Pathologie Biologie 57 (2009) 343-348.
- **Ben Haj Khalifa.A et Khedher. M. 2010.** Epidémiologie des souches de *Klebsiella* spp.uropathogènes productrices de B-lactamases à spectre élargi dans un hopital universitaire Tunisien.pathologie Biologie 60(2012) e1-e5.
- **Bessard G. 2004.** Pharmacologie des antibiotiques. Faculté de médecine de Grenoble. Université Joseph Fourier. DCEM I. Sur le lien: [www-sante.ujfgrenoble.fr/SANTE/pharma/site.fac/diaporama/antibio2.ppt](http://www-sante.ujfgrenoble.fr/SANTE/pharma/site.fac/diaporama/antibio2.ppt).
- **Boll E J., Nielsen L N., Krogfelt K A et Struve C. 2012.** Novel screening assay for in vivo selection of *Klebsiella pneumoniae* genes promoting gastrointestinal colonisation. Boll et al. BMC Microbiology 2012, 12:201.

- **Botelho-Nevers E., Gouriet F., Lepidi H., Couvret A., Amphoux B., Dessi P., Raoult D. 2007.**Chronic nasal infection caused by *Klebsiella rhinoscleromatis* or *Klebsiella ozaenae*: two forgotten infectious diseases. International Journal of Infectious Diseases (2007) 11, 423—429.
- **Botto H. 2003.** Infections urinaires nosocomiales de l'adulte : conférence de consensus 2002 >, texte court. Médecine et maladies infectieuses 33 (2003) 370–375.
- **Boukadida J., Salem N., Hannachi N., Monastiri K., Snoussi N. 2002.** Exploration génotypique d'une bouffée épidémique nosocomiale néonatale à *Klebsiella pneumoniae* productrice de bêta-lactamase à spectre étendu.Arch Pédiatr 2002 ; 9 :463-8.
- **Boutet-Dubois A., Pantel A., Sotto A., Philippe Lavigne J. 2012.** Les entérobactéries productrices de carbapénémases. Lettre d'information du CClin Sud-Est destinée aux Acteurs de la Lutte contre les Infections Nosocomiales & Associées aux Soins. Avril 2012.
- **Brisse S., Duijkeren E V. 2004.** Identification and antimicrobial susceptibility of 100 *Klebsiella* animal clinical isolates. Veterinary Microbiology 105(2005) 307-312.
- **Bryskier A. 1999.** Antibiotiques. Agent antibactériens et antifongiques. Ellipses ; Paris.p : 54- 436-445.

C/

- **Carlet J., Rambaud C., Pulcini C. 2012.** Alliance contre les bactéries multirésistantes : sauvons les antibiotiques ! Alliance against MDRO: Safeguarding antibiotics. Annales Francaises d'Anesthésie et de Réanimation 31(2012) 704-708.
- **Carpentier M., Appere V., Saliou P., de Tinteniach A., Floch H., Le Gall F., M. Cosse M., El Bouyousfi M., Baron R., Boles J-M., Jourdain S., B. Lejeune., B. Nancy., G. Prat., D. Tande., M. Virmaux., J.-P. Wagnier., R. Garlantézec. 2012.** Outbreak of extended spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in an intensive care unit (Brest). Médecine et maladies infectieuses 42 (2012) 501–509.
- CA-SFM. 2012. Comité de l'antibiogramme de la société française demicrobiologie. Sur le lien : <http://www.sfm-microbiologie.org/>
- CA-SFM. 2010. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Sur le lien : <http://www.sfm.asso.fr/>.
- **Cavallo J-D., R. Fabre R., Jehl F., Rapp C., Garrab E. 2004.** Bêta-lactamines. EMC-Maladies Infectieuses 1 (2004) 129-202.

- **Claire W. 2013.** Fluoroquinolones. Interne-Service Maladies Infectieuses, Pr Stahl, Grenoble. [www.infectiologie.com/...grenoble/2013-DUATB-Grenoble-Fluoroquino](http://www.infectiologie.com/...grenoble/2013-DUATB-Grenoble-Fluoroquino).
- **Courvalin P., Drugeon N., Flandrois J.P. et Goldstein F. 1991.** Aspects théoriques et thérapeutiques. Bactéricidie. Ed Maloine. p113-26.

#### E/

- **El Fertas-Aissani R., Messai Y., Alouache S., Bakour R. 2012.** Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. PATBIO-3048; No. of Pages 8.
- **Elhani D., Bakir L et Aouni M. 2006.** Dissémination des souches de *Klebsiella pneumoniae* productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu dans un centre hospitalo-universitaire tunisien. Ann Biol Clin 2006 ; 64 (3) : 237-43.

#### G/

- **George M Garrity., Julia A Bell et Timothy G Lilburn. 2004.** Taxonomic Outline of the Prokaryotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition. DOI : 10.1007/bergeysoutline 200405.
- **Grall N., Andremont A., Armand-Lefèvre L. 2011.** Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse ? ANTINF-16 ; No. of Pages 16.
- **Gueudet T., Richter S., Szulc M et Jehl F. 2009.** Les nouvelles formes de résistance des bactéries aux antibiotiques : deux cas de *Klebsiella pneumoniae* produisant une céphalosporinase plasmidique. MEDMAL-2927 ; No. Of Pages 3.

#### H/

- **Hennequin C., Forestier C. 2007.** Influence of capsule and extended-spectrum beta-lactamases encoding plasmids upon *Klebsiella pneumoniae* adhesion. Research in Microbiology 158(2007) 339-347.
- **Hennequin C., Robin F., Cabrolier N., Bonnet R., et Forestiera C. 2012.** Characterization of a DHA-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strain Involved in an Outbreak and Role of the AmpR Regulator in Virulence. 0066-4804/12/\$12.00 Antimicrobial Agents and Chemotherapy p. 288–294.

- **Hmamouchi B., Chakkouri K., Nejmi S E., Chlilek A. 2005.**Épidémiologie de l'infection nosocomiale en réanimation pédiatrique. *Lettres à la rédaction / Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 24 (2005) 697–700.
- **Houssni B., Berkli H., Madani H., Azzouzi A. 2011.** Résistances bactériennes, consommation d'antibiotiques et politique de gestion de l'antibiothérapie. *L'officiel* N° 88.
- **Hsieh P-F., Lin TL., Yang FL., Wu M-C., Pan YJ., Wu S H., Wang J T.2012.**Lipopolysaccharide O1 Antigen Contributes to the Virulence in *Klebsiella pneumoniae* Causing Pyogenic Liver Abscess. March 2012 | Volume 7 | Issue 3 | e33155.

#### J/

- **Jarlier V et Nordmann P. 2000.** Entérobactéries et  $\beta$ -lactamines. *ESKA 2000-Précis de bactériologie clinique.*
- **Joly B et Reynaud A. 2002.** Entérobactéries. Systématique et méthodes de diagnostic. P : 79-80-83.

#### M/

- **Meradi L., Djahoudi A., Abdi A., Bouchakour M., Perrier Gros Claude J-D., Timinouni M. 2009.**Resistance aux quinolones de types qnr, aac (60)-Ib-cr chez les entérobactéries isolées à Annaba en Algérie. *Pathologie Biologie* 59(2011) e73-e78.

#### N/

- **Naas T. 2003.** Phénotype de résistance aux antibiotiques de la souche *Acinetobacter baumannii* productrice de la  $\beta$ -lactamase VEB-1. Service de Bactériologie-Virologie-Hygiène (P. Nordmann), CHU de Bicêtre. *Journal of Clinical Microbiology*; 41: 3542-7.
- **Nedjai S., Barguigua A., Djahmi N., Jamali L., Zerouali K., Dekhil M., Timinouni M. 2011.**Prevalence and characterization of extended spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group bacteria, in Algeria. *Médecine et maladies infectieuses* 42 (2012) 20–29.
- **Nordmann P et Carrer A. 2010.** Les carbapénèmes des entérobactéries. *Archives de pédiatrie* 2010 ; 17 :S154-162.

- **Nordmann P., Cuzon G et Naas T. 2009.**The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing Bacteria. [www.thelancet.com/infection](http://www.thelancet.com/infection) Vol 9 April 2009.

## P/

- **Paul H. Roy. 1997.** Dissémination de la résistance aux antibiotiques : le génie génétique à l'œuvre chez les bactéries. Médecine/ sciences n° 8-9, vol. 13.
- **Philippon A., et Arlet G. 2006.**β-Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel ! Ann Biol Clin 2006 ; 64 (1) : 37-51.

## R/

- **Rodriguez H., Villalobos M., Struelens J. 2006.** Résistance bactérienne par B-lactamases à spectre étendu : implications pour le réanimateur. Réanimation 15 (2006) 205-213.
- **Romero EDV., Padilla TP., Hernandez AH., Grande RP., Vazquez MF., Garcia IG., et al. 2007.** Prevalence of clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. producing multiple extended-spectrum β-lactamases. Diagn Microbiol Infect Dis 2007;59:433–7.
- **Ruppé E. 2010.** Épidémiologie des β-lactamases à spectre élargi : l'avènement des CTX-M. Doi : 10.1016/j.antib.2010.01.003. Vol 12 - N° 1. P. 3-16.

## S/

- **Sekhri –Arafa N. 2011.** Fréquence et marqueurs épidémiologiques de *Klebsiella pneumoniae* dans les services à haut risque infectieux au niveau du CHU Benbadis de Constantine.Thèse Pour l'obtention du Grade de Docteur en Sciences.
- **Souna D.2011.**Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries au niveau du C.H.U de Sidi Bel Abbes.Thèse de magister.
- **Srinivasan V B., Vaidyanathan V., Mondal A., Rajamohan G.2012.** Role of the Two Component Signal Transduction SystemCpxAR in Conferring Cefepime and Chloramphenicol Resistance in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044.April 2012 | Volume 7 | Issue 4 | e33777.

- **Stahlhut S G., Struve C., Krogfelt K A et Reisner A. 2012.** Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65 (2012) 350–359.
- **Szarecka A., Lesnock K R., Ramirez-M CA., Nicholas H B et Wymore T. 2011.** The Class D  $\beta$ -lactamase family: residues governing the maintenance and diversity of function. *Protein Engineering, Design & Selection* vol. 24 no. 10 pp. 801–809, 2011.

#### T/

- **Tlamçani Z., Ellaia K., Benomar A., Kabbaj H., Alaoui AE et Seffar M. 2009.** La résistance aux fluoroquinolones chez des souches de *Klebsiella* spp productrices de bêta-lactamase à spectre étendu isolées dans les urines. *Ann Biol Clin* 2009 ; 67 (5) : 553-6.
- **Touati A., benallaoua S., forte D., Madoux J., Brasme L. et De Champs C. 2006.** First report of CTX-M-15 CTX-M-3  $\beta$ -lactamase among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Béjaia, Algeria. *International Journal of Antimicrobial Agents*; 27: 397-402.

#### W/

- **Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. 2001.** Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clin Infect Dis* 2001 ; 32 : S94-103.
- **Wolff M., Joly-Guillou M-L et Pajot O. 2008.** Le point sur les carbapénèmes. *Réanimation* (2008) 17,242-250.

#### Y/

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

*Annexe*

## Annexe 1. Tableau de lecture des résultats de la galerie 20E

### *TABLEAU DE LECTURE*

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/c up.)	REACTIONS/ ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
<b>ONPG</b>	2-nitrophényl-βD-galactopyranoside	0,223	β-galactosidase (OrthoNitroPhényl-βD-Galactopyranosidase)	Incolore	jaune(1)
<b>ADH</b>	L-arginine	1,9	ArginineDiHydrolase	Jaune	rouge/ orangé(2)
<b>LDC</b>	L-lysine	1,9	LysineDéCarboxylase	Jaune	rouge/ orangé(2)
<b>ODC</b>	L-ornithine	1,9	OrnithineDéCarboxylase	Jaune	rouge/ orangé(2)
<b>CIT</b>	trisodiumcitrate	0,756	utilisationduCITrate	vertpâle/ jaune	bleu-vert/ bleu(3)
<b>H2S</b>	sodiumthiosulfate	0,075	productiond'H2S	incolore/ grisâtre	dépotnoir/ finliseré
<b>URE</b>	Urée	0,76	UREase	Jaune	rouge/ orangé(2)
<b>TDA</b>	L-tryptophane	0,38	TryptophaneDésAminase	Jaune	TDA/immédia marron-rougeâtre
<b>IND</b>	L-tryptophane	0,19	productiond'INDole	Incolore vertpâle/ jaune	JAMES/immédia rose
<b>VP</b>	sodiumpyruvate	1,9	productiond'acétoïne (VogesProskauer)	incolore/ rosepale	VP1+VP2/10min rose/ rouge(5)
<b>GEL</b>	Gélatin (originebovine)	0,6	Gélatinase(GELatine)	nondiffusion	diffusiondupigmentnoir
<b>GLU</b>	D-glucose	1,9	fermentation/ oxydation (GLUcose)(4)	bleu/ bleu-vert	jaune/ jaunegrise
<b>MAN</b>	D-mannitol	1,9	fermentation/ oxydation (MANnitol)(4)	bleu/ bleu-vert	jaune
<b>INO</b>	Inositol	1,9	fermentation/ oxydation (INOsitol)(4)	bleu/ bleu-vert	jaune
<b>SOR</b>	D-sorbitol	1,9	fermentation/ oxydation (SORbitol)(4)	bleu/ bleu-vert	jaune
<b>RHA</b>	L-rhamnose	1,9	fermentation/ oxydation (RHAMnose)(4)	bleu/ bleu-vert	jaune
<b>SAC</b>	D-saccharose	1,9	fermentation/ oxydation (SACcharose)(4)	bleu/ bleu-vert	jaune
<b>MEL</b>	D-melibiose	1,9	fermentation/ oxydation (MELibiose)(4)	bleu/ bleu-vert	jaune
<b>AMY</b>	amygdaline	0,57	fermentation/ oxydation (AMYgdaline)(4)	bleu/ bleu-vert	jaune
<b>ARA</b>	L-arabinose	1,9	fermentation/ oxydation (ARABinose)(4)	bleu/ bleu-vert	jaune

Annexe 2. Tableau d'identification catalogue analytique API 20E

TABLEAU D'IDENTIFICATION / IDENTIFICATION TABLE / PROZENTTABELLE / TABLA DE IDENTIFICACION / TABELLA DI IDENTIFICAZIONE / QUADRO DE IDENTIFICAÇÃO  
 ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ / IDENTIFIKATIONSTABEL / IDENTIFIKATIONSTABELL / TABELA IDENTIFYKACYJNA

% de reações positivas após 18-24 / 48 h à 36°C ± 2°C / % of positive reactions after 18-24 / 48 hrs. at 36°C ± 2°C / % der positiven Reaktionen nach 18-24 / 48 Std. bei 36°C ± 2°C /  
 % de las reacciones positivas después de 18-24 / 48 h a 36°C ± 2°C / % di reazioni positive dopo 18-24 / 48 ore a 36°C ± 2°C / % de reacções positivas após 18-24 / 48 h a 36°C ± 2°C /  
 % θετικές αντιδράσεων μετά από 18-24 / 48 ώρες στους 36°C ± 2°C / % pozitivna reakcija efter 18-24 / 48 timmer vid 36°C ± 2°C / % at positive reaktioner efter 18-24 / 48 timer ved 36°C ± 2°C /  
 % pozytywnych reakcji po 18-24 / 48 godzinach w 36°C ± 2°C

API 20 E	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	IND	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	N2	MOB	McC	OF6	OFF
<i>Burkholderia agrestis</i>	100	0	0	85	25	0	0	0	0	0	0	100	100	0	1	99	0	92	99	100	0	100	100	100	100	
<i>Cedecea davisiae</i>	99	89	0	99	75	0	0	0	0	89	0	100	100	10	0	0	100	0	100	100	0	87	100	100	100	
<i>Cedecea lapagei</i>	99	98	0	75	0	0	0	0	0	90	0	100	99	0	0	0	0	1	100	1	0	95	100	100	100	
<i>Citrobacter braakii</i>	50	45	0	99	75	81	1	0	4	0	0	100	100	1	100	100	1	91	99	99	0	95	100	100	100	
<i>Citrobacter freundii</i>	90	24	0	0	75	75	1	0	1	0	0	100	99	25	99	99	82	40	99	0	98	0	95	100	100	
<i>Citrobacter koseri</i> / <i>amalonaticus</i>	99	75	0	100	97	0	1	0	99	0	0	100	100	1	99	99	1	1	98	99	0	100	0	95	100	
<i>Citrobacter koseri</i> / <i>farmeri</i>	99	2	0	100	25	0	1	0	99	0	0	100	100	1	99	99	99	80	99	99	0	100	0	95	100	
<i>Citrobacter youngae</i>	100	50	0	1	80	30	0	1	0	0	0	100	100	0	0	1	100	0	25	100	0	85	0	95	100	
<i>Edwardsiella icterae</i>	0	0	100	99	50	94	0	0	99	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	100	100	
<i>Edwardsiella icterae</i>	0	0	100	99	1	75	0	0	99	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	100	100	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	99	0	99	98	82	0	1	0	0	85	0	99	99	99	99	99	99	99	99	99	0	100	0	97	100	
<i>Enterobacter amnigenus</i> 1	99	25	0	99	40	0	0	0	0	75	0	100	100	0	0	100	99	99	99	99	0	100	0	92	100	
<i>Enterobacter amnigenus</i> 2	99	80	0	99	80	0	0	0	0	0	0	100	99	25	100	0	99	0	100	100	0	100	0	100	100	
<i>Enterobacter asburiae</i>	100	25	0	99	80	0	0	0	0	10	0	100	100	0	1	100	1	1	100	100	0	100	0	99	100	
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	100	75	0	99	99	0	1	0	0	89	0	100	100	0	1	100	0	1	100	100	0	100	0	95	100	
<i>Enterobacter cloacae</i>	98	82	1	92	90	0	1	0	0	85	0	99	99	12	90	85	96	90	99	99	0	100	0	90	100	
<i>Enterobacter cloacae</i>	98	82	1	92	90	0	1	0	0	85	0	99	99	23	100	99	100	100	99	100	0	100	0	90	100	
<i>Enterobacter gergoviae</i>	99	0	32	100	75	0	93	0	0	90	0	100	97	0	88	99	40	100	99	100	0	100	0	92	100	
<i>Enterobacter intermedium</i>	99	0	0	99	1	0	0	0	0	2	0	100	100	100	75	8	99	99	99	99	0	100	0	96	100	
<i>Enterobacter sakazakii</i>	100	96	0	91	94	0	1	0	25	91	10	100	100	98	1	91	82	36	75	3	99	0	100	0	95	100
<i>Escherichia coli</i> 1	90	1	74	70	0	1	3	0	0	89	0	99	98	1	42	30	3	3	1	70	0	98	0	5	100	
<i>Escherichia coli</i> 2	26	1	45	20	0	1	1	0	0	50	0	99	90	1	42	30	3	3	1	70	0	98	0	5	100	
<i>Escherichia ferusonii</i>	96	1	99	100	1	0	0	0	99	0	0	100	99	1	0	87	0	1	99	99	0	100	0	93	100	
<i>Escherichia hermannii</i>	100	0	1	100	1	0	0	0	99	0	0	100	100	0	0	99	25	0	99	99	0	100	0	99	100	
<i>Escherichia vulneris</i>	100	30	50	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	1	95	7	95	95	99	0	100	0	100	100	
<i>Escherichia vulneris</i>	100	30	50	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	1	95	7	95	95	99	0	100	0	100	100	
<i>Evangelia americana</i>	98	0	0	0	75	0	0	0	0	95	1	99	99	0	0	1	0	1	50	1	0	100	0	60	100	
<i>Halvha alvei</i> 1	75	0	99	98	50	0	10	0	0	50	0	99	98	0	1	99	0	0	25	99	0	100	0	85	100	
<i>Halvha alvei</i> 2	50	0	99	99	1	0	1	0	0	10	0	99	98	0	1	1	1	0	0	0	1	100	0	0	100	
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	100	0	99	99	99	0	85	0	100	65	0	100	100	99	100	100	100	100	100	100	0	100	0	100	100	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	99	0	80	0	88	0	78	0	99	80	0	100	100	99	100	99	99	100	100	100	0	100	0	100	100	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>ozeanae</i>	94	18	25	1	18	0	1	0	0	0	1	99	96	57	66	53	20	80	97	85	0	92	0	0	100	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i>	99	0	73	0	86	0	75	0	0	90	0	100	99	99	99	99	99	100	100	100	0	100	0	100	100	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>rhinoscleromatis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	99	99	99	99	99	99	99	99	0	100	0	100	100	
<i>Klebsiella terrigena</i>	100	0	99	6	52	0	0	0	0	75	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	0	100	0	100	100	
<i>Kluyvera spp.</i>	95	0	25	99	60	0	0	0	80	0	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	0	100	0	100	100	
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	98	0	0	0	0	0	0	0	99	0	1	100	99	0	2	100	66	99	99	100	0	100	0	100	100	
<i>Moraxella wisconsinensis</i>	97	0	0	0	40	0	0	0	15	1	0	100	1	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	100	100	
<i>Morganella morganii</i>	1	0	10	98	1	1	99	83	99	0	0	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	90	0	100	100	
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	99	50	75	99	98	1	1	82	98	0	0	0	0	1	0	0	0	0	88	0	100	100	
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	100	100	
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	100	100	
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	100	100	
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	100	100	
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	100	100	
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	100	100	
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	100	100	
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	100	100	
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	100	100	
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	100	100	
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	100	100	
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	100	100	
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	100	100	
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	100	100	
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	100	100	
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	100	100	
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	100	100	
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	100	100	
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	100	100	
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	100	100	
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	100	100	
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	100	100	
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	0</																						

Annexe3. Tableaud'identificationducatalogueanalytiqueAPI20E

API 20 E	V4.0	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	DX	NO2	N2	MOB	MAC	OF/O	OF/F
<i>Salmonella paratyphi A</i>	0	5	0	75	99	0	1	0	0	0	0	0	100	99	0	99	98	0	96	0	99	0	100	0	95	100	100	
<i>Salmonella pullorum</i>	0	1	75	100	0	85	0	0	0	0	0	0	100	100	0	100	100	0	99	0	75	0	100	0	100	100	100	
<i>Salmonella typhi</i>	0	1	99	0	8	0	8	0	0	0	0	0	100	99	0	99	0	0	99	0	0	0	100	0	97	100	100	
<i>Salmonella spp.</i>	1	56	82	93	65	83	0	0	0	1	0	1	99	100	40	99	86	1	90	1	99	1	92	0	95	100	100	
<i>Serratia ficaria</i>	99	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	50	99	74	99	99	100	99	0	99	0	100	100	100	
<i>Serratia litchicola</i>	99	0	73	99	75	0	0	0	0	0	0	0	100	100	97	100	99	30	99	99	99	0	99	0	91	100	100	
<i>Serratia liquefaciens</i>	95	1	78	98	80	0	2	0	0	0	0	0	100	99	80	98	2	99	72	97	97	0	100	0	95	100	100	
<i>Serratia marcescens</i>	94	0	95	95	96	0	25	0	1	70	87	65	100	99	85	98	1	99	68	97	25	0	95	0	97	100	100	
<i>Serratia odorifera 1</i>	95	0	95	99	95	0	0	0	0	99	50	99	100	99	99	99	99	99	99	99	99	0	99	0	100	100	100	
<i>Serratia odorifera 2</i>	95	0	96	1	95	0	0	0	0	99	50	99	100	99	99	99	99	1	99	99	95	0	99	0	100	100	100	
<i>Serratia plymuthica</i>	99	0	0	0	65	0	0	0	0	0	65	50	100	90	70	70	1	99	85	98	98	0	99	0	50	100	100	
<i>Serratia rubidaea</i>	99	0	30	0	92	0	1	0	0	71	82	99	99	75	1	3	99	95	99	99	99	0	100	0	85	100	100	
<i>Shigella spp.</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	0	23	0	0	99	63	0	7	7	1	20	0	50	0	100	0	100	100	100	
<i>Shigella sonnei</i>	96	0	0	93	0	0	0	0	0	0	0	0	99	99	0	1	75	1	1	0	99	0	100	0	100	100	100	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	80	0	0	90	0	98	0	0	50	5	0	0	99	99	25	98	1	99	4	75	75	0	98	0	2	100	100	
<i>Yersinia frederiksenii/intermedia</i>	99	0	0	75	1	0	99	0	99	1	0	0	100	99	25	99	99	99	1	99	99	0	98	0	5	100	100	
<i>Yersinia kristensenii</i>	80	0	0	80	0	0	99	0	97	0	0	0	100	99	10	99	0	0	0	99	99	0	98	0	5	100	100	
<i>Yersinia pestis</i>	68	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	99	99	0	70	0	0	0	30	30	0	47	0	0	99	100	
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	98	0	0	0	0	1	0	99	0	0	0	0	99	97	0	0	75	0	50	25	50	0	95	0	0	100	100	
<i>Aeromonas hydrophila gr. 1</i>	98	0	25	1	25	0	0	0	85	25	0	0	99	99	1	3	5	97	1	75	75	0	97	0	95	99	99	
<i>Aeromonas hydrophila gr. 2</i>	99	97	80	1	80	0	0	0	85	80	97	97	99	99	9	9	1	80	1	75	5	0	97	0	95	99	99	
<i>Aeromonas salmonicida ssp. salmonicida</i>	1	60	1	0	0	0	0	0	0	1	0	75	50	54	0	0	0	0	0	1	0	100	98	0	1	99	99	
<i>Photobacterium damsela</i>	1	99	75	0	1	0	98	0	0	0	10	1	50	0	0	0	0	1	0	0	0	100	100	0	25	99	99	
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	95	99	100	100	0	0	0	0	0	100	0	0	99	0	99	0	0	0	0	0	0	100	99	0	95	99	99	
<i>Vibrio alginolyticus</i>	0	0	98	75	60	0	1	0	100	10	75	99	100	0	0	1	100	0	10	10	10	47	0	100	99	94	94	
<i>Vibrio cholerae</i>	98	1	94	97	75	0	0	0	0	99	98	92	98	98	0	0	0	94	0	5	0	100	96	0	100	99	99	
<i>Vibrio fluvialis</i>	95	98	0	0	0	1	0	0	0	80	0	75	75	80	0	1	0	75	0	36	75	100	100	0	100	99	99	
<i>Vibrio holisae</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	94	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	99	99	
<i>Vibrio mimicus</i>	99	0	99	99	50	0	0	0	0	0	0	0	99	99	0	0	0	0	0	0	0	100	95	0	100	95	99	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0	0	100	99	50	0	1	0	100	1	75	100	99	0	0	1	1	0	12	60	100	63	0	100	98	99	99	
<i>Vibrio vulnificus</i>	99	0	91	90	25	0	0	0	99	1	99	99	75	0	0	0	1	0	90	0	99	54	0	100	99	99	99	
<i>Pasteurella aerogenes</i>	99	0	0	80	0	0	0	0	0	97	0	0	99	0	97	0	1	99	0	0	75	75	100	0	100	99	99	
<i>Pasteurella multocida 1</i>	4	0	0	25	0	0	0	0	0	99	0	0	23	1	0	1	0	75	0	0	0	99	90	0	0	2	23	
<i>Pasteurella multocida 2</i>	7	0	0	45	0	0	0	0	0	99	0	44	99	0	44	99	0	99	0	0	0	99	90	0	0	2	23	
<i>Pasteurella pneumotropicalis/haemolytica</i>	60	0	1	10	0	0	25	0	15	7	3	35	12	12	12	12	1	35	1	2	1	80	0	0	0	9	33	
<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	0	0	0	0	51	0	1	0	0	5	5	99	0	0	0	0	0	0	99	1	99	0	3	0	0	90	98	
<i>Bordetella/Atcaligenes/Moraxella spp. *</i>	0	0	0	0	52	0	14	1	0	25	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	95	62	1	75	75	0	
<i>Burkholderia cepacia</i>	50	0	25	16	78	0	0	0	0	0	1	43	60	1	0	0	0	13	0	7	20	90	40	0	99	88	97	
<i>Citrobacterium anthracis</i>	0	99	0	0	75	0	0	0	14	0	99	99	0	0	0	0	0	10	0	0	0	99	75	0	99	99	99	
<i>Citrobacterium violaceum</i>	86	75	0	0	94	0	0	0	0	25	13	84	0	1	0	1	1	15	1	85	0	30	0	100	91	94	0	
<i>Chryseomonas luteola</i>	5	0	0	12	0	0	90	0	75	0	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	20	0	0	57	90	
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	77	0	0	0	20	0	1	0	85	0	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	6	0	0	43	93	
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	0	0	75	99	0	0	0	0	0	25	1	75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	95	0	1	1	49	
<i>Eikenella corrodens</i>	0	0	0	0	89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	100	99	99	
<i>Flavimonas oryzaeblans</i>	0	0	0	0	50	0	75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	84	2	2	
<i>Mycobacterium Chryseobacterium indologenes</i>	0	0	0	0	30	0	25	1	0	15	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	42	60	99	99	47	
<i>Citrobacterium anthracis</i>	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	90	0	0	100	100	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	89	0	0	92	0	25	0	0	0	1	75	50	0	0	0	0	1	10	1	25	97	12	56	97	100	98	
<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	0	75	0	0	0	0	0	0	0	0	10	27	25	0	0	0	0	0	25	1	20	99	26	0	100	96	93	
<i>Non-fermenter spp.</i>	1	1	0	0	37	0	1	0	0	0	15	9	9	0	0	0	1	1	1	1	1	93	48	35	99	85	49	
<i>Shewanella putrefaciens</i>	0	0	0	80	75	75	1	0	0	0	0	75	1	0	0	0	0	0	0	0	0	96	95	0	100	86	9	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	70	0	75	1	75	1	0	0	0	0	0	90	1	0	0	0	0	0	0	0	0	25	1	100	91	49	0	

**Annexe4. Tableaude Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour les entérobactéries (CA-SFM, 2010).**

Familles d'antibiotiques	Antibiotiques testés	Signe	Charges des disques	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)	
				S	R	S	R
β-lactamines	Ampicilline	AM	10 µg	≤4	>8	≥19	<16
	Amoxicilline	AMX	25µg	≤4	>8	≥21	<16
	Amoxicilline+ Ac.clavulanique	AMC	20/10µg	≤4/2	>8/2	≥21	<16
	Ticarcilline	TIC	75µg	≤8	16	≥24	<22
	Ticarcilline+ Ac.clavulanique	TCC	75/10µg	≤8/2	>16/2	≥24	<22
	Pipéracilline	PIP	75µg	≤8	>16	≥20	<16
	Pipéracilline+ tazobactam	TZP	75/10µg	≤8/4	>16/4	≥21	<17
	Imipénème	IPM	10µg	≤2	>8	≥24	<17
	Aztréonam	ATM	30µg	≤1	>8	≥27	<21
	Céfalotine	CF	30µg	≤8	>32	≥18	<12
	Céfuroxime	CXM	30µg	≤8	>8	≥22	<22
	Céfoxitine	FOX	30µg	≤8	>32	≥22	<15
	Latamoxef	MOX	30µg	≤4	>32	≥23	<17
	Céfotaxime	CTX	30µg	≤1	>2	≥26	<23
	Céftriaxone	CRO	30µg	≤1	>2	≥26	<23
	Ceftazidime	CAZ	30µg	≤1	>8	≥26	<19
	Céfépime	FEP	30µg	≤1	>8	≥24	<17
Cefpirome	CPO	10µg	≤1	>8	≥24	<17	
Aminosides	Kanamycine	K	30UI	≤8	>16	≥17	<15
	Tobramycine	TM	30µg	≤2	>4	≥18	<16
	Amikacine	AN	30µg	≤8	>16	≥17	<15
	Gentamicine	GM	15µg(10UI)	≤2	>4	≥18	<16
Quinolones	Ac.nalidixique	NA	30µg	≤8	>16	≥20	<15
	Ofloxacine	OFX	5µg	≤0.5	>1	≥25	<22
	Ciprofloxacine	CIP	5µg	≤0.5	>1	≥25	<22
Divers	Colistine	CS	50µg	≤2	>2	≥15	<15
	Triméthoprime+ Sulfaméthoxazole	SXT	1,25/23,75µg	≤2/38	>4/76	≥16	<13

**Annexe5.Préparationdessolutionsd'antibiotiques(Courvalinetal.,1991)**

<b>Solutioninitiale (µg/ml)</b>	<b>Solutionmère (ml)</b>	<b>Eaudistillée (ml)</b>	<b>Concentration obtenue(µg/ml)</b>	<b>Concentrationfinale dans lemilieu (*µg/ml)</b>
5120	2	2	2560	256
5120	1	3	1280	128
5120	0,5	3,5	640	64
5120	0,5	7,5	320	32
320	2	2	160	16
320	1	3	80	8
320	0,5	3,5	40	4
320	0,5	7,5	20	2
20	2	2	10	1
20	1	3	5	0,5
20	0,5	3,5	2,5	0,25
20	0,5	7,5	1,25	0,125
1,25	2	2	0,6	0,06

## Annexe6.Résultats d'antibiogramme.

CODE	AMX	AMC	CTX	CAZ	ERTA	ATM	IMP	MECANISME	FOX	GN	AK	NA	CIP	NOR	CS
K1MI	R	S	S	S	S	S	S	phénotype sauvage	S	S	S	S	S	S	S
K2MI	R	S	S	S	S	S	R	phénotype sauvage	S	S	S	S	S	S	S
K3MI	R	S	S	S	S	S	S	phénotype sauvage	S	S	S	S	S	S	S
K4MI	R	S	S	I	S	S	S	phénotype sauvage	S	S	S	S	S	I	S
K5MI	R	S	S	S	S	S	S	phénotype sauvage	S	S	S	S	S	S	S
K6MI	R	S	S	I	S	S	S	phénotype sauvage	S	S	S	S	S	S	S
K7 TE	R	S	S	I	S	S	S	phénotype sauvage	S	S	S	S	S	S	S
K8 TE	R	S	S	S	S	S	S	phénotype sauvage	S	S	S	S	S	S	S
K9TE	R	S	S	S	S	S	S	phénotype sauvage	S	S	S	S	S	S	S
K10	R	S	S	S	S	S	S	phénotype sauvage	S	S	S	S	S	I	S
K11	R	S	S	S	S	S	S	phénotype sauvage	S	S	S	S	S	S	S
K12	R	S	S	I	S	I	S	phénotype sauvage	S	S	S	S	S	S	S
K13 T	R	S	S	I	S	S	S	phénotype sauvage	S	S	S	S	S	S	S
K14 T	R	S	S	I	I	I	S	phénotype sauvage	S	S	S	S	S	I	S

**K1MI:** *Klebsiella pneumoniae* isolée à partir de médecine interne (patient).

**K 13 T:** *Klebsiella pneumoniae* isolée à partir de traumatologie (patient).

**E :** Environnement.

## Annexe6.Résultatsd'antibiogramme.

CODE	AMX	AMC	CTX	CAZ	RTA	ATM	IMP	MECANISME	FOX	GN	AK	NA	CIP	NOR	CS
Kp1R	R	R	R	R	S	R	S	BLSE	S	R	S	R	R	R	S
KP2R	R	R	R	R	S	S	S	CASE+BLSE	S	R	S	R	S	S	S
KP3R	R	R	R	R	S	R	S	CASE+BLSE	S	R	R	R	R	R	S
KP4R	R	R	R	R	R	R	R	BLSE	S	R	R	R	R	R	S
KP5R	R	S	S	S	S	S	S	Phenotype sauvage	S	S	S	S	S	S	S
KP6R	R	S	S	S	S	S	S	Phenotype sauvage	S	S	S	S	S	S	S
KP7R	R	R	R	R	S	R	S	BLSE	S	R	S	S	R	R	S

*Kp 1 R*: *Klebsiella pneumoniae* isolée à partir de Réanimation

**BLSE**=  $\beta$ -lactamase à spectre élargi.

**Case** = Céphalosporinase.

*Klebsiella pneumoniae* هي بكتيريا ممرضة انتهازية اكتشفت منذ أكثر من 100 عام، حيث وجدنا أن الدراسات التي أجريت عليها اليوم متبينا أنها على رأس الجراثيم المسؤولة عن أوبئة في المستشفيات المستعصية وصعبة العلاج. في هذه الدراسة الحساسية لـ 14 مضاد حيوي (8 بيتاكتامين-2 أمينوزيد-3 كينولون وكوليستين) عن طريق إنتشار الأقراص في وسط هلامي وفق المعايير CASFM قيّمت على 21 عينة تنتمي لنوع *Klebsiella pneumoniae* مأخوذة من المستشفى الجامعي بتلمسان. نسبة المقاومة عنده البكتيريا تقدر بـ: (04.19%) للكينولون و بـ: (23.8%) لـ C3G. نتائجا تظهر وجود خمسة سلالات من *Kp* منتجة لـESLB (23.80%). تجارب PCR بينت أنّ BLSE من نوع TEM و HSV. المفتاحية الكلمات: *Klebsiella pneumoniae*-حيوية-مقاومة-BESL-PCR-TEM-VHS-مضادات

## Résumé

*Klebsiella pneumoniae* est un pathogène opportuniste découvert depuis plus d'une centaine d'années. Aujourd'hui elle est le chef de file des germes responsables d'infections nosocomiales sévères et difficiles à traiter, des épidémies sont causées par des souches résistantes à une large variété d'antibiotiques. Dans cette étude, La sensibilité vis-à-vis de 14 antibiotiques (8  $\beta$ -lactamines, 2 aminosides, 3 quinolones et colistine) a été évaluée pour 21 souches de *Klebsiella pneumoniae* provenant du CHU de Tlemcen par la méthode de diffusion des disques en milieu gélosé, selon les normes du CA-SFM. La fréquence de la résistance chez cette espèce est estimée à 19.04% aux quinolones et 23.80% aux céphalosporines de troisième génération. Nos résultats montrent la présence de 5 souches de *Klebsiella pneumoniae* productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) soit 23.80%. L'amplification par PCR en utilisant des amorces spécifiques montrent que les BLSE exprimées sont de type TEM et SHV.

**Mots clés:** *Klebsiella pneumoniae*-antibiotiques-résistance-BLSE-PCR-TEM-SHV.

## Abstract

*Klebsiella pneumoniae* is an opportunistic pathogen found in more than a hundred years. Today she is the leader of the germs responsible for severe nosocomial infections and difficult to treat, epidemics are caused by strains resistant to a wide variety of antibiotics. In the present work, The sensitivity to 14 antibiotics (8  $\beta$ -lactams, 2 aminoglycosides, 3 quinolones, and colistin) is evaluated for 21 strains of *Klebsiella pneumoniae* taken from Tlemcen CHU by the disk diffusion method in agar medium, according to CA-SFM. The frequency of *Klebsiella pneumoniae* resistance to quinolones was 19.04% and to third generation cephalosporins was 23.80%. Five *Klebsiella pneumoniae* strains were producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase witch corresponds to 23.80%. The presence of (*bla SHV*) genes and (*bla TEM*) was verified by polymerase chain reaction (PCR).

**Key words:** *Klebsiella pneumoniae* – antibiotics – resistance - ESBL-*bla SHV*- *bla TEM*.