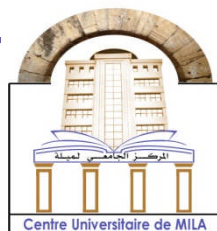


N° Ref :.....



Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila

Institut des Sciences et de la Technologie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire préparé En vue de l'obtention du diplôme de **Master**

Filière : Biologie

Spécialité : Biologie Appliquée et Environnement

Option : Biochimie et Microbiologie Appliquées

Thème :

Etude de *Klebsiella pneumoniae* multirésistante aux antibiotiques : Incidence, Epidémiologie et Analyse spatiale.

Présentée par : BELDI Hakima

HENNACHE Malika

Devant le jury composé de :

M^{lle} RABHI Nour El-Houda

M^{lle} HADEF Sawsen

Mr BOUBENDIR Abdelhafid

Maitre Assistantes B

Maitre Assistantes B

Maitre de Conférences B

Présidente

Examinatrice

Promoteur

Année Universitaire: 2014/2015

Remerciements

En tout, nous remercions le grand Dieu tout puissant qui nous a donné la force, le courage, la santé et de nous avoir permis d'arriver à ce stade là. Ce mémoire n'aurait pas pu être réalisé sans la contribution de nombreuses personnes que nous tenons à remercier par ces quelques lignes.

Mes remerciements s'adressent d'abord, à notre encadreur, Monsieur BOUBENDIR Abdelhafid Maître de Conférences B au Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila, sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour. Nous ne cesserons jamais de le remercier pour la confiance qu'il a placé en nous pour effectuer ce travail. Sa simplicité, sa compétence et surtout sa rigueur scientifique sont les atouts qui nous ont fasciné, dont nous avons bénéficié tout au long de notre recherche. Il n'a ménagé aucun effort pour la réalisation de ce travail qui est également le sien. Nous avons gardé de bons souvenirs de ces enseignements avec clarté et précision, et nous lui disons : « vous êtes un excellent modèle pour nous, surtout dans le domaine scientifique ».

Nous adressons également nos sincères remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce modeste travail à savoir " M^{elle} RABHI NourEl-Houda. Vous nous faites le grand honneur de présider ce jury. Nous vous prie de bien vouloir recevoir le témoignage de notre profond respect, et M^{elle} HADEF Sawsen nous vous remercions de nous faire l'honneur de juger ce modeste travail. Veuillez accepter mes chaleureux remerciements pour votre participation à ce jury "

Nous remercions, tous ceux, près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

***A mon père :** Je te dis merci papa pour tout ce que tu as fait pour moi et mes frères et sœurs pour nous encourager dans les études financièrement avec la grâce de Dieu et moralement.*

Merci pour tes encouragements. J'espère que ce travail sera à la hauteur de tes attentes.

***A ma mère :** Toi qui m'a mis au monde, éduqué et entre tenu, ainsi j'ai appris de toi l'honneur, la dignité, la modestie, l'humilité, la générosité surtout le respect de soi même et*

l'amour du prochain ; qualités dont j'ai bénéficié tout au long de mes études. En m'inclinant devant toi en signe de reconnaissance, de dévouement et d'entière soumission, je te présente mes excuses pour tout le mal lié à mon âge et à mon orgueil et demande tes

bénédictions qui ne m'ont d'ailleurs jamais manqué.

Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

A mes chers et adorable sœurs et frères

Fairouz, Abba, Hala, Darine, Salim et Zakaria.

Que Dieu nous garde toujours unis, heureux et sincères.

***A mes beaux-frères** Omar et Haroun. Vers lesquelles j'ai un grand respect.*

***A mes neveux et nièces :** Basma, Zineb, Aridj, Siradj et Basem.*

Que Dieu tout puissant vous donne longue vie, beaucoup de santé et vous préserve du mal.

Je vous aime tant.

A toute ma famille.

A tous mes camarades de promotion, surtout : Malika, Sana et Widad.

Je vous dédies ce travail en hommage à tous les moments

Agréables, inoubliables qui nous avons vécu ensemble.

A tous ceux que j'ai omis de citer et qui n'en sont

Pas des moindres.

Dans la vie, il y a trois facteurs : le talent, la chance et le travail.

Avec deux de ces facteurs, on peut réussir.

Mais l'idéal est de disposer de trois.

(De Bernard Werber)

HAKIMA BELDI

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à

Mon père mon trésor dans cette vie

Je te dis merci papa pour tout le soutien et l'amour que tu es me porte depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

A mes chers et adorable Frères et mes sœurs :

K haled, K heireddine, Tarik, Soumia et K hawla

Merci pour nous encourager dans les études financièrement avec la grâce de Dieu et moralement.

A mes petits Anges :

A nes, A web et wassim.

A mes chères cousines :

H assina, K arima, N ihal, O lia , Radia ,Saliha et Souad

A mon chère binôme et sa famille :

H akima ma sœur

A ucune dédicace ne saurait exprimer mon respect,

Mon amour éternel

U n très grand merci

Pour tous les bons moments passés,

Pour nos fous rires partagés

A tous mes Amis particuliers :

A mina, Fatima, meriem, noudjoud, Sana, siham, soumia, widad et

Zahira

A Tous mes amies et mes collègues de promotion de biologie 2015

A tous ceux qui m'ont aidé lors de la réalisation de ce travail, merci à tous

***Malika
Malika***

Sommaire

Liste des Abréviations.....	I
Liste des Tableaux.....	IV
Liste des Figures.....	VI
Introduction.....	1

Partie I : Recherche Bibliographique

Chapitre 01 : Généralités sur le genre *Klebsiella* spp.

1. Historique.....	3
1.1. Position taxonomique.....	3
1.2. Caractères biochimiques des entérobactéries.....	5
2. Le genre <i>Klebsiella</i> spp.....	6
2.1. Pouvoir pathogène et habitat.....	6
2.2. Caractères bactériologiques.....	7
2.2.1. Caractères morphologique.....	7
2.2.2. Caractères culturels.....	7
2.3. Caractères biochimiques.....	8
2.4. Facteurs de virulence chez <i>Klebsiella</i> spp.....	9

Chapitre 02 : Les antibiotiques utilisés dans le traitement des infections dues aux Klebsielles

1. Les principaux antibiotiques utilisés dans le traitement des infections dues aux Klebsielles.....	14
2. Classification des antibiotiques.....	15
3. Cible des principaux antibiotiques.....	19

Chapitre 03: Supports génétiques de la résistance aux antibiotiques chez *Klebsiella* spp.

1. Types de résistance.....	20
1.1. Résistance naturelle.....	20
1.2. Résistance acquise.....	21
2. Mécanismes génétiques de la résistance acquise aux antibiotiques chez <i>Klebsiella</i> spp.....	22
2.1. Résistance par mutation chromosomique.....	22
2.2. Résistance extrachromosomique.....	22
2.2.1. Les plasmides.....	23
2.2.2. Les éléments transposables et les intégrons.....	29
3. La cartographie totale des gènes de résistance aux antibiotiques.....	45

Partie II : Recherche Expérimentale

1. Matériel et Méthodes

1.1. Matériel.....	51
1.1.1. Souches bactériennes.....	52
1.2. Méthodologie.....	53
1.2.1. Culture et isolement des souches.....	53
1.2.2. Tests d'identification.....	54
1. Tests macroscopique.....	54
2. Tests microscopiques.....	54
1.2.3. Tests biochimiques.....	56
1.2.4. Réalisation pratique de l'antibiogramme.....	58
1.2.5. Conservation des souches.....	66
1.2.6. Réactivation.....	67
1.2.7. Analyse statistique.....	68

Résultats et Discussion

1. Incidence de <i>K. pneumoniae</i> isolées à l'hôpital de Mila de 2014/2015.....	77
1.1. Incidence de <i>K. pneumoniae</i> selon le sexe.....	78
1.2. Incidence de <i>K. pneumoniae</i> selon la nature du prélèvement.....	79
1.3. Incidence de <i>K. pneumoniae</i> selon les services hospitaliers.....	82
2. Incidence totale de la résistance aux antibiotiques de <i>Klebsiella</i> spp. isolées à l'hôpital de Mila (2007 à 2013).....	84
2.1. La résistance aux β -lactamines.....	86
2.1.1. La résistance à l'Imipénème.....	87
2.1.2. La résistance à Céfotaxime.....	88
2.2. La résistance aux Aminosides.....	89
2.3. La résistance aux Quinolones.....	90
2.4. La résistance aux Sulfamides.....	92
2.5. La résistance aux Macrolides.....	93
2.6. La résistance à la famille de Tétracyclines.....	93
3. Evolution de la résistance aux antibiotiques de <i>Klebsiella</i> spp. de 2007 à 2013	94
4. Incidence de la résistance aux antibiotiques de <i>K. pneumoniae</i> isolées à l'hôpital de Mila de Janvier 2014 à Février 2015.....	98
5. Analyse spatiale de la résistance aux antibiotiques de <i>Klebsiella</i> spp.....	104
Conclusion et Perspectives.....	111
Références.....	113
Annexes	

Liste des abréviations

< : Inférieur

> : Supérieur

≤ : Inférieur ou égal

≥ : Supérieur ou égal

μg : Microgramme

μm : Micromètre

subsp. : Sous-espèce

spp. : Espèce

16 S : Svedberg (vitesse de sédimentation)

AAC : Aminoglycoside acetyltransferases

AAD : Aminoglycoside adenytransferase

ACP : Analyse en Composantes Principales

ADH : Arginine déshydrogénase

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFC : Analyse Factorielle des Correspondances

AFM : Analyse Factorielle Multiple

Arm : Aminoglycoside resistance methylase

ARN : Acide Ribonucléique

ARNt : Acide Ribonucléique de transfert

BES : Brazilian extended-spectrum β-lactamase

BLSE : β-lactamase à Spectre Elargi ou Etendu

°C : Degrés Celsius

CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CC : Citrate Christensen

CHU : Centre Hospitalo-universitaire

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

cm : Centimètre

CS : Citrate de Simmons

CSP I : Céphalosporines de 1^{ère} génération

CTn : Transposon Conjugatif

CTX-M : Céfotaximase-Munich

C3G : Céphalosporines de 3^{ème} génération
D-ala : D-alanine
DHA : Gène codant pour une céphalosporinase
DHPS : Dihydroptéroate-synthétase
DO : Densité optique
ECBU : Examen Cyto-Bactériologique des Urines
E coli : *Escherichia coli*
EMB : Eosin Méthylene Blue
EPH : Etablissement Public Hospitalier non universitaire
FQ : Fluoroquinolones
GEL : Gélatinase
GES : Guyana Extended-Spectrum β -lactamase
GLU : Glucose
H₂S : sulfure d'hydrogène
I β L : Inhibiteur bêta-Lactamines
ICE : Élément d'intégration et de conjugaison ou « Integrative and Conjugative Element »
IgM : Immunoglobuline de type M
IgG₂ : Immunoglobuline de type G₂
Inc L/M : Groupe d'incompatibilité du plasmide
IND : Indole
IR : Inversion Répétée ou « inverted repeat »
IRL : Répétition inverses gauche ou « Inverted repeat left »
IRR : Répétition inverses droite ou « Inverted Repeat Right »
IS : Séquence d'insertion ou « insertion sequence »
Kb : kilo base
KpBLSE : *Klebsiella pneumoniae* β -lactamase à spectre étendu
KPC : *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase
LAC : Lactose
LDC : Lysine-Décarboxylase
LEN : Bêta-lactamase chromosomique
LPS : Lipopolysaccharide
LT : Thermolabile
magA : mucoviscosité-associated gene A.
MAL : Malonate

MBL : Métallo- β -lactamase
mm : Millimètre
MTn : Transposon mobilisable
NCBI : National Center for Biotechnology Information
NDM : New Delhi Metallo- β -lactamase
NIT : Nitrate réductase
nm : Nanomètre
ODC : Ornithine-décarboxylase
ONPG : Orthonitrophényl- β -D-galactopyranoside
ORF : Open Reading Frame
ORL : L'Oto-Rhino-Laryngologie
OXA-48 : Oxacillinase
pb : Paire de base
PCR : Polymérase Chain Reaction
PDA : Phényle alanine désaminase
pH : Potentiel d'Hydrogène
PER : *Pseudomonas* Extended Resistance
qepA : Pompe d'efflux Fluoroquinolones
qnr : Quinolones résistance gene
rmpA : regulator of the mucoid phenotype A
SHV : SulfHydrile Variable
TDA : Tryptophane désaminase
TEM : D'après TEMoniera : nom du malade chez qui la première souche a été isolée
TLA : Tlahuicas - tribu indienne
Tn : Transposon
TRI : TEM Résistantes aux Inhibiteurs
TSI : Triple Sugar Iron
UMC : Urgences Médico-chirurgicale
URE : Uréase
USA : Etats Unis d'Amérique ou « United States of America »
USI : Unités de Soins Intensifs
VIM : Verona Imipéménase (Carbapénémase)
VP : Vogues-Proskauer (recherche de l'acétoïne)

Liste des Tableaux

Numéro	Intitulé	Page
Tableau 01	Les caractères d'identification des genres des entérobactéries les plus fréquemment rencontrés (Meziani, 2012).	5
Tableau 02	Caractères biochimiques de l'espèce type <i>K. pneumoniae</i> (Gueye, 2007).	8
Tableau 03	Caractères biochimiques d'identification des espèces de <i>Klebsiella</i> spp. et des subsp <i>K. pneumoniae</i> (Carbonnelle <i>et al.</i> , 1987 ; Belbel, 2014).	9
Tableau 04	Les différentes classes d'antibiotiques n'interférant pas avec la synthèse des protéines (Maurice, 2007).	15
Tableau 05	Les différentes classes d'antibiotiques interférant avec la synthèse des protéines (Maurice, 2007).	17
Tableau 06	Les principaux antibiotiques utilisés en Algérie (Anonyme 5, 2012).	18
Tableau 07	Structure de base schématisée des différents types d'éléments transposables selon la nomenclature proposée par Roberts <i>et al.</i> , 2008 (Faure, 2009).	29
Tableau 08	Résumé des gènes mentionnés dans ce chapitre, leurs fonctions, localisations, phénotypes de résistance.	47
Tableau 09	Matériel et produits	51
Tableau 10	Fréquences d'isolement des souches de <i>Klebsiella</i> spp. dans l'hôpital de Mila (2014/2015).	52
Tableau 11	Tests utilisés pour l'identification biochimique de <i>K. pneumoniae</i> (Meziani, 2012).	56
Tableau 12	les résultats des isollements et des tests de l'antibiogramme effectués au laboratoire de l'hôpital « Sept frères Meghlaoui », et au Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila.	69
Tableau 13	Résultats de la galerie biochimique de <i>K. pneumoniae</i>	75
Tableau 14	L'antibiorésistance de 30 souches de <i>K. pneumoniae</i> isolées à l'hôpital de Mila (Janvier 2014 à Février 2015).	76

Tableau 15	Incidence des souches de <i>K. pneumoniae</i> selon leur origine hospitalières ou communautaire à l'hôpital de Mila (2014/2015).	77
Tableau 16	Incidence de <i>K. pneumoniae</i> selon le sexe à l'hôpital de Mila (2014/2015).	79
Tableau 17	Incidence de <i>K. pneumoniae</i> selon la nature du prélèvement à l'hôpital de Mila (2014/2015).	81
Tableau 18	Incidence de <i>K. pneumoniae</i> selon le service hospitalier à l'hôpital de Mila (2014/2015).	83
Tableau 19	Antibiorésistance totale des souches de <i>Klebsiella</i> spp. isolées à l'hôpital de Mila de l'année 2007 à 2013.	84
Tableau 20	Evolution de l'antibiorésistance de <i>Klebsiella</i> spp. isolées à l'hôpital de Mila, de 2007 à 2013.	94
Tableau 21	Antibiorésistance totale de 30 souches de <i>K. pneumoniae</i> isolées à l'hôpital de Mila de 2014 à 2015.	98
Tableau 22	Matrice de corrélation de Pearson (n).	104
Tableau 23	Vecteurs propres.	105
Tableau 24	Valeurs propres.	105
Organigramme 01	Les étapes de l'antibiogramme (Meziani, 2012).	64

Liste des photos

Numéro	Intitulé	Page
Figure 01	Arbre phylogénétique de la famille des entérobactéries (Betsy et Keogh, 2002).	4
Figure 02	Colonies de <i>K. pneumoniae</i> avec un bord lisse et une surface luisante (Gueye, 2007).	8
Figure 03	Représentation schématique des facteurs de virulences de <i>Klebsiella</i> spp. (Podschun et Ullmann, 1998)	9
Figure 04	Cibles des principaux antibiotiques (Souana, 2011).	19
Figure 05	La carte génétique circulaire du plasmide pKP048 multi-résistant chez une souche hospitalière <i>K. pneumoniae</i> (KP048) (Yan Jiang <i>et al.</i> , 2010).	24
Figure 06	Représentation schématique de la 25kb du plasmide pKP048, qui porte les gènes : <i>armA</i> , <i>ampR</i> , <i>bla_{DHA-1}</i> , <i>qnrB4</i> et un cluster codant pour la résistance au Mercure chez <i>K. pneumoniae</i> (Yan Jiang <i>et al.</i> , 2010).	25
Figure 07	La carte génétique circulaire du plasmide multi-résistant pNL194 de <i>K. pneumoniae</i> (pNL194) (n°d'accèsion dans GenBank : GU585907) (Miriagou <i>et al.</i> , 2010).	26
Figure 08	Représentation schématique du plasmide (pKOX-R1), qui indique les déterminants génétiques de la réplication, du transfert, et de la résistance antimicrobienne (Huang <i>et al.</i> , 2013).	28
Figure 09	Annotation partielle des métrages plasmide 24.3 kb portant le transposon Tn4401chez <i>K. pneumoniae</i> (S15) (Gootz <i>et al.</i> , 2009).	31
Figure 10	Représentation schématique des isoformes du Tn4401 sur plasmides des <i>K. pneumoniae</i> productrices des carbapénèmases (KPC) (Thierry-Naas <i>et al.</i> , 2010).	31
Figure 11	La carte génétique du plasmide pJHCMW1 de <i>K. pneumoniae</i> (Sarno <i>et al.</i> , 2002).	32
Figure 12	La carte génétique du Tn1331 : région du plasmide d'une souche de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (pBK15692) (Ramirez <i>et al.</i> , 2014).	33
Figure 13	Environnement génétique du gène <i>qnrA3</i> dans <i>K. pneumoniae</i> He96 (pHe96) et <i>K. ascorbata</i> Kas96 (pKas96).	35

Figure 14	Carte schématique du <i>bla</i> _{NDM-1} associé aux structures génétiques identifiés parmi les isolats d'entérobactéries (Poirel <i>et al.</i> , 2011).	37
Figure 15	Représentation schématique de l'environnement génétique du gène <i>bla</i> _{NDM-1} dans différents plasmides (Villa <i>et al.</i> , 2012).	38
Figure 16	Disposition des contextes de gènes chromosomiques et des allèles de <i>bla</i> _{SHV} mobiles (Ford et Avison, 2004).	40
Figure 17	Locus postulés pour SHV-1 et LEN-1 (Chaves <i>et al.</i> , 2001).	40
Figure 18	Structure génétique de la cassette <i>bla</i> _{CTX-M-15} (Farce <i>et al.</i> , 2010)	42
Figure 19	Représentation schématique des environnements génétiques environnants les gènes <i>bla</i> _{CTX-M} correspondant aux cas suspects d'événements de mobilisation au sein de différents groupes CTX-M (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9, et CTX-M-25 (Cantón <i>et al.</i> , 2012).	42
Figure 20	Origine de génotype CTX-M (Farce <i>et al.</i> , 2010).	43
Figure 21	Environnement génétique du transposon Tn1999 qui porte le gène <i>bla</i> _{OXA-48} . Le gène <i>bla</i> _{OXA-48} est flanqué entre deux séquences d'insertion de type IS1999 (Poirel <i>et al.</i> , 2011).	44
Figure 22	Le génome complet de plasmide pKpn2146b (Hudson <i>et al.</i> , 2014).	46
Figure 23	Aperçu de la paillasse avant la manipulation; (b) . Méthode d'ensemencement de <i>K. pneumoniae</i> par stries sur le milieu Hektoen ; (c et d) . Incubation de <i>K. pneumoniae</i> à l'étuve à 37°C/24h	53
Figure 24	a) . Préparation du frottis ; (b) . Fixation du frottis à la flamme du bec bunsen ; (c) . Coloration de Gram de <i>K. pneumoniae</i>	55
Figure 25	Coulage du milieu Mueller-Hinton en boîte de Pétri	59
Figure 26	Préparation de l'inoculum de <i>K. pneumoniae</i> pour l'antibiogramme	60
Figure 27	Méthode d'ensemencement de <i>K. pneumoniae</i> par strie sur Mueller-Hinton	61
Figure 28	(a) . Antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme de <i>K. pneumoniae</i> . ; (b, c et d) . Application des disques d'antibiotiques.	62
Figure 29	Incubation de <i>K. pneumoniae</i> à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24h.	63
Figure 30	Schéma explicatif de la détermination des phénotypes de résistance de BLSE.	65

Figure 31	Les étapes de la conservation de <i>K. pneumoniae</i> dans le bouillon glycérolé (20%) au congélateur à -20°C.	66
Figure 32	(a et b). Réactivation des souches de <i>K. pneumoniae</i> dans le bouillon nutritif ; (c). Incubation à l'étuve à 37°C pendant 24h	67
Figure 33	Incidence des souches de <i>K. pneumoniae</i> selon leur origine hospitalières ou communautaire à l'hôpital de Mila (2014 à 2015).	77
Figure 34	Incidence de <i>K. pneumoniae</i> selon le sexe à l'hôpital de Mila (2014/2015).	79
Figure 35	Incidence de <i>K. pneumoniae</i> selon la nature du prélèvement à l'hôpital de Mila (2014/2015).	81
Figure 36	Incidence de <i>K. pneumoniae</i> selon le service hospitalier à l'hôpital de Mila (2014/2015).	83
Figure 37	Antibiorésistance de <i>Klebsiella</i> spp. isolées à l'hôpital de Mila de 2007 à 2013.	85
Figure 38	Evolution de l'antibiorésistance chez les souches de <i>Klebsiella</i> spp. isolées à l'hôpital de Mila de 2007 à 2013.	95
Figure 39	Antibiorésistance de <i>K. pneumoniae</i> isolée à l'hôpital de Mila de 2014 à 2015.	99
Figure 40	Analyse spatiale de la résistance aux antibiotiques de <i>Klebsiella</i> spp. par ACP à l'hôpital de Mila (2007/2013).	106

Introduction

La découverte des antibiotiques au début du XX^{ème} siècle a constitué une véritable révolution pour le traitement des maladies infectieuses d'origine bactérienne. Cependant, l'utilisation massive et parfois abusive des antibiotiques, en ville comme à l'hôpital, a modifié considérablement l'écologie microbienne et tend à augmenter le taux des bactéries résistantes (Faure, 2009). La résistance aux antibiotiques est un sujet à l'examen continu et plusieurs études publiées chaque année avec de nouvelles données peuvent modifier ou redéfinir notre point de vue sur ce problème (Canton *et al.*, 2012).

En effet ces dix dernières années, nous avons constaté une importante augmentation de la résistance aux antibiotiques (Elhani *et al.*, 2011), en particulier chez *Klebsiella* spp. productrice des bêta-lactamases à spectre élargie (BLSE) (Camara *et al.*, 2011). Cette augmentation est devenue un préoccupant problème de santé publique, qui nécessite une attention immédiate (Dwassay *et al.*, 2011 ; Kabbaj *et al.*, 2012).

Des études internationales de surveillance ont confirmé l'ampleur de la production des BLSE chez *K. pneumoniae*. Parmi les pays d'Afrique du Nord, l'Égypte semble avoir la prévalence de *K. pneumoniae* BLSE la plus élevée. L'incidence des BLSE parmi les souches de *K. pneumoniae* en Égypte varient entre 58 et 67%. *K. pneumoniae* semble être l'espèce prédominante en Tunisie avec une prévalence variant de 10 à 32,4% pouvant atteindre 87,5% dans les unités de soins intensifs pédiatriques. La prévalence des souches de *K. pneumoniae* BLSE est de 19,9% en Algérie. En Amérique du Sud, la prévalence de BLSE produites par *K. pneumoniae* atteint jusqu'à 43,7 % (Elhaniet *al.*, 2011).

Au niveau national, et selon le réseau de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques (2007-2008), sur 3277 bactéries multi-résistantes toutes espèces confondues, isolées en milieu hospitalier et sur un effectif global de 13620 isolats, *K. pneumoniae* vient en tête avec 31,5% des cas. Le réseau rapporte aussi que 46,2% des souches des *K. pneumoniae* isolées à l'hôpital sont des BLSE. Les souches résistantes aux β -lactamines sont souvent résistantes aux autres familles d'antibiotiques laissant le champ thérapeutique très réduit (Arafa, 2011). En 2009, la prévalence des KpBLSE à l'Est de l'Algérie avoisinait les 60%. Par ailleurs, cette prévalence a dépassé les 80% à l'Ouest de l'Algérie en 2012, ce

qui signale l'augmentation du taux des KpBLSE au niveau des hôpitaux Algériens (Belbel, 2014).

Cependant, la répartition géographique n'est pas homogène et la prévalence varie considérablement d'un continent à un autre, d'un pays à un autre et d'un CHU à un autre (Elhaniet *al.*, 2011).

Face à cette problématique touchant toutes les régions du monde et suite à de nombreuses recommandations, plusieurs études épidémiologiques et moléculaires ont été rapportées, afin de contrôler et surveiller la diffusion et la dissémination de la résistance aux antibiotiques (Rolain et Berrazeg, 2014).

C'est dans cet ordre d'idées que nous nous sommes intéressés à isoler et tester la résistance aux antibiotiques de *K. pneumoniae* à l'hôpital « Sept Frères Meghlaoui » de Mila. Ensuite, expliquer à l'ombre de la bibliographie les mécanismes moléculaire de la résistance. Afin d'observer le phénomène de résistance aux antibiotiques de *K. pneumoniae* pour une longue durée, notre étude est complétée par celle réalisée par nos collègues de Master de la promotion 2013/2014, de ce fait leurs résultats de 2007 à 2013 sont utilisés, discutés et enrichis.

Les objectifs de ce travail sont :

- Etude de l'incidence totale de la résistance aux antibiotiques de *Klebsiella* spp. de 2007 à 2013.
- Etude de l'évolution de la résistance aux antibiotiques.
- Etude de l'incidence de la résistance aux antibiotiques de 2014 à 2015.
- Etude des mécanismes moléculaires de la résistance aux antibiotiques par discussion des résultats par rapport à la bibliographie.
- Essais de corrélation entre la cartographie génétique et la distribution spatiale de la résistance aux antibiotiques par l'Analyse en Composantes Principales (ACP).

Chapitre 01 : Généralités sur le genre *Klebsiella* spp.

1. Historique

La famille des *Enterobacteriaceae* est une famille hétérogène, elle comprend de nombreux genres bactériens qui sont rassemblés selon leurs caractères bactériologiques communs. Ce sont des bacilles à Gram négatif, non sporulés, ils sont aéro-anaérobies facultatifs et se développent sur milieu ordinaire (18 à 24 heures à pH neutre à 37°C) (Avril *et al.*, 2000). Elle regroupe des micro-organismes ayant en commun un certain nombre de propriétés biochimiques et morphologiques, parmi lesquels on retrouve les genres : *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia* et *Shigella* regroupant au total 112 espèces (Gueye, 2007).

Le diagnostic de genre et d'espèce repose sur l'étude des caractères biochimiques, après que le diagnostic de famille ait été établi avec certitude (Minor et Veron, 1984). Les différences entre les nombreux genres et espèces viennent de critères plus précis, comme la fermentation des différents sucres, la production ou non de sulfure, la présence ou l'absence d'enzymes du métabolisme (désaminases, décarboxylases) (Tableau 01) (Denis *et al.*, 1998).

1.1. Position taxonomique

La taxinomie de la famille des *Enterobacteriaceae* étant actuellement en grand mouvance, les dénominations adoptées ne devront pas être considérées comme des prises de position, mais comme une approche utile pour le diagnostique différentiel (Carbonnelle *et al.*, 1987).

La période de naissance de la famille des *Enterobacteriaceae* se situe entre 1937 lorsqu'Otto Rahn proposa le genre *Enterobacter* pour regrouper les microorganismes présentant des propriétés biochimiques et morphologiques communes. Deux années après cette description qui concernait 112 espèces, ce nombre fut ramené à 67.

En 1972, Edwards et Ewing intégraient 11 genres et 26 espèces dans la famille des *Enterobacteriaceae*.

En 1973, 31 genres et 139 espèces étaient caractérisés.

En 1985, Farmer et Coll décrivaient 22 genres comprenant 69 espèces et 29 groupes entériques.

La classification phylogénique de *Klebsiella* spp. selon Bergey en 2004 (Delarras, 2007), est la suivante :

Domaine : Eubactéria

Phylum XII : Protéobactéria

Classe : Gamma Proteobacteria

Ordre : *Enterobacteriales*

Famille : *Enterobacteriaceae*

Genre : *Klebsiella* (Figure 01)

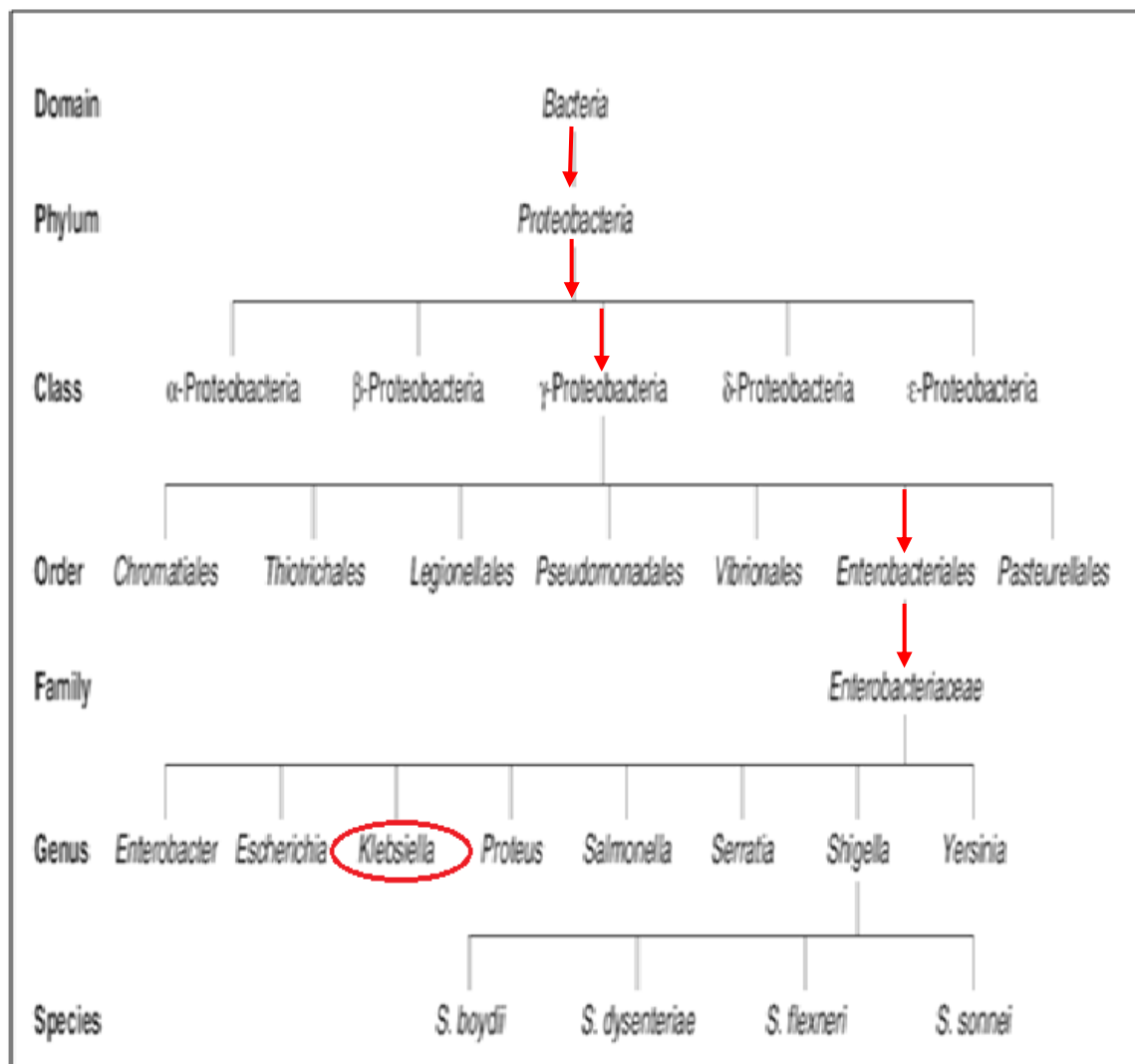


Figure 01 : Arbre phylogénétique de la famille des entérobactéries (Betsy et Keogh, 2002).

1.2. Caractères biochimiques

Tableau 01: Les caractères d'identification des genres des entérobactéries les plus fréquemment rencontrés (Meziani, 2012).

	<i>Escherichia</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Serratia</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Yersinia</i>
Lactose	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPG	+	+	+	+	+	-	+/-	-	+
Indole	+	-	-	+/-	-	-	+/-	+/-	+/-
VP (Acétoïne)	-	-	+	+	+	-	-	-	+*
Citrate	-	+	+	+	+	+/-	-	+/-	-
Mobilité	+	+	+	-	+	+	-	+	+*
Urée	-	-	-	+	-	-	-	+	+
PDA	-	-	-	-	-	-	-	+	-
H₂S	-	+/-	-	-	-	+	-	+/-	-

* à 20°C seulement, (+) : Résultat positif, (-) : Résultat négatif, (+/-) : Caractère inconstant.

2. Le genre *Klebsiella* spp.

Le genre *Klebsiella* a été nommé par Trevisan en 1887 pour honorer Klebs Edwin, un microbiologiste Allemand du 19^{ème} siècle (Belbel, 2014). L'espèce type est *Klebsiella pneumoniae*, connue autre fois sous le nom : pneumobacille de Friedlander. Ce dernier avait décrit cette bactérie dans les poumons d'un patient décédé d'une pneumonie (Kone-Diallo, 2010).

Actuellement, le genre *Klebsiella* comporte deux espèces principales: *K. oxytoca* et *K. pneumoniae* subdivisée en 3 sous-espèces : *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae*. Enfin, s'ajoutent *K. granulomatis* agent de la donovanose, ainsi qu'un taxon récemment individualisé qui est la *K. variicola* (Belbel, 2014).

2.1. Pouvoir pathogène et habitat :

K. pneumoniae est distribuée dans tous les services hospitaliers surtout les unités de soins intensifs (USI), elle a la particularité d'acquérir des marqueurs de résistance, elle se trouve souvent la première entérobactérie engagée dans un mécanisme de résistance à une nouvelle molécule (Arafa, 2011).

K. pneumoniae est une bactérie commensale de l'homme et des animaux ; elle est responsable d'infections communautaires (urinaires et respiratoires) et d'infections opportunistes chez les malades hospitalisés (infections urinaires, broncho-pulmonaires, septicémies avec choc) (Jarlier *et al.*, 2004).

Ce germe est un pathogène à fort potentiel épidémique fréquemment impliqué dans des infections sévères et difficiles à traiter (Arafa *et al.*, 2009). De nombreuses épidémies nosocomiales causées par cette bactérie ont été décrites, tels que les infections urinaires, intra-abdominales, infections de site opératoire, septicémies et pneumonies, notamment chez des patients hospitalisés dans des unités de soins intensifs adultes ou pédiatriques (Farmer *et al.*, 1985 ; Carbonnelle *et al.*, 1987).

K. pneumoniae est une espèce ubiquitaire. Elle peut être isolée de l'environnement (sol, eaux de surface, eaux usées, végétaux), ainsi que des flores commensales de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux, où elle existe toujours en faibles quantités. Chez l'homme *K. pneumoniae* est en particulier un saprophyte du nasopharynx et du tractus gastro-intestinal (Raude, 2003 ; Pérez-Moreno *et al.*, 2011 ; El Fertas-Aissani *et al.*, 2013).

2.2. Caractères bactériologiques

2.2.1. Caractères morphologiques

Les *Klebsiella* sont des bacilles à Gram négatif de 0,5µm sur 3µm environ, à extrémités arrondies, se présentant de manière isolée, groupés en diplobacilles ou en courtes chaînettes (Al-muhanna *et al.*, 2013) souvent enrobés dans la même capsule (Gueye, 2007). Cette bactérie se distingue par son immobilité constante, elle est asporogène, capsulée mais cette dernière peut être absente chez 5% des souches (Minor et Véron, 1989).

2.2.2. Caractères cultureux

K. pneumoniae et *K. oxytoca* se développent en aéro-anaérobiose (Maurice, 2007), sur les milieux classiques d'isolement pour entérobactéries (gélose nutritive, gélose au sang, gélose de Drigalski, Hektoen, Mac Conkey, gélose éosine bleu de méthylène : EMB) après une incubation de 18 à 24h à 30 ou à 37°C (Kone-Diallo, 2010). Les colonies sont d'un diamètre de 3 à 4mm, lisses, lactose positives, bombées, brillantes, muqueuses, parfois filantes à l'anse de platine (Janda *et al.*, 1998).



Figure 02 : Colonies de *K. pneumoniae* avec un bord lisse et une surface luisante (Gueye, 2007).

2.3. Caractères biochimiques

K. pneumoniae présente les caractères généraux des entérobactéries : c'est une bactérie aéro-anaérobie facultative, fermentant le glucose avec production du gaz, oxydase négative, catalase positive (Raud, 2003).

L'identification phénotypique de *K. pneumoniae* repose essentiellement sur Les caractères biochimiques différentiels illustrés dans le Tableau 02 (Gueye, 2007).

Tableau 02: Caractères biochimiques de l'espèce type *K. pneumoniae* (Gueye, 2007).

TESTS	ADH	ONPG	CC	CS	GEL	H ₂ S	IND	MAL	PDA	LDC	ODC	TDA	URE	NIT	GLU	LAC	VP
RESULTAT	-	+	+	+	-	-	+	+/-	+/-	+	-	-	+	-	+	+	+

+: Caractère positif ; - : Caractère négatif ; +/- : Caractère inconstant.

Tableau 03: Caractères biochimiques d'identification des espèces de *Klebsiella* spp. et des subsp *K. pneumoniae* (Carbonnelle *et al.*, 1987; Belbel, 2014).

Test	<i>K. pneumoniae</i>			<i>K. oxytoca</i>
	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i>	
Indole	-	-	-	+
ODC	-	-	-	-
LDC	V	+	-	+
VP	-	+	-	+

V : variable ; + : Caractère positif ; - : Caractère négatif.

2.4. Facteurs de virulences chez *Klebsiella* spp.

Les facteurs de virulence mis en œuvre par la bactérie diffèrent selon le site de l'infection. De nombreux facteurs contribuant à la pathogénicité de cette bactérie ont été identifiés (Figure 03) (Raude, 2003).

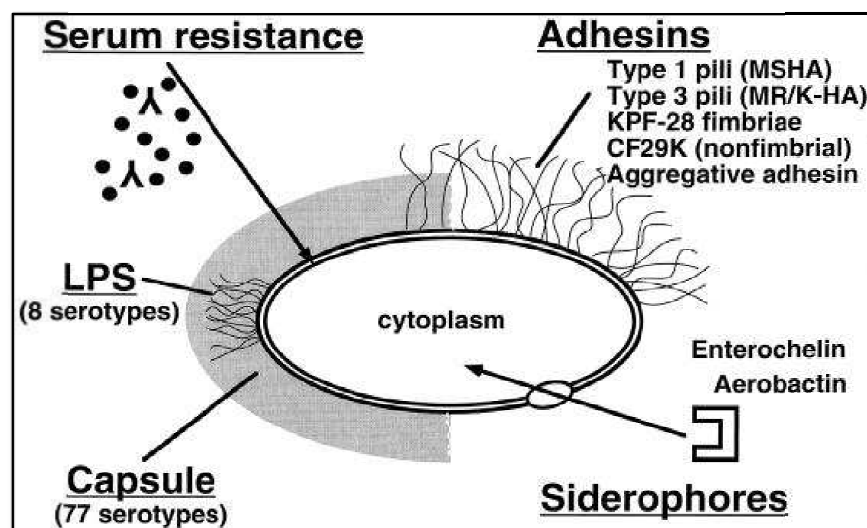


Figure 03 : Représentation schématique des facteurs de virulences de *Klebsiella* spp. (Podschun et Ullmann, 1998).

1-Les antigènes de surface

Deux types d'antigènes sont exprimés à la surface de *K. pneumoniae*. Ces deux antigènes contribuent à la pathogénie de ces bactéries : Le premier est l'antigène O qui est composant des lipopolysaccharides (LPS) et dont 9 types ont été identifiés. Le second est l'antigène capsulaire (K), un polysaccharide capsulaire dont 82 ont été décrits et 78 caractérisés (Kassis-Chikhani, 2012).

- **Le lipopolysaccharides (LPS)**

Le LPS, est formé de plusieurs composés : le lipide A de structure oligosaccharidique, et l'antigène O, composé le plus externe du LPS, est formé d'unités répétées de polymères d'oligosaccharide. Il existe une grande variabilité génétique des gènes impliqués dans la synthèse de l'antigène O est situés au niveau du cluster Wb. Le lipide A correspond à l'endotoxine des bactéries à Gram négatif et participe au pouvoir pathogène (Podschun et Ullmann, 1998). D'après Merino *et al*, (2000), l'antigène lipopolysaccharidique (O5) est indispensable pour certaines fonctionnalités pathogènes chez *K. pneumoniae* comme la résistance au sérum, l'adhérence aux cellules uro-épithéliales et la colonisation des voies urinaires.

- **La capsule :**

K. pneumoniae est une bactérie entourée d'une capsule, de nature polysaccharidique, impliquée dans la pathogénie, par son rôle dans l'adhérence des bactéries aux cellules-hôte et leur protection contre le système immunitaire de l'hôte, spécifique ou non spécifique. Les sous unités de cette capsule, composées de 4 à 6 sucres (fucose, galactose, mannose) et, très souvent, d'acides glycuroniques (composés chargés négativement), peuvent être classés en plus de 80 types sérologiques. Le matériel capsulaire forme d'épais amas de structures fibrillaires recouvrant la surface bactérienne et apparaissant, à la coloration de Gram, sous la forme d'un halo clair, entourant la bactérie (Raude, 2003).

Il existe 02 gènes impliqués dans la synthèse de la capsule ont été proposés comme facteurs de virulence. Le premier gène, *magA* (mucoviscosité-associated gene A). Il s'agit d'un gène chromosomique (WZY_{KPK1}) localisé dans l'opéron capsulaire (*cps*) et spécifique du sérotype K1. Sa présence est corrélée avec le phénotype hypermuqueux, la résistance à la phagocytose et au sérum (Kassis-Chikhani, 2012). Le second gène associé aux infections

invasives, *rmpA* (regulator of the mucoid phenotype) a été décrit en 1989 par Nassif et al. Il s'agit d'un gène plasmidique connu comme un activateur transcriptionnel de la synthèse de lipopolysaccharide extra-capsulaire, différent de la capsule et, participant au caractère hypermuqueux (Nassif *et al.*, 1989). Yu et al. (2006), montrent, qu'il y aurait une corrélation entre phénotype hypermuqueux et présence du gène *rmpA* et que la coexistence des gènes *magA* et *rmpA* potentialiserait l'expression du phénotype hypermuqueux.

1. Adhérence

La capsule bactérienne est impliquée dans l'adhérence de la bactérie aux cathéters, sondes et autres dispositifs médicaux utilisés dans les hôpitaux, dont elle permet la colonisation. Elle augmente également l'adhérence de la bactérie aux cellules intestinales et celle des bactéries entre elles (Kassis-Chikhani, 2012).

2. Immunité non spécifique

Lorsqu'une bactérie parvient à pénétrer chez un hôte, celui-ci réagit en mobilisant ces défenses spécifiques et non spécifiques, constituées, entre autres, des protéines du complément et des cellules phagocytaires. La capsule, premier constituant de la bactérie à entrer en contact avec le système immunitaire, protège, d'une part, de la phagocytose par les polynucléaires et les monocytes-macrophages (Raud, 2003) et peut, d'autre part, nuire à l'activation du complément. En effet, elle peut interférer dans la reconnaissance entre la fraction C3b et le récepteur auquel celle-ci doit se lier de façon non spécifique, sur la paroi cellulaire bactérienne, afin de permettre l'activation de la voie alterne du complément. De plus, la capsule peut inhiber l'opsonisation de la bactérie et prévient la destruction de celle-ci par les facteurs bactéricides du sérum (Williams *et al.*, 1983).

3. Immunité spécifique

Les antigènes polysaccharidiques capsulaires sont des antigènes T-indépendants, favorisant la production d'anticorps opsonisants qui facilitent la phagocytose des souches capsulées. Ces anticorps sont cependant souvent de classe IgM, anticorps de faible affinité, ou des IgG₂. De plus, la grande diversité antigénique explique que l'immunité acquise soit souvent prise en défaut. Pour *K. pneumoniae*, on décrit plus de 80 antigènes de type K. Même si l'hôte réussit à produire des anticorps anti-capsulaires, certaines bactéries parviennent à contourner cette défense, en relâchant une certaine quantité de leur capsule

dans l'environnement. Les anticorps reconnaissent ces capsules libres et sont ainsi saturés, ne pouvant donc plus agir sur la bactérie (Raud, 2003).

- Pili (fimbriae)

Les propriétés d'adhérences des entérobactéries sont généralement médiées par différents types de pili, projection filamenteuse situées à la surface de la bactérie, qui permettent à celle-ci de se rapprocher étroitement des surfaces muqueuses de l'hôte et de s'y fixer. Il existe différents types de pili, dont deux prédominent chez *K. pneumoniae*.

- Pili de type 1 (pili communs)

Ce sont des adhésines les mieux connues, ils permettent à la bactérie de se lier aux muqueuses ou aux cellules épithéliales des tractus urogénital, respiratoire et intestinal. Ils jouent un rôle important dans la pathogénie des infections urinaires basses et des pyélonéphrites, du fait de leur capacité à se lier aux cellules de tube proximal (Kassis-Chikhani, 2012).

- Pili de type 3

Les souches de *K. pneumoniae* exprimant ce type de pili, elles sont capable d'adhérer aux cellules endothéliales et épithéliales du tractus respiratoire, ainsi qu'aux cellules uro-épithéliales. Au niveau des reins, ces pili interviennent dans l'adhérence des bactéries aux membranes tubulaires, à la capsule de Bowman et aux vaisseaux sanguins (Raud, 2003).

- Autres types d'adhésines

D'autres adhésines ont été plus récemment décrites : l'adhésine CF29K qui permet l'adhérence de ces bactéries aux cellules intestinales (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1992), l'adhésine KPF-28 dans le rôle est encore mal connu (Di Martino *et al.*, 1996).

- Sidérophores

C'est la possibilité qu'ont les bactéries de capter le fer environnant grâce à des structures particulières, les sidérophores. Dans l'organisme de l'hôte, le fer n'est pas à l'état libre mais associé à des glycoprotéines telles que la transferrine et la lactoferrine. En effet la captation du fer est essentielle à la croissance et à la réplication *in vivo* des bactéries et joue un rôle dans l'installation et la progression de l'infection (Belbel, 2014).

- **Ilots de pathogénicité**

C'est un grand fragment chromosomique d'ADN (35-45 kb) ; il porte les gènes de virulence, en particulier le locus de la yersiniabactine indispensable à l'expression du phénotype hyper-virulent de *Yersinia sp.* Il s'insère au niveau de la terminaison 3' du gène de l'ARN de transfert; le taux de G+C% est différent de celui du reste du chromosome et il est flanqué de séquences répétées. Cet îlot contient de nombreux gènes dont le locus de la yersiniabactine: sa fonction essentielle est de capter des molécules de fer essentielles à la croissance et à la dissémination de la bactérie (Belbel, 2014).

- **Élément d'intégration et de conjugaison (ICE : Intégrative and Conjugative Element) :**

Le transfert horizontal de gènes, intra-espèces et inter-espèces, joue un rôle essentiel dans l'évolution et la capacité d'adaptation des bactéries (Cruz et Davies, 2000). Trois mécanismes principaux, la transformation, la transduction et la conjugaison permettent à des populations bactériennes d'acquérir des gènes par transfert horizontal de répondre ainsi rapidement aux défis et stress environnementaux (Belbel, 2014).

Chapitre 02 : Les antibiotiques utilisés dans le traitement des infections dues aux Klebsielles

Par définition, les antibiotiques sont des molécules produites par le métabolisme secondaire de certains micro-organismes, bactéries ou champignons, comme *Streptomyces*, *Bacillus*, *Penicillium*, *Cephalosporinium* (Gautier, 2007).

Ces substances naturelles, non toxiques pour l'hôte, exercent une toxicité sélective vis à vis de leur cible. La découverte des nouvelles molécules et leur développement à l'échelle industrielle a conforté l'idée que les infections bactériennes pouvaient être vaincues. Cependant, l'utilisation massive et parfois mal contrôlée de ces agents a conduit à la sélection des bactéries résistantes à de nombreux antibiotiques (Faure, 2009).

C'est en 1941 que fut utilisé pour la première fois un antibiotique, la pénicilline, découverte en 1928 par le bactériologiste anglais Alexander Fleming pour traiter un patient atteint de septicémie à staphylocoque (Souna, 2011).

1. Les principaux antibiotiques utilisés dans le traitement des infections dues aux Klebsielles

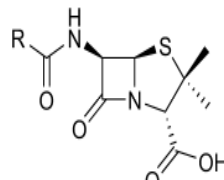
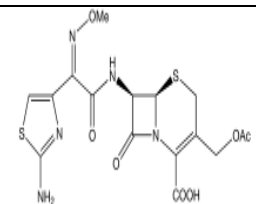
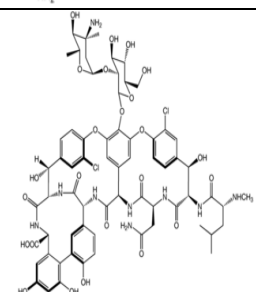
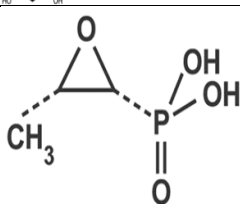
Les bêta-lactamines sont parmi les antibiotiques les plus utilisés dans le traitement des infections causées par les *K. pneumoniae* (vue leur diversité, faible toxicité, activité bactéricide et large spectre d'action. Elles comprennent les dérivés de la Pénicilline, les Céphalosporines, les Monobactames et les Carbapénèmes, et ont toutes en commun le cycle β -lactame (Belbel, 2013).

En effet les *Klebsiella* possèdent une résistance naturelle à l'Ampicilline et à la Carbénicilline (chez les nouveau-nés et nourrissons soumis à un traitement à l'Ampicilline, le nombre des *Escherichia coli* diminue dans les selles, celui des *Klebsiella* et *Enterobacter cloacae* augmente) mais elles restent en général sensibles aux Céphalosporines. Parmi les antibiotiques les plus actifs, on peut citer la Colistine, l'Acide Nalidixique et les dérivés du Furane (infections urinaires), l'association Triméthoprime-Sulfaméthoxazole, certains Aminosides (Gentamicine), les Quinolones, les Céphalosporines de troisième génération ou la Ticarcilline convenablement choisis. La prophylaxie repose sur les mesures de prévention des infections nosocomiales et idéalement l'éradication des réservoirs hospitaliers (Kone-Diallo, 2010)

2. Classification des antibiotiques

La classification des antibiotiques est tout d'abord basée sur leur mécanisme d'action puis sur leur origine, leur nature chimique, leur modalité d'action et enfin leur spectre d'action (Maurice, 2007)

Tableau 04 : Les différentes classes d'antibiotiques n'interférant pas avec la synthèse des protéines (Maurice, 2007).

Cible	Classe	Exemple	Origine	Structure chimique	Mode d'action	Spectre d'action
Paroi cellulaire	β-lactamines	Penicilline	<i>Penicillium chrysogenum</i>		Inhibition des transpéptidases	Gram +
	Céphalosporines	Céfotaxime	Synthèse chimique			Gram + Gram -
	Glycopeptides	Vancomycine	<i>Streptomyces orientalis</i>		Blocage de la synthèse du peptidoglycane	Gram +
	Fosfomycines	Fosfomycine	<i>Streptomyces</i>		Bloque la formation d'acide N-acétyl muraminique	Gram + Gram -
Membrane Plasmique	Polymyxines	Polymyxine B Colistine	<i>Bacillus polymyxa</i>	Polypeptides de 10 acides aminés	Interaction avec les phospholipides membranaires	Gram -
	Lipopeptides	Daptomycine	<i>Streptomyces roseosporus</i>	Peptide cyclique poly-anionique	Formation de canaux ioniques	Gram +

Partie I : Recherche Bibliographique

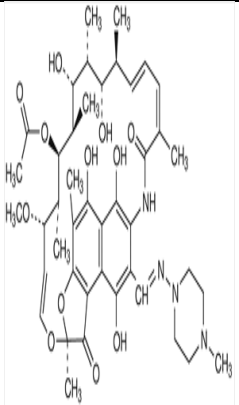
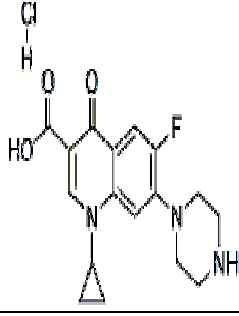
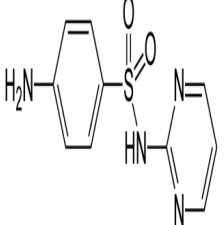
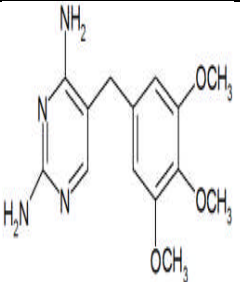
Synthèse des acides nucléiques	Rifamycines	Rifampicine	<i>Streptomyces nocardia mediterranei</i>		Blocage de la transcription par inhibition de l'ARN Polymérase	Gram + Gram -
	Quinolones	Ciprofloxacine	Synthèse chimique		Blocage de la réplication de l'ADN par inhibition de la gyrase	Gram +
Métabolisme de l'acide folique	Sulfamides	Sulfadiazine	Synthèse chimique		Inhibition de la dihydrofolate synthétase	Gram + Gram -
	Diamino-pyrimidines	Triméthoprime	Synthèse chimique		Inhibition de la dihydrofolate réductase	Gram + Gram -

Tableau 05 : Les différentes classes d'antibiotiques interférant avec la synthèse des protéines (Maurice, 2007).

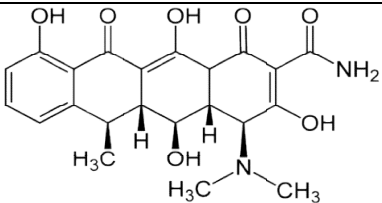
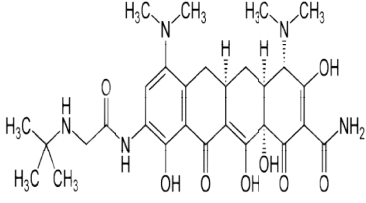
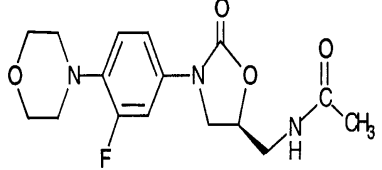
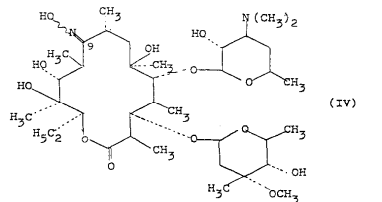
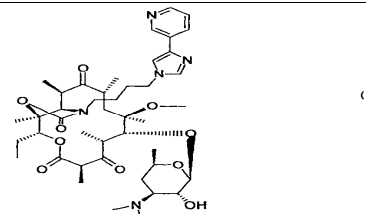
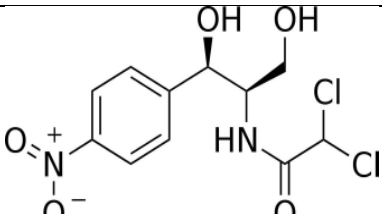
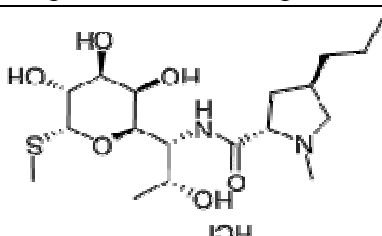
Classe	Exemple	Origine	Structure chimique	Mode d'action	Spectre d'action
Tétracycline	Doxycycline	<i>Streptomyces aureofaciens</i>		Inhibition de la fixation de l'ARN de transfert aminoacylé à la sous-unité 30S	Gram + Gram -
Glycylcyclines	Tigécycline	Synthèse chimique		Blocage de la sous unité 30S par fixation au site de liaison de l'ARNt	Gram + Gram -
Oxazolidinones	Linezolid	Synthèse chimique		Inhibition de l'association des sous-unités 30S et 50S	Gram +
Macrolides	Erythromycine	<i>Streptomyces erythreus</i>		Inhibition de l'élongation de la chaîne peptidique par fixation au site P de la sous-unité 50S	Gram +
Kétolides	Télithromycine	Synthèse chimique		Fixation sur un site supplémentaire de la sous-unité 50S par rapport aux Macrolides	Gram +
Phénicoles	Chloramphénicol	<i>Streptomyces venezuelae</i>		Inhibition de l'activité peptidyltransférase par liaison à la sous unité 50S	Gram + Gram -
Lincosamides	Lyncomycine	<i>Streptomyces lincolnensis</i>		Inhibition de l'élongation de la chaîne peptidique par fixation au site P de la sous-unité 50S (antagonisme avec les Macrolides)	Gram +

Tableau 06 : Les principaux antibiotiques utilisés en Algérie (Anonyme 6, 2012).

Famille	Exemple	Abréviation
β-lactamines	Pénicilline	P
	Oxacilline	OX
	Ampicilline	AM
	Amoxicilline	AMX
	Amoxicilline+Ac.clavulanique	AMC
	Ticarcilline	TIC
	Ticarcilline +Ac.clavulanique	TCC
	Pipéracilline	PIP
	Céfalexine	LEX
	Céfazoline	CZO
	Céfalotine	CEF
	Céfprome	CPO
	Céfoxitine	FOX
	Céfotaxime	CTX
	Céftiofur	TIO
	Céftriaxone	CRO
Céftazidime	CAZ	
Aztréonam	ATM	
Imipénème	IPM	
Aminosides	Gentamicine	GEN
	Gentamicine Haut niveau	GEH
	Streptomycine	STR
	Streptomycine Haut niveau	STH
	Kanamycine	KAN
	Amikacine	AMK
	Tobramycine	TOB
	Nétilmicine	NET
	Spectinomycine	SPT
Néomycine	NEO	
Cyclines	Tétracycline	TCY
	Doxycycline	DOX
Macrolides	Erythromycine	ERY
	Azithromycine	AZM
	Clindamycine	CLI
	Pristinamycine	PRI
	Spiramycine	SPI
	Tilmicosine	TIL
Phénicoles	Chloramphénicol	CHL
Polypeptides	Colistine	COL
Glycopeptides	Vancomycine	VAN
	Teicoplanine	TEC
Sulfamides et associés	Triméthoprim + Sulfaméthoxazole	SXT
Quinolones	Acide nalidixique	NAL
	Ciprofloxacine	CIP
	Ofloxacine	LVX
	Norfloxacine	NOR
Nitrofurantoines	Furanes	NIT
Autres	Acide fusidique	FUS
	Rifampicine	RIF
	Fosfomycine	FOS

3. Cible des principaux antibiotiques

Les antibiotiques constituent un important groupe de médicaments pour la médecine. À côté de leurs propriétés de lutter contre les infections humaines dues aux bactéries pathogènes, ils sont également utilisés en médecine vétérinaire (Souna, 2011).

Les antibiotiques agissent à un niveau précis dans les structures bactériennes et chaque famille possède son site d'action propre (Figure 04):

- Action sur la paroi bactérienne.
- Action sur la structure de la membrane.
- Action sur la synthèse protéique.
- Action sur la synthèse de l'ADN.
- Action sur le métabolisme de l'acide folique (Souna, 2011).

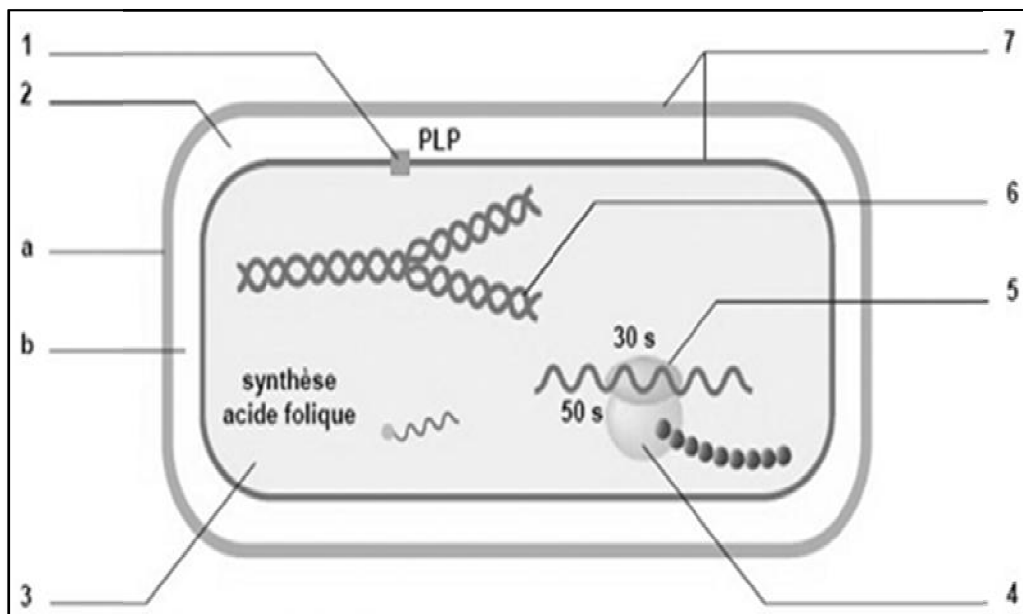


Figure 04 : Cibles des principaux antibiotiques (Souna, 2011).

a. Paroi bactérienne ; **b.** Espace péri-plasmique ; **1.** PLP (β -lactamine) ; **2.** D-ala (Glycopeptides) ; **3.** Dihydroptéorate synthétase (Sulfamides) ; **4.** Fixation à la sous-unité 50S du ribosome (Macrolides, Synergistines, Lincosamides, Phénicoles) ; **5.** Fixation à la sous-unité 30S du ribosome (Aminosides, Tétracyclines) ; **6.** Acides nucléiques (Quinolones, Rifamycines, Nitro-Imidazoles) ; **7.** Membranes cytoplasmiques (Polymyxines).

Chapitre 03: Supports génétiques de la résistance aux antibiotiques chez *Klebsiella* spp.

La résistance aux antibiotiques est un phénomène important et inquiétant, véritable enjeu de santé publique. Il existe une course poursuite entre la résistance des bactéries et l'industrie pharmaceutique pour trouver des antibiotiques qui «résistent à la résistance» (Roy, 1997). La résistance bactérienne se définit comme la capacité de continuer à croître ou à survivre en présence de l'antibiotique. Les conditions d'activité d'un antibiotique sont de posséder une cible spécifique, de demeurer sous forme active, d'accéder à la cible et d'interagir efficacement avec elle en la désactivant. Il existe de nombreux mécanismes aboutissant à l'expression de la résistance et suivant son caractère inné ou acquis : la résistance naturelle et la résistance acquise (Amado-Diallo, 2013).

1. Types de résistance :

1.1. Résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque est une caractéristique propre à une espèce bactérienne et partagée par toutes les souches de cette espèce. Elle peut être due à la présence d'un gène chromosomique commun à toutes les bactéries de l'espèce (Gautier, 2007). Pour chaque classe d'antibiotique, il existe des espèces bactériennes pour lesquelles l'antibiotique est inactif par défaut de cible ou d'accès à la cible. Ainsi, l'absence de paroi chez les mycoplasmes rend les β -lactamines inactives vis à vis de ces bactéries (Faure, 2009).

Dans tous les cas, la résistance naturelle fait partie des caractères normaux de l'espèce, elle détermine le niveau de sensibilité « basal » des bactéries et définit le phénotype sauvage d'une espèce (Gautier, 2007). C'est la résistance de classe. Elle est constitutive et touche toute une famille d'antibiotiques (Amado-Diallo, 2013).

-*K. pneumoniae* est naturellement résistante aux Aminopénicillines (Amoxicilline, Ticarcilline) par production d'une β -lactamase de classe A d'espèce (chromosomique) du groupe fonctionnel 2a, inhibée par l'Acide Clavulanique (Arafa, 2011).

-*K. pneumoniae* est classée au sein du groupe II des *entérobactéries* dont le phénotype, souvent appelé « pénicillinase à bas niveau », se caractérise par la production naturelle,

constitutive et à bas niveau d'une pénicillinase chromosomique (avec plusieurs variants *SHV*, *LEN*, *OKP*), inactivant la benzyl-pénicilline, les Amino et Carboxy-pénicillines. Le bas niveau de résistance se traduit par la persistance, sur l'antibiogramme, d'une petite zone d'inhibition autour du disque de Carboxypénicilline (Ticarcilline) et souvent même autour du disque d'Aminopénicilline (Amoxicilline) (Raud, 2003; Kassis-Chikhani, 2012).

1.2. Résistance acquise

Elle existe grâce à l'acquisition d'un ou de plusieurs mécanismes de résistance qui, déterminent un phénotype bien précis de résistance, différent du phénotype sauvage, caractérisant les souches n'ayant pas acquis ce mécanisme. Elle ne concerne qu'une population plus ou moins importante de souches d'une espèce (Meyer *et al.*, 2004).

La résistance acquise a été observée le début de l'antibiothérapie, mais sa fréquence était initialement faible (Lozniewski *et al.*, 2010).

-En réponse à la pression de sélection exercée par les bêta-lactamines, des souches de *K. pneumoniae* ont acquis des plasmides porteurs de gènes codant pour des β -lactamases de type *TEM* et *SHV*, leur permettant d'hydrolyser les Céphalosporines de 1^{ère} génération et certaines pénicillines à spectre large (Raude, 2001).

-En 1980, l'introduction des Céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G), ayant une meilleure activité antibactérienne et réputées non hydrolysables par les β -lactamases de type *TEM*, a constitué un réel progrès thérapeutique (Gautier, 2007). Malheureusement, suite à l'importance prescription de ces antibiotiques, la résistance acquise aux C3G a rapidement été observée chez certaines souches de *K. pneumoniae*, isolées essentiellement en milieu hospitalier. Ce nouveau phénotype de résistance était liée à la production d'une β -lactamase plasmidique ayant évolué par mutation et qui, en raison de son large spectre d'activité, fut dénommée β -lactamase à spectre étendu (BLSE) (Raude, 2003). Cette enzyme désignée *SHV-2*, dérivait de l'enzyme chromosomique *SHV-1* de *K. pneumoniae* par le remplacement d'une glycine en position 238 par une sérine, d'autres substitutions ont été depuis observées (Gautier, 2007).

-Plus récemment, cette espèce occupe une position importante dans l'émergence et la dissémination de certaines enzymes conférant la résistance aux Carbapénèmes (KPC, OXA-48). Lorsque on fait un bilan des nouvelles β -lactamases décrites depuis 1983, *K. pneumoniae* est dans 80% des cas l'hôte chez qui ont été découvertes ces nouvelles

enzymes (de type *TEM*, *SHV*). Lorsqu'elle n'est pas le premier hôte, on retrouve très fréquemment cette espèce comme responsable de la diffusion épidémique de nouvelles enzymes comme les métallo-enzymes de type *VIM* et *NDM-1* (Belbel, 2014).

2. Mécanismes génétiques de la résistance acquise aux antibiotiques chez *Klebsiella* spp.

2.1. Résistance par mutation chromosomique

Les résistances mutationnelles sont chromosomiques, spontanées, rares (fréquence de 10^{-6} à 10^{-9}), stables et transmissibles uniquement de façon verticale. L'antibiotique n'est pas l'agent mutagène, il sélectionne seulement les mutants devenus résistants. Elles n'intéressent qu'un antibiotique ou qu'une famille d'antibiotique à la fois (Faure, 2009).

La mutation du gène peut entraîner l'apparition d'une protéine particulière ou d'une variabilité structurelle responsable de la résistance, elle peut aussi entraîner la disparition ou la modification d'une protéine structurale ou enzymatique normale. En absence d'antibiotiques dans le milieu exerçant une pression de sélection, la plupart des mutants naturels vont disparaître (Amado-Diallo, 2013).

Par opposition à la résistance extrachromosomique, la résistance chromosomique n'est pas transmissible d'une espèce bactérienne à une autre, ni d'un genre à un autre. Elle ne concerne que 10% des résistances acquise (Arafa, 2011).

2.2. Résistance extrachromosomique

La résistance aux antibiotiques acquise par les bactéries est principalement due à la présence de trois types d'éléments extrachromosomiques portant des gènes de résistance : les plasmides, les transposons et des cassettes de résistances insérées sur des intégrons (Bennett, 2008; Martinez, 2009).

Ce type de résistance est transmissible d'une souche ou d'une espèce à une autre selon trois modes de transmission, à savoir la conjugaison (transfert direct entre deux bactéries ayant établi temporairement un contact physique), la transformation (transfert d'ADN nu) et la transduction (transport d'ADN bactérien par des bactériophages) (Perry *et al.*, 2004). Elle concerne 90% de résistance acquise (Arafa, 2011).

2.2.1. Les plasmides

Les plasmides sont des agents essentiels pour le flux horizontal de gènes et donc une composante importante de l'évolution bactérienne (Belbel, 2014). Ce sont des ADN extra-chromosomiques, circulaires, bicaténaire, de localisation cytoplasmique (Perry *et al.*, 2004). Les plasmides codent également pour des fonctions conférant un avantage à la cellule hôte, comme leur capacité à porter et à transmettre les gènes codant pour la résistance aux antimicrobiens (Carattoli, 2009 ; Doublet *et al.*, 2012). Les plasmides de résistance sont rencontrés principalement chez les bacilles Gram négatif (chez qui ils sont transmis par conjugaison) (Abdoul Karim Traore, 2009).

-En chine l'an 2006, la présence d'un plasmide multi-résistant (pKP048) appartenant au groupe F d'incompatibilité (Inc F) a été détecté chez une souche hospitalière de *K. pneumoniae* (KP048), isolée à partir d'un échantillon d'expectoration. Il porte plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques tels que : *bla*_{KPC-2}, *bla*_{DHA-1}, *qnrB4*, et *armA*, conférant une résistance aux Carbapénèmes, Céphalosporines, Fluoroquinolones et aux Aminoglycosides respectivement. Ce plasmide porte aussi un cluster de gènes codant pour des protéines conférant une résistance aux métaux lourds (Mercure) et un gène codant pour une enzyme 2'-phosphotransférase Mph2 celui-ci confère une résistance aux Macrolides. (Figure 05 et 06). On trouve aussi des gènes codant pour d'autres fonctions tels que : la réplication, la stabilité génétique, la plasticité des gènes et pour la conjugaison (Yan Jiang *et al.*, 2010).

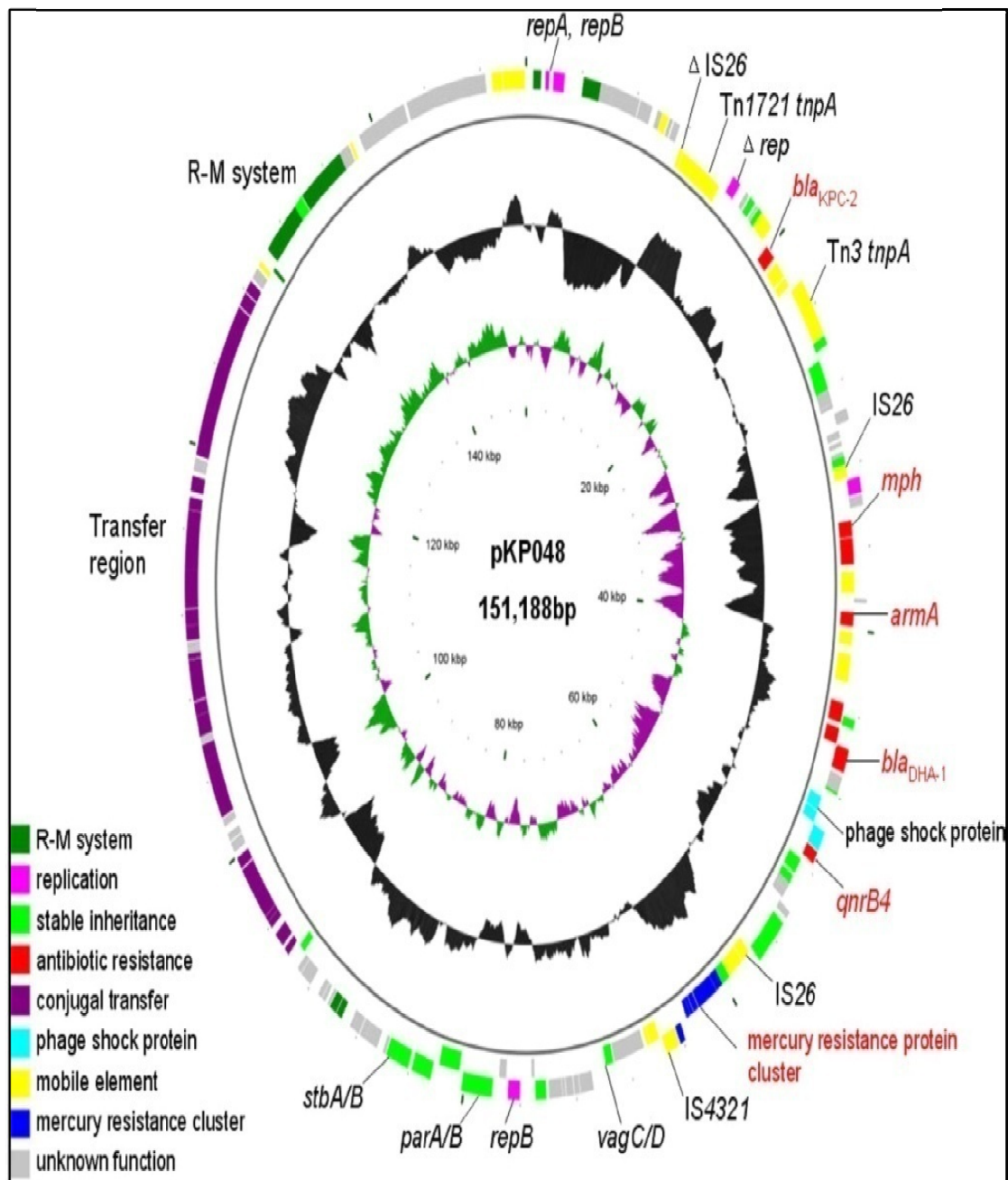


Figure 05 : La carte génétique circulaire du plasmide pKP048 multi-résistant chez une souche hospitalière *K. pneumoniae* (KP048) (Yan Jiang *et al.*, 2010).

Les deux cercles extérieurs représentent les orientations des cadres de lecture ouverts (ORF), dont le plus (extérieur) et moins (à l'intérieur) respectivement. Les gènes sont codés par couleur comme expliqué dans la clé (Yan Jiang *et al.*, 2010).

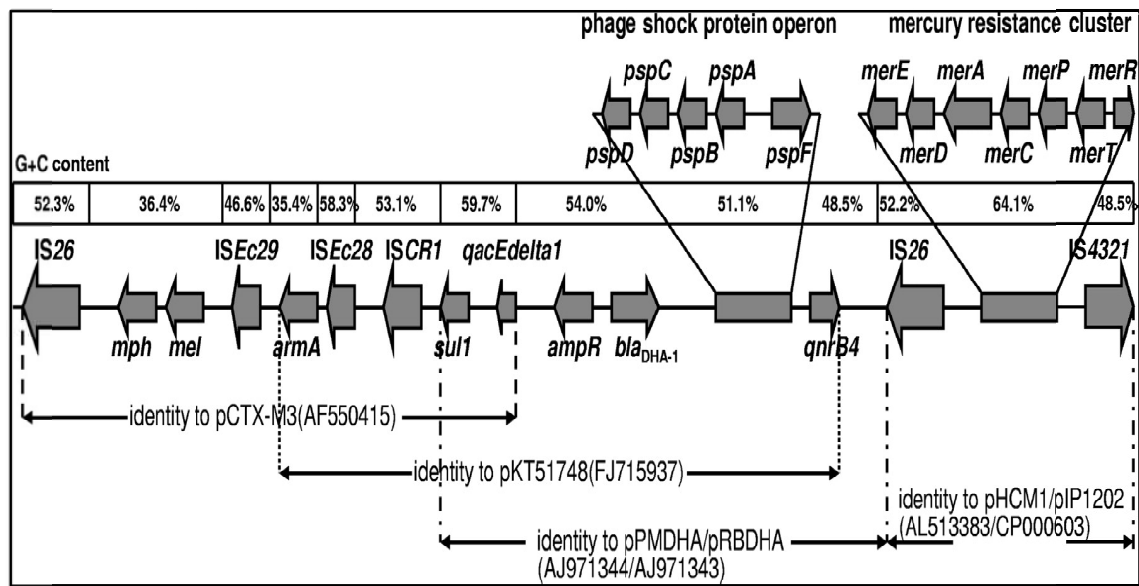


Figure 06 : Représentation schématique de la 25kb du plasmide pKP048, qui porte les gènes : *armA*, *ampR*, *bla_{DHA-1}*, *qnrB4* et un cluster codant pour la résistance au Mercure chez *K. pneumoniae* (Yan Jiang *et al.*, 2010).

-Un autre plasmide autotransférable (pNL194), appartient au group N d'incomptabilité (Inc N) et isolé à partir des souches de *K. pneumoniae* multi-résistantes à Athènes en 2007, constitué de 79.307 pb et contient 96 séquences codantes. Il porte un segment de 38.940 pb inclue 42 cadres de lecture ouverts (ORF), et le reste des gènes (40.367pb) ce sont des séquences d'insertion, des fragments de transposon (Tn) et trois intégrons (In). Il comprenait également 10 gènes codant pour la résistance aux antibiotiques, tels que les gènes cassettes *bla_{VIM-1}*, *aacA7*, *aadA1*(deux exemplaires), *aadA2*, *aphA1*, *strA*, *strB*, *dfrA1*(deux exemplaires), et *dfrA12*, ainsi que *sulI*(deux copies), conférant une résistance aux β -lactamines (en particulier à l'Imipenème), aux Aminosides (Kanamycine et Streptomycine), à la Triméthoprime, et aux Sulfonamides respectivement, est enfin un opéron codant pour la résistance au Mercure. Ce plasmide comprend également un système de transposition (*oriT*), un opéron de stabilité et trois origines de répliation (*oriB*, *oriS*, et *oriV*). La carte génétique du plasmide pNL194 est représentée dans la Figure 07 (Miriagou *et al.*, 2010). Toutes les régions codantes de ce plasmide sont illustrées (Annexe 07).

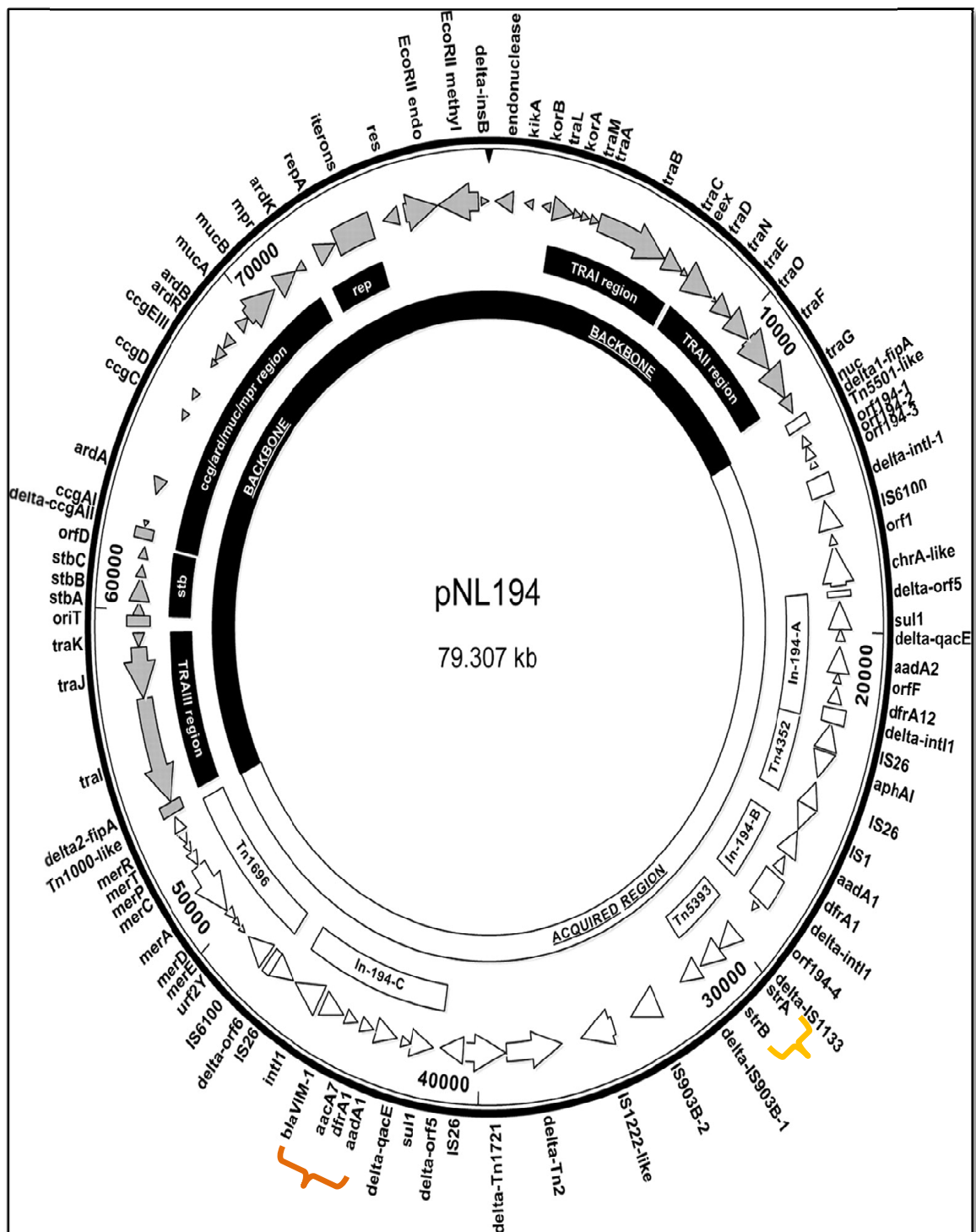


Figure 07 : La carte génétique circulaire du plasmide multi-résistant pNL194 de *K. pneumoniae* (pNL194) (n° d'accèsion dans GenBank : GU585907) (Miriagou *et al.*, 2010).
 -Les cadres de lectures ouverts (ORF) et la direction de la transcription des gènes sont représentés par des flèches grises, les flèches blanches indiquent l'acquisition des nouveaux gènes.

- Un nouveau plasmide pKOX-R1 multi-résistant, isolé à partir d'une souche de *K. oxytoca* E718 du Taiwan. Ce plasmide à une structure circulaire, constitué de 353.865pb, et possède trois origines de répllication d'au moins Inc A/C et Inc H. A l'intérieur de ce plasmide on trouve des gènes codants pour des protéines de conjugaison, d'autres gènes conférant une résistance à de nombreuses familles d'antibiotiques (Huang *et al.*, 2013).

Une recherche dans la base de donnée NCBI, permet d'identifier deux régions *armA* associés : une région I (de la position 133971pb jusqu'à 159654pb), inclue un intégron celui-ci porte un transposon (Tn3) portant 3 types de BLSE : *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-12}, conférant une résistance aux β -lactamines, et une région II (de la position 337148pb jusqu'à 350762pb) (Figure 08 {B}). Ces deux régions contient des intégrons, ces derniers portent plusieurs gènes, tels que : *aadA2*, *aadA5*, *aac(6)-Ib* conférant une résistance aux Aminoglycosides, et les deux gènes *dfr* et *sul* conférant une résistance aux Triméthoprimes et aux Sulfonamides respectivement (Huang *et al.*, 2013).

La structure génétique en détaille de ce plasmide, est illustrer dans la Figure 08.

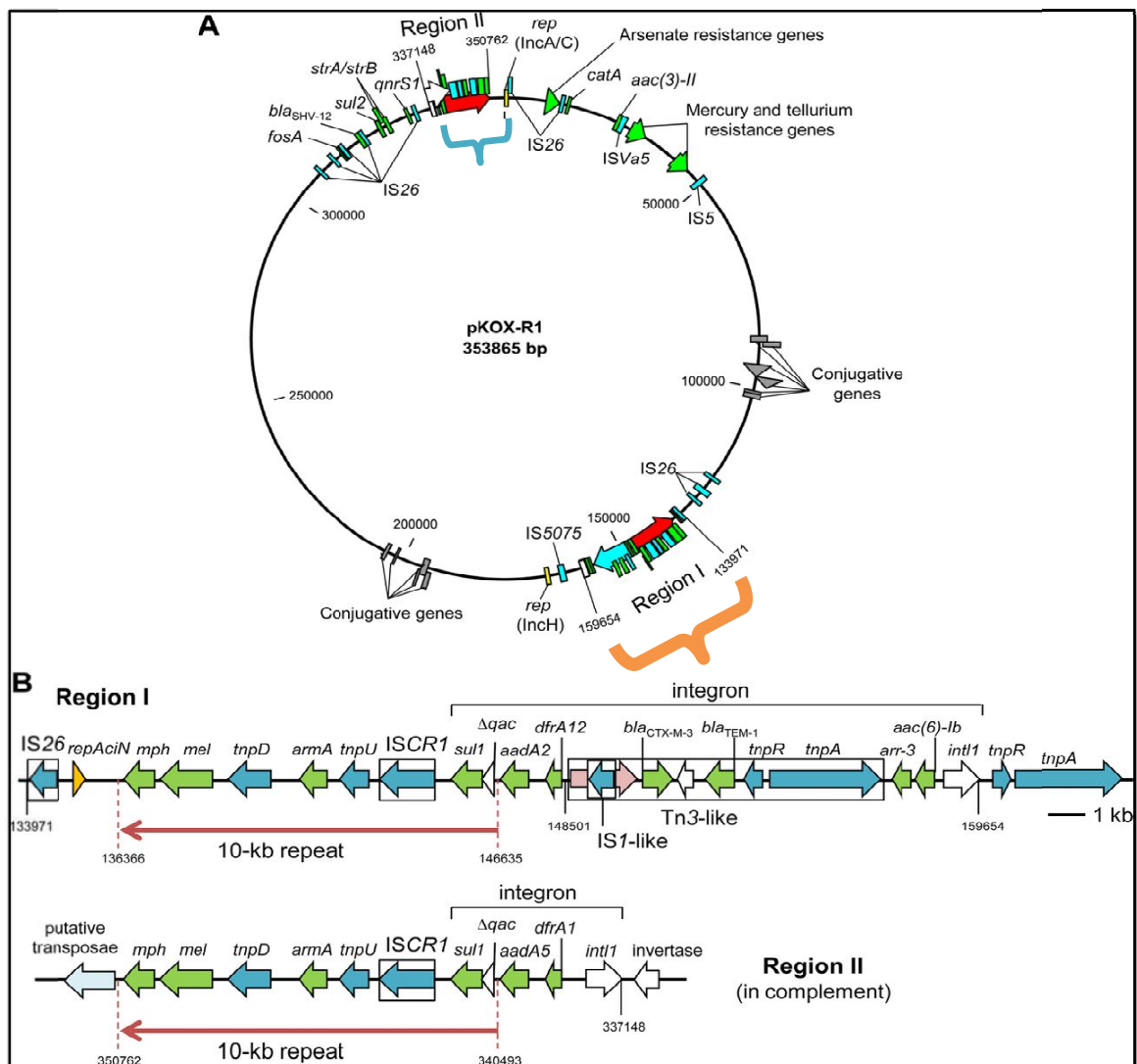


Figure 08 : (A) : Représentation schématique du plasmide (pKOX-R1), qui indique les déterminants génétiques de la répllication, du transfert, et de la résistance antimicrobienne (Huang *et al.* , 2013).

(B) : Détails de deux régions *armA*-associées.

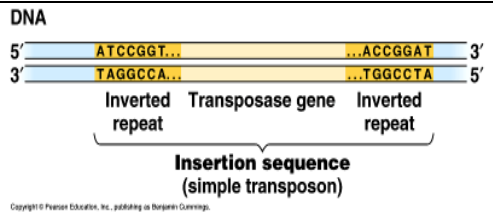
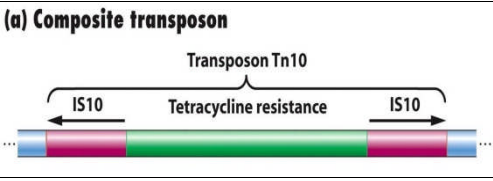
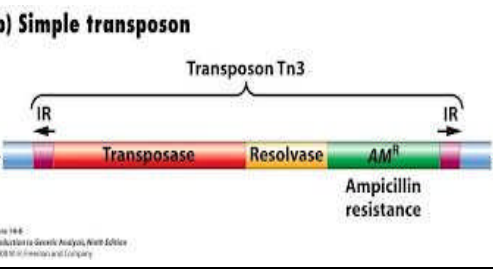
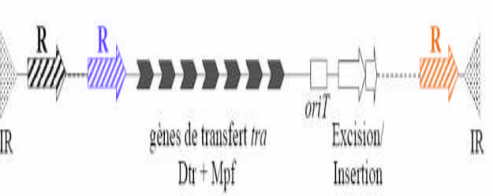
Les flèches rouges indiquent les répétitions de 10 kb, qui contiennent le gène *armA* et les gènes de résistance aux Macrolides (*mph* et *Mel*). Les gènes codant pour la transposase sont indiqués par des flèches bleues, alors que ceux fonctionnant dans la résistance aux antimicrobiens sont indiqués par des flèches vertes. La flèche jaune indique un gène d'initiation de la répllication, et les flèches blanches représentent les cadres de lecture ouverts (ORF). Les boîtes indiquent des éléments mobiles. La flèche rose représente l'ISEcp1 divisé en deux parties par insertion d'un élément de type IS1-like. La flèche bleu clair indique un gène de transposase putative (Huang *et al.*, 2013).

2.2.2. Les éléments transposables et les intégrons

Les éléments transposables sont capables d'être transférés d'un site donneur vers un site cible, localisés ou non sur la même molécule d'ADN, plasmidique ou chromosomique. Ces fragments d'ADN ne peuvent généralement se répliquer, mais codent pour les déterminants de leur transposition (Faure, 2009). Les éléments génétiques mobiles, identifiés et étudiés depuis le milieu du XX ième siècle, jouent un rôle considérable dans l'adaptation et l'évolution des bactéries. Ils sont capables de véhiculer un grand nombre de gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques mais aussi dans le métabolisme ou encore la pathogénicité (Doublet *et al.*, 2012).

Les éléments transposables impliqués dans la résistance aux antibiotiques sont les suivant : les séquences d'insertion (IS), les transposons composites, les transposons non-composites et les transposons mobilisables dont les caractéristiques sont résumées dans le Tableau 07 (Faure, 2009).

Tableau 07 : Structure de base schématisée des différents types d'éléments transposables selon la nomenclature proposée par Roberts *et al.*, 2008 (Faure, 2009).

Type d'éléments transposables	Définition	Structure schématisée
Séquence d'insertion (IS)	Élément codant pour une transposase, encadré de 2 séquences inversées répétées (IR)	 <p>DNA 5' ATCCGGT... ACCGGAT 3' 3' TAGGCCA... TGGCCTA 5' Inverted repeat Transposase gene Inverted repeat Insertion sequence (simple transposon)</p>
Transposon Composite (Tn10)	Élément codant pour une résistance à un antibiotique, encadré de 2 éléments IS.	 <p>(a) Composite transposon Transposon Tn10 IS10 Tetracycline resistance IS10</p>
Transposon non composite (Tn3)	Élément codant pour un résolvasse, un transposase et porteur d'un ou de plusieurs gènes accessoires, encadré de 2 séquences inversées répétées (IR).	 <p>(b) Simple transposon Transposon Tn3 IR Transposase Resolvase AM^R Ampicillin resistance</p>
Transposon mobilisable (MTn)	Élément nécessitant la présence d'éléments conjugatifs pour transférer d'une cellule à une autre (plasmides, CTn)	 <p>IR R R genes de transfert tra Dtr+Mpf oriT Excision/Insertion IR</p>

1. Les transposons

1.1. Les gènes *bla*_{KPC}

La première *K. pneumoniae* KPC-2 date de 2005 et a été isolée chez un patient ayant séjourné dans un hôpital new-yorkais. Depuis, d'autres souches isolées de patients transférés des USA, d'Israël et de grec ont été rapportés (Kassis-Chikhani, 2012).

Le support génétique de cette résistance est le gène *bla*_{KPC} porté sur le transposon (Tn4401) codant pour une enzyme particulière appelée KPC (Cuzon *et al.*, 2010 ; Chen *et al.*, 2012). Les KPC sont des enzymes plasmidiques (Pool, 2004) de classe A, actives sur la plupart des β -lactamines (Boutet-Dubois *et al.*, 2012), y compris les Oximino-Céphalosporines et l'Imipénèmes (Pool, 2004). Plusieurs variants ont été décrits à ce jour (KPC-1 à KPC- 11), le gène *bla*_{KPC-2} est actuellement le plus répandu sur la planète (Boutet-Dubois *et al.*, 2012).

Le Tn4401 et les gènes *bla*_{KPC} ont été rapportés dans des plasmides de diverses tailles, qui diffèrent par leur capacité à transférer à l'intérieur d'une même espèce ou entre les espèces, portent différents éléments de résistance aux antibiotiques, et possèdent différentes groupes d'incompatibilité (Inc), y compris Inc FII, inclus Inc N, Inc R, et ColE1 (Figure 09) (Chen *et al.*, 2012).

Le Tn4401 est constitué de 10Kb, est délimité par deux séquences répétées inversées (IRS) de 39pb. Il porte des gènes codant pour la résolvasse, la transposase et deux séquences d'insertions (IS) désignés ISKpn6 et PSKpn7, situées immédiatement en aval et en amont du gène *bla*_{KPC} (Figure 10) (Gootz *et al.*, 2009 ; Chen *et al.*, 2011). Ce transposon peut être existé sous forme de trois isomères principale : Tn4401a, Tn4401b (10Kb), Tn4401d (4,7Kb), différant par une de 100 à 200pb en amont de la séquence *bla*_{KPC} (Chen *et al.*, 2011). Le Tn4401 a été décrit dans des souches d'origine géographiques diverses (Lytsy *et al.*, 2008).

Une autre étude a été identifié une région génétique complexe encadrant le gène *bla*_{KPC-3}, dans ce cas le Tn4401 est inséré dans un autre transposon, Tn1331, au niveau duquel un gène *qnrB19*, mobilisé par la séquence d'insertion ISEcpI, s'est également intégré (Figure 12) (Valverde *et al.*, 2004).

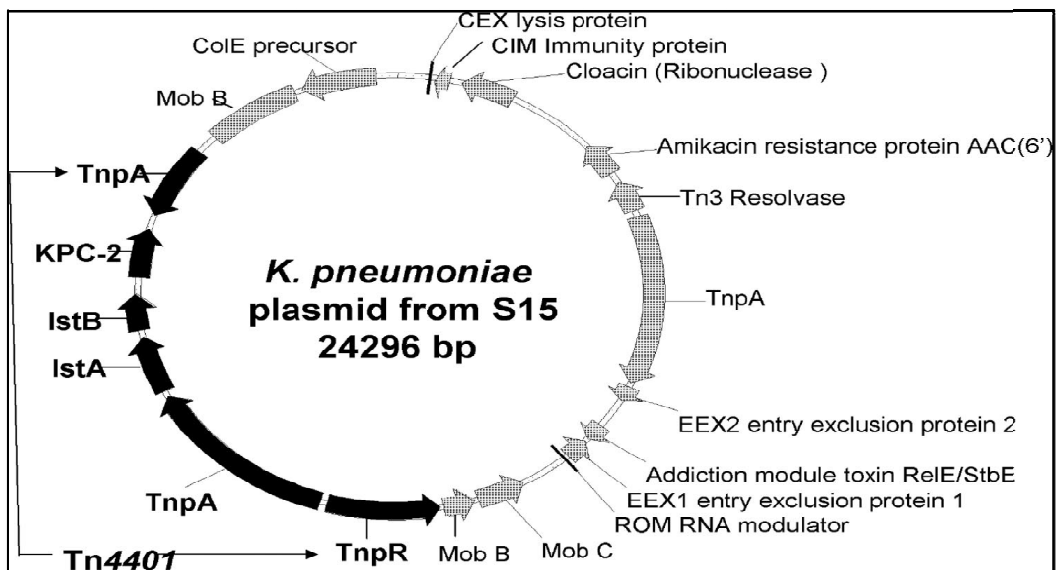


Figure 09 : Annotation partielle des métrages plasmide 24.3kb portant le transposon Tn4401chez *K. pneumoniae* (S15) (Gootz *et al.* , 2009).

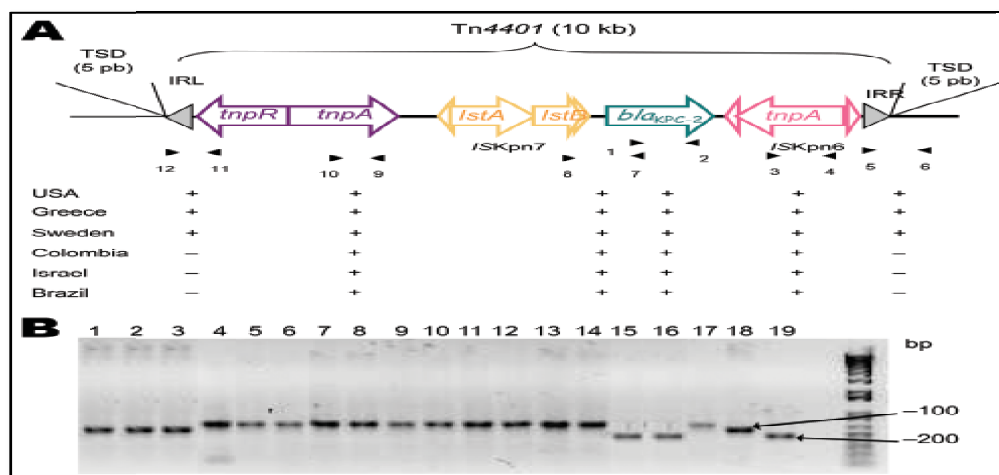


Figure 10 : Représentation schématique des isoformes du Tn4401 sur plasmides des *K. pneumoniae* productrices des carbapénèmases (KPC) (Thierry-Naas *et al.*, 2010).

(A) : Les flèches indiquent le positionnement des gènes et les directions de leur transcription. Les triangles gris représentent les répétitions inversées gauche (IRL) et droite (IRR) de Tn4401. Les petits et vides triangles indiquent les répétitions inversées des séquences d'insertions (ISKpn6 et ISKpn7)

(B) : Résultats de PCR des différentes souches de *K. pneumoniae* productrices des carbapénèmases (Thierry-Naas *et al.*, 2010).

-Le plasmide pJHCMW1 de *K. pneumoniae*, isolé d'un nouveau née atteint d'une méningite, constitué de 11.354 pb et porte un transposon Tn1331 (7.993pb) multi-résistant, ainsi que d'autres gènes codant pour des fonctions principal tels que: la réplication, la stabilité et la mobilisation (Figure 11, 12) (Sarno *et al.*, 2002). Le Tn1331 porte plusieurs gènes : *aac(6)-Ib*, *aadA1*, *bla_{OXA-9}* et *bla_{TEM-1}* conférant une résistance aux Aminosides (Kanamycines et Tobramycines), aux β-lactamines (Sarno *et al.*, 2002), et d'autres gènes codant pour des facteurs de virulence (Ramirez *et al.*, 2014).

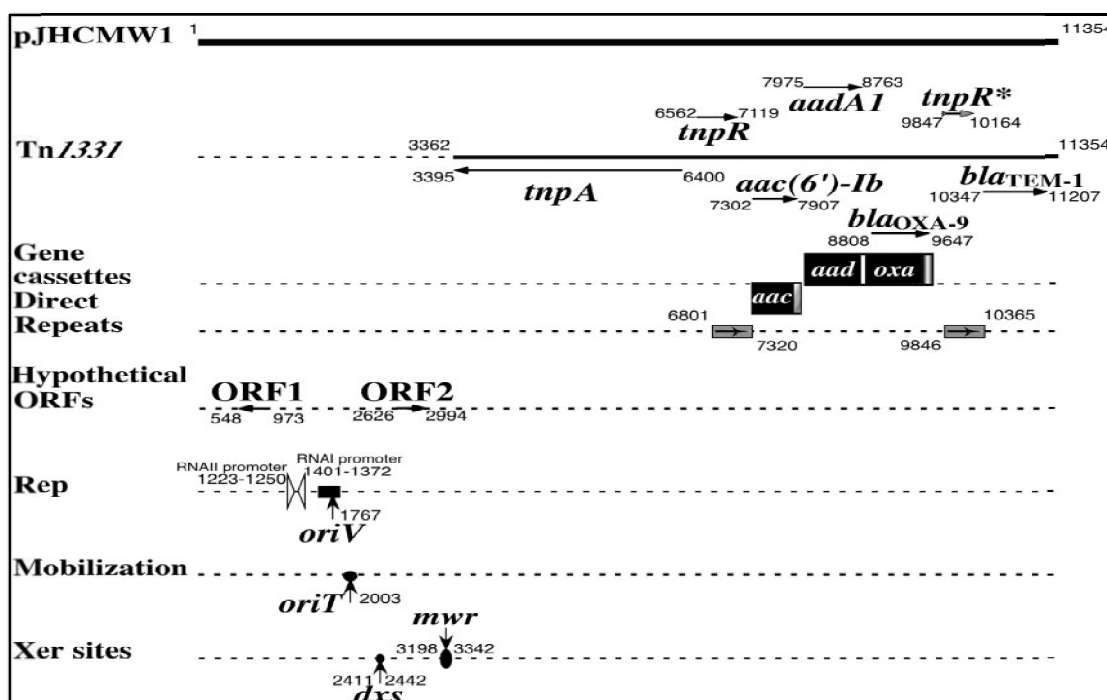


Figure 11: La carte génétique du plasmide pJHCMW1 de *K. pneumoniae* (Sarno *et al.*, 2002).

Le positionnement du Tn1331, des répétitions directes, des gènes de la réplication (Rep), de la mobilisation, et des éléments de recombinaison sont indiqués. La pointe de flèche dans *tnpR*, gris indique qu'il y a un gène tronqué (Sarno *et al.*, 2002).

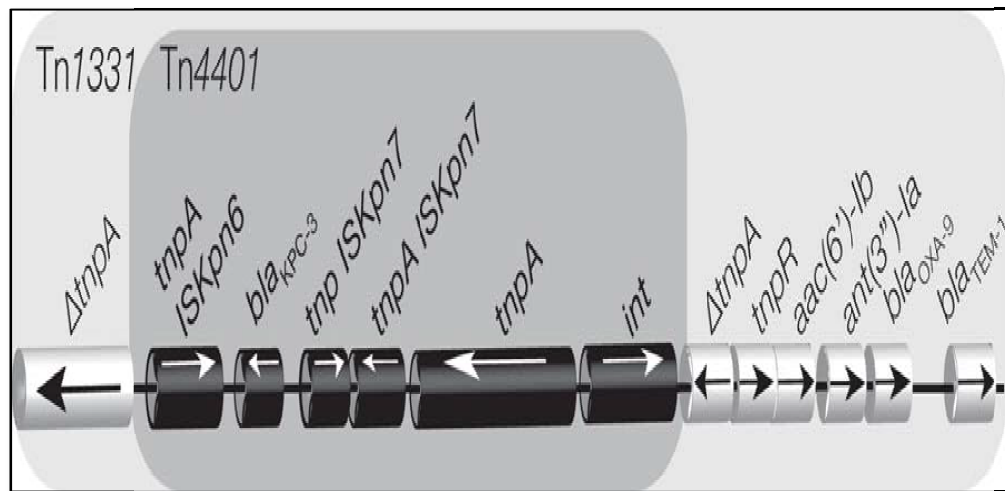


Figure 12: La carte génétique du Tn1331 : région du plasmide d'une souche de *Klebsiella pneumoniae* (pBK15692) (Ramirez *et al.*, 2014).

2. Les intégrons

Les intégrons (In) sont des structures génétiques immobiles qui peuvent acquérir ou perdre des gènes de résistance insérés sous forme d'éléments mobiles, les gènes cassettes. Identifiés par Hall et Stokes en 1989, ils sont insérés dans des plasmides, des transposons ou le chromosome bactérien (Gautier, 2007).

Un intégron est constitué de :

- La région 5' conservée (5'-Conserved Segment ou 5'-CS) composée d'un gène codant une intégrase (*intI*) capable d'intégrer ou d'exciser les gènes cassettes par un système de recombinaison spécifique grâce au site de recombinaison *attI*.
- La région 3' conservée (3'-Conserved Segment ou 3'-CS) comprenant trois cadres de lecture ouverts, *qacEdelta1* qui code une résistance aux ammoniums quaternaires, *sulI* qui code une résistance aux sulfamides et l'*orf5* qui code une protéine de fonction inconnue.
- Gènes cassettes encadrés par ces régions 5' et 3'-CS. Une cassette contient classiquement un gène de résistance aux antibiotiques, bordée à son extrémité 3' du site de recombinaison *attC* permettant soit la circularisation de la cassette lorsqu'elle est libre, soit l'insertion dans un intégron grâce au site *attI*. L'extrémité 5' de la cassette est constituée des 6 dernières pb du site *attC* de la cassette précédente. La plupart des gènes cassettes insérés dans un intégron ne possèdent pas de promoteur. La transcription de ces gènes est rendue

possible par l'existence d'une région promotrice commune (P1 et P2), située dans le segment 5'CS (Gautier, 2007).

2.1. Les gènes *qnr*

- *K. pneumoniae* est naturellement sensible aux Quinolones, l'utilisation abusive de ces molécules en médecine humaine a fait augmenter la résistance de *Klebsiella* spp. aux quinolones (Tlamçani *et al.*, 2009).

Le support de la résistance aux Quinolones était supposé être uniquement chromosomique jusqu'en 1998 où Martinez-Martinez *et al.* ont décrit la première souche *K. pneumoniae* (Meradi *et al.*, 2009) isolée de l'urine, à Birmingham Alabama (USA) (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2006) dont le support de la résistance est un plasmide transférable (pMG252) hébergeant le gène *qnrA* codant pour une protéine QnrA de 218 acides aminés appartenant à la famille des protéines à motifs penta-peptidiques répétés qui protège le complexe ADNgyrase de l'inhibition par les Quinolones (Meradi *et al.*, 2009).

- En 2006, un nouveau mécanisme de résistance plasmidique aux quinolones a été détecté, il s'agit d'une inactivation des fluoroquinolones par acétylation au niveau de l'azote aminé du substituant pipérazinyl. Le déterminant de cette résistance est un variant d'une aminoside N-acétyltransférase (*aac (6')-Ib-cr*), dont le gène codant présente deux mutations spécifiques au niveau des codons 103 et 179 entraînant l'inactivation des FQ est en particulier la Ciprofloxacine (Park *et al.*, 2006 ; Tlamçani *et al.*, 2009). Récemment, un nouveau mécanisme de résistance plasmidique aux FQ à été découvert par excrétion active des FQ via la pompe d'efflux *qepA*. Quatre autres déterminants plasmidiques également impliqués dans la résistance aux quinolones ont été rapportés (*qnrB*, *qnrS*, *qnrC* et *qnrD*), ainsi que différents variant des protéines QnrA et QnrB (Meradi *et al.*, 2009 ; Arafa, 2011). L'origine du déterminant *qnrA* a été identifiée récemment comme étant l'espèce de l'environnement hydrique *Shewanella algae*. Le support plasmidique de la résistance aux Quinolones est associée à des intégrons de classe I de type *sul1*, portant des déterminants de résistance à plusieurs autres antibiotiques comme les β -lactamines et / ou les Aminoglycosides (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2006 ; Carattoli, 2009 ; Meradi *et al.*, 2009).

Chez *K. pneumoniae* (pHe96) le gène *qnrA3* (*qnrS*), est insérer immédiatement en amont d'une séquence d'insertion (IS26) (Lascols *et al.*, 2008) sur un intégron de classe I avec d'autres gènes y compris: *aac (6')-Ib-cr*, *bla_{OXA-1/30}*, *catB3* et *arr-3*, *dfr*, *aac(6')-Ib*

situées successivement en amont du gène *qacEΔ1* qui sont tous portés probablement sur le même plasmide (Figure 13), conférant une résistance aux: Quinolones (NAL, CIP), β-lactamines (AM, AMC, CTX), Phénicoles (CHL), aux autres antibiotiques : FOS, RIF, Triméthoprime et aux Aminosides (TOB, KAN, STR), successivement (Pérez-Moreno *et al.*, 2011), et un gène *orf513*, ce dernier codant pour une recombinaison putative impliqué dans l'acquisition des autres gènes de résistance spécifique au site (Lascols *et al.*, 2008).

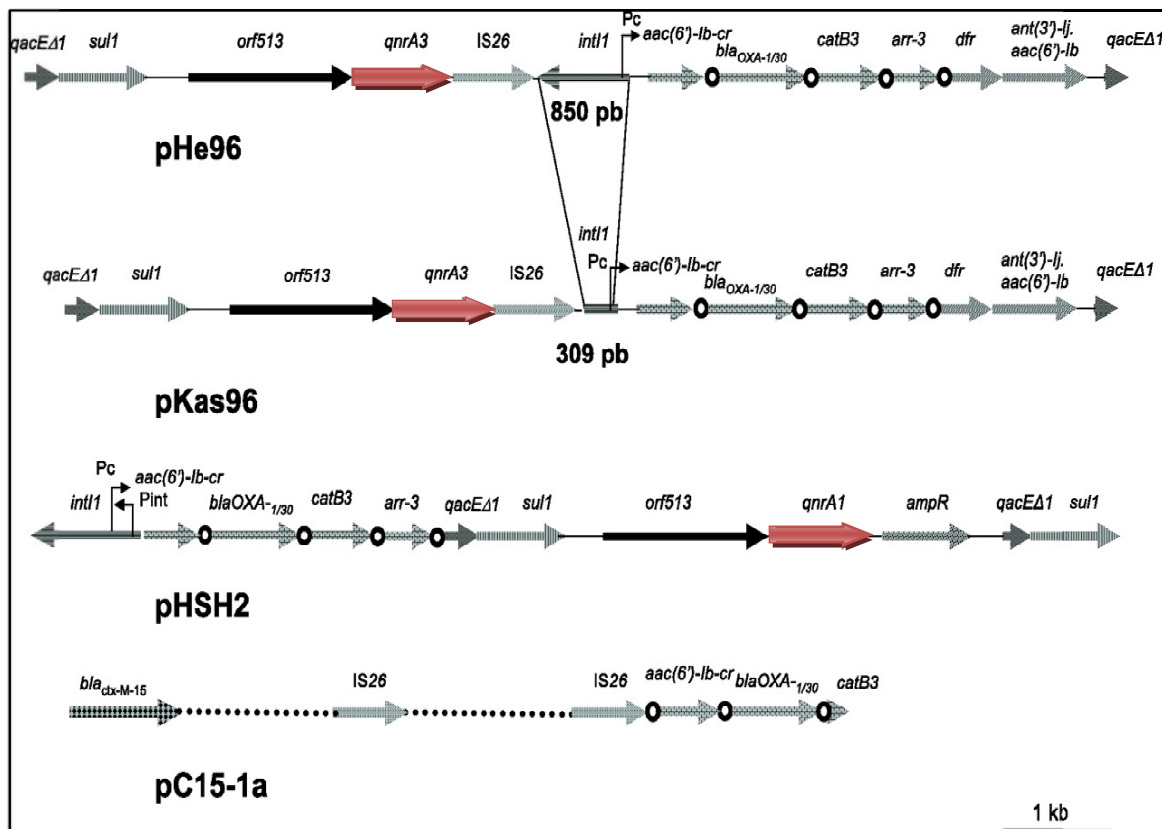


Figure 13 : Environnement génétique du gène *qnrA3* dans *K. pneumoniae* He96 (pHe96) et *K. ascorbata* Kas96 (pKas96).

Les séquences des pHe96 sont comparés à ceux décrits pour pHSH2 (50) (numéro d'accès dans GenBank : AY259086) et pC15-1a (5) (Numéro d'accès dans GenBank : NC005327). Les gènes *qnrA3* et *qnrA1* sont indiqués par des flèches marron (Lascols *et al.*, 2008).

2.2. Les gènes *bla*_{VIM}

Plusieurs études montrent que les gènes *bla*_{VIM}, sont dans la majorité de cas portés sur des intégrons de classe I (In-e541) (Miriagou *et al.*, 2010), qui sont généralement intégrés dans des transposons porté par des plasmides (Figure 07), et sont alors très mobiles (Kassis-Chikhani, 2012). Ces intégrons contient typiquement les gènes : *bla*_{VIM-1}, *aacA7*, *drfA1* et *aadA1* (Vatopoulos, 2008 ; Miriagou *et al.*, 2010), ce qui confère un phénotype multi-résistant à l'espèce type *K. pneumoniae* (Kassis-Chikhani, 2012).

Le gène *bla*_{VIM} code pour des enzymes de type IMP (Imipénémase) ou VIM (Verona Integron encoded metallo-β-lactamases) qui représentent la majorité des carbapénémases de classe B (Boutet-Dubois *et al.*, 2012), formés généralement de 266 acides aminés à l'exception de VIM-7 (265AA) et VIM-18 (262AA) (Castanheira *et al.*, 2009), ces enzymes possèdent des ions zinc dans leur site actif, et hydrolysent fortement toutes les β-lactamines à l'exception de l'Aztréoname. Ce gène qui a été décrite en premier lieu chez *P. aeruginosa* puis chez *Acinetobacter baumannii* est maintenant très répandu chez les entérobactéries, notamment chez *K. pneumoniae* (Vatopoulos, 2008). Les VIMs ont une distribution géographique différentes : VIM-1 et VIM-4 se trouvent surtout en Europe, VIM-3 à Taiwan, VIM-6 en Asie, VIM-7 aux USA alors que VIM-1 à une distribution mondiale (Kassis-Chikhani, 2012).

2.3. Les gènes *bla*_{NDM-1}

Ces gènes codants pour une enzyme métallo-β-lactamase (MBL) de classe B, de découverte la plus récente (Boutet-Dubois *et al.*, 2012 ; Villa *et al.*, 2012). Elle a été identifiée en Suède en 2008, dans une souche de *Klebsiella pneumoniae* (05-506) productrice de Carbapénémase (KPC) isolée chez un patient hospitalisé précédemment en Inde (New-Delhi) (Yong *et al.*, 2009 ; Poirel *et al.*, 2010 ; Hudson *et al.*, 2014). Ce type d'enzyme a été principalement isolé chez *K. pneumoniae*, et dans une moindre mesure, chez les autres entérobactéries (Boutet-Dubois *et al.*, 2012 ; Huang *et al.*, 2013).

L'origine du gène *bla*_{NDM} est actuellement inconnue même si une source environnementale parait probable (Kassis-Chikhani, 2012). Différentes études ont montré que ces gènes sont portés sur des plasmides conjugatifs avec d'autres gènes de résistance (Figure 15) (Hudson *et al.*, 2014) ou occasionnellement sur des chromosomes (Huang *et al.*, 2013). Des études moléculaires ont montrés que le gène *bla*_{NDM} est entouré d'au moins

une séquence d'insertion (ISAbal25) (Figure 14), ce qui facilite leur distribution (Poirel *et al.*, 2011).

En Algérie aucun cas de *K. pneumoniae* exprimant le gène *NDM-1* n'était rapporté contrairement à nos voisins le Maroc et la Tunisie (Ben *et al.*, 2013).

Par exemple chez une souche de *K. pneumoniae* (ST) 15 du Maroc (pNDM-MAR), il a été trouvé que le gène *NDM-1* est porté sur des plasmides conjugatifs de type : Inc H (ce type de plasmides est identique au group F d'incompatibilité codant pour les pilis sexuelles), avec d'autres gènes y compris : *CTX-M-15* et *qnrB1* conférant un phénotype multi-résistant aux β -lactamines et aux Quinolones respectivement (Figure 15) (Villa *et al.*, 2012). Les caractéristiques génétiques associées à *bla*_{NDM-1} sont divers, et peuvent confèrent une résistance à tous les antibiotiques sauf la Tigécycline et la Colistine (Huang *et al.*, 2013).

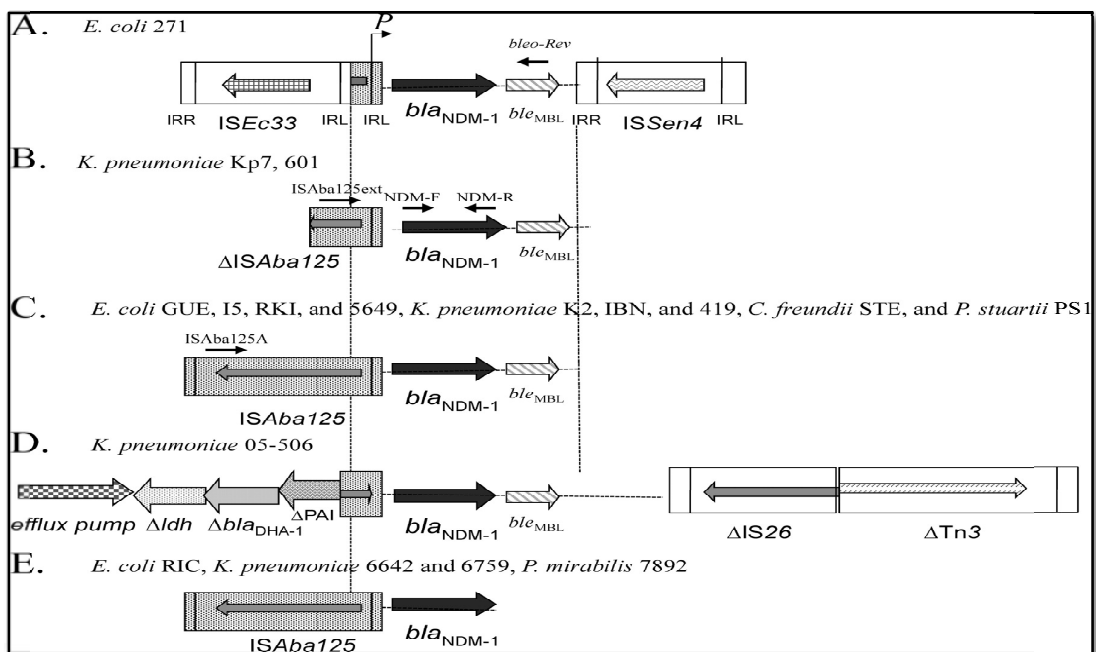


Figure 14 : Carte schématique du *bla*_{NDM-1} associé aux structures génétiques identifiées parmi les isolats d'entérobactéries (Poirel *et al.*, 2011).

Les Gènes et leurs orientations de transcription sont indiqués par des flèches horizontales. Les positions des amorces ainsi que le promoteur *bla*_{NDM-1} sont indiquées.

(A) : Structure identifié à partir d'*E. coli* 271 dans lequel les éléments ISEc33 et ISSen4 ont été identifiés sur les deux extrémités du gène *bla*_{NDM-1}.

(B) : Structure identifié à partir de *K. pneumoniae* KP7 dans laquelle la séquence ISAb125 présente comme un élément tronquée, mais sans ISEc33.

(C) : Structure dans laquelle la séquence ISAb125 est présent sous forme d'un élément plein et le gène *ble*_{MBL} est présent (*E. coli* NGL, I5, RKI et 5649; *K. pneumoniae* K2, IBN et 419; *Citrobacter freundii* STE, et P. PS1).

(D) : La structure a été identifiée initialement chez *K. pneumoniae* 05-506.

(E) : La séquence ISAb125 est présent sous forme d'un élément, mais le gène de résistance *ble*_{MBL} est absent ou tronqué (*E. coli* RIC, *K. pneumoniae* 6642 et 6759, *Proteus mirabilis* 7892) (Poirel *et al.*, 2011).

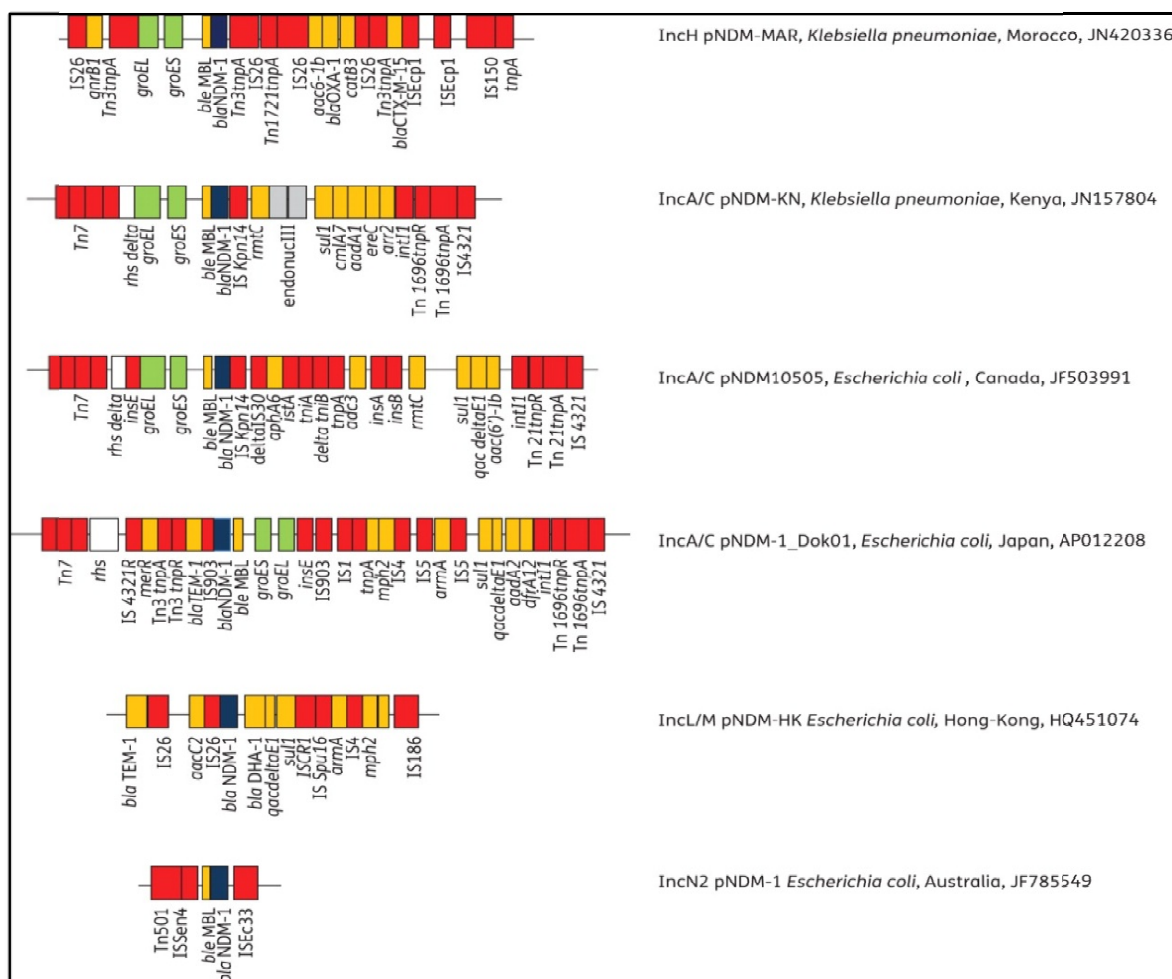


Figure 15: Représentation schématique de l'environnement génétique du gène *bla*_{NDM-1} dans différents plasmides (Villa *et al.*, 2012).

Comparaison par paires des régions plasmidiques autour du gène *bla*_{NDM-1} entre les plasmides : pNDM-MAR (JN420336), pNDM-KN (JN157804), pNDM10505 (JF503991), pNDM-1-Dok01 (AP012208), pNDM-HK (HQ451074) et pNDM-1 (JF785549). Les gènes de résistance sont indiqués par des boîtes orange, sauf le gène *bla*_{NDM-1}, qui est indiqué par une boîte bleue. Les transposons de classe 1 intégrase (*tnpA*, *tnpR*, TNPM), et les séquences d'insertion sont indiqués par des rectangles rouges. D'autres gènes sont indiqués par cases colorées comme suit: gris, les enzymes de restriction et les gènes d'ADN méthylase; vert, un cluster *groEL-groES* (Villa *et al.*, 2012).

3. Les séquences d'insertion

Ces éléments sont capables de se transférer entre le chromosome et les plasmides, mais aussi entre deux sites de la même molécule d'ADN (plasmide ou chromosome) (Perry *et al.*, 2004).

3.1. Les gènes *bla*_{SHV}

C'est chez *K. pneumoniae* et *Serratia marcescens* qu'a été décrite la 1^{ère} BLSE de type *SHV* (*SHV-2*), en Allemagne, en 1983 (Kassis-Chikhani, 2012).

L'enzyme SHV (*SHV-1*) provient d'une mutation dans le gène chromosomique (*SHV*) (variable sulfhydryle). Cette enzyme appartient à la classe A, est hydrolyse seulement les pénicillines et les céphalosporines à spectre étroit (Pool, 2004). La famille *SHV* des β -lactamases à été dérivée de *Klebsiella* spp. *SHV-1* est universellement trouvé dans *K. pneumoniae*, évolué comme un gène chromosomique dans *Klebsiella* spp. et plus tard a été incorporée dans un plasmide (Jain et Mondal, 2008) du fait de l'acquisition de deux séquences d'insertion de type IS26 de part et d'autre de ce gène (Figure 16). En effet, un récent rapport a suggéré qu'au moins une souche de *K. pneumoniae* porte à la fois *bla*_{LEN-1} et *bla*_{SHV-1}, et les gènes peuvent être côte-à-côte (Figure 17) (Chaves *et al.*, 2001 ; Ford et Avison, 2004). Les résultats obtenus par Chaves *et al.* (2001), appuient fortement l'hypothèse que l'ancêtre de la β -lactamase *SHV-1* provenait du chromosome de *K. pneumoniae*.

Le *bla*_{SHV} confère à *K. pneumoniae* une résistance à plusieurs antibiotiques, y compris : l'Ampicilline, Amoxicilline + Acide Clavulanique, Céfixime, Céfuroxime, Céfepodoxime, Céfotaxime, Céfotaxime, Céftazidime, Aztréonam, Nétilmycine, Amikacine, Gentamycine,

Chloramphénicole, Cotrimoxazole, Tétracycline, ainsi qu'aux Céphalosporines de 3^{ème} génération (Jain et Mondal, 2008). Ce gène est largement distribué (Ford et Avison, 2004).

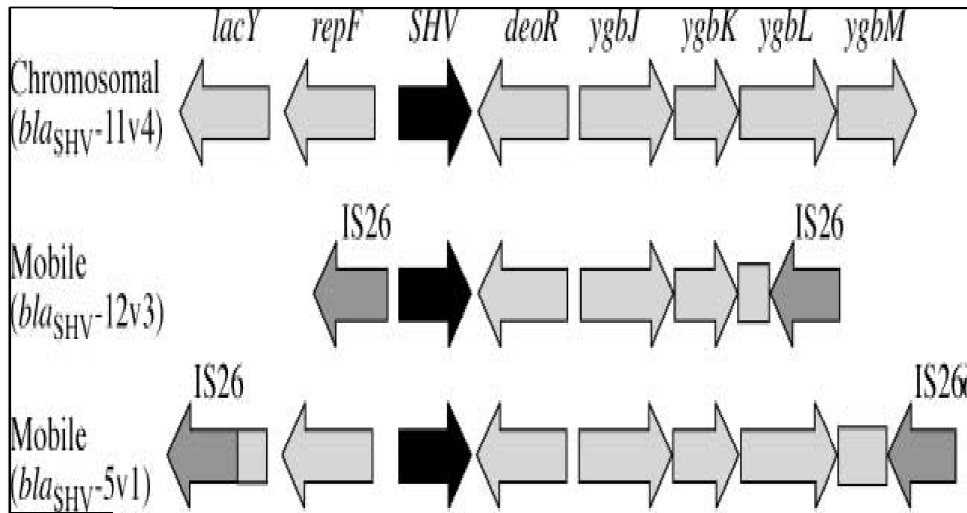


Figure 16 : Disposition des contextes de gènes chromosomiques et des allèles de *bla_{SHV}* mobiles (Ford et Avison, 2004).

Les orientations de transcription des différents gènes sont représentées par des flèches. Les noms de gènes, provenant de la plus proche homologue Blast10 trouvés sont notés. Les flèches noires représentent le gène *bla_{SHV}*, et les flèches gris foncé représentent les séquences d'insertion (IS26) (qui comprend le gène de transposase et les séquences répétées correspondantes) (Ford et Avison, 2004).

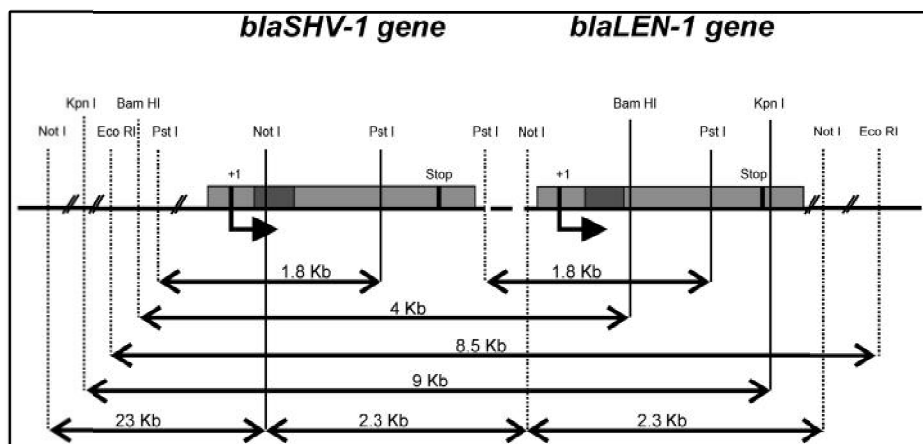


Figure 17 : Locus postulés pour SHV-1 et LEN-1 (Chaves *et al.*, 2001).

3.2. Les gènes *bla*_{CTX-M}

Les gènes *bla*_{CTX-M} sont très répandus et sont devenus le dominant codage de famille de gènes β -lactamases à spectre étendu dans le monde, jusqu'à ce jour 90 *bla*_{CTX-M} ont été identifiés (Zong *et al.*, 2011). Ces gènes codant pour des enzymes particulières (CTX-M), représentent actuellement les BLSEs les plus fréquentes au sein des entérobactéries au niveau mondial après une diffusion rapide depuis le milieu des années 90 (Amado-Diallo, 2013 ; Zhuo *et al.*, 2013). CTX-M-15 semble être la BLSE prédominante chez *K. pneumoniae* dans certaines parties du monde. La diversité des plasmides porteurs du gène *bla*_{CTX-M-15} chez *K. pneumoniae* témoigne d'un transfert fréquent de ce gène entre différents réplicons.

En effet, la provenance des gènes codant pour les CTX-M des groupes 1 et 2 et pour celles des groupes 8 et 9 sont respectivement *K. ascorbata* et *K. georgiana*, tandis que les sources des CTX-M des groupes 25 et 45 restent inconnues (Amado-Diallo, 2013).

Les enzymes de type CTX-M comportent actuellement de plus de 70 enzymes différentes divisées en cinq clusters selon leurs séquences d'acide aminé (cluster CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 et CTX-M-25) (Amado-Diallo, 2013). Ces enzymes hydrolysant le céfotaxime, la céftriaxone plus efficacement que la céftazidime (Arafa, 2011).

En Algérie, le gène CTX-M-15 reste le plus impliqué dans les épidémies hospitalières, après sa première détection dans un hôpital à Bejaia, ce qui confirme la diffusion mondiale de ce gène (Touati *et al.*, 2007).

- **Diversité des supports plasmidiques du gène *bla*_{CTX-M-15} chez *K. pneumoniae***

Peu d'études ont déterminé le type de réplicon des plasmides porteurs de *CTX-M-15* chez *K. pneumoniae* et ont pu identifier les réplicons de type Inc FII et Inc L/M, Inc FI, Inc R et Inc A/C montrant ainsi la diversité des supports plasmidiques du gène *bla*_{CTX-M-15} chez *K. pneumoniae*. En effet, la séquence d'insertion *ISEcp1* a été retrouvée en amont de certains gènes *bla*_{CTX-M} particulièrement le gène *bla*_{CTX-M-15} (Figure 18). Une seule copie d'*ISEcp1* localisée en amont du gène *bla*_{CTX-M} est donc suffisante pour le mobiliser. Ces *bla*_{CTX-Ms} sont généralement situés sur des plasmides transférables codant pour la résistance à d'autres familles d'antibiotiques (Elhani *et al.*, 2011), ils peuvent donc coexister avec d'autres BLSE : *KPC-2*, *OXA-48* et même avec des métallob- β -lactamases tels que : *VIM-1* contribuant à un phénotype multi-résistant chez *Klebsiella* spp. (Cantón *et al.*, 2012).

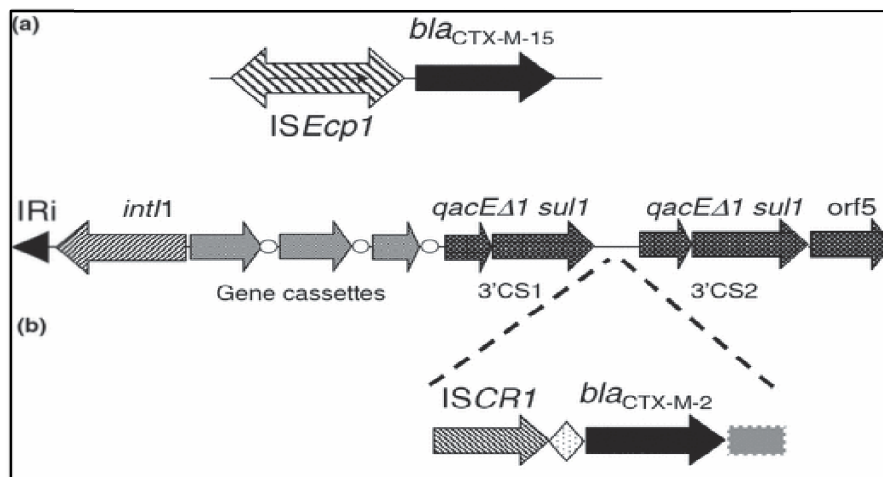


Figure 18: Structure génétique de la cassette *bla*_{CTX-M-15} (Farce *et al.*, 2010).

Aujourd'hui, il a été pu identifier au moins neuf événements de mobilisation : trois dans le groupe CTX-M-1 (*bla*_{CTX-M-10}, *bla*_{CTX-M-53}, et d'autres gènes *bla*_{CTX-M} connus inclus dans ce groupe), deux en CTX-M-2 (*bla*_{CTX-M-2} et *bla*_{CTX-M-5}), deux en CTX-M-9 (*bla*_{CTX-M-9} et *bla*_{CTX-M-14}), et un dans le groupe CTX-M-25 (Figure 19) (Cantón *et al.*, 2012).

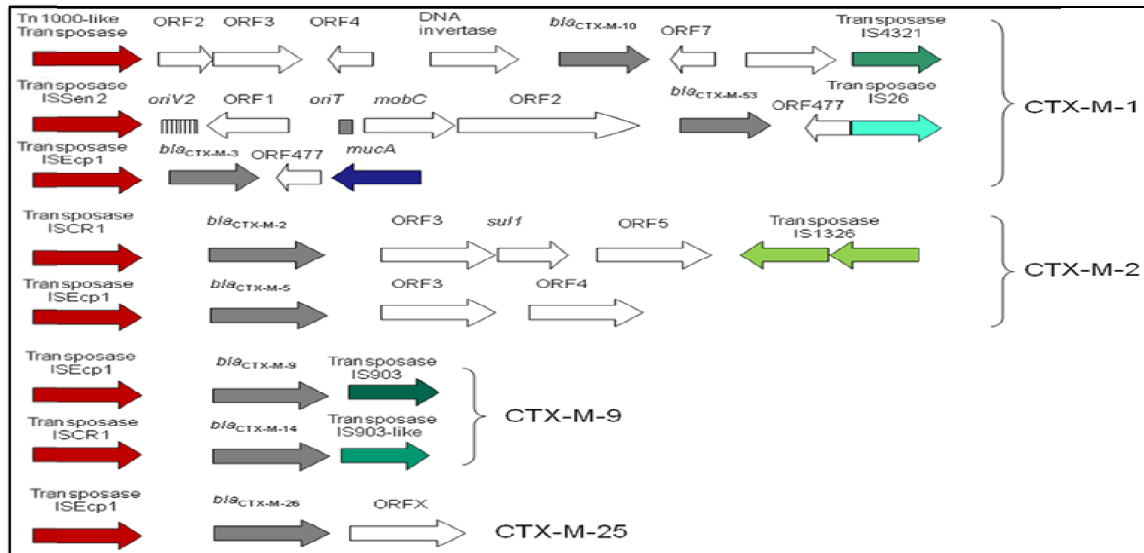


Figure 19: Représentation schématique des environnements génétiques environnants les gènes *bla*_{CTX-M} correspondant aux cas suspects d'événements de mobilisation au sein de différents groupes CTX-M (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9, et CTX-M-25 (Cantón *et al.*, 2012)).

• Origine du gène *bla*_{CTX-M}

Il est fort probable qu'*E. coli* constitue un réservoir génétique important à partir duquel d'autres espèces partageant la même niche écologique peuvent acquérir facilement ce type de résistance. Cependant, la mobilisation répétée des gènes *bla*_{CTX-M} (mais pas pour tous les allèles) à partir du chromosome des espèces de *Kluyvera* vers *E. coli* est très intrigant (Figure 20). Le mécanisme exact de cette mobilisation répétée vers les plasmides reste inconnu (Elhani *et al.*, 2011). L'acquisition du gène *bla*_{CTX-M-15} par les souches de *K. pneumoniae* s'est probablement réalisée par transfert horizontal à partir d'*E. coli* (Elhani *et al.*, 2011).

Sur la base des homologues de séquence d'acides aminés, les céfotaximases ou CTX-M codées par le gène *bla*_{CTX-M} semblent dériver des céphalosporinases chromosomiques naturelles des bactéries de l'environnement *Kluyvera ascorbata* et *Kluyvera georgiana*, codées respectivement par les gènes *bla*_{KLUA} et *bla*_{KLUG}. Ces CTX-Ms sont généralement plus actives vis à vis de la Céftriaxone, Céfotaxime que de la Céfotaxime, cependant des mutations peuvent accroître leur activité contre la Céfotaxime (Bonnet, 2004 ; Poirel *et al.*, 2008 ; Faure, 2009). Le gène chromosomique *bla*_{KIUC} présent dans *Kluyvera cryocrescens* a été considéré comme l'ancêtre du cluster CTX-M-1, le gène *bla*_{KLUA} de *Kluyvera ascorbata* est l'origine du cluster CTX-M-2 (Humeniuk *et al.*, 2002) et trois différents gènes chromosomiques *bla*_{KIUG} et *bla*_{KIUY}, et le *bla*_{CTX-M-78} de *Kluyvera georgiana*, à l'origine de CTX-M-8, CTX-M-9, et CTX-M-25, respectivement (Cantón *et al.*, 2012).

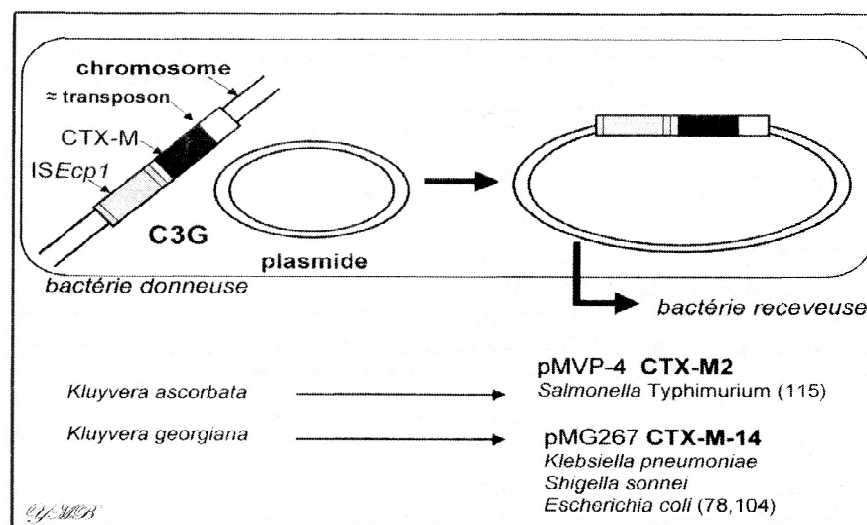


Figure 20 : Origine de génotype CTX-M (Farce *et al.*, 2010).

3.3. Les gènes *bla*-OXA-48

Ces gènes codent pour des β -lactamases de classe D, ils ont été essentiellement décrits chez *Acinetobacter* spp. (Kassis-Chikhani, 2012). La classe D correspond essentiellement aux enzymes de type Oxacillinases (OXA-48, OXA-163, OXA-181). Ces enzymes hydrolysent fortement les Carbapénèmes mais pas ou peu les Céphalosporines de 3^{ème} génération. Elles sont résistantes aux inhibiteurs de β -lactamases (l'Acide Clavulanique et le Tazobactam) (Boutet-Dubois *et al.*, 2012).

Ces gènes peuvent être associés à d'autres BLSE (Nordmann et Carrer, 2010), en particulier *CTX-M-15* et *SHV-12*, ce qui rend les souches résistantes à toutes les β -lactamines (Kassis-Chikhani, 2012).

L'enzyme OXA-48 a été identifiée uniquement chez les entérobactéries et la première chez *K. pneumoniae* en Turquie, l'origine du gène codant pour l'enzyme OXA-48 a été identifiée : il s'agit de *Shewanella* sp. ce qui suggère la mobilisation de ce gène en milieu aqueux. Plusieurs études ont montré que les plasmides portant le gène *bla*-OXA-48 sont des plasmides conjugatifs ayant des tailles allant de 60 à 70 kb, appartenant au groupe L d'incompatibilité (Inc L) (Poirel *et al.*, 2011).

- Dans un plasmide pOXA-48a, le gène *bla*_{OXA-48} est localisé au sein d'un transposon (Tn1999) comportant 2 séquences d'insertion identiques de type IS1999 assurant la mobilité et l'expression de ce gène (Figure 21). Cette enzyme (OXA-48), est largement diffusée dans de nombreux hôpitaux des pays du pourtour méditerranéen : Turquie, Liban, Israël, Egypte, Maroc, Tunisie et en Argentine (Poirel *et al.*, 2011).

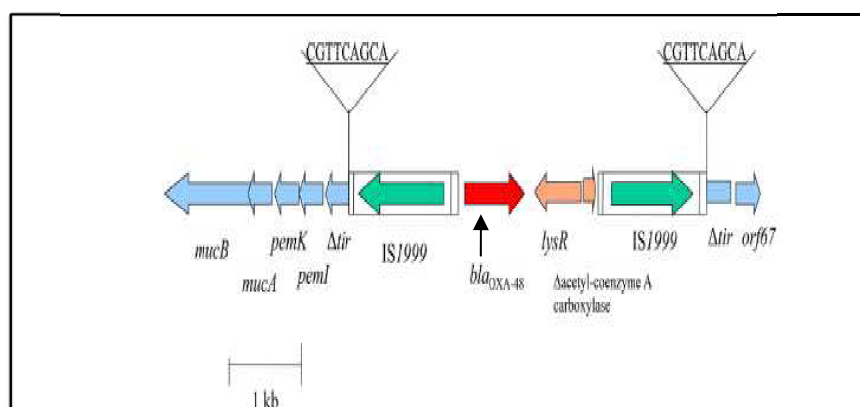


Figure 21: Environnement génétique du transposon Tn1999 qui porte le gène *bla*-OXA-48. Le gène *bla*-OXA-48 est flanqué entre deux séquences d'insertion de type IS1999 (Poirel *et al.*, 2011).

3. La cartographie totale des gènes de résistance aux antibiotiques

Les entérobactéries multi-résistantes sont en train d'émerger comme un défi infectieux grave de nombreuses maladies. Ces souches peuvent accumuler de nombreux gènes de résistance, c'est le cas d'une souche hospitalière *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146 (Kpn2146), aux Etats-Unis d'Amérique (Hudson *et al.*, 2014).

K. pneumoniae ATCC BAA-2146 (Kpn2146), est la première souche américaine (USA) codant pour une métallo- β -lactamase (NDM) avec une grande variété des déterminants de résistance supplémentaires.

Cette étude présente le génome plasmidique complet d'une souche isolée en 2010 à partir de l'urine d'un patient qui avait été récemment reçu des soins médicaux en Inde. Les déterminants de résistance aux antibiotiques expliquent pleinement le profil de résistance. Ces déterminants comprennent principalement 23 gènes codant pour des enzymes particulières, dont huit sont des β -lactamases (*bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{SHV-11}), ce qui explique le phénotype BLSE de cette souche, des gènes de résistance pour la Tétracycline, Sulfamides, Triméthoprime, Macrolides, et de multiples gènes de résistance aux Aminoglycosides y compris trois variantes *aac(6')-Ib*, dont une confère une résistance supplémentaire est à bas niveau aux Quinolones, le gène *qnrB9* codant pour des enzymes de résistance aux Quinolones, confère aussi une résistance à bas niveau aux Fluoroquinolones, ainsi que d'autres gènes y compris: *catB3*, *sul2*, *strA*, *strB*, *attI1*, *dfra14*, conférant une résistance à un nombre illimité des antibiotiques (Hudson *et al.*, 2014).

Le plasmide pKpn2146b est le plus riche des plasmides par les déterminants de résistance, et le plus fortement mosaïque, avec le plus grand nombre (six) des séquences d'insertion de type IS26 (Hudson *et al.*, 2014).

Le génome complet de ce plasmide multi-résistant est illustré dans la Figure 22. Tous les déterminants de résistance de ce plasmide sont indiqués dans le Tableau 08.

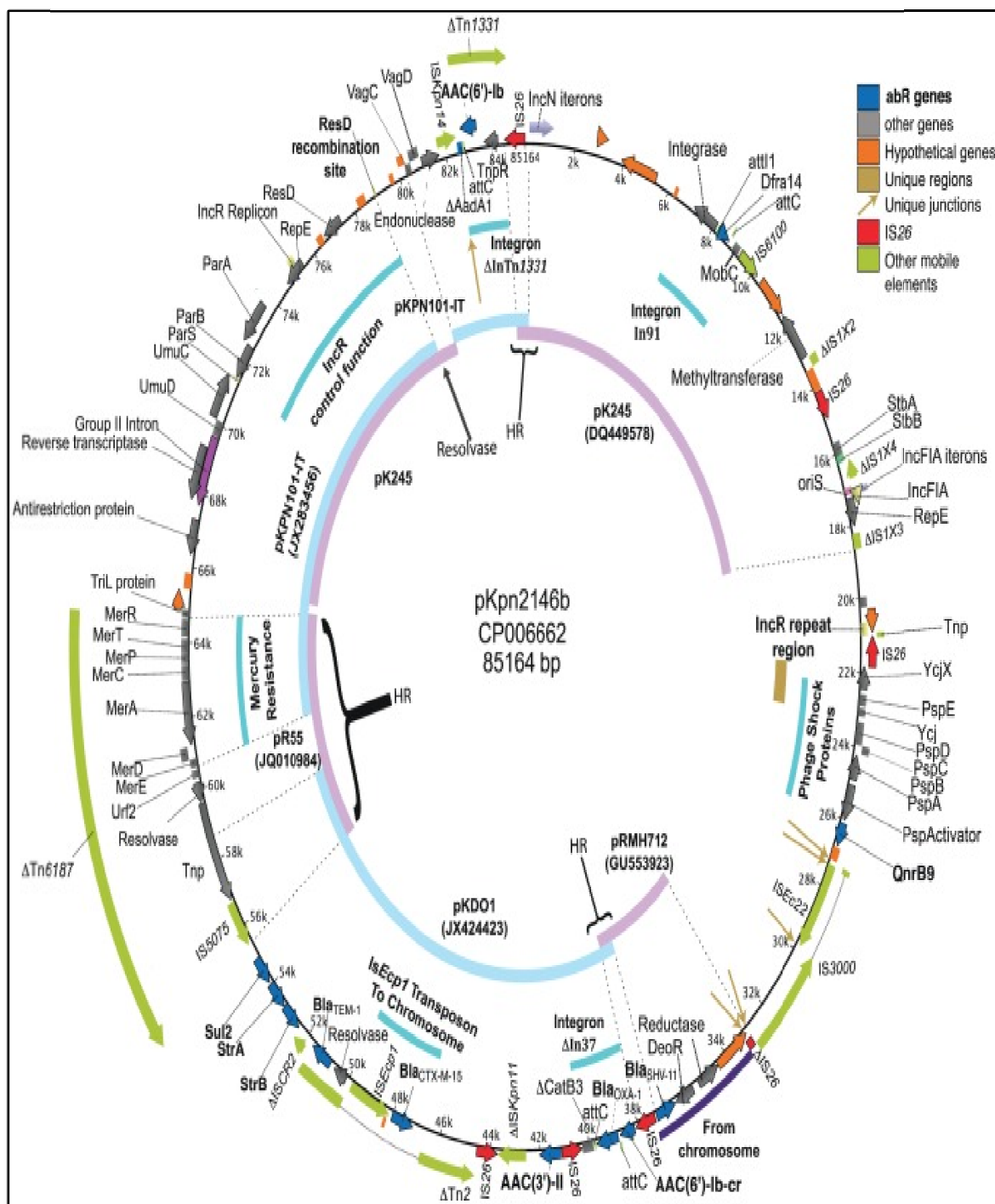


Figure 22: Le génome complet du plasmide pKpn2146b (Hudson *et al.*, 2014).

Les couleurs codent pour les gènes, les éléments mobiles, avec des couleurs supplémentaires pour les gènes non caractéristiques. Le cercle intérieur représente la correspondance avec les autres plasmides. Les flèches noires indiquent les événements de recombinaison les plus récents. abR, la résistance aux antibiotiques. HR : Recombinaison Homologue (Hudson *et al.*, 2014).

Tableau 08 : Résumé des gènes mentionnés dans ce chapitre, leurs fonctions, localisations, phénotypes de résistance.

Gènes	Enzymes	Phénotypes de résistance	Support génétique	Références bibliographique		
<i>bla</i> _{KPC-2}	KPC2	Carbapénèmes	Plasmide (pKP048)	Ma et al (2008) ; Yan Jiang et al (2010)		
<i>bla</i> _{DHA-1}	/	Céphalosporines				
<i>qnrB4</i>	QnrB4	Fluoroquinolones				
<i>armA</i>	/	Aminoglycosides				
<i>mph2</i>	2'-phosphotransférase	Macrolides				
<i>bla</i> _{VIM-1}	Métallo-β-lactamase	β-lactamines (IPM)	Plasmide (pNL 194)	Ma et al (2009) ; Miriagou et al (2010) ; Hudson et al (2014) ; Cambou et Guillard (2012)		
<i>aacA7</i>	aminoglycoside-adényl transférase	Aminoglycosides				
<i>aadA1</i>						
<i>aadA2</i>						
<i>dfrA1</i>	dihydrofolate réductase (DHFR)	Diamynopyrimidines (Triméthoprime)				
<i>dfrA12</i>						
<i>aphA1</i>	Kanamycine phosphotransférase	Kanamycine				
<i>strA-like</i>	Stréptomycine phosphotransférase	Streptomycine				
<i>strB-like</i>						
<i>sul1</i>	dihydropteroate synthase	Sulfonamides				
<i>bla</i> _{CTX-M-3}	CTX-M-3	β-lactamines	pKOX-R1	Miriagou et al (2010) ; Huang et al (2013) ; Hudson et al (2014)		
<i>bla</i> _{TEM-1}	TEM-1					
<i>bla</i> _{SHV-12}	SHV-12					
<i>aadA2</i>	/	Aminoglycosides				
<i>aadA5</i>	/					
<i>aac(6)-Ib</i>	/					
<i>Dfr</i>	/				Triméthoprime	
<i>Sul</i>	/	Sulfonamides				
<i>bla</i> _{KPC-2}	KPC2	β-lactamines (Oximino-Céphalosporine et l'Imipénème)			Tn4401	Pool (2004) ; Cuzon et al (2010) ; Chen et al (2012) ; Boutet-Dubois et al (2012) ; Frasson et al (2012)
<i>aac(6)-Ib</i>	/	Tobramycine, Amikacine, Nétilmycine, Sisomicine			pJHCMW1 (Tn1331)	Sarno et al (2002) ; Hudson et al (2014)
<i>aadA1</i>	/	Aminoglycosides				
<i>bla</i> _{OXA-9}	/	β-lactamines				
<i>bla</i> _{TEM-1}	/	Pénicillines, quelques Céphalosporines				
<i>qnrA</i>	QnrA	Quinolones et Fluoroquinolones à bas niveau	Intégron de classe I	Rodriguez-Martinez et al (2006) ; Meradi et al (2009)		
<i>qnrA3</i>	/	Quinolones (Ciprofloxacine) et Fluoroquinolones à bas niveau	(pHe96) Intégron de classe I.	Park et al (2006) ; Lascols et al (2008)		
<i>aac(6)-Ib-cr</i>	aminoglycoside acétyl transférase					
<i>bla</i> _{OXA-1/30}	/	β-lactamines				
<i>CatB3</i>	/	Phénicoles (CHL)				
<i>arr-3</i>	/	Fosfomycine, Rifampicine				
<i>qacEΔ1</i>	/	Ammonium quaternaire				
<i>Dfr</i>	/	Triméthoprime				
<i>bla</i> _{VIM-1}	Métallo-β-lactamase (classe B).	β-lactamines (IPM)	Intégron de classe I (pNL194)	Vatopoulos (2008) ; Castanheira et al (2009) ; Miriagou et al (2010) ; Hudson et al (2014)		
<i>aacA7</i>	aminoglycoside adényl-transférase.	Aminoglycosides				
<i>aadA</i>						
<i>dfrA1</i>	dihydrofolate réductase	Triméthoprime				

Partie I : Recherche Bibliographique

<i>bla</i> _{NDM-1}	/	β-lactamines (Imipenème)	Plasmide conjugatifs (Inc H)	Poirel et al (2011) ; Villa et al (2012)
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	/			
<i>qnrB1</i>	/			
<i>bla</i> _{SHV-1}	SHV-1	pénicillines et les céphalosporines à spectre étroit	Séquence d'insertion (IS26)	Pool, (2004) ; Jain et Mondal (2008)
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	CTX-M-15	Céfotaxime, Céftriaxone	Séquence d'insertion (ISEcp1)	Arafa (2011) ; Elhani et al (2011)
<i>bla</i> _{SHV11}	SHV11 (Classe A)	Pénicillines, quelques Céphalosporines	1. pKpn2146b 2. Chromosome	Hudson et al (2014)
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	CTX-M-15 (Classe A)	Pénicillines, quelques Céphalosporines, Aztréoname	1.pKpn 2146b (ISEcp1) 2.Chromosome(ISEcp1)	
<i>bla</i> _{TEM-1}	TEM-1 (Classe A)	Pénicillines, quelques Céphalosporines	pKpn2146b (Tn2)	
<i>bla</i> _{OXA-1}	OXA-1 (Classe D)	Pénicillines	pKpn2146b ΔIn37	
<i>aac(6')-Ib</i>	aac(6')-Ib (1)	Tobramycine, Amikacine, Nétilmycine, Sisomicine	pKpn2146b (ΔInTn1331)	
<i>Sul2</i>	Sul2	Sulfonamides	pKpn2146b (ISCR2)	
<i>dfrA14</i>	DfrA14	Triméthoprime	pKpn2146b (In191)	
<i>qnrB9</i>	QnrB9	Quinolones, Fluoroquinolones	pKpn2146b	

1. Matériel et Méthodes

Durant notre stage de Master (de septembre 2014 à février 2014)) dans le laboratoire de Bactériologie à l'hôpital « sept frères Meghlaoui » de Mila, nous nous sommes intéressés à isoler, identifier *Klebsiella pneumoniae*, et étudier sa résistance aux antibiotiques. *K. pneumoniae* provenaient des prélèvements des urines, des pus, des prélèvements vaginaux et pleuraux. Elles étaient isolées chez des patients hospitalisés et consultants externes.

Présentation du lieu d'étude

L'Etablissement Public Hospitalier (EPH) des Frères Meghlaoui est le siège du secteur sanitaire de Mila regroupant 8 communes. L'hôpital à une capacité d'accueil de 152 lits et contient 5 services (service de chirurgie, service gynéco-obstétrique, service de pédiatrie, Urgences Médico-Chirurgicale (UMC) et le service d'accompagnement). Il a pour mission la prise en charge curative et préventive des cas qui relève des pathologies essentiellement chirurgicale. Pour assurer à bien cette mission il est composé des services suivants :

Chirurgie : Capacité de 64 lits dans lequel ils ont développé les activités de : chirurgie viscérale, chirurgie pédiatrique, chirurgie O.R.L, chirurgie traumatologique, chirurgie urologique.

Gynéco-obstétrique : Capacité de 44 lits. Ce service prend en charge tous les cas, sauf les cas nécessitant une prise en charge spécialisée.

Pédiatrie : Capacité de 32 lits. Il a 9 spécialistes, assurant la prise en charge de tous les enfants même ceux qui sont orientés des établissements limitrophes.

UMC : Capacité de 10 lits d'observation + 02 lits pour les soins intensifs. Les urgences sont assurées par une équipe pluridisciplinaire (médecins généralistes, chirurgiens, médecins anesthésistes, réanimateurs et traumatologue).

Services d'accompagnement :

- Une paillasse d'analyses médicales regroupant tous les analyses médicales d'urgence fonctionnelle H 24.
- Un service de radiologie assurant les examens standards médicale.
- Un service de pharmacie assurant l'approvisionnement du service en médicaments, consommables et accessoires médicaux de jour comme de nuit.

Le laboratoire : C'est un service composé de plusieurs paillasse : biochimique, hématologique, parasitologique, sérologique et bactériologique assurant tous les examens médicaux à l'exception de l'hormonologie. Au niveau du laboratoire de bactériologie 30 Examens Cytobactériologiques des Urines (ECBU) sont effectués par jour. Un laboratoire d'Anatomie pathologique a été crée en 2012 doté de tous le matériel nécessaire.

Le bloc opératoire : Doté de 3 salles opératoires, il assure les urgences et le programme durant tous les jours ouvrables de la semaine.

Le personnel comprend :

- Des médecins spécialistes en: chirurgie générale, chirurgie pédiatrique, ORL, traumatologue, urologue, anesthésistes, médecin de travail, pédiatre Anapath, gynécologue, ophtalmologue, médecin légiste, biochimiste, bactériologue, médecin spécialiste en oncologie.
- Un médecin généraliste.
- Un pharmacien.

Afin d'observer le phénomène de résistance aux antibiotiques de *K. pneumoniae* pour une longue durée, notre étude est complétée par celle réalisée par nos collègues de Master de la promotion 2013/2014, de ce fait leur résultats de 2007 à 2013 sont utilisés et discutés dans ce travail.

1.1. Matériel

Le matériel et les produits utilisés dans l'isolement, l'identification et l'antibiogramme sont indiqués dans le Tableau 09.

Tableau 09: Matériel et produits

Matériel	Produits
-Ecouvillons stériles	Isolement et identification :
-Pipette graduées	-Gélose Hektoen (LIOFILCAM)
-Tubes à essais	-Gélose Nutritive
-Etuve (Mettler)	-Bouillon Nutritif (BIOKAR)
-Autoclave	-Eau physiologique
-Bec bunsen	-Eau distillée
-Vortex	Conservation :
-Barreau magnétique	-Glycérol
-Balance de précision	-Bouillon Nutritif (BIOKAR)
-Tubes coniques (Eppendorf)	Coloration de Gram :
-Epruvettes	-Violet de Gentiane
-Erlenmeyer	-Lugol
-Flacons en verre avec bouchon rodé	-Alcool
-Epingle	-Fuschine
-Microscope optique (OPTIKA B-192)	-Huile à immersion
-Lames et Lamelles	Galerie biochimique :
-Bain marie (Mettler)	-Mannitol-Mobilité
-Agitateur magnétique	-Citrate de Simmons
-Embouts stériles	-TSI (glucose, lactose, saccharose, H ₂ S)
-Lames porte-objet	-Disques ONPG
-Micropipette (SOCOREX 1000 µl)	-Indole
-Papier buvard	-Urée-Indole
	-Eau oxygénée
	-Réactif de Kovacs
	Antibiogramme :
	-Gélose Mueller-Hinton (BIOKAR)
	-Antibiotiques en disque

1.1.1. Souches bactériennes

La collecte des souches de *K. pneumoniae*, est étendue sur environ 14 mois (de janvier 2014 à Février 2015) avec des fréquences d'isolements indiqués dans le Tableau 10. Des informations concernant chaque prélèvement effectué ont été recueillies de manière prospective: La date du prélèvement, le sexe du malade, l'âge, nature de prélèvement et le service où le malade a été hospitalisé, dans le Tableau 14.

Tableau 10 : Fréquences d'isolement des souches de *K. pneumoniae* dans l'hôpital de Mila (2014/2015).

Années et mois		Nombre de souches	Pourcentage %
2014	Janvier	03	10
	Février	03	10
	Mars	03	10
	Avril	01	3.33
	Juin	01	3.33
	Juillet	01	3.33
	Aout	01	3.33
	Septembre*	05	16.66
	Octobre	0	0
	Novembre	06	20
2015	Janvier	04	13.33
	Février	0	0
Total		30	100

* : Hygiène de service de pédiatrie (Mur, Matlas et Drap).

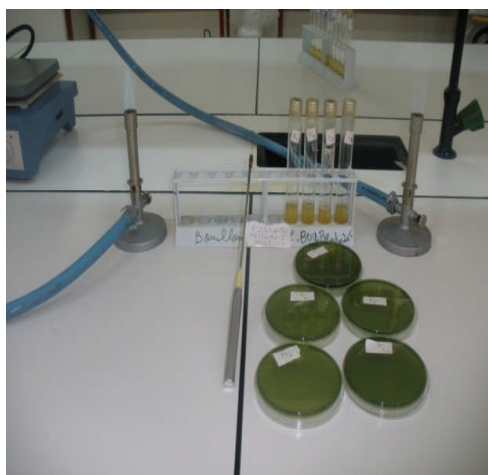
Les souches sont isolées et identifiées au niveau du laboratoire de Bactériologie à l'hôpital de Mila. Parmi les 30 souches recueillies, nous avons manipulé 05 souches de *K. pneumoniae*, provenant de l'environnement du service de pédiatrie (Murs, Matlas, Draps) dans le laboratoire de Microbiologie et Biochimie de l'Institut des Sciences et de la Technologie (Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila).

1.2. Méthodologie

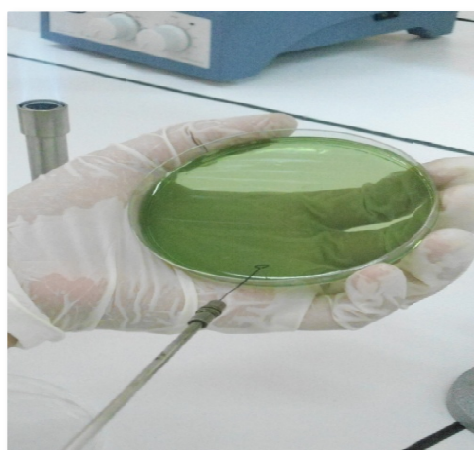
1.2.1. Culture et isolement des souches

Les isolats ont été cultivés sur le milieu sélectif Hektoen par la méthode des stries, puis incubés à l'étuve à 37°C pendant 24h. *Klebsiella* spp. sur le milieu Hektoen, donne de grandes colonies muqueuses, lactose + (apparition de couleur jaune dans le test TSI) ayant un aspect de goutte de miel, avec une tendance à la confluence.

La Figure 23 présente la méthode d'ensemencement et l'incubation de *K. pneumoniae*.



(a)



(b)



(c)



(d)

Photos 01: (a). Aperçu de la paillasse avant la manipulation; (b). Méthode d'ensemencement de *K. pneumoniae* par stries sur le milieu Hektoen ; (c et d). Incubation de *K. pneumoniae* à l'étuve à 37°C/24h (Photos réalisées dans le laboratoire de Microbiologie et Biochimie du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila).

1.2.2. Tests d'identification

1. Test macroscopique

K. pneumoniae sur la gélose nutritive donne de grandes colonies muqueuses, ayant un aspect de goutte de miel, avec une tendance à la confluence (Avril *et al.*, 1992).

2. Tests microscopiques

- **Examen à l'état frais**

Il permet d'apprécier la morphologie des bactéries, leur mode de groupement, leur abondance et leur mobilité. Sur une lame porte objet stérile, déposer une goutte d'eau physiologique et un fragment de colonie. Homogénéiser et recouvrir d'une lamelle en évitant d'emprisonner les bulles d'air, lire au microscope optique à l'objectif x 40 (Carbonnelle *et al.*, 1987).

K. pneumoniae donne des bacilles immobiles courts (Gueye, 2007).

- **Coloration de Gram**

Elle permet une classification des bactéries selon la structure de leur paroi. Plusieurs facteurs interviennent dans la coloration :

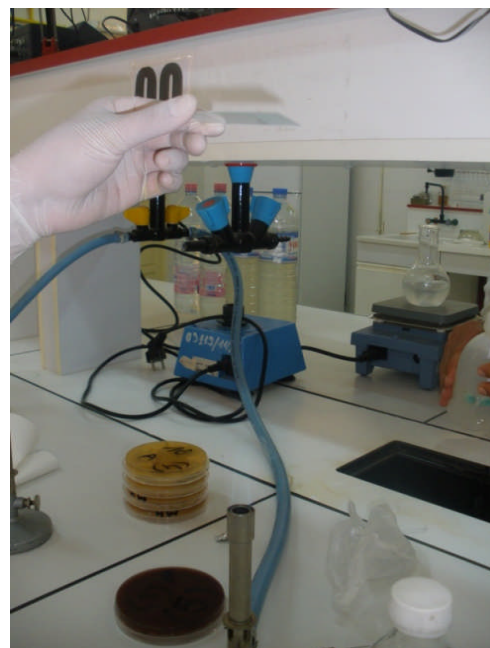
- la différence de composition chimique des parois bactériennes.
- la différence de perméabilité de la paroi (Gueye, 2007).

La coloration de Gram se déroule en plusieurs étapes :

- fixer le frottis à la flamme d'un bec bunsen ;
- recouvrir le frottis de la solution de cristal violet de gentiane, laisser agir une minute ;
- rejeter le colorant puis laver à l'eau ;
- recouvrir la préparation de Lugol, laisser agir une minute ;
- rejeter le Lugol puis laver à l'eau ;
- décolorer à l'alcool 95° ;
- rincer à l'eau courante et recouvrir la lame de solution de fuchsine diluée, laisser agir quelques secondes ;
- rejeter la fuchsine, laver abondamment, égoutter, sécher entre deux feuilles de papier buvard propres (Gueye, 2007). La coloration de Gram révèle des bacilles ou diplobacilles à Gram négatif colorés en rose .



(a)



(b)



(c)

Figure 24 : (a). Préparation du frottis ; (b). Fixation du frottis à la flamme du bec bunsen ; (c). Coloration de Gram de *K. pneumoniae* (Photos réalisées dans le laboratoire de Microbiologie et Biochimie du Centre universitaire Abdalhafid BOUSSOUF de Mila).

1.2.3. Tests biochimiques

Les tests biochimiques d'identification sont illustrés dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Tests utilisés pour l'identification biochimique de *K. pneumoniae* (Meziani, 2012).

Test	Méthode	Résultats
Citrate de Simmons (CS)	La pente du milieu est ensemencée par stries sur toute la surface. Incubation à 37°C/18 h.	La bactérie qui utilise le citrate, elle alcalinise le milieu, ce qui fait virer le bleu de bromothymol du vert au bleu en milieu basique.
Triple Sugar Iron (TSI)	La pente du milieu TSI est ensemencée par stries et le culot par pique centrale, puis incubation à 37°C/18h.	Pente jaune : fermentation du lactose et saccharose. Culot jaune : fermentation du glucose. Culot noir : production de H ₂ S.
Mannitol-Mobilité	L'ensemencement du milieu s'est fait par piqure centrale jusqu'au fond du tube avec la souche à tester à l'aide d'une pipette Pasteur. Incubation à 37°C/18 h.	Si la bactérie est immobile, on observe des colonies au lieu de l'ensemencement, par contre si la bactérie est mobile on observe une répartition des colonies dans le milieu.
Indole	Le test est réalisé en introduisant dans de l'eau peptonée exempte d'indole quelques gouttes de la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette Pasteur suite à une incubation de 18h à l'étuve + addition du réactif de Kovacs.	Certaines bactéries dégradent le tryptophane grâce à une tryptophanase en formant de l'indole. Après addition du réactif de Kovacs, Le diméthyl-amino-4-benzaldéhyde contenu dans le réactif de Kovacs réagit avec l'indole, et forme un composé coloré en rouge. (Annaux rouge → Indole+).

Partie II : Recherche Expérimentale

<p>Production de l'uréase (Urée-indole)</p>	<p>le milieu urée-indole est inoculé avec quelques gouttes de la suspension bactérienne après l'avoir préparée dans de l'eau physiologique. Ensuite une incubation pendant 18 h à 37C°.</p>	<p>les bactéries uréolytiques peuvent décomposer l'urée en carbonate d'ammonium qui alcalinise le milieu, et qui fait virer l'indicateur coloré de pH (le rouge de phénol) du jaune au rouge en milieu basique. (Couleur rouge → uréase+)</p>
<p>Test de l'ONPG (production de β-galactosidase)</p>	<p>Faire une suspension dense en eau physiologique, puis déposer un disque imprégné d'ONPG et incuber à 37°C pendant 24h.</p>	<p>ONPG+ : donne une coloration jaune qui signifie l'hydrolyse de l'ONPG.</p> $\begin{array}{ccc} \text{ONPG} & \xrightarrow{\quad} & \text{ONP} + \text{galactose} \\ (\text{incolor}) & & (\text{jaune}) \\ & \uparrow & \\ & \beta\text{-galactosidase} & \end{array}$
<p>Test de la Catalase</p>	<p>Une colonie est prélevée à partir de la boîte de Pétri et déposée sur une lame. Une goutte de H₂O₂ (10 volumes) est déversée sur cette colonie.</p>	<p>La présence de la catalase se matérialise par la production de bulles de gaz (O₂). -Pas de bulles : Catalase négative.</p> $\begin{array}{ccc} \text{H}_2\text{O}_2 & \xrightarrow{\quad} & \text{H}_2\text{O} + 1/2 \text{O}_2 \\ & \uparrow & \\ & \text{Catalase} & \end{array}$

1.2.4. Réalisation pratique de l'antibiogramme

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion des disques imprégnés d'antibiotiques en milieu Mueller-Hinton.

L'antibiogramme est l'examen biologique destiné à mesurer l'interaction entre chacune des molécules antibactériennes utilisables et une souche bactérienne susceptible d'être pathogène, isolée d'un patient. Le résultat contribue à évaluer la sensibilité de la souche bactérienne examinée ou sa résistance, ce qui signifie que la molécule sera probablement active au sens thérapeutique ou le traitement sera un échec. Le résultat numérique brut est accompagné d'une interprétation ou remplacé par elle: résistant, sensible, intermédiaire, ou (indéterminée) (Arafa, 2011).

L'antibiogramme est un outil qui permet au médecin de choisir le bon antibiotique, où l'association d'antibiotiques permettant de traiter efficacement un patient (Carbonnelle *et al.*, 1987).

Les antibiotiques testés dans l'hôpital de Mila sont mentionnés dans l'Annexe 04. Le protocole utilisé dans notre étude est celui de l'Institut Pasteur (Anonyme 4, 2011) réalisé par les étapes suivantes :

Préparation du matériel pour l'antibiogramme

- Gélose Mueller-Hinton en boîte de Pétri.
- Disques d'antibiotique.
- Souche pure de la bactérie à étudier.
- Un râteau ou un écouvillon.
- Pipette de 10 ml.
- Tubes à essais stériles.
- Pincés stériles.
- Bec bunsen.
- Vortex.
- Portoir.
- Pipettes Pasteur.
- Eau physiologique stérile.

Préparation du milieu Mueller-Hinton

- Il doit être coulé en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm (Figure 25).
- Les géloses doivent être séchées avant l'emploi.



Figure 25 : Coulage du milieu Mueller-Hinton en boîte de Pétri (Photo réalisée dans le laboratoire de Microbiologie et Biochimie du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila).

Préparation de l'inoculum

- A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Bien décharger l'anse ou l'écouvillon dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9% (Figure 26).
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mac Farland ou à une D.O. de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm. L'utilisation d'un densitomètre est fortement souhaitable.

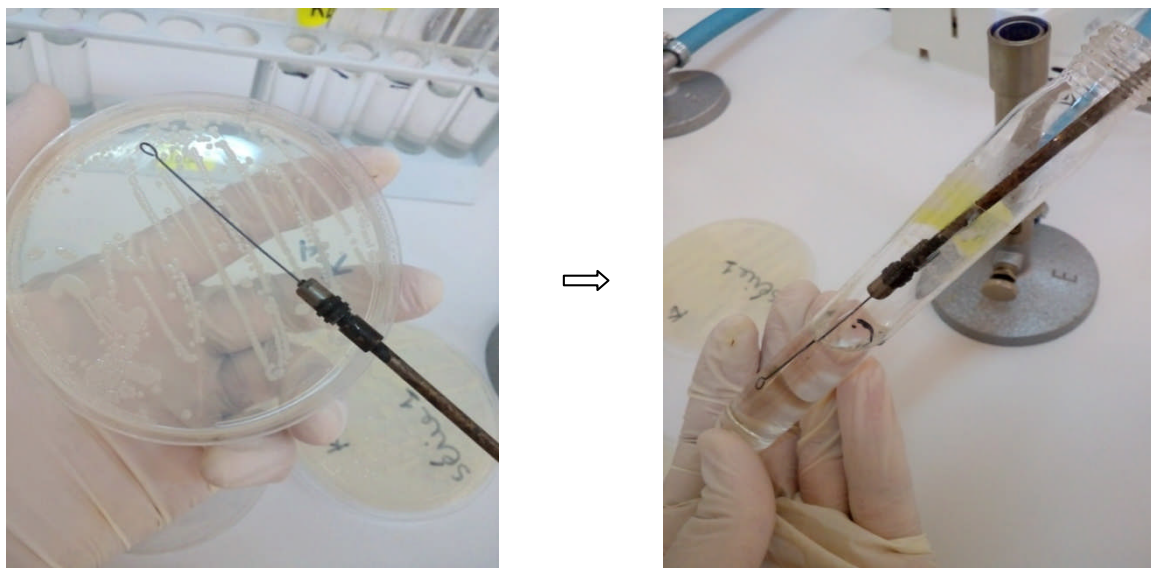
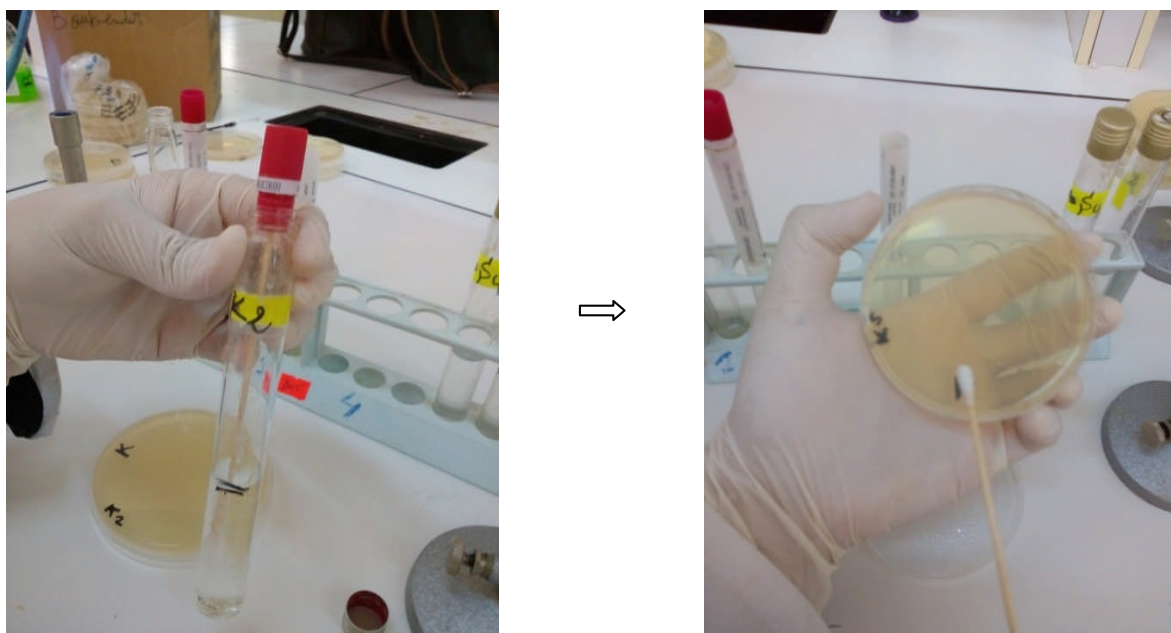


Figure 26 : Préparation de l'inoculum de *K. pneumoniae* pour l'antibiogramme (Photos réalisées dans le laboratoire de Microbiologie et Biochimie du Centre universitaire Abdalhafid BOUSSOUF de Mila).

Ensemencement

- Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum.
- L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose (Figure 27).
- Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois (Anonyme 4, 2011).



(a)

(b)

Figure 27 (a et b) : Méthode d'ensemencement de *K. pneumoniae* par strie sur Mueller-Hinton (Photos réalisées dans le laboratoire de Microbiologie et Biochimie du Centre universitaire Abdalhafid BOUSSOUF de Mila).

Application des disques d'antibiotiques

-Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90 mm.

-Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide de pinces bactériologiques stériles et ne pas déplacer les disques après application (Figure 28) (Anonyme 4, 2011).

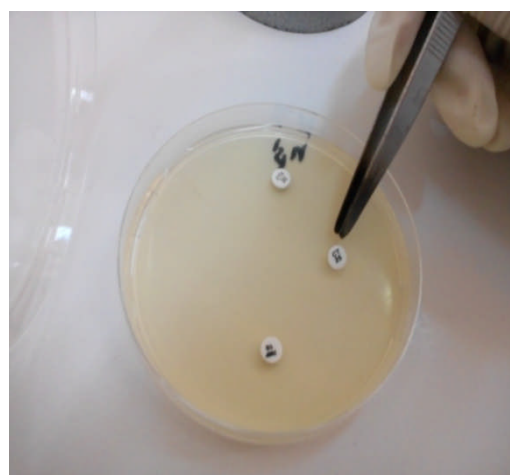
-Les antibiotiques testés sont les suivants : Vancomycine (30 μ g), Pénicilline (10 μ g), Imipénème (10 μ g), Céfotaxime (30 μ g), Gentamycine (10 μ g), Colistine (25 μ g) et Fosfomycine (30 μ g).



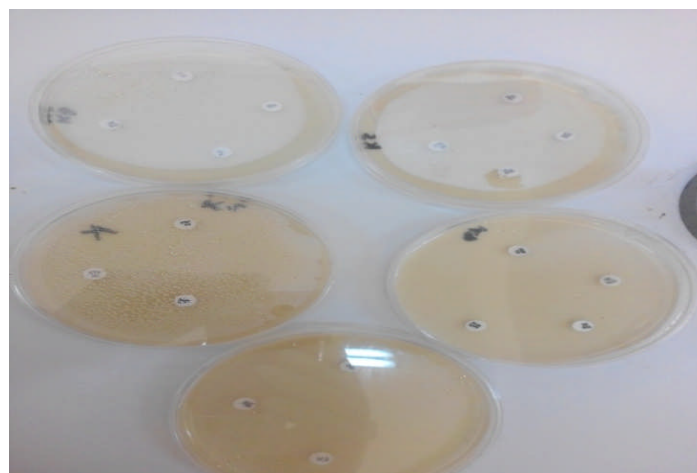
(a)



(b)



(c)



(d)

Figure 28 : (a). Antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme de *K. pneumoniae*; (b, c et d). Application des disques d'antibiotiques (Photos réalisées dans le laboratoire de Microbiologie et Biochimie du Centre universitaire Abdalhafid BOUSSOUF de Mila).

Conditions d'incubation

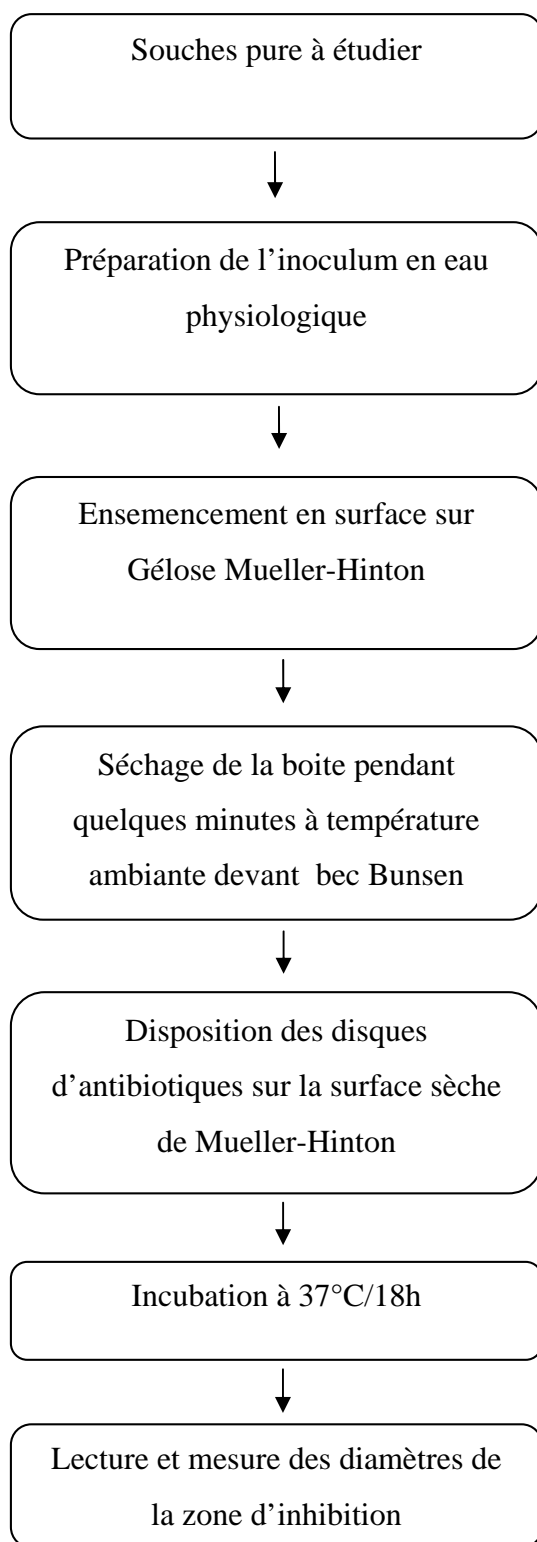
Respecter la température, l'atmosphère et la durée d'incubation recommandées pour chaque bactérie. Pour *K. pneumoniae* les boîtes sont mises à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24h (Figure 29).



Figure 29 : Incubation de *K. pneumoniae* à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24h (Photo réalisée dans le laboratoire de Microbiologie et Biochimie du Centre universitaire Abdalhafid BOUSSOUF de Mila).

Lecture des résultats

- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.
- Pour les bactéries testées sur Mueller-Hinton simple, les mesures seront prises en procédant par transparence à travers le fond de la boîte de Pétri fermée.
- Pour les bactéries testées sur Mueller-Hinton au sang, les mesures de diamètres de zones d'inhibition seront prises, boîte de Pétri ouverte et bien éclairée.
- Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans l'Annexe 06. Classer la bactérie dans l'une des catégories S, R ou I. L'organigramme suivant résume la démarche adoptée.



Organigramme 01: Les étapes de l'antibiogramme (Meziani, 2012).

Détermination du phénotype de résistance des BLSE

La détermination des phénotypes de la BLSE se fait par la détection des substrats préférentiels de cette enzyme, elle se réalise en recherchant les éventuelles images de synergie en bouchon de champagne qui peut apparaître, sur gélose, entre les disques de bêta-lactamines utilisés.

La préparation de la suspension bactérienne ainsi que l'ensemencement d'une gélose Mueller-Hinton sont réalisés selon la technique de l'antibiogramme (Anonyme 4, 2011). Les disques d'antibiotiques suivants : AMC, CAZ, CTX, CRO et ATM sont placés sur la gélose Mueller-Hinton selon le schéma ci-dessous. La distance entre deux disques est de 3 cm. L'incubation des boîtes se fait 18 à 24h à 37°C (Farah *et al.*, 2007; Anonyme 4, 2011 ; Arafa, 2011).

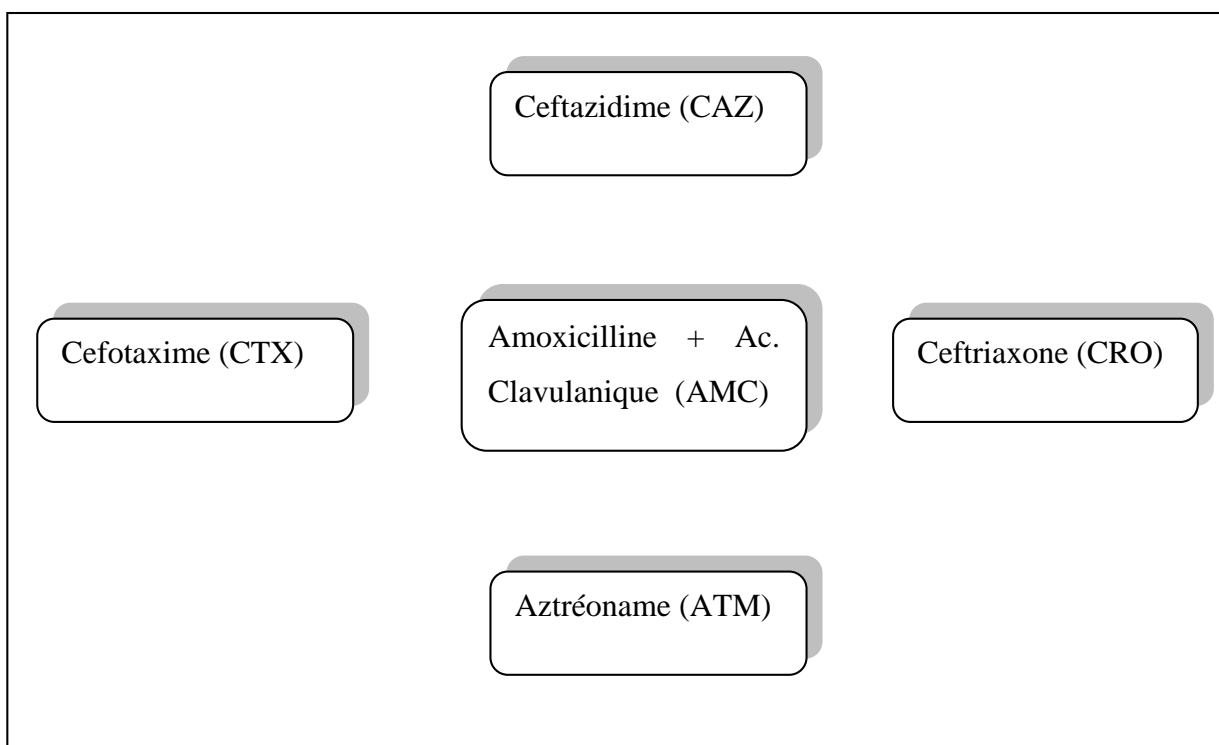
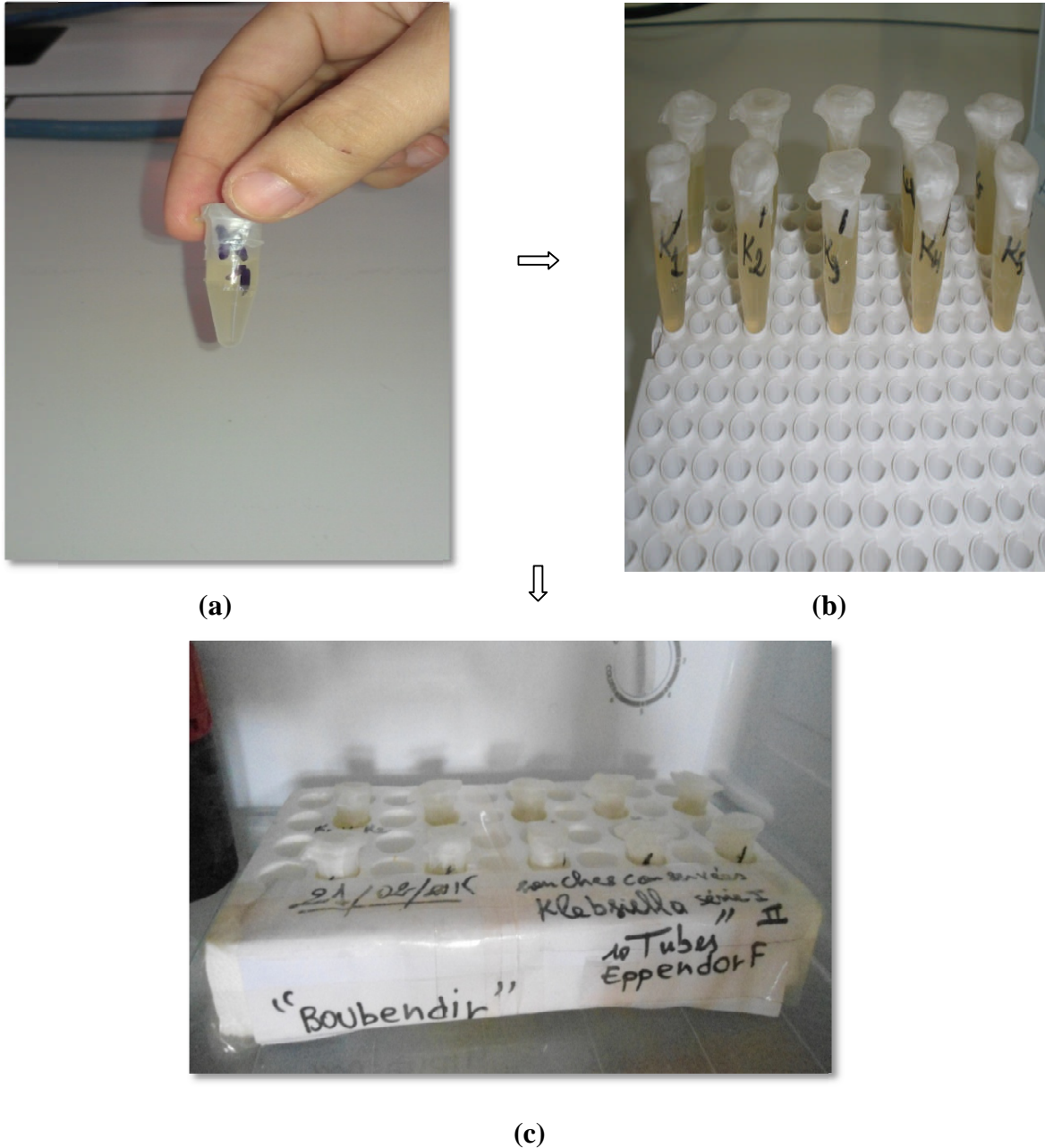


Figure 30: Schéma explicatif de la détermination des phénotypes de résistance de BLSE.

1.2.5. Conservation des souches

Les souches sont conservées dans le bouillon nutritif glycérolé à 20 % (800µl du bouillon nutritif + 200µl du glycérol) en tubes Eppendorf, au congélateur à -20°C. Le but est de préserver la viabilité des cellules et leur stabilité génétique (Figure 31).



Figures 31 : (a, b et c). Les étapes de la conservation de *K. pneumoniae* dans le bouillon glycérolé (20%) au congélateur à -20°C (Photos réalisées dans le laboratoire de Microbiologie et Biochimie du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila).

1.2.6. Réactivation

Les souches conservées sont régénérées dans un bouillon d'enrichissement (bouillon nutritif ou Cœur cerveau) et incubées à l'étuve à 37°C pendant 24h (Figure 32).

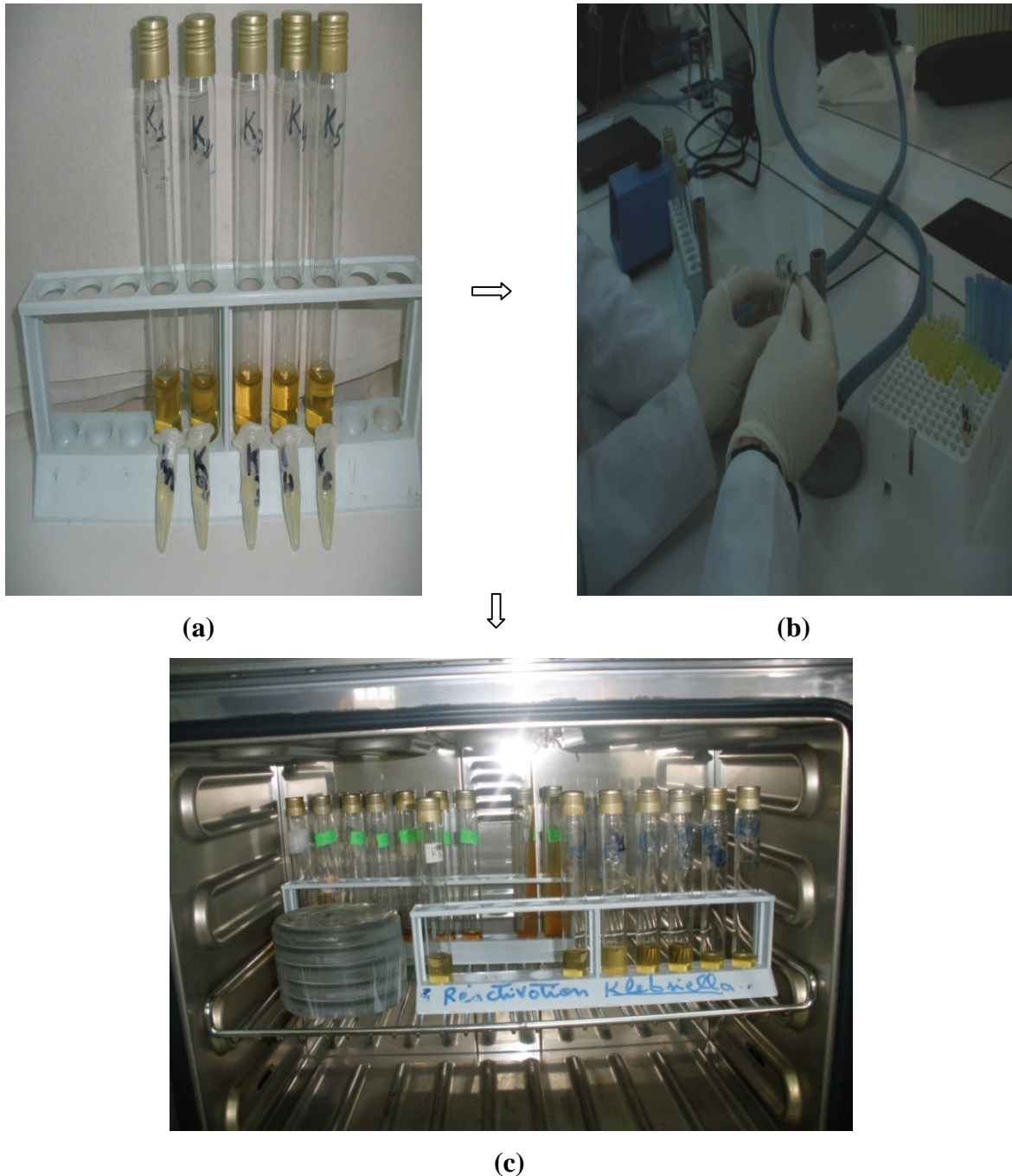


Figure 32 : (a et b). Réactivation des souches de *K. pneumoniae* dans le bouillon nutritif ;
(c). Incubation à l'étuve à 37°C pendant 24h (Photos réalisées dans le laboratoire de Microbiologie et Biochimie du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila).

1.2.7. Analyse statistique :



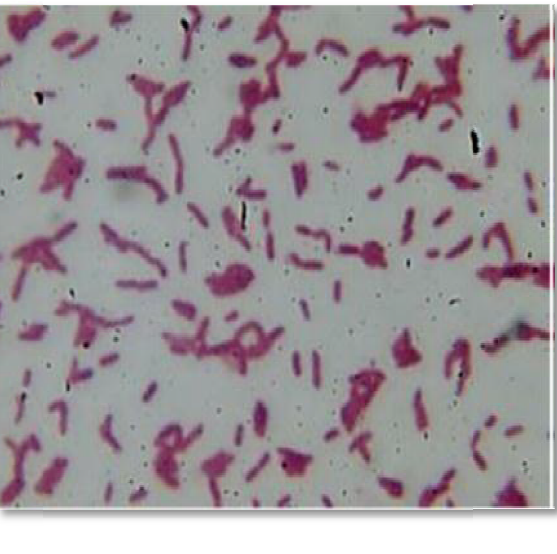
L'utilisation du logiciel Xlstat 2014, nous a permis de construire l'Analyse en Composantes Principales (ACP) pour les 7 antibiotiques les plus utilisés à l'hôpital de Mila de 2007 à 2013. Les variables étudiés dans cette analyse sont les incidences de la résistance aux antibiotiques durant les années d'études.

L'ACP propose de représenter le nuage de points formé par l'ensemble des individus selon deux dimensions ou composantes principales au lieu de le représenter dans les n dimensions, ce qui n'est pas possible à l'œil humain. Or nous ne pouvons concevoir de telles dimensions, faute de quoi une représentation en deux dimensions serait le bien venue (Boubendir, 2012).


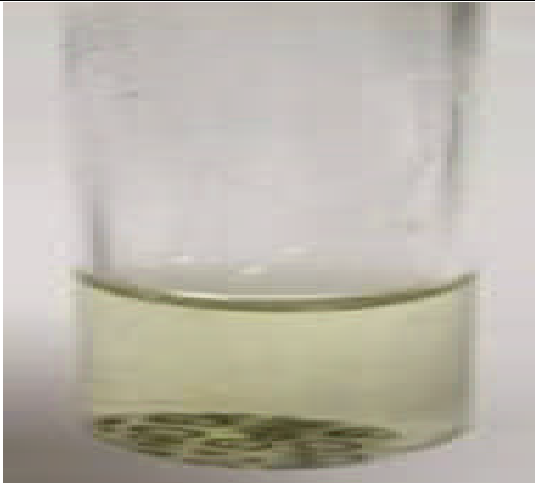
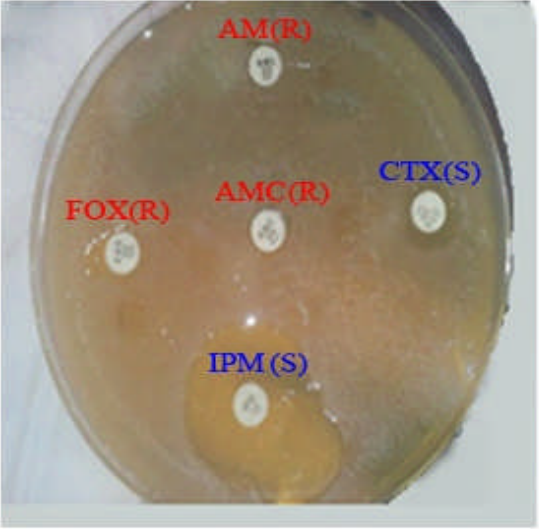
L'ACP consiste à transformer des variables corrélées en nouvelles variables sont nommées " composantes principales ", ou axes. Elle permet de réduire l'information en un nombre de composantes plus limités que le nombre initial de variables. Il s'agit d'une approche à la fois géométrique (représentation des variables dans un nouvel espace géométrique selon des directions d'inertie maximale et statistiques (recherche d'axes indépendants expliquant au mieux la variabilité-la variance-des données) (Legendre P et Legendre L, 1998).

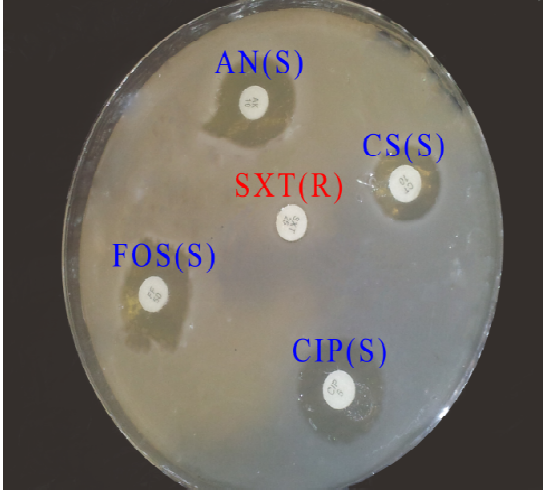
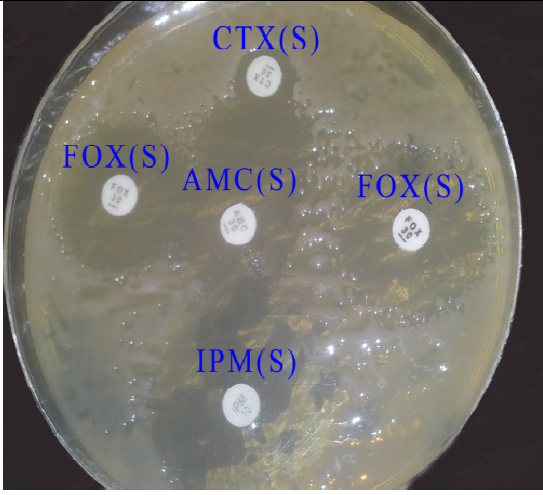
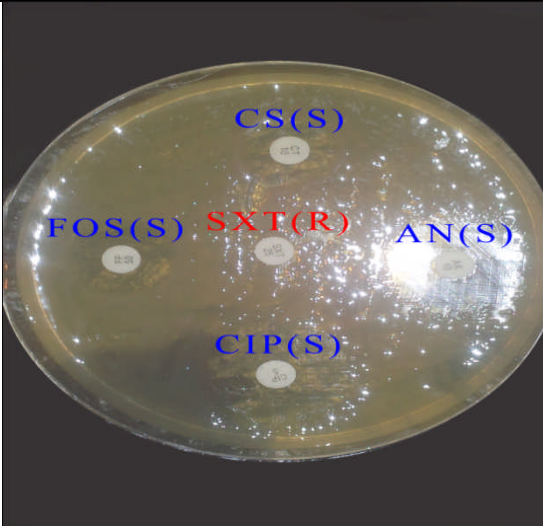
1.3. Résultats et Discussion

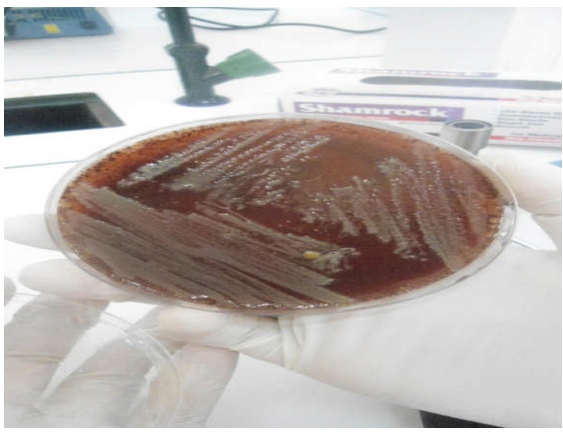
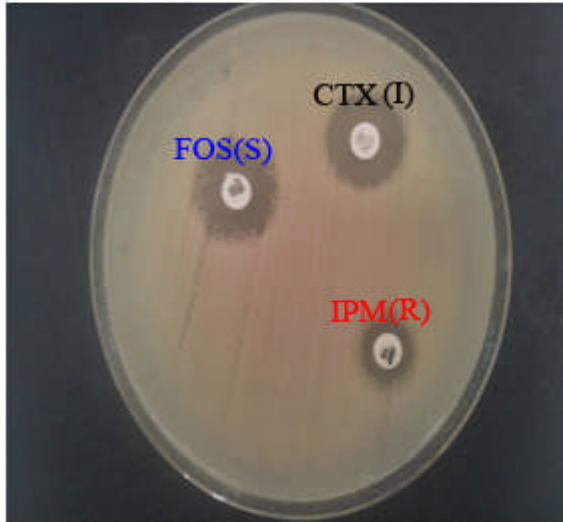
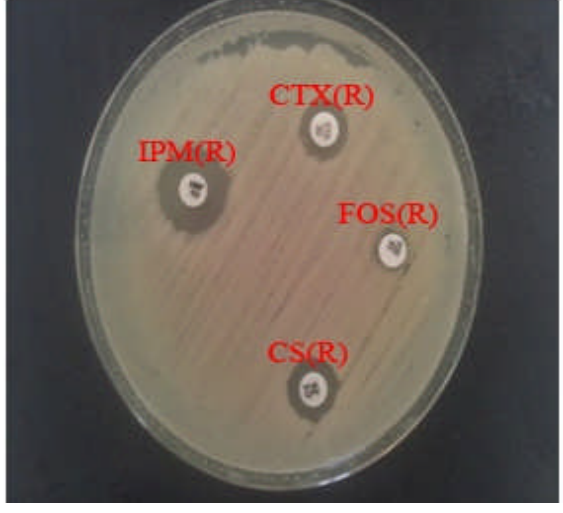
Le Tableau 12 résume les résultats des isolements et des tests de l'antibiogramme effectués au laboratoire de l'hôpital « Sept frères Meghlaoui », et au Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila.

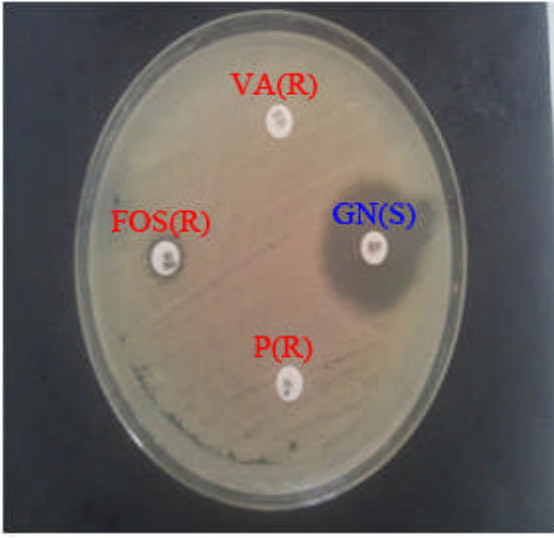
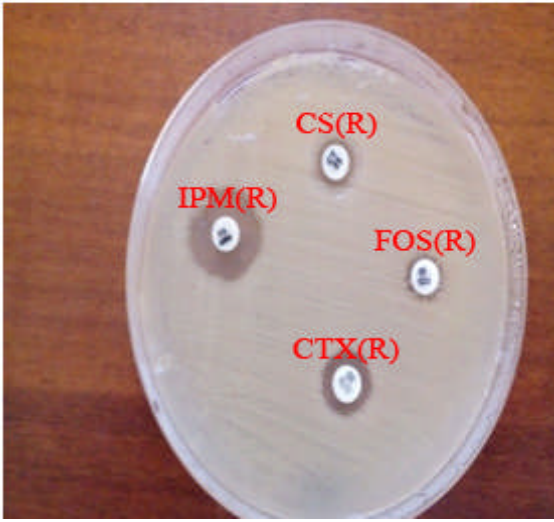
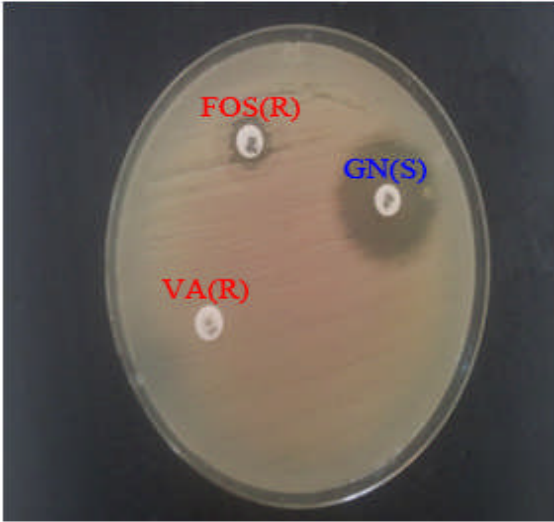
	<p>Aspect macroscopique des colonies de <i>K. pneumoniae</i> sur gélose Hektoen. Les colonies sont rondes, grandes (3 à 4 mm), lisses, bombées, brillantes et confluentes (Photo réalisée dans le laboratoire de Microbiologie et Biochimie du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila).</p>
	<p>Aspect macroscopique des colonies de <i>K. pneumoniae</i> sur gélose nutritive. Les colonies sont rondes, blanches, grandes (3 à 4 mm), bombées, lisses, brillantes, et confluentes (Photo réalisée dans le laboratoire de Microbiologie et Biochimie du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila).</p>
	<p><i>K. pneumoniae</i> observée par coloration de Gram au grossissement x100 à l'huile d'immersion. Les cellules sont des bacilles courts à Gram négatif, isolées ou regroupées en diplobacilles (Photo réalisée dans le laboratoire de Microbiologie et Biochimie du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila).</p>

	<p>Culture sur milieu TSI. <i>K. pneumoniae</i> a fermenté le lactose ainsi que le saccharose, avec production du gaz mais pas H₂S (Photo réalisée dans le laboratoire de Microbiologie et Biochimie du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila).</p>
	<p>Culture sur milieu Citrate de Simmon. L'utilisation du citrate comme seule source de carbone entraîne une alcalinisation du milieu, d'où le virage du vert au bleu (Photo réalisée dans le laboratoire de Microbiologie et Biochimie du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila).</p>
	<p>Culture sur milieu Mannitol-Mobilité. <i>K. pneumoniae</i> a fermenté le mannitol, d'où le virage du rouge au jaune et est immobile (Photo réalisée dans le laboratoire de Microbiologie et Biochimie du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila).</p>

	<p>Test Urée-Indole : <i>K. pneumoniae</i> a dégradé l'urée d'où le virage du jaune au rouge. <i>K. pneumoniae</i> est (uréase positif). Absence de la formation d'anneau rouge après addition du réactif de Kovacs, donc il n'y a pas dégradation du Tryptophane en indole. <i>K. pneumoniae</i> est (indole négatif) (Photo réalisée dans le laboratoire de Bactériologie de l'hôpital sept frères Meghlaoui de Mila).</p>
	<p>Test d'ONPG : le milieu devient jaune, due à la production de la β-galactosidase par <i>K. pneumoniae</i> et dégradation de l'ONPG. <i>K. pneumoniae</i> est (ONPG positif). (Photo réalisée dans le laboratoire de Microbiologie et Biochimie du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila).</p>
	<p>Résultats de l'antibiogramme de <i>K. pneumoniae</i> (K1). La sensibilité se manifeste par des plages de lyse. Sensibilité : CTX, IPM ; Résistance : AM, AMC, FOX. (Photo réalisée dans le laboratoire de Bactériologie à l'hôpital « sept frères Meghlaoui » de Mila).</p>



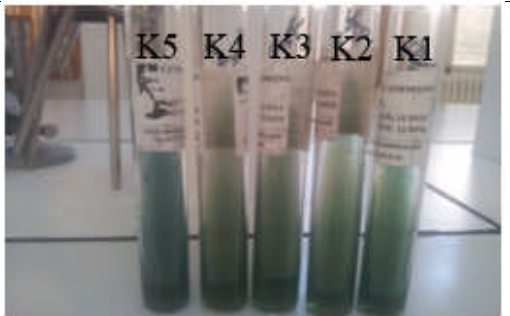


 <p>AN(S) CS(S) SXT(R) FOS(S) CIP(S)</p>	<p>Résultats de l'antibiogramme de <i>K. pneumoniae</i> (K2). La sensibilité se manifeste par des plages de lyse. Sensibilité : CS, AN, FOS, CIP ; Résistance : SXT (Photo réalisée dans le laboratoire de Bactériologie à l'hôpital « sept frères Meghlaoui » de Mila).</p>
 <p>CTX(S) FOX(S) AMC(S) FOX(S) IPM(S)</p>	<p>Résultats de l'antibiogramme de <i>K. pneumoniae</i> (K3). La sensibilité se manifeste par des plages de lyse. Sensibilité : CTX, FOX, AMC, IPM (Photo réalisée dans le laboratoire de Bactériologie à l'hôpital « sept frères Meghlaoui » de Mila).</p>
 <p>CS(S) FOS(S) SXT(R) AN(S) CIP(S)</p>	<p>Résultats de l'antibiogramme de <i>K. pneumoniae</i> (K4). La sensibilité se manifeste par des plages de lyse. Sensibilité : CIP, CS, AN, FOS ; Résistance : SXT (Photo réalisée dans le laboratoire de Bactériologie à l'hôpital « sept frères Meghlaoui » de Mila).</p>

	<p>Aspect macroscopique des colonies de <i>K. pneumoniae</i> (K5) sur gélose au sang cuit. Les colonies sont grandes, bombées, lisses, brillantes et confluentes (Photo réalisée au laboratoire de Bactériologie à l'hôpital « sept frères Meghlaoui » de Mila).</p>
	<p>Résultats de l'antibiogramme de <i>K. pneumoniae</i> (K2). La sensibilité se manifeste par des plages de lyse. Sensibilité : FOS ; Résistance : IPM ; Intermédiaire : CTX (Photo réalisée dans le laboratoire de Microbiologie et Biochimie du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila).</p>
	<p>Résultats de l'antibiogramme de <i>K. pneumoniae</i> (K3). La sensibilité se manifeste par des plages de lyse. Résistance : IPM, CS, FOS, CTX (Photo réalisée dans le laboratoire de Microbiologie et Biochimie du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila).</p>

 <p>Antibiogram of <i>K. pneumoniae</i> (K3) on a Mueller-Hinton agar plate. The plate shows four antibiotic discs: VA(R) at the top, FOS(R) on the left, GN(S) on the right, and P(R) at the bottom. The VA, FOS, and P discs show no zone of inhibition, indicating resistance. The GN disc shows a large, clear zone of inhibition, indicating sensitivity.</p>	<p>Résultats de l'antibiogramme de <i>K. pneumoniae</i> (K3). La sensibilité se manifeste par des plages de lyse. Sensibilité : GN ; Résistance: VA, FOS, P. (Photo réalisée dans le laboratoire de Microbiologie et Biochimie du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila).</p>
 <p>Antibiogram of <i>K. pneumoniae</i> (K5) on a Mueller-Hinton agar plate. The plate shows four antibiotic discs: CS(R) at the top, IPM(R) on the left, FOS(R) on the right, and CTX(R) at the bottom. All four discs show no zone of inhibition, indicating resistance to all tested antibiotics.</p>	<p>Résultat de l'antibiogramme de <i>K. pneumoniae</i> (K5). La sensibilité se manifeste par des plages de lyse. Résistance : CS, FOS, CTX, IPM (Photo réalisée dans le laboratoire de Microbiologie et Biochimie du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila).</p>
 <p>Antibiogram of <i>K. pneumoniae</i> (K5') on a Mueller-Hinton agar plate. The plate shows three antibiotic discs: FOS(R) at the top, GN(S) on the right, and VA(R) at the bottom. The FOS and VA discs show no zone of inhibition, indicating resistance. The GN disc shows a large, clear zone of inhibition, indicating sensitivity.</p>	<p>Résultat de l'antibiogramme de <i>K. pneumoniae</i> (K5'). La sensibilité se manifeste par des plages de lyse. Sensibilité : GN ; Résistance : VA, FOS (Photo réalisée dans le laboratoire de Microbiologie et Biochimie du Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF de Mila).</p>

Le Tableau 13 résume les résultats de la galerie biochimique de 5 souches de *K. pneumoniae*.

Tableau 13 : Résultats de la galerie biochimique de *K. pneumoniae*.

Tests		K1	K2	K3	K4	K5	Figure
TSI	Lactose	+	+	+	+	+	
	Saccharose	+	+	+	+	+	
	Glucose	-	-	-	-	-	
	H ₂ S	-	-	-	-	-	
	Gaz	-	-	+	-	+	
Mannitol	+	+	+	+	+		
Mobilité	-	-	-	-	-		
Citrate de Simmon	+	+	+	+	+		
ONPG	+	+	+	+	+		
Urée	+	+	+	+	+		
Indole	-	-	-	-	-		

K : *Klebsiella*, **ONPG** : Orthonitrophényl-β-D-galactopyranoside, **TSI** : Tripl Sugar Iron, **+** : Positif, **-** : Négatif.

Le Tableau 14 résume les données de l'antibiorésistance de 30 souches de *K. pneumoniae* isolées à l'hôpital de Mila de Janvier 2014 à Février 2015.

Tableau 14: L'antibiorésistance de 30 souches de *K. pneumoniae* isolées à l'hôpital de Mila selon le sexe, l'âge, nature du prélèvement, service et antibiogramme (Janvier 2014 à Février 2015).

Date	Sexe	Age	NP	SV	Antibiogramme		
					S	I	R
22/01/2014	F	44A	PU	Gynécologie	CIP, IPM, AN, CTX	/	VA, OX
26/01/2014	F	37A	PU	EXT	CTX, NA, SXT	/	AMC
26/01/2014	H	33A	PU	CH	CTX	/	AMC, SXT, NA, AMX
04/02/2014	F	4M	PP	Pédiatrie	CS, GN, AN	/	CTX, AMC, OX, FA, CIP
08/02/2014	F	3A	PU	Pédiatrie	NA, GN	CTX	SXT, AMC
16/02/2014	H	56A	PU	CH	CTX, GN, NA	/	AMC
24/03/2014	F	24A	PU	Gynécologie	CTX, AN, CIP, AM, GN	/	SXT, AMC, AM
25/03/2014	F	20A	PV	EXT	IPM, CTX, AN, SXT, CS	FOS	VA, OX
30/03/2014	F	5A	PU	Pédiatrie	AN, IPM, CTX, CS	/	AMC, AM, NA, SXT, CIP
15/04/2014	F	57A	PV	EXT	IPM, CTX, AN, CS	/	AMC, SXT, NA
03/06/2014	H	67A	PU	EXT	GN, CIP	/	SXT, AM, SXT, NA, NA, CTX
06/07/2014	F	24A	PU	EXT	CIP	GN	CS, NA, CTX, IPM, SXT
31/08/2014	H	5A	PV	Pédiatrie	Ind	Ind	Ind
18/09/2014(K1)	/	/	Mur	Pédiatrie	CTX, IPM	/	AM, FOX, AMC
18/09/2014(K2)	/	/	Matlas	Pédiatrie	CS, AN, FOS	CTX	SXT, IPM
18/09/2014(K3)	/	/	Drap	Pédiatrie	FOX, AMC, GN	/	IPM, CTX, VA, FOS, P, CS
18/09/2014(K4)	/	/	Matlas	Pédiatrie	AN, CS, CIP, FOS	/	SXT
18/09/2014(K5)	/	/	Drap	Pédiatrie	GN	/	CS, FOS, CTX, IPM, VA
17/11/2014	H	24A	PU	EXT	Ind	Ind	Ind
23/11/2014	F	24A	PP	EXT	IPM, CIP, CS, FOS	/	AMC, SXT, AN, RA
23/11/2014	F	5A	LP	Pédiatrie	AN, CIP, CS, FOS	/	AMC
23/11/2014	H	43A	PP	EXT	IPM, AN, CS, CIP	/	AMC, SXT, NA, AMX
26/11/2014	F	Ind	PU	EXT	Ind	Ind	Ind
26/11/2014	F	34A	PP	Infection	IPM, CIP, FOS	/	AMC, AMX, SXT, AN
03/12/2014	F	60A	PU	CH	CIP, NA, CS, IPM	/	FOS, AMX, AMC
29/12/2014	F	Ind	PP	Pédiatrie	Ind	Ind	Ind
06/01/2015	F	5A	PU	Pédiatrie	Ind	Ind	Ind
14/01/2015	F	2A	PP	Pédiatrie	Ind	Ind	Ind
18/01/2015	F	41A	PU	CH	IPM, NA, CIP, CS, FOS, AN	/	AMX
18/01/2015	H	60A	PU	EXT	NA, A FOS		AMX

NP : Nature de Prélèvement, **SV** : Service, **S** : Sensible, **I** : Intermédiaire, **R** : Résistant, **F** : Femme, **H** : Homme, **A** : Ans, **M** : Mois, **PU** : Prélèvement Urinaire, **PP** : Prélèvement de Pus, **PV** : Prélèvement Vaginal, **LP** : Liquide Pleural, **CH** : Chirurgie, **EXT** : Externe, **Ind** : Indéterminé.

1. Incidence de *K. pneumoniae* isolées à l'hôpital de Mila de 2014 à 2015

De Janvier 2014 à Février 2015, 30 souches de *K. pneumoniae* ont été isolées, parmi elles 20 sont d'origine hospitalières (66.66%) et 10 d'origine externe (33.33%). Ces résultats ont montré qu'il y a une prédominance des souches hospitalières par rapport aux souches communautaires. Conformément aux données de la littérature, l'espèce *K. pneumoniae* est plus fréquemment isolée à l'hôpital qu'en communauté avec des fréquences de 92.94% contre 7.05% (Arafa, 2011).

Tableau 15 : Incidence des souches de *K. pneumoniae* selon leur origine hospitalières ou communautaire à l'hôpital de Mila (2014/2015).

Souches	Nombres de souches	Pourcentage%
Hospitalières	20	66.66
Communautaires	10	33.33
Total	30	100

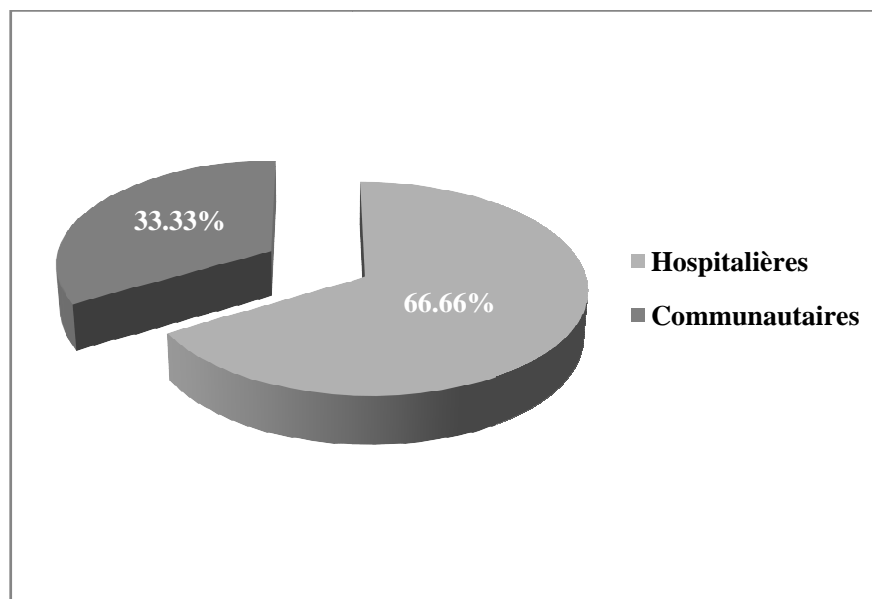


Figure 33: Incidence des souches de *K. pneumoniae* selon leur origine hospitalières ou communautaire à l'hôpital de Mila (2014 à 2015).

1.1. Incidence de *K. pneumoniae* selon le sexe

Au total, 25 patients ont été infectés par *K. pneumoniae*, 18 (72%) étaient des femmes et 7 des hommes (28%) (5 de l'environnement hospitalier : Murs, Matlas et Draps) (Tableau 16, Figure 34). Nos résultats concordent bien avec ceux de Belbel dans les hôpitaux de la ville d'Annaba (Algérie) (2014), qui a trouvé que parmi 100 patients infectés par *K. pneumoniae*, 54% ont été des femmes contre 46% sont des hommes. Des résultats contradictoires sont observés dans d'autres études : Au Mali, selon une étude réalisée par Kone-Diallo (2010), au laboratoire de bactériologie CVD du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) Gabriel Toure, parmi 43 patients infectés par *K. pneumoniae*, 25 (58.14%) étaient des hommes et 18 (41.86%) des femmes, le même constat est rapporté par Arafa (2011), au niveau du CHU Benbadis de Constantine, qui a été trouvé 54.11% sont des hommes contre 45.88% des femmes.

D'après Tompson (1989), les infections urinaires chez les femmes sont très fréquentes car l'urètre étant très court (2cm en moyenne) et situé très proche des organes génitaux et digestifs, il arrive que certaines bactéries puissent facilement remonter de la vulve jusqu'à la vessie, par l'urètre, et déclencher une infection aiguë. L'urètre chez l'homme est plus long ce qui le protège beaucoup mieux que la femme (Anonyme 1, 2002).

Aussi, selon Abdoul Karim Traore (2009), la proximité des orifices urétral, vaginal et anal, de même que la brièveté de l'urètre, expliquent la prédominance marquée de l'infection urinaire chez la femme. La pénétration des bactéries dans la vessie est favorisée par de nombreux facteurs, nous pouvons citer : la diminution ou la perturbation de la diurèse, la grossesse, la ménopause, la présence d'un obstacle ou d'un corps étranger, l'altération de la muqueuse urinaire, la modification de l'acidité vaginale et des sécrétions vaginales par les hormones, les agents chimiques (tels que les gels spermicides, etc.).

K. pneumoniae est couramment impliqués dans la pyélonéphrite aiguë chez les femmes enceintes avec des anomalies des voies urinaire telles que la lithiase urinaire, hydronéphrose ou malformations congénitales (Bokaeian *et al.*, 2014).

Tableau 16 : Incidence de *K. pneumoniae* selon le sexe à l'hôpital de Mila (2014/2015).

Sexe	Nombres de souches	Pourcentage%
Femmes	18	72
Hommes	7	28
Environnement hospitalier	5	/
Total	25	100

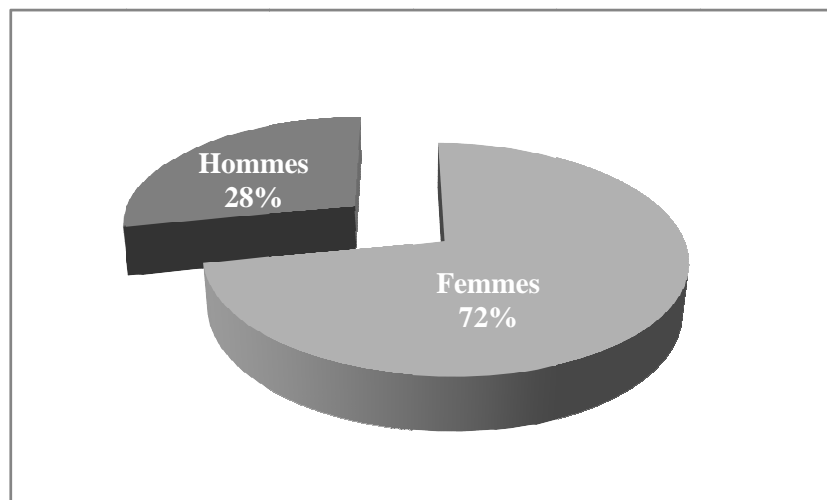


Figure 34 : Incidence de *K. pneumoniae* selon le sexe à l'hôpital de Mila (2014/2015).

1.2. Incidence de *K. pneumoniae* selon la nature du prélèvement

Sur les 30 souches de *K. pneumoniae* isolées, 15 ont été diagnostiquées dans les urines (60%), 6 dans les prélèvements de pus (24%), 3 dans les prélèvements vaginaux (12%), en revanche le taux le plus faible est enregistré dans le liquide pleural avec une fréquence de 4% (1 souche) et 5 souches à partir de l'environnement hospitalier (service de pédiatrie : Murs, Matlas et Draps) (Tableau 17, Figure 35). Ces résultats sont très proches de ceux obtenus au Sénégal où les prélèvements urinaires sont toujours dominants (59%) suivi par des prélèvements de pus avec une fréquence de 25% (Camara *et al.*, 2011). De même, Farah *et al.* (2007), dans les hôpitaux de la ville d'Annaba en Algérie, ont remarqué que *K. pneumoniae* se trouve en abondance dans l'urine avec 40 souches, le pus avec 13 souches, les sécrétions respiratoire avec 12 souches et dans les sécrétions vaginales 4 souches. Zamani *et al.* (2012), ont rapportés que parmi 105 *Klebsiella* spp. isolées chez des patients

admis aux hôpitaux de référence de Hamadan (Iran), au cours d'une période de 12 mois de 2007 à 2008, 38.1% provenaient d'urines. Aussi, nos résultats concordent bien avec les prévalences observées en Tunisie, parmi un total de 3745 bactéries responsables d'infection urinaire, 605 cas sont causés par *Klebsiella* spp. dans l'hôpital universitaire Tahar Sfar de Mahdia (Tunisie) (Ben Haj Khalifa et Khedher, 2010), en Arabie Saoudite (Tawfik *et al.*, 2011), et aux Etats Unis d'Amérique (Quale *et al.*, 2002). Tlamçani *et al.* (2009), ont rapportés que *Klebsiella* spp. est parmi les principales espèces bactériennes impliquées dans les infections urinaires dans l'hôpital de spécialité de Rabat. Parmi 253 patients atteints d'infections urinaire 72 sont causés par les Klebsielles (86% *K. pneumoniae*, 14% *K. oxytoca* et 37% *Klebsiella* spp.).

Par contre, Arafa *et al.* (2009), ont observé que parmi 52 souches de *K. pneumoniae* provenant de différents produits pathologiques à l'hôpital universitaire de Constantine (Algérie), les prélèvements de pus occupent la place de vedette avec une fréquence de 46.5%, suivis des prélèvements des urines et de sang avec respectivement 25.2% et 28.3%. Selon Poudshun et Ullmann (1998), le système urinaire et le site le plus fréquent des infections nosocomiales. *K. pneumoniae* est responsable de 6 à 17% des infections urinaires nosocomiales, classée en cinquième positions parmi tous les agents pathogènes incriminés. Les souches de *K. pneumoniae* exprimant les pili de type 3, sont capable d'adhérer aux cellules endothéliales et épithéliales du tractus respiratoire, ainsi qu'aux cellules uro-épithéliales (Raud, 2003).

D'après Sekhsokh (2008), *Klebsiella* et *Proteus* sécrètent une uréase qui alcalinise l'urine dont le pH, naturellement acide, ce qui empêche la prolifération des autres germes. Merino *et al.* (2000), ont rapporté que l'antigène lipopolysaccharidique (O5) est indispensable pour certaines fonctionnalités pathogènes chez *K. pneumoniae* comme la résistance au sérum, l'adhérence aux cellules uro-épithéliales et la colonisation des voies urinaires.

Il a été constaté que *K. pneumoniae* a été isolée aussi bien chez les malades hospitalisés (25 souches) dans les différents produits pathologiques que dans l'environnement hospitalier (le service de pédiatrie, 5 souches), ceci conduit à conclure que les souches de *K. pneumoniae* peuvent être transmises d'un réservoir humain à un réservoir environnemental ou le cas contraire via des procédures invasives (Murs, matlas, draps) (Tableau 14).

Tableau 17 : Incidence de *K. pneumoniae* selon la nature du prélèvement à l'hôpital de Mila (2014/2015).

Nature de prélèvement	Nombres de souches	Pourcentage %
Prélèvement Urinaire	15	50
Prélèvement de pus	6	20
Prélèvement vaginal	3	10
Liquide pleural	1	3.33
Environnement hospitalier*	5	16.66
Total	30	100

* : Service de pédiatrie (Murs, Matlas et Draps).

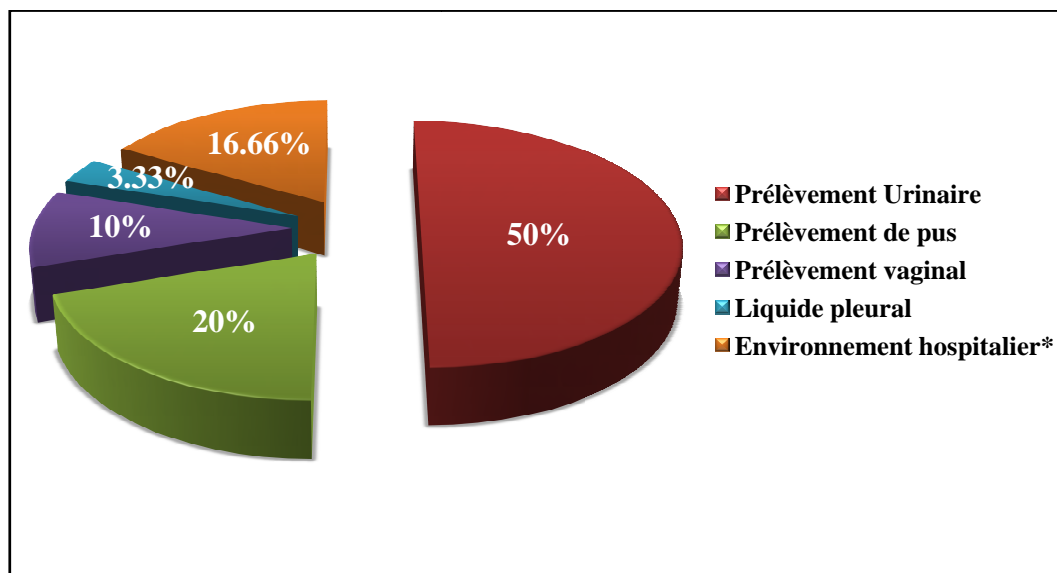


Figure 35 : Incidence de *K. pneumoniae* selon la nature du prélèvement à l'hôpital de Mila (2014/2015).

* : Service de pédiatrie (Murs, Matlas et Draps).

1.3. Incidence de *K. pneumoniae* selon les services hospitaliers

Dans la distribution des *K. pneumoniae* selon les services, il a été observé (Tableau 18, Figure 36) que le service de pédiatrie semble être le plus incriminé avec 8 souches de *K. pneumoniae* (53.33%), ce résultat est en agrément avec celui de Podschun et Ullmann (1998), qui ont montré que les *K. pneumoniae* sont souvent des agents pathogènes causant des infections néonatales particulièrement chez les nourrissons prématurés. Par contre Ben Haj Khalifa et Khedher (2012), dans une étude menée à l'hôpital Tahar Sfar de Mahdia (Tunisie), ont mentionnés que le taux d'isolement de *Klebsiella* spp. le plus élevé est enregistré dans le service de consultation (67 souches), aussi Farah et al. (2007), dans les hôpitaux de la ville d'Annaba (hôpital Dorban, hôpital Ibn Rochd et hôpital Ibn Sina) ont trouvés que *K. pneumoniae* occupe la place de vedette dans les services de réanimation et de chirurgie.

D'après Woloj et al. (1985), *K. pneumoniae* est la cause la plus importante de la méningite chez les nouveaux nés et les nourrissons, avec un taux de mortalité d'environ 90%. En second lieu, le service de chirurgie présente une fréquence de 26.66% (4 souches), suivi du service gynécologie avec un taux de 13.33% (2 souches). La prévalence la plus basse est enregistrée au service d'infection 6.66% (1 souche) (Tableau 18, Figure 36). Selon les données de la littérature, au cours des infections nosocomiales en milieu pédiatrique Tunisien : les bacilles à Gram négatif étaient les bactéries les plus fréquemment isolées (68%) et étaient dominés par *K. pneumoniae* (22.7%) (Ben Jabllah *et al.*, 2006). La même bactérie représente 24.5% des infections nosocomiales dans les infections de la plaie opératoire dans le service de chirurgie générale et pédiatriques de l'hôpital Gabriel Touré (Mali) (Dolo, 2001). D'après Liu et al. (2013), *K. pneumoniae* est l'agent pathogène le plus important qui augmente le taux de morbidité et de la mortalité chez les nouveau-nés. Belbel (2014), a montré que les nouveau-nés sont particulièrement des hôtes sensibles à *K. pneumoniae* en raison de leur système immunitaire immature et leurs faible poids à la naissance, en particulier lorsque les dispositifs invasifs (une source de contamination) sont utilisés. Aussi dans étude rétrospective étalée sur une période allant d'Octobre 2008 à Novembre 2011 au laboratoire de Microbiologie du CHU Hassan II, Fès (Maroc), il a été déclaré que parmi 40 nouveau-nés atteints des infections urinaire 30% de ces cas sont causés par l'espèce *K. pneumoniae* (Anonyme 5, 2011).

Tableau 18 : Incidence de *K. pneumoniae* selon le service hospitalier à l'hôpital de Mila (2014/2015).

Services	Nombres de souches	Pourcentage%
Pédiatrie	8	53.33
Chirurgie	4	26.66
Gynécologie	2	13.33
Infection	1	6.66
Total	15	100

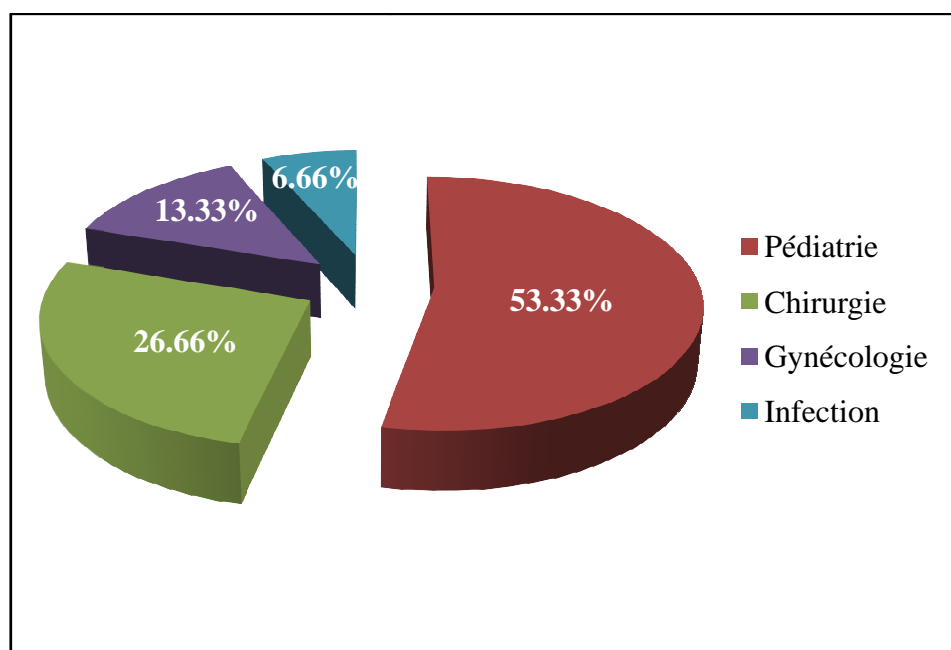


Figure 36 : Incidence de *K. pneumoniae* selon le service hospitalier à l'hôpital de Mila (2014/2015).

Selon l'âge, les résultats obtenus montrent que toutes les tranches d'âges sont touchées par les infections à *K. pneumoniae* avec des extrêmes d'âges variant entre 4 mois et 67 ans.

Afin d'enrichir la discussion de nos collègues de Master de la promotion 2013/2014, nous avons renforcé leur résultats avec des références récentes.

2. Incidence totale de la résistance aux antibiotiques de *Klebsiella* spp. isolées à l'hôpital de Mila (2007 à 2013).

Tableau 19 : Antibiorésistance totale des souches de *Klebsiella* spp. isolées à l'hôpital de Mila de 2007 à 2013.

Familles	Antibiotiques	% de résistance
β-lactamines	AM	87.75
	AMC	93
	AMX	81.81
	IPM	37.68
	OX	95
	CTX	33.76
	CZ	84.28
Aminosides	GM	15
	AN	24.28
Quinolones	NA	46.05
	NOR	40
	CIP	14.89
Macrolides	L	100
	E	87.50
	CM	44.44
	SP	46.44
Sulfamides	SXT	58.02
Cyclines	TE	66.66
Autres	FOS	75
	CS	39.21

AM : Ampicilline, **AMC :** Amoxicilline + Acide Clavulanique, **AMX :** Amoxicilline, **IPM :** Imipénème, **OX :** Oxacilline, **CTX :** Céfotaxime, **CZ :** Céfazoline, **GM :** Gentamycine, **AN :** Amikacine, **NA :** Acide Nalidixique, **NOR :** Norfloxacin, **CIP :** Ciprofloxacine, **L :** Lincomycine, **E :** Erythromycine, **CM :** Clindamycine, **SP :** Spiramycine, **SXT :** Triméthoprim + Sulfaméthoxazole, **TE :** Tétracycline, **FOS :** Fosfomycine, **CS :** Colistine.

2.1. La résistance aux β -lactamines

Les taux de résistance les plus élevés sont enregistrés (Tableau 19, Figure 37) dans la famille des β -lactamines avec 95% pour l'Oxacilline, suivi par Amoxicilline + Acide Clavulanique (93%), l'Ampicilline (87.75%), le Céfazoline (84.28%) et l'Amoxicilline, (81.81%). Les taux de résistance les plus faibles sont remarqués pour l'Imipénème (37.68%) et le Céfotaxime (33.76%). Des résultats très proches pour l'Ampicilline et l'Amoxicilline ont été obtenus par Souna (2011), dans les différents services de CHU de Sidi Bel Abbes (Algérie), avec une résistance de 100% pour les deux antibiotiques testés. Ma et al. (2009), enregistré une résistance de 100% à l'Ampicilline, et un taux de résistance à Céfotaxime beaucoup plus élevés (62.1%) chez 235 souches de *K. pneumoniae* (BLSE) collectés à partir d'une surveillance nationale effectuée à Taiwan.

K. pneumoniae est naturellement résistante aux Aminopénicillines (Amoxicilline, Ticarcilline) par production d'une β -lactamase de classe A d'espèce (chromosomique) du groupe fonctionnel 2a, inhibée par l'Acide Clavulanique (Arafa, 2011).

Cette résistance peut être due en raison de la production d'une enzyme SHV (SHV-1) provient d'une mutation dans le gène chromosomique (*SHV*) (variable sulfhydryle). Cette enzyme appartient à la classe A, est hydrolyse seulement les pénicillines et les céphalosporines à spectre étroit (Pool, 2004). La famille *SHV* des β -lactamases à été dérivée de *Klebsiella* spp. SHV-1 est universellement trouvé dans *K. pneumoniae*, évolué comme un gène chromosomique dans *Klebsiella* spp. et plus tard a été incorporé dans un plasmide (Jain et Mondal, 2008). Le *bla*_{SHV} confère à *K. pneumoniae* une résistance à plusieurs antibiotiques, y compris : l'Ampicilline, Amoxicilline + Ac. Clavulanique, Céfixime, Céfuroxime, Céfopodoxime, Céfotaxime, Céftazidime, Aztréonam, Nétilmycine, Amikacine, Gentamycine, Chloramphénicole, Cotrimoxazole, Tétracycline, ainsi qu'aux Céphalosporines de 3^{ème} génération (Jain et Mondal, 2008).

Les niveaux de résistance atteints vis-à-vis les β -lactamines sont associés à de nombreux mécanismes de résistance, avec prédominance de la production de β -lactamases à spectre étendu (BLSE), mais aussi la production de pénicillinase (Souna, 2011).

2.1.1. La résistance à l'Imipénème

Le taux de résistance à l'Imipénème (37.68%) observé dans cette étude est plus élevés que ceux rapportés par Ma et al. (2009), qui ont remarqués parmi 235 souches de *K. pneumoniae* collectées à partir d'une surveillance nationale effectuée à Taiwan, seulement 2 souches sont résistantes à l'Imipénème (2.1%) ; et ceux de Farah et al. (2007), où ils ont enregistré une résistance de 4 souches parmi un total de 100 souches de *K. pneumoniae* isolées dans les hôpitaux de la ville d'Annaba (hôpital Dorban, hôpital Ibn Rochd et hôpital Ibn Sina). Du 2/12/2003 au 30/05/2004, une souche de *K. pneumoniae* résistante à toutes les β -lactamines, y compris à l'Imipénème, a été isolée chez 6 patients d'un service de chirurgie en région parisienne, 3 patients sont décédés dont 1 de sepsis (Jarlier *et al.*, 2004). D'après les résultats déclarés par le 9^{ème} rapport d'évaluation et de surveillance de résistance des bactéries aux antibiotiques (2008) (Algérie), est parmi un total de 600 souches de *K. pneumoniae*, 2 souches seulement trouvé résiste à l'Imipénème (0.3%).

Par contre, le présent résultat est différent de ceux trouvés par Tlamçani et al. (2009), Arafa et al. (2009) et Kabbaj et al. (2012), qui ont tous trouvés que tous les isolats testés étaient sensible à 100% à l'Imipénème. Ivanov et Egorov (2008), ont aussi trouvé que parmi un total de 212 *Klebsiella* spp. isolées des patients atteints des infections nosocomiales qui ont été traités en réanimation et unités de soins intensifs (USI) et d'autres unités de centres médicaux de diverses villes russes, sont tous sensibles 100% à l'Imipénème. Une autre étude menée par Al-Tawfiq et Amalraj (2007), en Arabie Saoudite sur une période de 6 ans (1998-2003), 3070 *K. pneumoniae* ont été isolées par l'organisation Saoudite « ARAMCO » pour les services médicaux et sont trouvés que tous les isolats testés sont tous sensible 100% à l'Imipénème. Pareillement dans une étude française sur les infections urinaires nosocomiales de l'adulte faite en 2002 il à été remarqué que tous les souches de *K. pneumoniae* sont 100% sensible à l'Imipénème (Anonyme 1, 2002).

La résistance à l'Imipénème est probablement liée soit à un phénomène d'imperméabilité associé à une modification des porines membranaires, soit à une production de Carbapénèmases (Arafa, 2011). Plus récemment, *K. pneumoniae* occupe une position importante dans l'émergence et la dissémination de certaines enzymes conférant la résistance aux Carbapénèmes (KPC, OXA-48). Lorsque on fait un bilan des nouvelles β -lactamases décrites depuis 1983, *K. pneumoniae* est dans 80% des cas l'hôte

chez qui ont été découvertes ces nouvelles enzymes (de type *TEM*, *SHV*). Lorsqu'elle n'est pas le premier hôte, on retrouve très fréquemment cette espèce comme responsable de la diffusion épidémique de nouvelles enzymes comme les métallo-enzymes de type *VIM* et *NDM-1* (Belbel, 2014).

Cette résistance peut être issue par une production des KPC. Les KPC sont des enzymes plasmidiques (Pool, 2004) de classe A, actives sur la plupart des β -lactamines (Boutet-Dubois *et al.*, 2012), y compris les Oximino-Céphalosporines et l'Imipénème (Pool, 2004). *K. pneumoniae* peut également être résistante en raison de l'existence des gènes *bla_{VIM}*. Les *bla_{VIM}*, sont dans la majorité de cas portés sur des intégrons de classe I (In-e541) (Miriagou *et al.*, 2010), qui sont généralement intégrés dans des transposons portés par des plasmides (Figure 7, chapitre 3). Ces intégrons contiennent typiquement les gènes : *bla_{VIM-1}*, *aacA7*, *drfA1* et *aadA1* (Vatopoulos, 2008 ; Miriagou *et al.*, 2010), ce qui confère un phénotype multi-résistant à l'espèce type *K. pneumoniae* (Kassis-Chikhani, 2012).

Le gène *bla_{VIM}* code pour des enzymes de type IMP (Imipénémase) ou VIM (Verona Integron encoded metallo- β -lactamases) qui représentent la majorité des carbapénémases de classe B (Boutet-Dubois *et al.*, 2012), formés généralement de 266 acides aminés à l'exception de VIM-7 (265AA) et VIM-18 (262AA) (Castanheira *et al.*, 2009), ces enzymes possèdent des ions zinc dans leur site actif, et hydrolysent fortement toutes les β -lactamines à l'exception de l'Aztréonam. Ce gène qui a été décrit en premier lieu chez *P. aeruginosa* puis chez *Acinetobacter baumannii* est maintenant très répandu chez les entérobactéries, notamment chez *K. pneumoniae* (Vatopoulos, 2008).

2.1.2. La résistance à Céfotaxime

La présente étude montre un taux de 33.76% de résistance à Céfotaxime, ce dernier est beaucoup plus faible que celui trouvé par Souna (2011), qui a enregistré un taux de résistance de 80%. Ma *et al.* (2009), ont déclaré que parmi 235 *K. pneumoniae* collectées à partir d'une surveillance nationale effectuée à Taiwan, 146 souches sont résistantes à Céfotaxime (62.1%). Aussi, dans une étude russe, il a été observé que le taux de résistance à Céfotaxime est variable de 50 à 100% pour *K. pneumoniae* (*TEM+SHV*) et *K. pneumoniae* (*CTX*) respectivement (Ivanov et Egorov, 2008). D'après ses résultats

obtenus, il peut être dit que la présence du gène *CTX* confère une résistance de 100% à Céfotaxime.

Cette résistance peut être due, en raison de la présence des gènes *CTX-M*. Ces gènes codant pour des enzymes particulières (*CTX-M*), représentent actuellement les BLSEs les plus fréquentes au sein des entérobactéries au niveau mondial après une diffusion rapide depuis le milieu des années 90 (Amado-Diallo, 2013 ; Zhuo *et al.*, 2013). Les enzymes *CTX-M* hydrolysent fortement le Céfotaxime, la Céftriaxone plus efficacement que la Céfotaxime (Arafa, 2011). L'acquisition du gène *bla_{CTX-M-15}* par les souches de *K. pneumoniae* s'est probablement réalisée par transfert horizontal à partir d'*E. coli* (Figure 20, chapitre 3) (Elhani *et al.*, 2011). Les Céfotaximases ou *CTX-M* codées par le gène *bla_{CTX-M}* semblent dériver des Céphalosporinases chromosomiques naturelles des bactéries de l'environnement *Kluyvera ascorbata* et *Kluyvera georgiana*, codées respectivement par les gènes *bla_{KLUA}* et *bla_{KLUG}*. Ces *CTX-Ms* sont généralement plus actives vis à vis de la Céftriaxone, Céfotaxime que de la Céfotaxime, cependant des mutations peuvent accroître leur activité contre la Céfotaxime (Bonnet, 2004 ; Poirel *et al.*, 2008 ; Faure, 2009).

2.2. La résistance aux Aminosides

Pour les Aminosides, le taux le plus important a été enregistré pour l'Amikacine (24.28%), suivi de la Gentamycine (15%) (Tableau 19, Figure 37). Des taux de résistance beaucoup plus élevés sont enregistrés au Taiwan, avec 45.9% et 91.1% de résistance à l'Amikacine et à la Gentamycine respectivement (Ma *et al.*, 2009). Par contre, 100% des souches de *K. pneumoniae* étaient sensibles à l'Amikacine dans les études menées par Seck dans le laboratoire de Bactériologie Virologie du CHU Aristide le Dantec (2005). Aussi Al-Tawfik et Amalraj (2007), dans une étude rétrospective de 6 ans ont enregistré des taux de résistance très faibles pour ces deux antibiotiques avec une résistance de 0% (1999) à 6% (2003) pour l'Amikacine et de 4% (1998) à 12% (2009) pour la Gentamycine. Une résistance élevée a été enregistrer vis-à-vis à la Gentamycine avec 69.23% dans la série de Arafa dans le CHU Benbadis à Constantine (Algérie) (2011).

Cette résistance notée vis-à-vis des Aminosides, est probablement due par la présence des variants *aac(6')-Ib*, *aac(3')-II*, qui sont censés avoir une activité élevée contre l'Amikacine et la Gentamycine. Comme peut être due en raison de la présence des méthylases qui agissent sur l'ARNr 16S, par une méthylation (Ma *et al.*, 2009 ; Bjørge *et*

al., 2014). Cette méthylation de l'ARNr 16S a été récemment rapportée chez les bactéries pathogènes pour l'homme. Dix gènes ont été décrits *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC* et *rmtD*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG*, *rmtH* et *npmA* avec prédominance du genre *armA* et *rmtB*. Le gène *armA* a été détecté pour la première fois en 2003 en France chez une souche de *K. pneumoniae* montrant un haut niveau de résistance à tous les Aminosides cliniquement cruciaux. Ce gène était porté sur un plasmide, du groupe d'incompatibilité IncL/M à large spectre d'hôte, capable de répliquer chez les entérobactéries et qui confère également la résistance à Céfotaxime par la production de la β -lactamase CTX-M-3. Le gène *rmtB* a été largement répandu chez les entérobactéries de l'Asie orientale, l'Europe et l'Amérique. Certaines bactéries peuvent exporter les Aminosides grâce à des systèmes d'efflux (Belbel, 2014). La résistance aux Aminosides est associée à la résistance acquise aux β -lactamines. Ramirez et al. (2014), on été rapporté, qu'il y a un transposon (Tn1331) porte plusieurs gènes : *aac(6)-Ib* ; *aadA1* ; *bla_{OXA-9}* et *bla_{TEM-1}* conférant une résistance aux Aminosides (Kanamycines et Tobramycines), aux β -lactamines (Sarno *et al.*, 2002), et d'autres gènes codant pour des facteurs de virulence.

2.3. La résistance aux Quinolones

Concernant la résistance aux Quinolones, le taux de résistance le plus élevé est enregistré à l'Acide Nalidixique (46.05%), suivi du Norfloxacin (40%) en revanche le taux le plus bas a été enregistré avec le Ciprofloxacine (14.89%) (Tableau 19, Figure 37). Un taux de résistance beaucoup plus faible a été déclaré selon le 9^{ème} rapport d'évaluation et de la surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques en Algérie, parmi un total de 653 souches de *K. pneumoniae* isolées 115 ont été résistaient à l'Acide Nalidixique avec seulement 17.6% (Anonyme 2, 2008). Au Mali, selon une étude réalisée par Kone-Diallo (2010), au laboratoire de Bactériologie CVD du Centre Hospitalo-universitaire (CHU) Gabriel Toure, il a enregistré une résistance de 6% à Ciprofloxacine. Par contre, Belbel (2014), a enregistré un taux de résistance à Ciprofloxacine beaucoup plus élevée avec 54% dans les hôpitaux de la ville d'Annaba (Algérie).

K. pneumoniae est naturellement sensible aux Quinolones, l'utilisation abusive de ces molécules en médecine humaine a fait augmenter la résistance de *Klebsiella* spp. aux Quinolones (Tlamçani *et al.*, 2009). Deux principaux mécanismes de résistance aux

Quinolones chez *K. pneumoniae* s'exercent séparément ou en combinaison et confèrent des niveaux de résistance variables :

- la résistance par mutation chromosomique qui est due, soit à la diminution d'affinité des cibles intracellulaires qui sont les complexes ADN-ADN gyrase et ADN-ADN topoisomérase IV (Arafa, 2011), soit à la diminution d'accumulation intracellulaire de l'antibiotique, par défaut de pénétration passive et / ou excrétion active. La perte d'affinité pour la cible provient de modification structurale dans une région appelée la QRDR (Quinolone Resistance Determining Region), où sont trouvées la majorité des mutations responsables de la résistance aux Fluoroquinolones (Belbel, 2014). La première mutation survient généralement au niveau de la topoisomérase pour laquelle la Quinolone a la plus grande affinité, ce qui peut varier en fonction de l'espèce bactérienne et en fonction de la quinolone. Ainsi la cible primaire de la Ciprofloxacine est la sous-unité A de l'ADN gyrase chez les bacilles à Gram négatif tandis que c'est la sous-unité ParC de la topoisomérase IV chez les cocci à Gram positif. Les mutations des topoisomérases de type II confèrent de hauts niveaux de résistance (Cambou et Guillard, 2012).

- la résistance plasmidique est due à la protection de l'ADN gyrase de la fixation des quinolones. Cette résistance est décrite pour la première fois en 1998 aux Etats Unis d'Amérique (USA) chez une souche de *K. pneumoniae* hébergeant un plasmide portant le gène *qnrA* qui code pour une protéine QnrA (Meradi *et al.*, 2009). Un second gène *qnrB*, présentant 49,5 % d'identité avec *qnrA*, a été individualisé récemment et la protéine QnrB présente 39,5 % d'identité avec QnrA (Belbel, 2014). Dernièrement, un autre mécanisme de résistance plasmidique s'effectue par l'inactivation des Quinolones par l'acétyl transférase *aac (6')-Ib-cr*, ce variant confère la résistance simultanée aux Fluoroquinolones est en particulier au Ciprofloxacine (Park *et al.*, 2006 ; Tlamçani *et al.*, 2009).

Le support plasmidique de la résistance aux Quinolones est associée à des intégrons de classe I de type *sul1*, portant des déterminants de résistance à plusieurs autres antibiotiques comme les β -lactamines et / ou les Aminoglycosides (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2006 ; Carattoli, 2009 ; Meradi *et al.*, 2009). Chez *K. pneumoniae* (pHe96) le gène *qnrA3* (*qnrS*), est inséré immédiatement en amont d'une séquence d'insertion (IS26) (Lascols *et al.*, 2008) sur un intégron de classe I avec d'autres gènes y compris: *aac (6')-Ib-cr*, *bla_{OXA-1/30}*, *catB3* et *arr-3*, *dfr*, *aac(6')-Ib* situées successivement en amont du gène *qacE Δ 1* qui sont

tous portés probablement sur le même plasmide (Figure 13, Chapitre 3), conférant une résistance aux: Quinolones (NAL, CIP), β -lactamines (AM, AMC, CTX), Phénicoles (CHL), aux autres antibiotiques : FOS, RIF, Triméthoprimine et aux Aminosides (TOB, KAN, STR), successivement (Pérez-Moreno *et al.*, 2011), et un gène *orf513*, ce dernier codant pour une recombinaison putative impliqué dans l'acquisition des autres gènes de résistance spécifique au site (Lascols *et al.*, 2008).

2.4. La résistance aux Sulfamides

En analysant les résultats de Tableau 19, nous remarquons qu'il y a une résistance élevée pour l'association Triméthoprimine + Sulfaméthoxazole (58.02%). Un résultat très proche a été mentionnés par le 9^{ème} rapport d'évaluation et de la surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques en Algérie, avec 52.3% de résistance à l'association Triméthoprimine + Sulfaméthoxazole 5 (Anonyme 2, 2008). Des résultats élevés sont enregistré dans une étude menée par Ma et al. (2009) à Taiwan, avec un taux de 91.5%. Contrairement à une étude au Maroc faite par Tlamçani et al. (2009), dans un hôpital de spécialité de Rabat, où ils ont enregistré une résistance beaucoup plus faible avec 28%. Pour les Sulfamides, 3 gènes de résistance (*Sul I*, *Sul II*, *Sul III*) codent pour l'enzyme DHPS, la dihydroptéroate-synthétase, conférant une grande résistance (Arafa, 2011).

D'après Cambau et Guillard (2012), Les mécanismes de résistance aux Sulfamides sont les suivants:

- Diminution de concentration intra-bactérienne de Sulfamides : ceci est dû soit à la diminution de la perméabilité de la paroi des bactéries à Gram négatif par diminution quantitative des porines, soit à l'hyper-expression des pompes d'efflux de type RND (résistance, nodulation et division cellulaire). Ces mécanismes ne sont pas spécifiques des Sulfamides car ils concernent aussi l'influx et l'efflux d'autres molécules de petit poids moléculaire, plutôt hydrophiles comme les bêta-lactamines, les Aminosides et les Quinolones. Des mutations dans les gènes de régulation de la synthèse d'OmpF (opéron Mar) ou de l'expression de pompes d'efflux constitutives (opéron Acr) sont classiquement observées chez les entérobactéries. Le support de cette résistance est chromosomique.

- Production d'enzymes DHPS résistantes à l'action des Sulfamides : ces enzymes sont codées par des gènes (*sul1*, *sul2*, *sul3*) acquis à partir d'autres cellules et transférés via des transposons ou structures génétiques de type intégron. Le gène *sul1* caractérise les

intégrons de classe 1 au sein de transposons souvent portés par des plasmides de multi-résistance aux antibiotiques.

- Hyperproduction de DHPS (DiHydroPtéroate-Synthétase).

2.5. La résistance aux Macrolides

Nos résultats offrent des taux de résistances inquiétants pour la famille des Macrolides, y compris le Lincomycine avec une résistance totale (100%), suivi par l'Erythromycine (87.50%), Spiramycine avec un taux de 46.44% et Clindamycine 44.44% (Tableau 19, Figure 37). Des résultats proches ont été recueillis, par Bokaeian et al. (2014), qui ont trouvé que parmi 30 souches de *K. pneumoniae* isolée à partir de l'urine des patients hospitalisés à l'hôpital de Mir (Iran) sont résistantes à l'Erythromycine (70%).

D'après Seck (2005), une des caractéristiques des bacilles à Gram négatifs est d'être résistant spontanément aux Macrolides et aux substances apparentées. La résistance acquise est due à des plasmides qui codent pour la sécrétion d'une méthylase, qui elle-même va induire l'altération du l'ARN ribosomale 23S. L'existence de mutants chromosomique résistants a été prouvée. Fayaiz et al. (2002), ont été rapporté que la résistance aux Macrolides est due soit à une diminution de la perméabilité de l'antibiotique à travers l'enveloppe cellulaire, par une production d'une enzyme méthylase qui modifie la cible ribosomale ce qui réduit la liaison des Macrolides aux ribosomes, ou par production des estérases qui hydrolysent les Macrolides.

Un plasmide multi-résistant (pKP048) appartenant au groupe F d'incompatibilité (IncF) a été détecté chez une souche hospitalière de *K. pneumoniae* (KP048), isolée à partir d'un échantillon d'expectoration. Dans ce plasmide on trouve le gène Mph2 codant pour une enzyme 2'-phosphotransférase, celui-ci confère une résistance aux Macrolides (Figure 5, Chapitre 3) (Yan Jiang *et al.*, 2010).

2.6. La résistance à la famille de Tétracyclines

La résistance à la Tétracycline dans le présent travail est 66.66% (Tableau 19, Figure 37). Ce résultat est proche aux résultats obtenus par Bokaeian et al. (2014), qui ont déclarés que 30 souches de *K. pneumoniae* isolée à partir de l'urine des patients hospitalisés à l'hôpital de Mir (Iran) sont résistantes à la Tétracycline (50%). D'après Bokaeian et al. (2014), cette

résistance peut être issu par l'existence des gènes *tetA* et *tetB*, qui sont généralement portés sur des plasmides conjugatifs.

La résistance à la Tétracycline est médiée par quatre mécanismes essentiels: Le système d'efflux, la protection du ribosome, l'inactivation enzymatique, et la modification de la cible. À l'heure actuelle, 23 des gènes codant pour des pompes d'efflux et 11 gènes codant pour des protéines de protection ribosomiques, ont été rapportés (Bokaeian *et al.*, 2014). Pour les autres antibiotiques, on enregistre une résistance inquiétante pour la Fosfomycine (75%), ainsi qu'à la Colistine avec 39.21% (Tableau 19, Figure 37). Des résultats contradictoires ont été rapportés par Belbel dans les hôpitaux de la ville d'Annaba (2014), où elle déclarer que toutes les souches de *K. pneumoniae* (100%) étaient sensibles à la Colistine.

La Ciprofloxacin et la Gentamycine, se sont montrées très efficaces dans cette étude avec respectivement des taux de sensibilité de 85.11% et 85% vis-à-vis de *Klebsiella* spp.

3. Evolution de la résistance aux antibiotiques de *Klebsiella* spp. de 2007 à 2013

L'évolution de la résistance aux antibiotiques des souches de *Klebsiella* spp. a été étudié.

Les résultats sont représentés dans le Tableau 20 et la Figure 38.

Tableau 20: Evolution de l'antibiorésistance de *Klebsiella* spp. isolée à l'hôpital de Mila, de 2007 à 2013

Années	β-lactamines				Aminosides	Quinolones	Sulfamides	Autres
	AM	AMC	CTX	CZ	AN	NA	SXT	CS
2007	100%	88,88%	10%	/	16,66%	50%	61,90%	26,92%
2008	83,33%	83,33%	9,09%	62,50%	50%	40%	33,33%	50%
2009	80%	66,66%	50%	60%	42,85%	71,42%	71,42%	40%
2012	97,87%	96,22%	36,73%	84,09%	28,57%	45,65%	56%	60%
2013	100%	100%	14,28%	88,88%	40%	20%	/	/

AM : Ampicilline, AMC : Amoxicilline + Acide Clavulanique, CTX : Céfotaxime, CZ : Céfazoline, AN : Amikacine, NA : Acide Nalidixique, SXT : Triméthoprime + Sulfaméthoxazole, CS : Colistine.

Au cours des années de l'étude de nos collègues de la promotion 2007-2013, la résistance à l'Ampicilline ne subit pas des variations importantes (80%-100%). Des résultats semblables ont été enregistrés dans une étude faite par Farah et al. (2007), avec une résistance de 98.4% à l'Ampicilline. Selon Belbel (2014), *K. pneumoniae* résiste naturellement à l'Ampicilline et aux Carbénicillines par production de pénicillinase chromosomique.

Pour la résistance à l'association Amoxicilline + Acide Clavulanique, elle diminue de 88.88% en 2007 à 66.66% en 2009, ensuite elle augmente jusqu'à 100% en 2013. Ce taux de résistance est élevé par rapport à celui rapporté par Tlamçani et al. (2009), qui ont enregistré 50% de résistance de *Klebsiella* spp. à l'association Amoxicilline + Acide Clavulanique, et celles de Farah et al. (2007), avec un taux de résistance de 52.4%. Ce taux de résistance remarqué peut être due à la présence de bêta-lactamase de type TRI (pour TEM résistant aux inhibiteurs).

L'évolution de la résistance à la Céfazoline était en augmentation progressive de 62.5% en 2008 à 88.88% en 2013. Notre fréquence élevée est probablement due soit à l'acquisition d'une pénicillinase plasmidique de haut niveau, soit à une hyperproduction de la SHV-1 chromosomique, suite à une mutation du promoteur d'où une augmentation de l'expression du gène.

On observe une évolution progressive de la résistance à Céfotaxime de 10% en 2007, jusqu'à 50% en 2009 puis elle revient à diminuer jusqu'à 14.28% en 2013. Farah et al. (2007), ont enregistré une résistance de 37% à Céfotaxime. Cette résistance peut être conférée par l'acquisition du gène *CTX-M* chez *Klebsiella* spp. L'acquisition du gène *bla_{CTX-M-15}* par les souches de *K. pneumoniae* s'est probablement réalisée par transfert horizontal à partir d'*E. coli* (Figure 20, Chapitre 3) (Elhani *et al.*, 2011). Ces CTX-Ms sont généralement plus actives vis à vis de la Céftriaxone, Céfotaxime que de la Céfotaxime, cependant des mutations peuvent accroître leur activité contre la Céfotaxime (Bonnet, 2004 ; Poirel *et al.*, 2008 ; Faure, 2009).

Nos résultats ont montrés une augmentation suivie par une diminution de la résistance à l'Amikacine de 50% en 2008 jusqu'à 28.57% en 2012, puis s'élève à 40% en 2013 (Tableau 20, Figure 38). Ce nouveau phénotype de résistance est probablement due par la présence des variants *aac(6')-Ib*, *aac(3')-II*, qui sont censés avoir une activité élevée contre

l'Amikacine et la Gentamycine. Comme peut être due en raison de la présence des méthylases qui agissent sur l'ARNr 16S, par une méthylation (Ma *et al.*, 2009). Cependant, dans une étude en Norvège sur des isolats cliniques de *Klebsiella* spp. productrices de BLSE, aucune réduction de la sensibilité observé à l'Amikacine. Ça peut donner à penser que cet agent peut être utile pour le traitement des infections causées par des isolats producteurs de BLSE (Björg *et al.*, 2014). Ces taux de résistance est d'autant plus inquiétant, puisque l'Amikacine est considérée comme un aminoside de premier choix dans le traitement des infections nosocomiales à *K. pneumoniae* et surtout à *K. pneumoniae* BLSE+ (Arafa, 2011).

Une augmentation de la résistance à l'Acide Nalidixique (NA) était remarquée au niveau de l'hôpital de Mila de 50% (2007) à 71.42% (2009). Ce résultat concorde à celui de Ben Haj Khalifa et Khedher (2010), qui ont rapportés que la résistance aux Quinolones a connu ces dernières années une augmentation importante. D'après Lascols et al. (2008), cela, est probablement due en raison de la présence du gène *aac(6')Ib-cr* qui confère une résistance aux Quinolones (NAL, CIP). L'enzyme AAC (6')-Ib-cr est caractérisée par deux mutations (Trp104Arg et Asp181Tyr) qui entraînent d'une part une diminution de la résistance aux Aminosides, mais aussi une résistance à la Ciprofloxacine et à la Norfloxacine par N-acétylation du groupement amine secondaire du cycle pipérazinyl (Cambou et Guillard, 2012).

La résistance à l'association Triméthoprim + Sulfaméthoxazole (SXT) a subi des variations instables pendant les années d'étude (Figure 38). Cela est probablement dû à la présence des gènes (*Sul I*, *Sul II*, *Sul III*) codants pour l'enzyme DiHydroPtéroate-Synthétase (DHPS), qui confère une grande résistance (Arafa, 2011).

4. Incidence de la résistance aux antibiotiques de *K. pneumoniae* isolée à l'hôpital de Mila de Janvier 2014 à Février 2015.

Tableau 21: Antibiorésistance totale de 30 souches de *K. pneumoniae* isolées à l'hôpital de Mila de 2014 à 2015.

Familles	Antibiotiques	% de résistance
β-lactamines	AM	80
	AMC	93.33
	AMX	100
	CTX	33.33
	FOX	50
	IPM	28.57
	OX	100
	P	100
Aminosides	AN	18.18
	GN	0
Quinolones	CIP	14.28
	NA	50
Polypeptides	CS	21.42
Sulfamides	SXT	73.33
Glycopeptides	VAN	100
Autres	FA	100
	FOS	27.27
	RIF	50

AM : Ampicilline, **AMC** : Amoxicilline + Acide Clavulanique, **AMX** : Amoxicilline, **CTX** : Céfotaxime, **FOX** : Céfoxitine, **IPM** : Imipénème, **OX** : Oxacilline, **P** : Pénicilline, **AN** : Amikacine, **GN** : Gentamycine, **CIP** : Ciprofloxacine, **NA** : Acide Nalidixique, **CS** : Colistine, **SXT** : Triméthoprime + Sulfaméthoxazole, **VAN** : Vancomycine, **FA** : Acide Fusidique, **FOS** : Fosfomycine, **RIF** : Rifampicine.

La résistance aux β -lactamines :

L'étude de la résistance des 30 souches de *K. pneumoniae* révèle des taux de résistance très élevés pour la famille des β -Lactamines. En effet, une résistance totale (100%) pour l'Amoxicilline, l'Oxacilline et la pénicilline est observée. Aussi, une résistance de 93.33% à l'Amoxicilline + Acide Clavulanique et 80% à l'Ampicilline (Tableau 21, Figure 39) est remarquée. Des résultats proches en ont été mentionnés par Arafa et al. (2009), à l'hôpital universitaire de Constantine (Algérie), où 52 souches de *K. pneumoniae* ont été testées et présentaient une résistance de 100% à l'Amoxicilline et 81% à l'Amoxicilline + Acide Clavulanique. Également, Belbel (2014), dans les hôpitaux de la ville d'Annaba a rapporté une résistance de 81.2% pour l'association Amoxicilline + Acide Clavulanique. De même, Farah et al. (2007), dans les hôpitaux de la ville d'Annaba (hôpital Dorban, hôpital Ibn Rochd et hôpital Ibn Sina), ont enregistré une résistance de 100% à l'Amoxicilline. De plus, le laboratoire de microbiologie de l'hôpital Verge de la Cinta (Tortosa, Catalogne, Espagne) en 2005 a révélé un taux élevé de diminution de la sensibilité à l'Amoxicilline + Acide Clavulanique (AMC) (Pérez-Moreno *et al.*, 2011).

Un résultat contradictoire a été déclaré par le 9^{ème} rapport d'évaluation et de la surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques en Algérie, avec seulement 45.8% de résistance à l'association Amoxicilline + Acide Clavulanique et 5.3% de résistance à Céfoxitine (Anonyme 2, 2008). Aussi, dans une étude rétrospective observationnelle, s'étalant sur une période de 3 mois (du 1^{er} Août au 30 Octobre 2011), qui a inclus 32 patients ayant bénéficié d'une consultation pré-anesthésique (CPA) pour un geste chirurgical et hospitalisés pendant plus de 48H dans le service d'urologie de l'Hôpital Militaire d'Instruction Med V de Rabat, il a été enregistré une résistance de 50% à l'Amoxicilline + Acide Clavulanique chez *K. pneumoniae* (Anonyme 5, 2011).

Un taux de résistance trop élevé a été observé pour le Céfoxitine (50%). Ce résultat est en désaccord avec celui de Arafa et al. (2009), à l'hôpital universitaire de Constantine et ceux de Belbel (2014), dans les hôpitaux d'Annaba avec une résistance trouvée de 0% et 5% respectivement. Aussi le 9^{ème} rapport d'évaluation et de la surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques (Algérie), enregistre un taux de résistance trop faible par rapport à notre résultat avec 0.5% seulement de résistance à Céfoxitine (Anonyme 2, 2008).

Inhabituellement, il a été remarqué une résistance inquiétante pour l'Imipénème et le Céfotaxime 28.57% (4/14 des souches) et 33.33% (5/15 des souches) respectivement. Dans une étude faite dans un grand hôpital au nord d'Italie, ils ont mentionnées que 52 souches de *K. pneumoniae* (KPC positive) résistaient à tous les β -lactamines y compris: l'Imipénème, le Céfotaxime et la Colistine (Gaibani *et al.*, 2011). La première *K. pneumoniae* Carbapénémase (KPC), a été isolée en 2001 au nord Carolina (USA) (Lomaestro *et al.*, 2006), d'autres endémies de *K. pneumoniae* Carbapénémase (KPC), ont été déclaré aux : Etats Unis d'Amérique, Colombia, Israël, Grèce, Chine et en Italie (Nordmann *et al.*, 2011 ; Giani *et al.*, 2013). Le taux de résistance à l'Imipénème de la présente étude est remarquablement trop élevé par rapport aux résultats obtenus par Ma *et al.* (2009), qui ont remarqués que parmi 235 souches de *K. pneumoniae* collectées à partir d'une surveillance nationale effectuée à Taiwan, seulement 2 souches sont résistantes à l'Imipénème (2.1%). Aussi, Camara *et al.* (2013), dans un hôpital universitaire le Dantec Dakar au Sénégal, ont mentionnés un taux de résistance de 3.8% à l'Imipénème.

Par contre, le présent résultat est différent de ceux trouvés par Tlamçani *et al.* (2009), Arafa *et al.* (2009), Kabbaj *et al.* (2012) et Belbel (2014), qui ont tous trouvés que tous les isolats testés étaient sensible à 100% à l'Imipénème. Ivanov et Egorov (2008), sont aussi trouvés que parmi un total de 212 *Klebsiella* spp. isolées des patients atteints des infections nosocomial qui ont été traités en réanimation et unités de soins intensifs (USI) et d'autres unités de centres médicaux de diverses villes russes, sont tous sensibles 100% à l'Imipénème. Une autre étude menée par Al-Tawfiq et Amalraj (2007), en Arabie Saoudite sur une période de 6 ans (1998-2003), 3070 *K. pneumoniae* ont été isolées et sont tous sensible 100% à l'Imipénème.

La résistance aux Aminosides :

Concernant les Aminosides, il est observé une résistance à l'Amikacine de 18.18% (Tableau 21, Figure 39). Nos résultats sont proches de ceux de Zamani *et al.* (2012), à l'hôpital Hamadan (Iran), qui ont enregistré un taux de résistance de 25.71% à l'Amikacine, et aux ceux déclarés par le 9^{ème} rapport d'évaluation et de la surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques (Algérie), avec 24% de résistance à l'Amikacine (400/1661 souches de *K. pneumoniae*) (Anonyme 2, 2008). Aussi, Ben Haj Khalifa et Khedher (2010), dans l'hôpital universitaire Tahar Sfar de Mahdia (Tunisie) ont

enregistré seulement une résistance de 4%. Belbel (2014), a enregistré un taux beaucoup plus élevé (51%) de résistance à l'Amikacine. Quand à Farah et al. (2007), ils mentionnés une résistance de 35.7% à l'Amikacine. Aussi, Camara et al. (2013), dans l'hôpital universitaire le Dantec Dakar au Sénégal ont enregistré 41% de résistance à l'Amikacine. Par contre, Seck (2005), a été enregistré une sensibilité totale à l'Amikacine dans le laboratoire de Bactériologie Virologie du CHU Aristide le Dantec (Sénégal).

En ce qui concerne la Gentamycine, c'est l'une des molécules gardant le taux de sensibilité le plus élevé (100%). Cela est différent avec les prévalences observés en Tunisie, dans l'hôpital universitaire Tahar Sfar de Mahdia, où il a été observé un taux de résistance plus élevé à la Gentamycine avec 65% (Ben Haj Khalifa et Khedher, 2010), aux hôpitaux d'Annaba (hôpital Dorban, hôpital Ibn Rochd et hôpital Ibn Sina) en Algérie, avec une résistance de 50.7% (Farah *et al.*, 2007) et a l'hôpital universitaire le Dantec Dakar au Sénégal avec 78.6% de résistance à la Gentamicine (Camara *et al.*, 2013).

La résistance aux Quinolones :

Concernant la résistance aux Quinolones, le taux de résistance le plus élevé est enregistré à l'Acide Nalidixique (50%). Un résultat semblable a été mentionné par Seck (2005), dans le laboratoire de Bactériologie Virologie du CHU Aristide le Dantec au Sénégal avec 50% de résistance à l'Acide Nalidixique. De même, un résultat proche a été enregistré par Souna (2011) dans le CHU de Sidi Bel Abbes (Algérie), avec 66.7%. Le laboratoire de microbiologie de l'hôpital Verge de la Cinta (Tortosa, Catalogne, Espagne) en 2005 a révélé un taux de résistance de 57.9% à l'Acide Nalidixique (Pérez-Moreno *et al.*, 2011). Contrairement, Zamani et al. (2012), dans une étude en Iran, ils ont observé un taux de résistance plus faible de 28.57% à l'Acide Nalidixique. En revanche, le taux de résistance le plus bas est enregistré avec Ciprofloxacine (14.28%) (Tableau 21), ce taux est proche à celui mentionné par Zamani et al. (2012), qui ont trouvé 23.81% de résistance à la Ciprofloxacine; également, le laboratoire de microbiologie de l'hôpital Verge de la Cinta (Tortosa, Catalogne, Espagne) en 2005 a révélé une résistance de 26.3% à Ciprofloxacine (Pérez-Moreno *et al.*, 2011). D'autre part, Seck (2005) et Arafa et al. (2009), ont remarqué une sensibilité totale (100%) à la Ciprofloxacine dans le laboratoire de Bactériologie Virologie Artisid le Dantec au Sénégal et le CHU Benbadis de Constantine respectivement.

Par ailleurs, vis-à-vis des Sulfamides, un taux de résistance de 73.33% a été détecté pour l'association Triméthoprim + Sulfaméthoxazole. Ce taux est proche à celui mentionné par Farah et al. (2007), avec 67.3% de résistance à l'association Triméthoprim + Sulfaméthoxazole.

En ce qui concerne les Polypeptides, ont a enregistré une résistance de 21.42% à la Colistine. Par contre, aucune résistance n'a été observée pour la Colistine (100% de souches sensibles), dans une étude menée par Souna (2011). Notons également une résistance totale à la Vancomycine (100%). Dans une étude faite dans un grand hôpital au nord d'Italie, il a été mentionnés que 52 souches de *K. pneumoniae* (KPC positive), résistaient à tous les β -lactamines y compris : l'Imipénème, le Céfotaxime et la Colistine (Gaibani *et al.*, 2011).

Concernant les autres antibiotiques, les taux de résistance étaient les suivant : 100% pour l'Acide Fusidique, 50% pour le Rifampicine et 27.27% pour le Fosfomycine, ce qui présente un fort risque d'échec thérapeutique.

5. Analyse spatiale de la résistance aux antibiotiques de *Klebsiella* spp.

Tableau 20: Evolution de l'antibiorésistance de *Klebsiella* spp. isolée à l'hôpital de Mila, de 2007 à 2013.

Années	β-Lactamines			Aminosides	Quinolones	Sulfamides	Polypeptides
	AM	AMC	CTX	AN	NA	SXT	CS
2007	100%	88.88%	10%	16.66%	50%	61.90%	26.92%
2008	83.33%	83.33%	9.09%	50%	40%	33.33%	50%
2009	80%	66.66%	50%	71.42%	71.42%	71.42%	40%
2012	97.87%	96.22%	36.73%	28.57%	45.65%	56%	60%
2013	100%	100%	14.28%	40%	20%	55.66%	44.23%

AM : Ampicilline, **AMC** : Amoxicilline + Acide Clavulanique, **CTX** : Céfotaxime, **AN** : Amikacine, **NA** : Acide Nalidixique, **SXT** : Triméthoprim + Sulfaméthoxazole, **CS** : Colistine.

La Matrice de corrélation avec coefficient de Pearson (n) est représentée dans le Tableau 22.

Tableau 22 : Matrice de corrélation de Pearson (n)

Variables	AM	AMC	CTX	AN	NA	SXT	CS
AM	1						
AMC	0,848	1					
CTX	-0,331	-0,460	1				
AN	-0,914	-0,561	0,177	1			
NA	-0,442	-0,804	0,759	0,081	1		
SXT	0,115	-0,366	0,670	-0,454	0,839	1	
CS	-0,105	0,333	0,287	0,427	-0,373	-0,434	1

AM : Ampicilline, **AMC** : Amoxicilline + Acide Clavulanique, **CTX** : Céfotaxime, **AN**: Amikacine, **NA** : Acide Nalidixique, **SXT** : Triméthoprim + Sulfaméthoxazole, **CS** : Colistine.

Tableau 23: Vecteurs propres

	F1	F2
AM	-0,398	-0,420
AMC	-0,504	-0,098
CTX	0,405	-0,086
AN	0,238	0,581
NA	0,505	-0,236
SXT	0,320	-0,508
CS	-0,098	0,393

Tableau 24 : Valeurs propres

	F1	F2
Valeur propre	3,404	2,383
Variabilité (%)	48,629	34,046
% cumulé	48,629	82,675

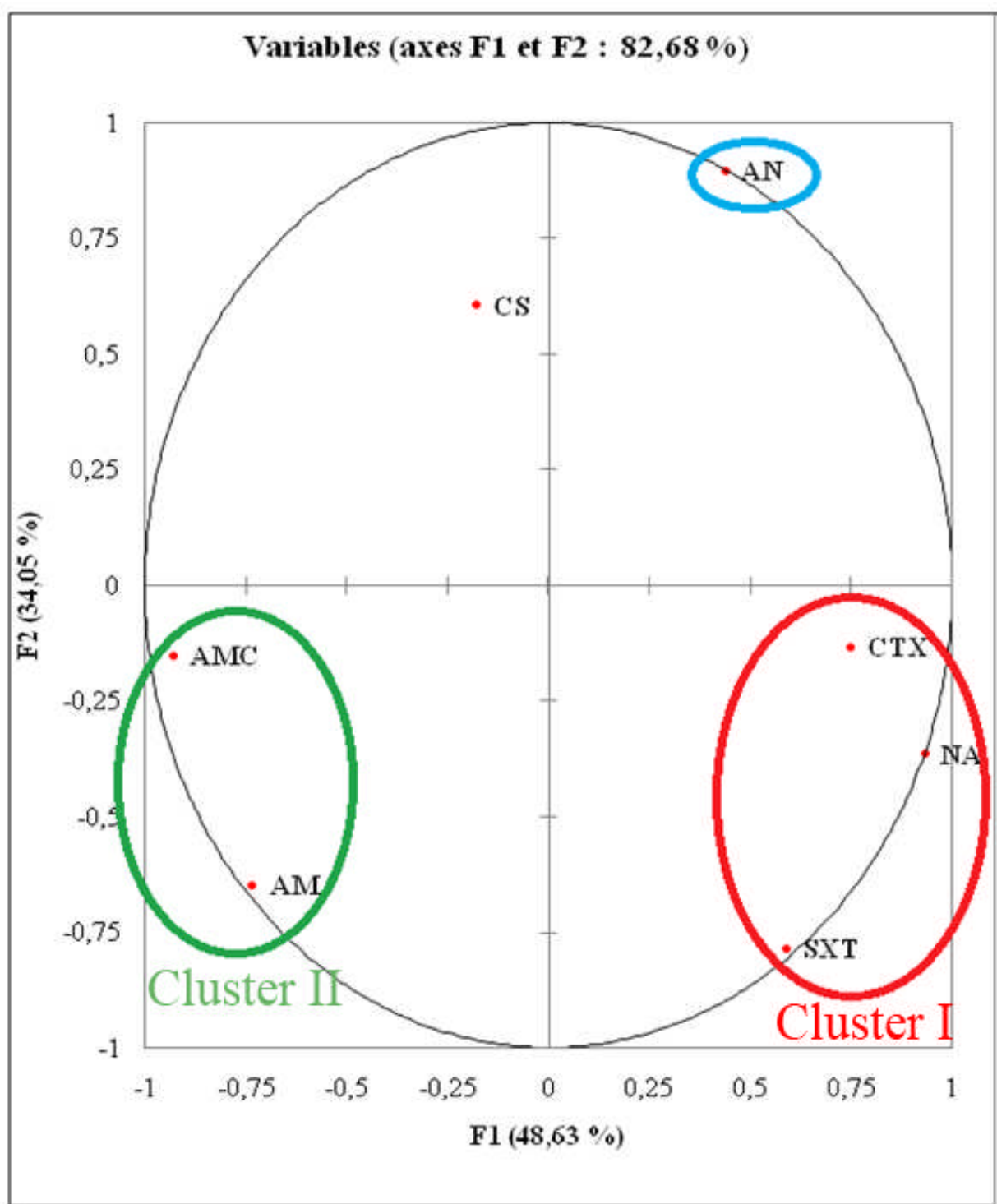


Figure 40 : Analyse spatiale de la résistance aux antibiotiques de *Klebsiella* spp. par ACP à l'hôpital de Mila (2007/2013).

AM : Ampicilline, AMC : Amoxicilline + Acide Clavulanique, CTX : Céfotaxime, AN : Amikacine, NA : Acide Nalidixique, SXT : Triméthoprime + Sulfaméthoxazole, CS : Colistine.

Dans l'Analyse en Composantes Principales (ACP) montrés dans la Figure 40, deux clusters principaux sont remarqués, regroupant des antibiotiques manifestant un comportement spatial similaire. Le premier cluster, localisé dans la partie Sud-Est du graphique regroupe le Céfotaxime (CTX), l'Acide Nalidixique (NA) et l'association Triméthoprième + Sulfaméthoxazole (SXT), et le second cluster regroupe l'association Amoxiciline + Acide Clavulanique (AMC) et l'Ampicilline (AM), situé dans la partie Sud-Ouest. L'Amikacine (AN) et la Colistine (CS) présentent un comportement spatiale différent, ils sont isolés du reste des antibiotiques et situés dans la partie Nord.

Dans le Cluster I, les antibiotiques Céfotaxime (CTX) de la famille des β -lactamines, Acide Nalidixique (NA) de la famille des Quinolones et l'association Triméthoprième + Sulfaméthoxazole (SXT) de la famille des Sulfamides ont montré un comportement spatial similaire. Ces couples d'antibiotiques ont présenté des valeurs de corrélation importantes (NA et SXT : $r = 0.839$; CTX et NA : $r = 0.759$; CTX et SXT : $r = 0.670$). Ce résultat est en agrément avec les données de la littérature qui ont montré que les gènes *aac(6')-Ib-cr*, *bla_{OXA-1/30}*, *catB3*, *arr-3*, *dfr* et *aac(6')-Ib* sont situés successivement en amont du gène *qacE Δ 1* et sont tous portés sur un intégrons de classe I, est probablement sur le même plasmide (Figure 13, Chapitre 3), conférant une résistance aux Quinolones (NAL, CIP), aux β -lactamines (AM, AMC, CTX), aux Phénicoles (CHL), aux antibiotiques : FOS, RIF, à la Triméthoprième et aux Aminosides (TOB, KAN, STR), successivement (Lascols *et al.*, 2008 ; Pérez-Moreno *et al.*, 2011). De plus, le support plasmidique de la résistance aux Quinolones est associée à des intégrons de classe I de type *sul1*, portant des déterminants de résistance à plusieurs autres antibiotiques comme les β -lactamines et/ou les Aminoglycosides (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2006 ; Carattoli, 2009 ; Meradi *et al.*, 2009). De même, dans le plasmide pKOX-R1 (Figure 8, Chapitre 3), on trouve que les deux gènes *qnrS1* et *sul2* sont porté sur un même plasmide et la distance génétique entre les deux est courte, ce qui concorde bien avec les résultats de l'ACP, où il a été observée une corrélation élevée entre (NA) et (SXT) avec $r = 0.839$.

Par contre, dans un autre plasmide pKpn2146b étudié en Californie (Etat Unis d'Amérique) (Figure 22, Chapitre 3), il est remarqué que les deux gènes *sul2* (codant pour la résistance aux Sulfonamides) et *QnrB9* (codant pour la résistance aux Quinolones et aux Fluoroquinolones) sont très éloignés ce qui contraste avec les résultats obtenus (Hudson *et*

al., 2014). D'autre part, dans le plasmide pKOX-R1 on trouve que les gènes *qnrS1*, *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{TEM1} sont très éloigné (Huang *et al.*, 2013) le même constat est fait dans le plasmide pKpn2146b où la distance génétique entre les deux gènes *QnrB9* et *bla*_{CTX-M15} est grande ceci est incompatible avec les résultats de l'ACP où il a été trouvé une corrélation importante entre l'Acide Nalidixique (NA) et le Céfotaxime (CTX) avec $r = 0.759$. L'explication la plus probable de ces points de divergence est la différence géographique des isolats bactériens (Environnement, type de maladie, service hospitalier et profil génétique du microorganisme, etc.).

Dans le Cluster II, l'AM (Ampicilline) et AMC (Amoxicilline + Acide Clavulanique) ont présenté un coefficient de corrélation important et positif ($r = 0.848$). En effet, ces deux antibiotiques appartiennent à la même famille qui est la famille des β -lactamines. Pool (2004), a rapporté que les gènes codants pour les β -lactamases sont chromosomiques ou plasmidiques. D'après les résultats obtenus par Jain et Mondal (2008), il peut être dit que le gène *bla*_{SHV} seul confère à *K. pneumoniae* une résistance à plusieurs antibiotiques, y compris : l'Ampicilline et l'Amoxicilline + Acide Clavulanique à la fois, donc un même gène (*bla*_{SHV}) confère la résistance à ces deux antibiotiques, ce qui explique le comportement spatiale similaire et la corrélation positive entre ces deux antibiotiques.

Malgré que le CTX (Céfotaxime) situé dans le Cluster I est appartient à la famille des β -lactamines, il a montré un comportement spatial différent à celui de l'AM (l'Ampicilline) et l'AMC (l'Amoxicilline + Acide Clavulanique) (Cluster II), avec des coefficients de corrélation importants et négatifs avec $r = -0.331$ et $r = -0.460$ respectivement. L'explication la plus probable de la distribution spatiale éloigné de cluster II (AMC et AM) par rapport au cluster I (CTX, NA et SXT) est la localisation chromosomique du gène SHV codant pour la résistance aux β -lactamines (Chaves *et al.*, 2001 ; Jain et Mondal, 2008 ; Kumar *et al.*, 2011 ; Hudson *et al.*, 2014), différente à la localisation plasmidiques du gène *bla*_{OXA-130} codants pour la résistance aux β -lactamines (CTX), qui est porté sur des intégrons de classe I avec d'autres phénotypes de résistance (Pérez-Moreno *et al.*, 2011). Les résultats obtenus par Chaves et al. (2001), appuient fortement l'hypothèse que l'ancêtre de la β -lactamase SHV-1 provenait du chromosome de *K. pneumoniae*.

Pour l'Amikacine (AN) de la famille des Aminosides, il a montré les corrélations suivantes par rapport au cluster I : entre l'Amikacine (AN) et le Céfotaxime (CTX), $r = 0.177$; entre l'Amikacine (AN) et l'Acide Nalidixique (NA), $r = 0.081$ et entre l'Amikacine (AN) et SXT, $r = -0.454$. Ce résultat concorde aux données de la littérature où les 3 gènes *armA* codant pour les aminosides, *bla_{DHA-1}* codant pour les céphalosporines et *qnrB4* codant pour les quinolones sont situés successivement sur un plasmide multi-résistant pKP048 étudié en Chine (Figure 5, Chapitre 3) appartenant au groupe F d'incompatibilité (IncF), et conférant une résistance aux Aminoglycosides, aux β -lactamines (Céphalosporines) et aux Quinolones respectivement (Yan Jiang *et al.*, 2010). En effet, la succession des 3 gènes confirmée dans le plasmide pKP048 est semblable à celle trouvée dans l'ACP. Selon la cartographie du pKP048, le premier gène est l'*armA* suivi par le gène *bla_{DHA-1}* conférant une résistance aux Aminosides et aux céphalosporines qui font partie de la famille des β -lactamines respectivement, la distance génétique entre ces deux gènes est moyenne, ce qui concorde bien avec les résultats de l'ACP (le coefficient de corrélation entre AN et CTX : $r = 0.177$). Ramirez *et al.* (2014), ont montré que le Tn1331 porte plusieurs gènes : *aac(6)-Ib* ; *aadA1* ; *bla_{OXA-9}* et *bla_{TEM-1}* conférant une résistance aux Aminoglycosides (Kanamycines et Tobramycines) et aux β -lactamines (Sarno *et al.*, 2002). De plus, une autre étude réalisée par Belbel (2014), aux hôpitaux d'Annaba, a montré après PCR et séquençage que le gène *armA* (conférant une résistance élevée aux Aminosides) et le gène *CTX-M-15* (codant pour une BLSE) sont présents chez tous les transcojugants, ce qui suggère que ces deux gènes sont portés par un même plasmide conjugatif.

Dans le plasmide pKP048, il a été observé que la distance génétique entre les deux gènes *bla_{DHA-1}* et *qnrB4* est très courte ceci est en accord avec les résultats de l'ACP, dont la corrélation est élevée entre CTX et NA avec $r = 0.759$. Cependant, selon Yan Jiang *et al.* (2010), la distance génétique entre les deux gènes *armA* et *qnrB4* est éloignée ce qui marche bien avec les résultats de l'ACP, où le coefficient de corrélation entre AN et NA, $r = 0.081$.

D'après les résultats de l'ACP, on trouve qu'il y a une faible corrélation entre AN (la famille des Aminosides) et SXT (la famille de Sulfamide) avec $r : (AN, SXT) = -0.454$, ce qui est en contraste aux données rapportées par Hudson *et al.* (2014), où les gènes *sul2* (codant pour la résistance aux Sulfonamides) *strA* et *strB* (codants pour la résistance à la

Streptomycine qui fait partie de la famille des Aminocyclitolides) sont situés côte à côte. Ce point de divergence peut être attribué à la différence géographique des souches.

La Colistine (CS) qui fait partie de la famille de Polypeptides, montre un comportement spatial isolée à ceux des autres antibiotiques, cela peut indiquer que le déterminant génétique de cet antibiotique pourrait être éloigné ou portée sur des supports génétiques différents à ceux des autres antibiotiques étudiés (AN, CTX, NA, SXT, AM et AMC).

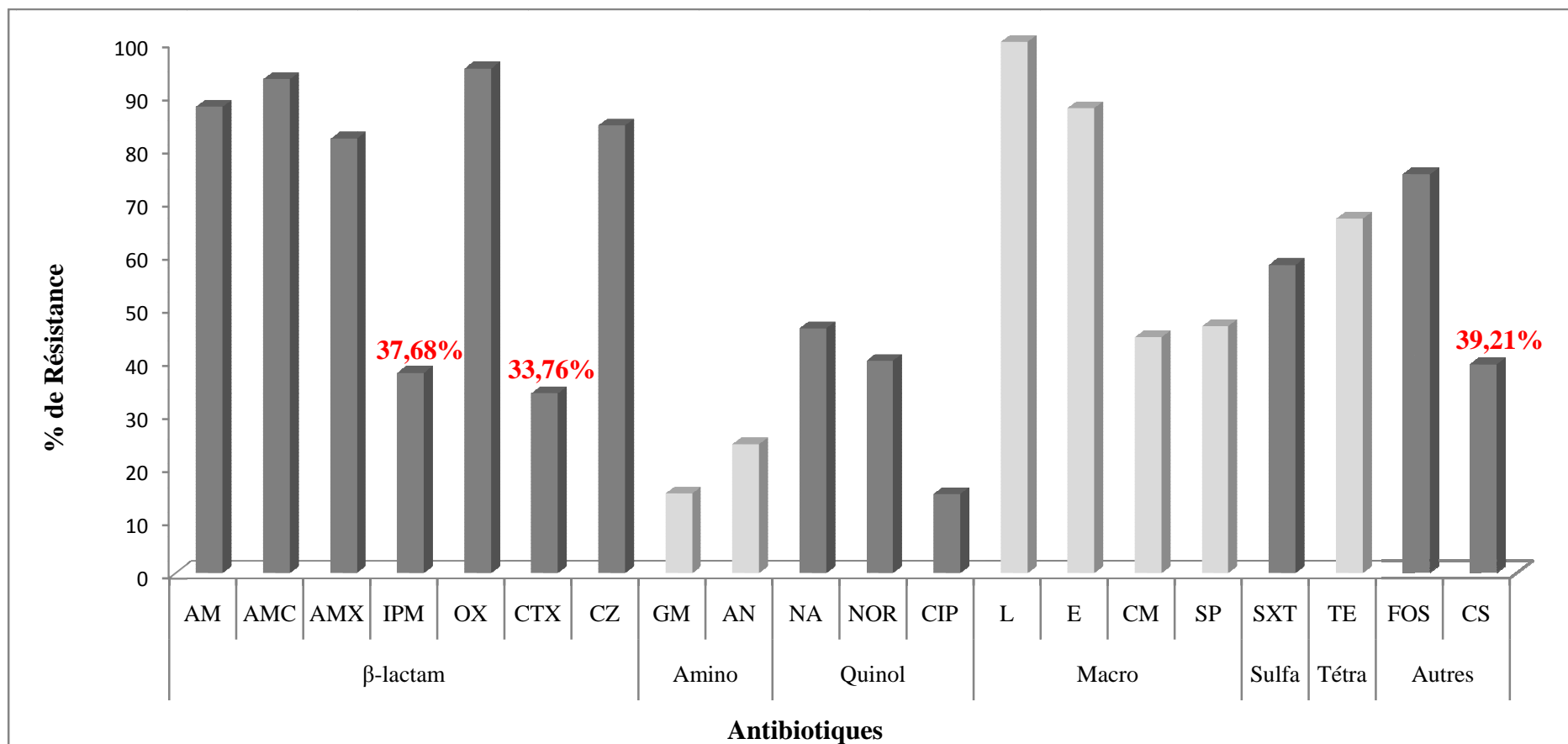


Figure 37 : Antibiorésistance de *Klebsiella* spp. isolées à l’hôpital de Mila de 2007 à 2013.

β-lactam : β-lactamine, **Amino :** Aminosides, **Quinol :** Quinolones, **Macro :** Macrolides, **Sulfa :** Sulfamides, **Tétra :** Tétracyclines, **AM :** Ampicilline, **AMC :** Amoxicilline + Acide Clavulanique, **AMX :** Amoxicilline, **IPM :** Impénème, **OX :** Oxacilline **CTX :** Céfotaxime, **CZ :** Céfazoline, **GM :** Gentamycine, **AN :** Amikacine, **NA :** Acide Nalidixique, **NOR :** Norfloxacin, **CIP :** Ciprofloxacine, **L :** Lincomycine, **E :** Erythromycine, **CM :** Clindamycine, **SP :** Spiramycine, **SXT :** Triméthoprime + Sulfaméthoxazole, **TE :** Tétracycline, **FOS :** Fosfomycine, **CS :** Colistine.

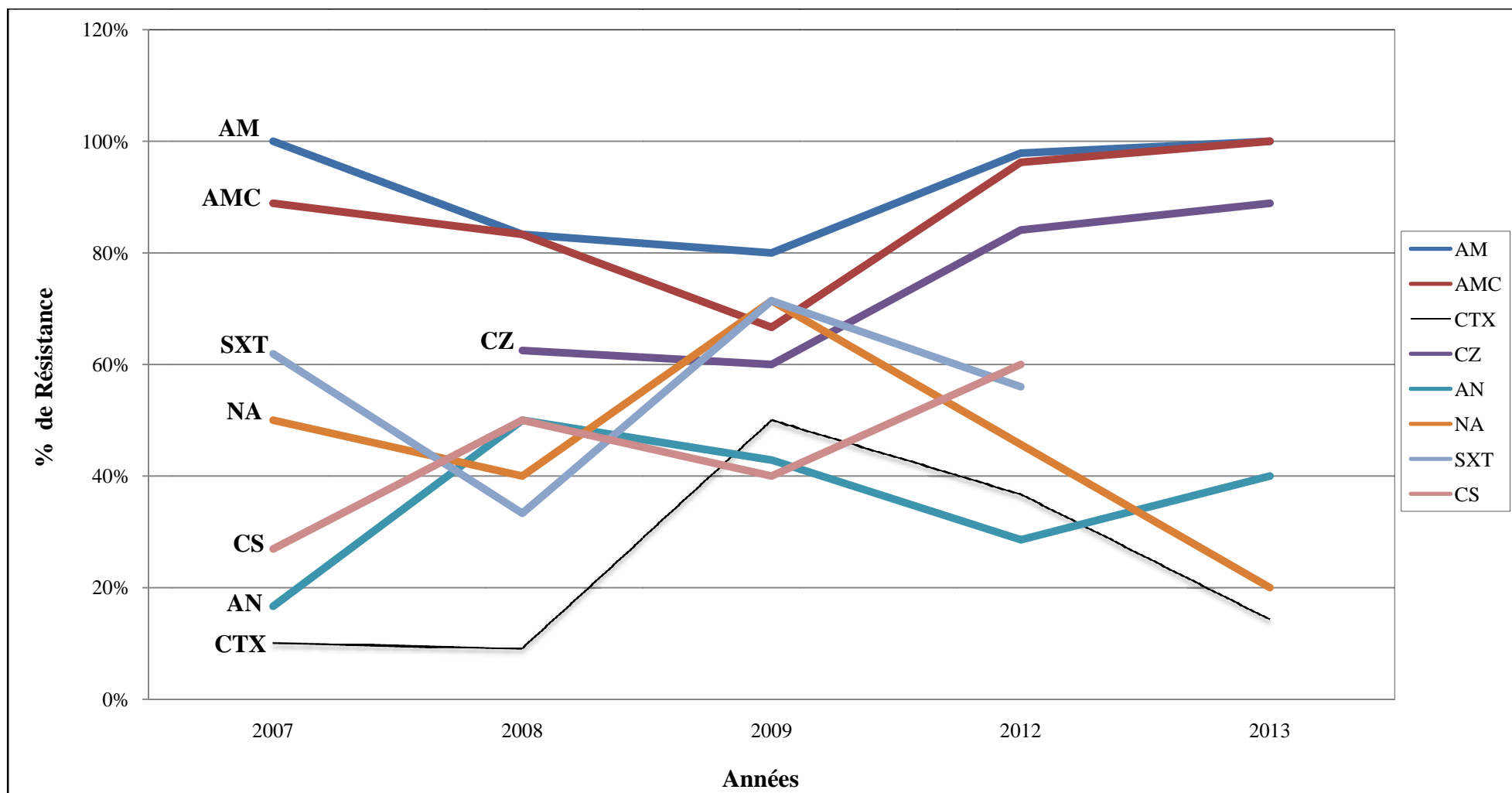


Figure 30 : Evolution de l'antibiorésistance de *Klebsiella* spp. isolées à l'hôpital de Mila de 2007 à 2013.

AM : Ampicilline, **AMC :** Amoxicilline + Acide Clavulanique, **CTX :** Céfotaxime, **CZ :** Céfazoline, **AN :** Amikacine, **NA :** Acide Nalidixique, **SXT :** Triméthoprim + Sulfaméthoxazole, **CS :** Colistine.

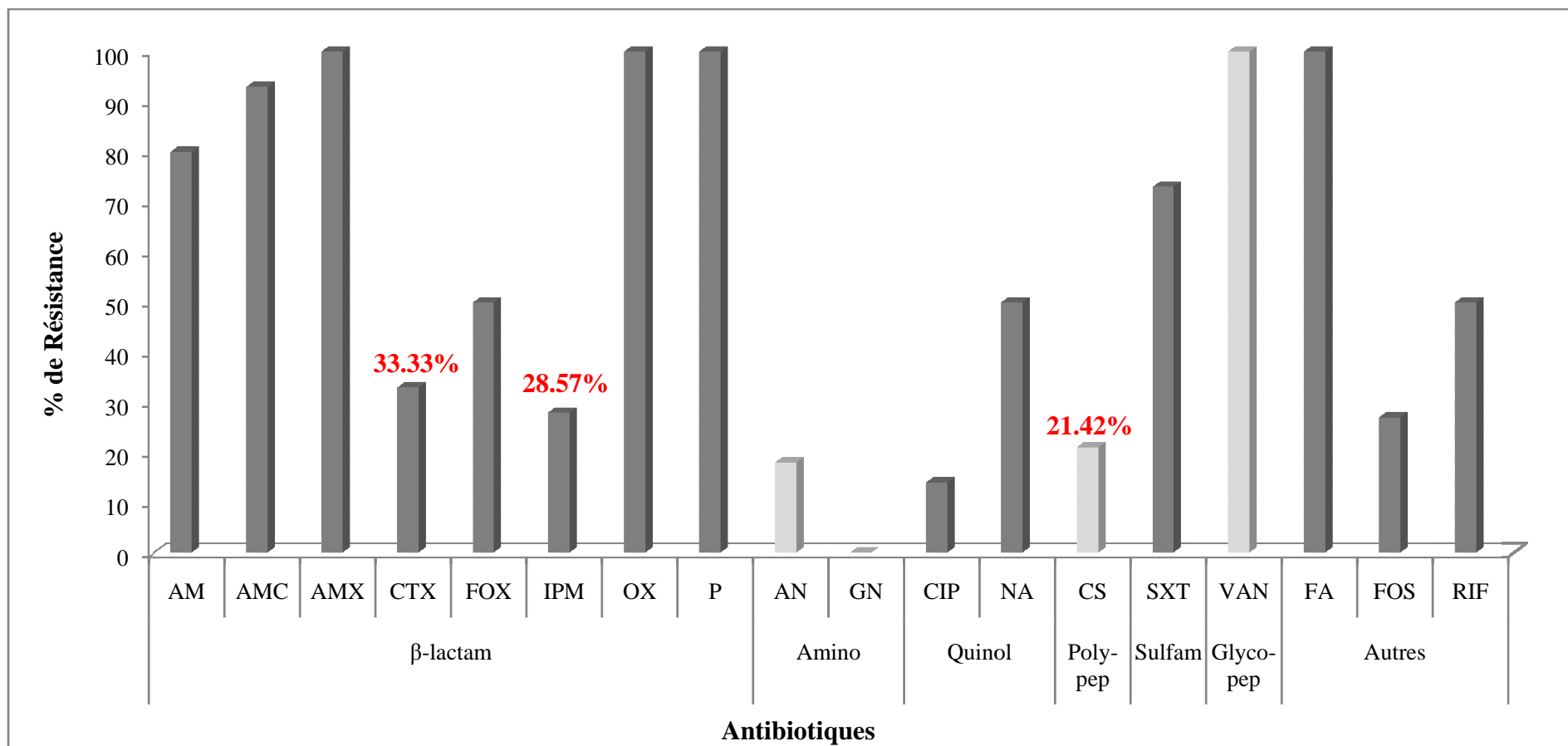


Figure 39 : Antibiorésistance de 30 souches de *K. pneumoniae* isolées à l’hôpital de Mila de 2014 à 2015.

β-lactam : β-lactamines, **Amino :** Aminosides, **Quinol :** Quinolones, **Poly-pep :** Poly-peptides, **Sulfam :** Sulfamides, **Glyco-pep :** Glyco-peptides, **AM :** Ampicilline, **AMC :** Amoxicilline + Acide Clavulanique, **AMX :** Amoxicilline, **CTX :** Céfotaxime, **FOX :** Céfoxitine, **IPM :** Imipénème, **OX :** Oxacilline, **P :** Pénicilline, **AN :** Amikacine, **GN :** Gentamycine, **CIP :** Ciprofloxacine, **NA :** Acide Nalidixique, **CS :** Colistine, **SXT :** Triméthoprime + Sulfaméthoxazole, **VAN :** Vancomycine, **FA :** Acide Fusidique, **FOS :** Fosfomycine, **RIF :** Rifampicine.

Conclusion et Perspectives

Ces dix dernières années, il a été constaté une importante augmentation de la résistance aux antibiotiques chez *Klebsiella pneumoniae* dans le monde, l'Afrique du Nord et en Algérie. Cette augmentation est devenue un préoccupant problème de santé publique, qui nécessite une attention immédiate.

Les résultats de cette étude permettent de fournir des données épidémiologiques sur les souches de *K. pneumoniae* au niveau de l'hôpital de Mila issues de différents services hospitaliers, de différents prélèvements et de patients de différents âge et sexes. Aussi, un intérêt particulier est réservé à l'observation et la surveillance de l'évolution de la résistance à plusieurs familles d'antibiotiques (β -lactamines, Quinolones, Aminosides, Sulfamides, Glycopeptides et Polypeptides).

Dans cette étude, il a été aussi remarqué que les souches de *K. pneumoniae* isolées sont multi-résistantes aux antibiotiques, de même, une émergence inquiétante et alarmante de la résistance à l'Imipénème (28.57%), le Céfotaxime (33.33%) et la Colistine (21.42%) est confirmée. Ces nouveaux phénotypes de résistance de *K. pneumoniae* et doivent amener à déclencher une alerte immédiate au niveau des services de santé.

La résistance aux antibiotiques chez *K. pneumoniae*, concordait souvent avec les résultats obtenus dans le monde. La différence dans certains cas est probablement due à la différence géographique des isolats bactériens (Environnement, type de maladie, service hospitalier et profil génétique du microorganisme, etc.).

La présente étude révèle que les deux antibiotiques Gentamicine et Ciprofloxacine reste très efficace dans le traitement des infections dues aux *K. pneumoniae* au niveau de la wilaya de Mila vue leur sensibilité remarquable observés de 100% et 85.71% respectivement.

L'ACP construite dans ce travail a montré souvent des concordances parfaites entre la distribution spatiale des phénotypes de résistance aux antibiotiques et la cartographie génétique longuement développé dans notre bibliographie

En perspectives, nous suggérons une approche plus détaillée pour recueillir plus d'informations épidémiologiques sur l'état de santé du malade et élaborer d'autres modèles d'analyse spatiale telle que l'AFC et l'AFM.

En recommandation, le développement de la résistance aux antibiotiques est un problème global qui nécessite des actions de recherche, de surveillance, d'éducation destinées à développer un usage prudent, ciblé, et raisonné de cette classe thérapeutique essentielle pour les médecins et les vétérinaires afin de préserver la santé publique.

Références

-Abdoul-Karim Traore (2009). Evaluation de l'efficacité d'Amoxicilline + l'Acide Clavulanique dans les infections de l'arbre urinaire dans le service d'urologie du CHU Gabriel Toure (Mali). Thèse pour obtenir le grade de Docteur en Médecine (Diplôme d'Etat). Université de BAMAKO (Mali). 90p.

-AL-Muhanna A. S., AL-Makhzoomy T. A. (2013). PCR detection of *CTX-M* genes coding antibiotic resistance in *Klebsiella* spp. isolates in Al-Najaf province, Iraq. *International Journal of Microbiology Research*. **5**(6): 490-493p.

-Al-Tawfiq J. A., Amalraj A. (2007). Antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae* in a Saudi Arabian Hospital: results of a 6-year surveillance study, 1998–2003. *J. Infect Chemother*. **13**: 230-234.

-Amado-Diallo A. (2013). *Escherichia coli* pathogènes et résistantes aux antibiotiques dans les effluents d'origine humaine et animale : Prévalence et caractérisation avant et après traitement épuratoire. Thèse en vue de l'obtention du Doctorat en Microbiologie de l'Université de Toulouse. (France). Université Toulouse III. 204p.

-Anonyme 1 (2002). Conférence de Consensus co-organisée par la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) et l'Association Française d'Urologie (AFU). (2002). Infections urinaires nosocomiales de l'adulte. Institut Pasteur (Paris). 45p.

-Anonyme 2 (2008). Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière. Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques. (2008). 9^{ème} Rapport d'évaluation (Septembre 2006 à Août 2007). Projet de l'Organisation Mondiale de la Santé. 177p.

-Anonyme 3 (2010). Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. (2010). Décret du 17 Mai 1993. (Journal Officiel n° 119). Edition de Janvier 2010. 49p. <http://www.sfm.asso.fr/>.

- Anonyme 4 (2011).** Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière. Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural. Réseau Algérien de la Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques. Standardisation de l'Antibiogramme à l'Echelle Nationale (Médecine humaine et vétérinaire). (2011). 6^{ème} édition. 192p. <http://www.sante.dz/aarn>.
- Anonyme 5 (2011).** Société Marocaine de Microbiologie Médical (SMAMM). (2011). Infection urinaire : du diagnostic à la thérapeutique. Infection urinaire nosocomial, infection urinaire communautaire, traitement des infections urinaires à bactéries résistantes, communication libres. 4^{ème} journée scientifique (Maroc). 44p.
- Anonyme 6 (2012).** Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière. Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques. Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques. (2012). 13^{ème} Rapport d'évaluation. 139p. <http://www.sante.dz/aarn>.
- Arafa S. 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. Université Mentouri de Canstantine (Algérie). 187p.
- Arafa S. N., Smati F., Scheftel J. M., Meunier O. (2009).** Caractérisation phénotypique et génotypique de souches de *Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae* isolées à l'hôpital universitaire de Constantine (Algérie). *Sciences et Technologie* N°30 : 43-49.
- Avril J. L., Dabernat H., Denis F. Monteil H. (2000).** Bactériologie Clinique. Ellipses Marketing. ISBN : 2729899081. 602p.
- Belbel Z. (2014).** Evaluation de la résistance aux antibiotiques des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées dans les hôpitaux de la ville d'Annaba. Thèse pour l'obtention du grade de Doctorat en Microbiologie. Université Badji Mokhtar Annaba (Algérie) : 146p.

- Ben Jabllah N., Bouziri A., Kchaou W., Hamdi A., Mnif K., Belhadj S., Khaldi A., Kazdaghli K. (2006).** Epidémiologie des infections bactériennes nosocomiales dans une unité de réanimation néonatale et pédiatrique tunisienne. *Med. Mal. Inf.* **36** : 379-85p.
- Ben Haj Khalifa A et Khedher M. (2012).** Epidémiologie des souches de *Klebsiella* spp. uropathogènes productrices de β -lactamases à spectre élargi dans un hôpital universitaire Tunisien, 2009. *Pathologie Biologie*. Elsevier Masson. **60**: 1-5.
- Ben N. A., Bercot B., Poirel L., Nordmann P., Decre D., Compain F., Genel N., Barguellil F., Arlet G. (2013).** Emergence of NDM-1 in Association with OXA-48 in *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia plasmid-mediated 16S rRNA methylases among extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* **57**: 4089-4090.
- Bennett P. M. (2008).** Plasmid encoded antibiotic resistance: Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal Pharmacol.* **153**:347-357.
- Betsy T., Keogh J. (2002).** Microbiology Demystified Teaching, Guide. 269p.
- Björg C. H., Gunnar S. S., Arnfinn S., Ørjan S et Norwegian study group on Aminoglycoside resistance. (2014).** Increased prevalence of Aminoglycoside resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Norway is associated with the acquisition of AAC(3)-II. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* **78**: 66-69.
- Bokaeian M., Saeidi S., Shahi Z., Kadaei V. (2014).** *tetA* and *tetB* genes in *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples. *Gene Cell Tissue.* **1**(2): 1-3.
- Bonnet R. (2004).** Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**(1): 1-14.
- Boubendir A. (2012).** Analyse et prévalence du risque infectieux de *Listeria monocytogenes* dans les laits crus récoltés dans deux régions à climat différent (zone semi-aride et le Nord-Est algérien) : Modélisation spatiale de la diversité floristique. Thèse pour

l'obtention du grade de Docteur en Microbiologie Appliquée. Université Mentouri de Constantine (Algérie). 145p.

-Boutet-Dubois A., Pantel A., Sotto A., Lavigne J. P. (2012). Les entérobactéries productrices de carbapénémases. *Alin & as*. Lettre d'information du CClin Sud-Est (France). **2**: 1-5.

-Cabral A. B., Andrade-Melo R. C., Vieira-Maciel M. A et Souza Lopes. (2012). Multidrug resistance genes, including *bla_{KPC}* and *bla_{CTX-M-2}*, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. **45(5)**:572-578.

-Camara M., Diop-Ndiaye H., Ba-Diallo A., Karam F., Mbow M., Faye A., Diop-Diop M., Diagne-Samb A., Toupane M., Mbengue A. S., Toure-Kane N. C., Mboup S., Gaye-Diallo A. (2013). Epidemiologie des souches de *Klebsiella pneumoniae* productrices de β -lactamases a spectre élargi dans un Hôpital Universitaire au Sénégal, 2011. **1(2)**: 33-37.

-Cambou E et Guillard T. (2012). Antibactériens agissant sur la synthèse et la conformation des acides nucléiques. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **31(1)**: 65-76.

-Cantón R., González-Alba J. M et Galán J. C. (2012). CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Frontiers in Microbiology. Antimicrob Agent and Chemother.* **3(110)**: 1-19.

-Carattoli A. (2009). Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents and Chemother.* **53(6)**: 2227-2238.

-Carbonnelle B., Denis F., Marmonier A., Pinon G., Vargues R. (1987). Bactériologie Médicale : Techniques usuelles. SIMEP S. A. Paris, France. ISBN 285334276. 330p.

-Castanheira M., Bell J. M., Turnidge J. D., Mathai D., Jones R. N. (2009). Carbapenem resistance among *Pseudomonas aeruginosa* strains from India: evidence for nationwide endemicity of multiple metallo-beta-lactamase clones (VIM-2, -5, -6 and -11

and the newly characterized VIM-18). *Antimicrob Agent and Chemother.* **53**(3): 1225-1227.

-Chaves J., Ladona M. G., Segura C., Coira A., Reig R., Ampurdanès C. (2001). SHV-1 β -lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**(10): 2856- 2861.

-Chen L., Chavda K. D., Fraimow H. S., Mediavilla J. R., Melano R. G., Jacobs M. R., Banomo R. A et Kreiswirth B. N. (2011). Partial excision of *bla*_{KPC} from Tn4401 in Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents and Chemother.* **56**(3): 1635-1638.

-Chen L., Chavda K. D., Fraimow H. S., Mediavilla J. R., Melano R. G., Jacobs M. R., Banomo R. A et Kreiswirth B. N. (2012). Complete nucleotide sequences of *bla*_{KPC-4} and *bla*_{KPC-5} harboring IncN and IncX plasmids from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in New Jersey. *Antimicrob Agents and Chemother.* **57**(1): 269-276.

-Chen Y. T., Shu H. Y., Li L. H., Liao T. L., Wu K. M., Shiao Y. L., Yan J. J., Su I. J., Tsai S. F et Lauderdale T. L. (2006). Complete nucleotide sequence of pK245, a 98-kilobase plasmid conferring Quinolone resistance and extended-spectrum- β -lactamase activity in a clinical *Klebsiella pneumoniae* isolate. *Antimicrob Agents and Chemother.* **50**(11): 3861-3866.

-Chowdhury P. R., Ingold A., Vanegas N., Martinez E., Marlino J., Merkier A. K., Gastro M., Rocha G., Borthagaray G., Centròn D., Toledo H. B., Marquez C. M et Stokes H. W. (2011). Dissemination of multiple drug resistance genes by class 1 integrons in *Klebsiella pneumoniae* isolates from four countries: a comparative study. *Antimicrob Agents and Chemother.* **55**: 3140-3149.

-Cruz F et Davies J. (2000). Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol.* **8**:128-133.

- Darfeuille-Michaud A., Jallat C., Aubel D., Sirot D., Rich C., Sirot J., et Joly B. (1992).** R-plasmid-encoded adhesive factor in *Klebsiella pneumoniae* strains responsible for human nosocomial infections. *Infection and Immunity*. **60**(1): 44-55.
- Davison J. (1999).** Genetic exchange between bacteria in the environment. *Impact Factor*. **42**(2):73-91.
- Decousser J. W., Poirel L., Nordmann P. (2001).** Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class-A- β -lactamase from *Kluyvera cryocrescens*. *Antimicrob Agents Chemother*. **45**: 3595-3598.
- Delarras C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Technique et Documentation. Paris (France). ISBN : 97827430. Lavoisier : 476p.
- Denis F., Dabernath-Monteil H., Avril J. L. (1998).** Bactériologie Clinique. Edition Marketing. (Paris). 144-145pp.
- Di Martino P., Livreli V., Sirot D., Joly B., et Darfeuille-Michaud A. (1996).** A new fimbrial antigen harbored by CAZ-5/SHV-4 producing *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infection and Immunity*. **64**: 2266-2273.
- Djelouat S. (2011).** *Klebsiella, Enterobacter, Hafnia et Serratia*. *Knol*. **81**(500): 46p.
- Dollo I. D. (2001).** Les infections de la plaie opératoire dans le service de chirurgie générale et pédiatrique de l'hôpital Gabriel Touré, Thèse pour obtenir le grade de Docteur en Médecine. N°01-M-125. Bamako (Mali), 47p.
- Doublet B., Bousquet-Mélou A., Madec J. Y. (2012).** Le concept « One Health » en antibiorésistance et les flux de gènes. *Innovations Agronomiques*. **24**: 79-90.
- Dwassy Y., Elmouali A., Ajdae L., Tangi R., Souly K., Zouhdi M. (2011).** Profil épidémiologique des entérobactéries productrices des β -lactamases à spectre élargie (BLSE) diagnostiques au laboratoire de bactériologie de l'hôpital Ibn Sina de Rabat. (Maroc). Société Marocaine de Microbiologie Médical : 4^{ème} journée scientifique. 51p.

- Edwards P. R et Ewing W. H. (1977).** Identification of the *Enterobacteriaceae*. Edition Burgess Published Company. Minneapolis, (USA). 3rd edition.
- El Fertas-Aissani R., Messai Y., Alouache S., Bakour R. (2013).** Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *Pathologie Biologie*. Elsevier Masson. **61**: 209-216.
- Elhani D., Bakir L., Aouni M. (2011).** Changement de l'épidémiologie de *Klebsiella pneumoniae* productrice de β -lactamases à spectre élargi. *Ann. Biol. Clin* 2. **69**(5): 523-529.
- Farah A., Boutefnouchet N., Dekhil M., Bouzerna N. (2007).** *Klebsiella pneumoniae* productrices de bêta-lactamases a spectre élargi (BLSE) isolées dans les hôpitaux de la ville d'Annaba, Algérie. *Scientific Study & Research*. **2**: 199-214.
- Farmer J. J., Davis B. R., Hickman-brenner F. W., Mc-Worther A., Huntley-Carter G. P., Asbury M. A., Riddle C., Wathen-Grady H. G., Elias C., Fanning G. R. (1985).** Biochemical identification of new species and biogroup of *Enterobacteriaceae* isolated of specimens. *J. Clin. Microbiol.* **21**: 46-76.
- Faure S. (2009).** Transfert d'un gène de résistance aux β -lactamines *bla*_{CTXM-9} entre *Salmonella* et les entérobactéries de la flore intestinale humaine : Impact d'une antibiothérapie. Thèse pour l'obtention du grade de Docteur en Biologie et Santé. Université de Rennes 1(France), n°d'ordre: 3900 .184p.
- Fayaiz A., Baqir S. N., Sohaib M. H., Khurheed R. H., Dilnawaz S., Khirram R. S. (2002).** Macrolides résistance in Gram positive and negative clinical isolates in Karachi. (Pakistan). *Journal of Pharmacology*. 33-38.
- Ford P. J et Avison M. B. (2004).** Evolutionary mapping of the SHV β -lactamase and evidence for two separate IS26-dependent *bla*_{-SHV} mobilization events from the *Klebsiella pneumoniae* chromosome. *J. Antimicrob and Chemother.* **54**: 69-75.

- Frasson I., Lavezzo E., Franchin E., Toppo S., Barzon L., Cavallaro A., Richter S. N. (2012).** Antimicrobial Treatment and Containment Measures for an Extremely Drug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* ST101 Isolate Carrying pKPN101-IT, a Novel Fully Sequenced *bla*_{KPC-2} Plasmid. *Antimicrob Agents Chemother.* **50**(11): 3768-3772.
- Gaibani P., Ambretti S., Berlingeri A., Gelsomino F., Bielli A., Landini M. P., Sambri V. (2011).** Rapid increase of Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in a large Italian Hospital: Surveillance period 1 March-30 September 2010. *Euro Surveill.* **16**(8) : 1-3.
- Giani T., Pini B., Arena F., Conte V., Baracco S., Miglivacca R., Pantosti A., Pagani L., Lurazaro F., Rossolini G. (2013).** Epidemic diffusion of KPC Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy: Results of the first countrywide survey, 15 May to 30 June 2011. *Euro Surveill.* **18**(22) : 1-9.
- Gautier V. (2007).** Caractérisation et expression des gènes codant pour les β -lactamases chromosomiques au sein des entérobactéries de l'environnement. Thèse Pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes. Ecole Pratique des Hautes Etudes: 25p.
- Gootz T. D., Lescoe M. K., Hajj F. D., Dougherty B. A., Della-latta P et Huard R. C. (2009).** Genetic organization of transposase regions surrounding *bla*_{KPC} carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City Hospital. *Antimicrob Agents and Chemother.* **53**(5): 1998-2004.
- Gueye O. (2007).** Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles à gram négatif. Thèse pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie (Diplôme d'Etat). Université Cheikh Anta Diop de Dakar (Mali). N°: 36. 97p.
- Huang T. W., Wang G. T., Lauderdale T. L., Liano T. L., Lai J. F., Tan M. C., Lin A. C., Chen Y. T., Tsai S. F et Chang S. C. (2013).** Complete sequences of two plasmids in a *bla*_{NDM-1}-Positive *Klebsiella oxytoca* isolate from Taiwan. *Antimicrob Agent and Chemother.* **57**(8): 4072-4076.

- Hudson C. M., Bent Z. W., Meagher R. J., Williams K. P. (2014).** Resistance determinants and mobile genetic elements of an NDM-1 encoding *Klebsiella pneumoniae* Strain. *Plos One*. **9(6)**:1-14.
- Humeniuk C., Arlet G., Gautier V., Grimont P., Labia R., Philippon A. (2002).** β -lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob Agents Chemother*. **46**: 3045-3049.
- Ivanov D. V et Egorov A. M. (2008).** Spreading and mechanisms of antimicrobial resistance in microorganisms producing β -Lactamases. Molecular Mechanisms of Resistance to β -Lactam Antibiotics of *Klebsiella* spp. strains, isolated in cases of nosocomial infections. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series b: Biomedical Chemistry*. **2(3)**: 311-317p.
- Jain A et Mondal R. (2008).** TEM & SHV genes in extended spectrum β -lactamase producing *Klebsiella* species & their antimicrobial resistance pattern. *Indian. J. Med. Res*. **128**: 759-764.
- Janda J. M., Abbott S., Historical L. (1998).** Perspectives on the family *Enterobacteriaceae*. *Lippin Cott Raven Publishers*. (Philadelphia). 7p.
- Jarlier V., Carbonne A., Astagneau P., Coignard B. (2004).** Cas groupés d'infections à *Klebsiella pneumoniae* résistante à toutes les β -lactamines y compris à l'Imipénème en région parisienne. Note d'information technique InVS/RAISIN aux responsables des C.CLIN et coordinateurs des réseaux BMR. *Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN)*. (France). Version 2. 84p.
- Jehl F., Chomar M., Weber M., Gerard A. (2003).** De l'antibiogramme à la prescription. Edition Biomérieux: 31-64pp.
- Journal Officiel de la République Algérienne Démocratique et Populaire. Convention et Accords Internationaux. 8 Joumada El Oula 1426, 15 Juin 2005.** Milieu de Culture, Réactifs et Sérums. N° : 42. 44^{ème} Années. 32p.

- Kabbaj H., Seffar M., Razouk S., Handour H., Amor M., Razine R., Belefquih B., Alaoui A. E. (2012).** Activités in vitro de la tigécycline vis-à-vis des entérobactéries sécrétrices de β -lactamases à spectre étendu dans un Hôpital Marocain. *J. Bio. Méd.* **1(3)**: 200-203.
- Karah N., Poirel L., Bengtsson S., Sundqvist M., Kahlmeter L., Nordmann P., Sundsfjord A., Samuelsen O et the Norwegian study group PMQR1. (2009).** Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. from Norway and Sweden. *Elsiever Masson.* **66**: 425-431.
- Kassis-Chikhani N. (2012).** *Klebsiella pneumoniae* pathogène nosocomial résistance et virulence. Thèse pour obtenir le grade de Docteur en Microbiologie. Université Pierre et Marie Curie. Ecole doctorale : Complexité du vivant (515): Paris VI. 190p.
- Kitchel B., Rasheed J. K., Endimiani A., Hujer A. M., Anderson K. F., Banomo R. A., Patel J. B. (2010).** Genetic factors associated with legated Carbapenem resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agent and Chemother.* **54(10)**: 4201-4207.
- Kone-Diallo K. (2010).** Fréquence d'isolement des *Klebsiella* au laboratoire de bactériologie CVD du CHU Gabriel Toure de 2002 à 2007. Thèse pour l'obtention du grade de Doctorat en Pharmacie (Diplôme d'Etat). Université de Bamako (Mali). 96p.
- Kumar V., Sun P., Vamathevan J., Li Y., Ingraham K., Palmer R., Huang J., Brown J. R. (2011).** Comparative genomics of *Klebsiella pneumoniae* strains with different antibiotic resistance profiles. *Antimicrob Agent and Chemother.* **55(9)**: 4267- 4276.
- Lascols C., Podglajen I., Verdet C., Gautier V., Gutmann L., Soussy C. J., Colletz E et cambau E. (2008).** A plasmid-borne *Shewanella algae* gene, *qnrA3*, and its possible transfer in vivo between *Kluyvera ascorbata* and *Klebsiella pneumoniae*. University Paris 12. *Journal of bacteriology.* **190(15)**: 5217-5223.
- Legendre P et Legendre L. (1998).** Numerical Ecology. Elsevier Science. 2nd edition. Ebook ISBN: 9780080523170. 852p.

- Liu Y., Li X. Y., Wan L. G., Jiang W. Y., Yang J. H., Li F. Q. (2013).** Acquisition of Carbapenem resistance in multiresistant *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 11 at a university hospital in China. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **76**: 241-243.
- Lozniewski A., Rabaud C., Nancy. (2010).** Résistance bactérienne aux antibiotiques. Fiches conseils pour la prévention du risque infectieux-Infections associées aux soins. *CCLIN Sud-Est*. (France). 4p.
- Lytsy B., Sandegren L., Tano E., Torell E., Andersson D. I., Melhus A. (2008).** The first major extended-spectrum β -lactamase outbreak in Scandinavia was caused by clonal spread of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* producing CTX-M-15. *Antimicrob Agent and Chemother.* **116**: 302-8.
- Ma L., Lin C. J., Chen J. H., Fung C. P., Chang F. Y., Lai Y. K., Lin J. C., Siu L. K and the Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistant Project. (2009).** Widespread dissemination of Aminoglycoside resistance genes *armA* and *rmtB* in *Klebsiella pneumoniae* isolates in Taiwan producing CTX-M-Type extended-spectrum β -Lactamases. *Antimicrob Agents and Chemother.* **53**(1): 104-111.
- Martinez J. L. (2009).** The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc Biol Sci.* **276**: 2521-2530.
- Maurice F. (2007).** Plasticité structurale et émergence d'antibiorésistance à large spectre : étude d'une aminoglycoside acétyltransférase et recherche d'inhibiteurs. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie. (Paris 6). Science de la vie. 179p.
- Meradi L., Djahoudi A., Abdi A., Bouchakour M., Claude P. G et Timinouni M. (2009).** Résistance aux Quinolones de types *qnr*, *aac (6')-Ib-cr* chez les entérobactéries isolées à Annaba en Algérie. **59**: 73-78.

- Merino S., Altarriba M., Izquierdo L., Noqueras M. M., Requé M., Tomás J. M. (2000).** Cloning and sequencing of the *Klebsiella pneumoniae* 05 wb gene cluster and its role in pathogenesis. *Infect Immun.* **68**(5): 2435-2440.
- Meziani M. (2012).** Contribution du diagnostic biochimique bactérien dans l'établissement des parentés phylogénétiques : cas des entérobactéries et *pseudomonas*. Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme de Magistère. Université Mentouri Constantine (Algérie). 67p.
- Minor L et Véron M. (1984).** Bactériologie Médicale, 2^{ème} édition. *Flam Méd Sciences*, Paris. 392 -394pp.
- Minor et Véron M. (1989).** Bactériologie Médicale, 2^{ème} édition. *Flam Méd Sciences*, Paris. 396-399pp.
- Miriagou V., Papagiannitsis C., Kotsakis S., Loli A., Tzelpi E., Legakis N et Tzouveleki L. (2010).** Sequence of pNL194, a 79.3-kilobase IncN plasmid carrying the *bla_{VIM-1}* Metallo- β -Lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**(10): 4497-4502.
- Nassif X., Honore N., Vasselon T., Cole S. T., Sansonetti P. J. (1989).** Positive control of colanic acid synthesis in *Escherichia coli* by *rmpA* and *rmpB*, two virulence-plasmid genes of *Klebsiella pneumoniae*. *Mol Microbiol.* **3**:1349-1359.
- Nordmann P et Carrer A. (2010).** Les Carbapénèmes des entérobactéries. *Elsevier Masson SAS*. 154-162.
- Nordmann P., Naas T., Poirel L. (2011).** Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis.* **17**: 1791-1798.
- Olson A. B., Silverman M., Boyd D. A., McGeer A., Willey B. M., Pong Porter V., Daneman N., Mulvey M. R. (2005).** Identification of a progenitor of the CTX-M- 9 group of extended-spectrum β -lactamases from *Kluyvera georgiana* isolated in Guyana. *Antimicrob Agents and Chemother.* **49**: 2112-2115.

- Pérez-Moreno M. O., Centelles-Serrano M. J., Cortell-Ortolà M., Fort-Galifa I., Ruiz J., Llovet-Lomberte M. I., Picó-Plana E et Jardí-Baiges. (2011).** Molecular epidemiology and resistance mechanisms involved in reduced susceptibility to Amoxicillin/clavulanic acid in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a chronic care centre. *International Journal of Antimicrobial Agents Spain*. **37**: 462-466.
- Perry J. J., Staley J. T., Lory S. (2004).** Microbiologie. Cours et Questions de Révision, Paris. Dunod: 320-340pp.
- Podshun R et Ullmann U. (1998).** *Klebsiella* spp. as Nosocomial pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clinical Microbiology reviews*. **11**(04): 589-603.
- Poirel L., Kämpfer P., Nordmann P. (2002).** Chromosome- encoded Ambler class A β -lactamase of *Kluyvera georgiana* probable progenitor of a subgroup of CTX- M extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents and Chemother*. **46**: 4038-4040.
- Poirel L., Naas T., Nordmann P. (2008).** Genetic support of extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect*. **14**: 75-81.
- Poirel L., Revathi G., Bernabeu S., Nordmann P. (2011).** Detection of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Kenya. *Antimicrob Agents Chemother*. **55**(2): 934-936.
- Poirel L., Bonnin R. A, Nordmann P. (2011).** Genetic features of the widespread plasmid coding for the Carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother*. **48**:559-562.
- Poirel L., Dortet L., Bernabeu S., Nordmann P. (2011).** Genetic features of *bla*_{NDM-1}-positive *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. **55**(11): 5403-5407.
- Pool K. (2004).** Resistance to β -lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Science*. **61**: 2200-2223.

- Quale J. M., Landman D., Bradford P. A., Visalli M., Ravishankar J., Flores C., Mayorga D., Vangala K., Adedeji A. (2002).** Molecular epidemiology of a city wide outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infection. *Clin Infect Dis.* **35**: 834-841.
- Ramirez M. S., Traglia G. M., Lin D. L., Tran T., Tolmasky M. E. (2014).** Plasmid-mediated antibiotic resistance and virulence in Gram negatives: the *Klebsiella pneumonia* paradigm. *Antimicrob Agents and Chemother.* **2(5)**: 1-15.
- Raud P. (2003).** Etude de la diversité génétique des souches de *Klebsilla pneumonia* productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE), isolées au CHU de Nantes, de 1990 à 2001. Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie. Université de Nantes. (France). 119p.
- Rodriguez-Martinez J. M., Poirel L., Pascual A et Nordmann P. (2006).** Plasmid-mediated Quinolone resistance in Australia. *Microbial Drug Resistance.* **12(2)**: 99-102.
- Rodríguez M. M., Power P., Sader H., Galleni M., Gutkind G. (2010).** Novel chromosome-encoded CTX- M-78 β -lactamase from *Kluyvera georgiana* clinical isolate as a putative origin of CTX-M-25 subgroup. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**: 3070-3071.
- Rolain J. M., Berrazeg M. (2014).** Nouvelles stratégies de détection et de surveillance des bactéries multi-résistantes. *Feuille de Biologie.* **9(317)** : 27-33.
- Roy P. H. (1997).** Dissémination de la résistance aux antibiotiques : Le génie génétique à l'œuvre chez les bactéries. **13**: 927-933.
- Sarno R., Gillivary G. M., Sherratt D., Actis L. A et Tolmasky M. E. (2002).** Complete nucleotide sequence of *Klebsiella pneumoniae* multiresistance plasmid pJHCMW1. *Antimicrob Agent and chemother.* **46(11)**: 3422-3427.

- Seck R. (2005).** Résistance des souches d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae* isolées d'infection urinaires. Thèse pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie (Diplôme d'Etat). N°1. Université Cheikh Anta Diop de Dakar (Sénégal). 67p.
- Sekhsokh Y., Chadli M. et El Hamzaoui S. A. (2008).** Fréquence et sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées dans les urines. *Médecine et maladies infectieuses*. **38**: 324-327.
- Senouci Bereksi M et Abdelouahid D. E. (2010).** Méthodes et Techniques en Bactériologie. Office des Publication Universtaire (Ben-Aknoun ; Alger) : 2010. 131p.
- Souna D. (2011).** Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries au niveau du CHU de Sidi Bel Abbas. Mémoire de Magister en Biologie. Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen (Algérie). 126p.
- Tawfik A. F., Alswailem A. M., Shibl A. M., Al-Agamy M. H. (2011).** Prevalence and genetic characteristics of TEM, SHV, and CTX-M in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Saudi Arabia. *Microb Drug Resist.* **17**:383-388.
- Thierry-Naas G. C., Truong H., Villegas M. V., Wisell K. T., Carmeli Y., Gales A. C., Navon-Venezia S., Quinn J. P et Patrice N. (2010).** World wide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produces β -lactamase *bla*_{KPC-2} gene. *Emerging Infectious Diseases*. **16**(9): 1349-1356.
- Thompson S. E. (1989).** Urinary tract infections in female patients. *Can. Fam. Physician*. **35**: 1851-1855.
- Tlamçani Z., Ellaia K., Benomar A., Kabbaj H., Alaoui A. E., 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*. **67**(5): 553-556.
- Touati A., Benaloula S., Djoudi F., Madoux J., Brasme L., Champs C. (2007).** Caractérisation of CTX-M-15- producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*

strains isolated from hospital environments in Algeria. *J Microbiol Drug Resistance*. **13**(2): 85-89.

-Valverde A., Coque T. M., Sanchez-Moreno M. P., Rollan A., Baquero F., Canton R. (2004). Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum betalactamase-producing *Enterobacteriaceae* during non outbreak situations in Spain. *J Clin Microbiol*. **42**: 4769-4775.

-Vatopoulos A. (2008). High rates of metallo-beta-lactamase- producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece-a review of the current evidence. *Euro surveillance*. **13**(4): 1-3.

-Villa L., Poirel L., Nordmann P., Carta C et Carattoli A. (2012). Complete sequencing of an IncH plasmid carrying the *bla*_{NDM-1}, *bla*_{CTX-M-15} and *qnrB1* genes. *J. Antimicrob and Chemother*. **67**:1645-1650.

-Williams P., Lambert P. A., Brown M. R. W et Jones R. J. (1983). The role of the O and K antigens in determining the resistance of *Klebsiella aerogenes* to serum killing and phagocytosis. *Journal of General Microbiology*. **129**: 2181-2191.

-Wolj M., Tolmasky M. E., Roberts M. S et Crosa J. H. (1985). Plasmide encoded Amikacin resistance in multiresistant strains of *Klebsiella pneumonia* isolated in neonates with meningitis. *Antimicrob Agent and chemother*. **29**(2): 315-319.

-Yang Jiang., Dongliang Yu., Ping Shun., Zhihui Zhou et Yunsong Yu. (2010). Complete Nucleotide sequence of *Klebsiella pneumonia* multidrug resistance plasmid pKP048, Carrying *bla*_{KPC-2}, *bla*_{DHA-1}, *qnrB4*, and *armA*. *Antimicrob Agents and Chemother*. **54**(9): 3967-3969.

-Yong D., Toleman M. A., Giske C. G., Cho H. S., Sundman K., Lee K., Walsh T. R. (2009). Characterization of a New Metallo-β-Lactamase gene, *bla*_{NDM-1}, and a novel Erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents and Chemother*. (2009). **53**(12): 5046-5054.

-
- Yu W., Ko W. C., Cheng K. C., Lee H. C., Ke D. S., Lee C. C., Fung C. P., Chuang Y. C. (2006).** Association between *rpmA* and *magA* genes and clinical syndromes caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Clin Infect Dis.* **42**(10): 1351-1358.
- Zamani A., Mashouf R. Y., Namvar Ebrahim zadeh A. M., Alikhani L. Y. (2012).** Detection of *magA* gene in *Klebsiella* spp. isolated from clinical samples. *Iranian Journal of Basic Medical Science.* **16**(2): 174-176.
- Zhuo C., Li X. q., Zong Z. y., Zhong N. S. (2013).** Epidemic plasmid carrying *bla*_{CTX-M15} in *Klebsiella pneumoniae* in China. *Plos One.* **8**(1): 1-8.
- Zong Z., Yu R., Wang X., lü X. (2011).** *bla*_{CTX-M-65} is carried by a Tn1722-like element on an IncN conjugative plasmid of ST131 *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* **60**: 435-441.

Annexe 01 : Formule des milieux de culture

Hektoen (Senouci Bereksi et Abdelouahid, 2010)	Composition
Protéose-peptones.....	12g
Extrait de levure.....	3g
Chlorure de sodium.....	5g
Thiosulfate de sodium.....	5g
Sels biliaires.....	9g
Salicine.....	2g
Lactose.....	12g
Saccharose.....	12g
Fuschine Acide.....	0.1g
Bleu de bromothymol.....	0.065g
Agar.....	14g
Eau distillée.....	1000 ml
pH 7.5 (environ)	
(Laisser bouillir quelques secondes, mais ne pas autoclaver).	

Mueller-Hinton (Senouci Bereksi et Abdelouahid, 2010)	Composition
Infusion de viande de bœuf	300.0
Hydrolysate de caséine.....	17,5 g
Amidon.....	1,5 g
Agar.....	15,0 g
pH finale 7,4 (environ)	
(Stérilisation à 121°C pendant 15 min).	

Gélose Nutritive (Journal Officiel, 2005)**Composition**

Extrait de viande.....	3.0g
Peptone	5.0g
Agar-agar.....	12.0g
Eau.....	1000ml
pH finale 7.0 ± 0.1	

(Stérilisation durant 20 min à 121±1°C)

Bouillon Nutritif (Journal Officiel, 2005)**Composition**

Macération de viande (eau distillée + extrait de viande).....	1L
Peptone tryptique.....	15g
NaCl ou KCl.....	5g
pH.....	7.2-7.4

(Stérilisation à 115°C pendant 20 min)

Mannitol-Mobilité (Senouci Bereksi et Abdelouahid, 2010)**Composition**

Peptone de viande.....	20
Agar.....	4
Mannitol.....	2
KNO ₃	1
Rouge de phénol a %	4ml

pH finale 7.6 – 7.8

(Stériliser à 110°C pendant 30 min)

Citrate de Simmons (Senouci Bereksi et Abdelouahid, 2010) **Composition**

Sulfate de magnésium.....	0.2
Phosphate mono-ammoniaque.....	1
Phosphate biotassique.....	1
Citrate de sodium.....	2
Chlorure de Sodium.....	5
Bleu de bromothymol.....	0.08
Agar.....	15
pH finale 6.8	
(Stériliser à 120 pendant 15 min)	

TSI (Senouci Bereksi et Abdelouahid, 2010) **Composition**

Extrait de viande de bœuf.....	3
Extrait de levure.....	3
Peptone.....	20
Chlorure de sodium.....	5
Citrate ferrique.....	0.3
Thiosulfate de sodium.....	0.3
Lactose.....	10
Saccharose.....	10
Glucose.....	1
Rouge de phénol.....	0.05*
Agar	12
pH final 7.4 (environ)	
*Ou 5ml de solution à 1%.	
(Stériliser à 120 pendant 15 min).	

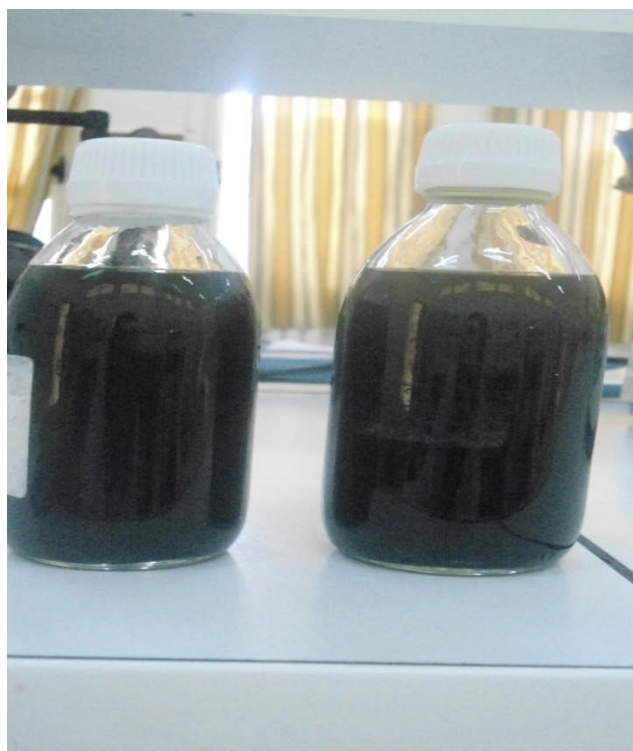
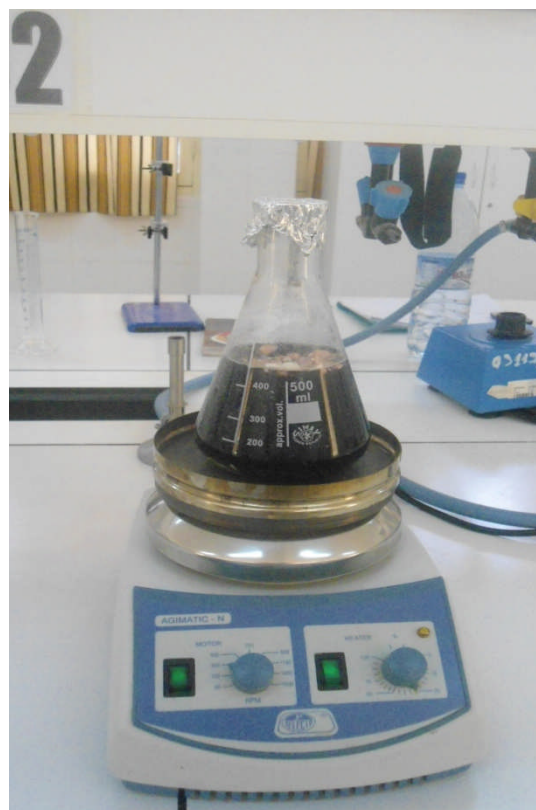
Urée-Indole (Journal Officiel, 2005)**Composition**

L-tryptophan.....	0.3g
KH ₂ PO ₄	0.1g
K ₂ HPO ₄	0.1g
NaCl.....	0.5g
Urée.....	2g
Alcool à 95°.....	1 ml
Rouge de phénol à 1%	0.25 ml
Eau distillée.....	100 ml

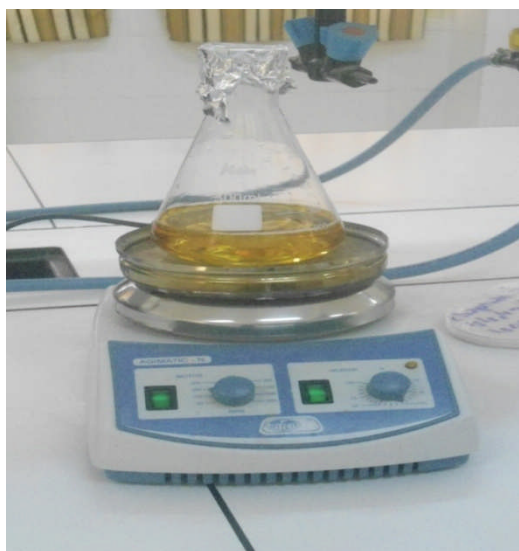
pH final 6.7

(Stériliser Par filtration)

Annexe 02 : Préparations des milieux de culture
Hektoen



Bouillon Nutritif



Annexe 03 : Les étapes de la coloration de Gram



Annexe 04

Wilaya de Mila.

Etablissement Public Hospitalier.

Frères Meghlaoui-Mila-.

Laboratoire de Bactériologie.

Service de Microbiologie.

N° :

Nom :

Prénom :

Age :

Domicile :

Service :

Code Patient :

Nature de Prélèvement :

Examen Cyto-Bactériologique

Leucocyte :

/Hématies :

Bactérie :

/Autres :

Germe isolé:

ANTIBIOGRAMME

Antibiotique	Abréviation	S	I	R	Antibiotique	Abréviation	S	I	R
Pénicilline	P				Céftazidime	CAZ			
Ampicilline	AM				Amikacine	AN			
Amoxicilline	AMX				Gentamicine	GN			
Augmentin	AMC				Tétracycline	TE			
Ticarcilline	TIC				Lincomycine	L			
Piperacilline	PIP				Colistine	CS			
Oxacilline	OX				Triméthoprime+Sulfaméthoxazole	SXT			
Imipénème	IPM				Acide Nalidixique	NA			
Céfazoline	CZ				Fosfomycine	FOS			
Céfotaxime	CTX				Vancomycine	VA			

Mila le : .../.../.....

Le responsable du service de Bactériologie :

Annexe 05 : Antibiorésistance de 30 souches de *K. pneumoniae* isolées à l'hôpital de Mila (Janvier 2014 à Février 2015).

Date	Sexe	Age	NP	AM	AMC	P	AMX	AN	RIF	CIP	CP	CS	CTX	FA	FOS	GN	IPM	NA	OX	SXT	VA	FOX
22/01/2014	F	41A	PU					S		S			S				S		R		R	
26/01/2014	F	37A	PU		R								S					S		S		
26/01/2014	H	33A	PU		R								S					R		R		
04/02/2014	F	4M	PP		R			S		R		S	R	R		S			R		R	
08/02/2014	F	3A	PU		R								I					S		R		
16/02/2014	H	56A	PU		R								S			S		S				
24/03/2014	F	24A	PU	R	R			S		S			S								R	
25/03/2014	F	20A	PV						S			S	S		I	S	S		R	S	R	
30/03/2014	F	5A	PU	R	R					R		S	S				S	R		R		
15/04/2014	F	57A	PV		R			S				S	S		S			R		R		
03/06/2014	H	67A	PU	R				R		S			R					R		R		
06/07/2014	F	24A	PU							S		R	R					R	R		R	
31/08/2014	H	5A	PV																			
18/09/2014	/	/	Mur	R	R								S				S					R
18/09/2014	/	/	Matlas					S				S	I		S		R				R	
18/09/2014	/	/	Draps		S	R						R	R		R	S	R				R	S
18/09/2014	/	/	Matlas					S		S		S			S						R	
18/09/2014	/	/	Draps									R	R		R	S	R				R	

Date	Sexe	Age	NP	AM	AMC	P	AMX	AN	RI	CIP	CP	CS	CTX	FA	FOS	GN	IPM	NA	OX	SXT	VA	Fox	
17/11/2014	H	24A	PU																				
23/11/2014	F	24A	PP		R			R	R	S		S			S		S			R			
23/11/2014	F	5A	LP		R			S		S		S			S								
23/11/2014	H	43A	PP		R			S		S		S			S		S			R			
26/11/2014	F	Ind	PU																				
26/11/2014	F	34A	PP		R			R		S					S		S			R			
03/12/2014	F	60A	PU		R		R			S			S		R		S						
29/12/2014	F	Ind	PP																				
06/01/2015	F	5A	PU																				
14/01/2015	F	2A	PP																				
18/01/2015	F	41A	PU					S		S		S					S	I		S			
18/01/2015	H	60A	PU	S								S					S	S		S			
22/02/2015	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

F : Femme, **H** : Homme, **A** : Année, **M** : Mois, **S** : Sensible, **I** : Intermédiaire, **R** : Résistant, **NP** : Nature de Prélèvement, **SV** : Service, **Ind** : Indéterminé, **PP** : Prélèvement de Pus, **PU** : Prélèvement Urinaire, **PV** : Prélèvement Vaginal, **LP** : Liquide Pleural.

Annexe 06 : Concentrations, diamètre critiques et règles de lecture interprétative pour
Enterobacteriaceae (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
(CA-SFM), 2010).

Antibiotique	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)	
		S	R	S	R
Ampicilline	10µg	≤ 4	> 8	≥ 19	< 16
Amoxicilline	25µg	≤ 4	> 8	≥ 21	< 16
Amoxicilline + Ac.clavulanique	20/10µg	≤ 4/2	> 8/2	≥ 21	< 16
Ticarcilline	75 µg	≤ 8	> 16	≥ 24	< 22
Ticarcilline + Ac.clavulanique	75/10µg	≤ 8/2	> 16/2	≥ 20	< 22
Pipéracilline	75 µg	≤ 8	> 16	≥ 24	< 16
Pipéracilline/ Tazobactam	75/10µg	≤ 8/4	> 16/4	≥ 21	< 17
Imipénème	10 µg	≤ 2	> 8	≥ 24	< 17
Méropénème	10 µg	≤ 2	> 8	≥ 22	< 15
Ertapénème	10 µg	≤ 0.5	> 1	≥ 28	< 26
Doripénème	10 µg	≤ 1	> 4	≥ 24	< 19
Aztréonam	30 µg	≤ 1	> 8	≥ 28	< 21
Céfalotine	30 µg	≤ 8	> 32	≥ 18	< 12
Céfoxitine	30 µg	≤ 8	> 2	≥ 22	< 15
Céfotaxime	30 µg	≤ 1	> 2	≥ 26	< 23
Céftriaxone	30 µg	≤ 1	> 8	≥ 26	< 23
Céftazidime	30 µg	≤ 1	> 8	≥ 26	< 19
Céfpime	30 µg	≤ 1	> 8	≥ 24	< 17
Kanamycine	30 UI	≤ 8	> 16	≥ 17	< 15
Tobramycine	10 µg	≤ 2	> 4	≥ 18	< 16
Amikacine	30 µg	≤ 8	> 16	≥ 17	< 15
Gentamicine	15µg	≤ 2	> 4	≥ 18	< 16
Nétilmicine	30 µg	≤ 2	> 4	≥ 21	< 19
Chloramphénicol	30 µg	≤ 8	> 8	≥ 23	< 23
Tétracycline	30 UI	≤ 4	> 8	≥ 19	< 17
Colistine	50 µg	≤ 2	> 2	≥ 15	< 15
Sulfamide	200 µg	≤ 64	> 256	≥ 17	< 12
Triméthoprime	5 µg	≤ 2	> 4	≥ 20	< 16
Triméthoprime /Sulfaméthoxazole	1.25/23.7 5 µg	≤ 2	> 4	≥ 16	< 13
Nitrofurane	300 µg	≤ 64	> 64	≥ 15	< 15
Acide Nalidixique	30 µg	≤ 8	> 16	≥ 20	< 15
Ciprofloxacine	5 µg	≤ 0.5	> 1	≥ 25	< 22
Norfloxacine	5 µg	≤ 0.5	> 1	≥ 25	< 22
Fosfomycine	50 µg	≤ 32	> 32	≥ 14	< 14

Annexe 07 : Les positions et les fonctions des cadres de lectures ouverts (ORF) du plasmide pNL194 (n° d'accèsion dans GenBank : GU585907) (Miriagou *et al.*, 2010).

Séquences codantes de pNL194	Coordonnée	Fonctions / produits
Restriction endonuclease gene	212–853	Endonuclease
<i>kikA</i>	1256–1570	Killing of <i>Klebsiella</i> during conjugation
<i>korB</i>	1926–2231	Inhibition of <i>kik</i> -mediated killing
<i>traL</i>	2340–3074	Conjugal transfer
<i>korA</i>	3083–3364	Inhibition of <i>kik</i> -mediated killing
<i>traM</i>	3375–3667	Conjugal transfer
<i>traA</i>	3717–4028	Conjugal transfer
<i>traB</i>	4033–6633	Conjugal transfer
<i>traC</i>	6651–7364	Conjugal transfer
<i>eex</i>	7372–7602	Entry exclusion
<i>traD</i>	7618–8658	Conjugal transfer
<i>traN</i>	8741–8887	Conjugal transfer
<i>traE</i>	8877–9575	Conjugal transfer
<i>traO</i>	9586–10470	Conjugal transfer
<i>traF</i>	10470–11630	Conjugal transfer
<i>traG</i>	11669–12664	Conjugal transfer
<i>nuc</i>	12664–13197	Periplasmic endonuclease
<i>fipA</i> -(3')	13370–13397	Fertility inhibition of IncP plasmids (truncated)
Δ Tn5501	13398–13717	Non coding sequence from Tn5501
<i>orf194-1</i>	13944–14300	Unknown (hypothetical protein)
<i>orf194-2</i>	14290–14691	Unknown (hypothetical protein)
<i>orf194-3</i>	14688–14984	Unknown (hypothetical protein)
Δ int11-1	15285–15873	Class 1 integrase (truncated)
<i>tnpA</i> of IS6100	16080–16844	Transposase of IS6100
<i>orf1</i>	17071–17376	Putative transcriptional regulator of PadR family
<i>chrA</i> -like	17387–18592	Chromate resistance
Δ orf5-A	18759–18935	Unknown
<i>sul1</i> -A	19063–19902	Dihydropteroate synthase
Δ qacE-A	19896–20243	Quaternary ammonium compound resistance (truncated)
<i>aadA2</i>	20407–21198	Aminoglycoside adenylyltransferase
<i>orfF</i>	21204–21494	Unknown
<i>dfrA12</i>	21606–22103	Dihydrofolate reductase
Δ int11-A	22248–22692	Class 1 integrase
<i>tnpA</i> of IS26	22745–23449	Transposase of IS26
<i>aphA1</i>	23579–24394	Kanamycin phosphotransferase
<i>tnpA</i> of IS26	24584–25228	Transposase of IS26
<i>insAB</i> of IS1	25350–26047	Transposase of IS1
<i>insA</i> of IS1	25350–256	Transposition regulatory protein
<i>aadA1</i>	26118–26909	Aminoglycoside adenylyl transferas
<i>dfrA1</i>	27002–27475	Dihydrofolate reductase
Δ int11-B	27632–28616	Class 1 integrase (truncated)
<i>strA</i> -like	29837–30640	Streptomycin phosphotransferase
<i>strB</i> -like	30640–31476	Streptomycin phosphotransferase
Δ orf1 of IS903.B-1	31582–32281	Transposase of IS903.B (truncated)
<i>orf2</i> of IS903.B-1	31619–31831	Unknown
<i>orf1</i> of IS903.B-2	33436–34359	Transposase of IS903.B
<i>orf2</i> of IS903.B-2	33697–33909	Unknown
<i>orfA</i> of IS1222-like	35161–35424	TransposaseOrfA of IS1222
<i>orfB</i> of IS1222-like	35451–36281	TransposaseOrfB of IS1222
Δ tnpA of Tn2	37001–39030	Transposase of Tn2 (truncated)
Δ tnpA of Tn1721	39064–40580	Transposase of Tn1721 (truncated)
<i>tnpA</i> of IS26	40644–41348	Transposase of IS26
Δ orf5-C	41401–41519	Transposase of IS26

<i>sulI-C</i>	41647–42486	Unknown
Δ <i>qacE-C</i>	42480–42827	Dihydro pterate synthase
<i>aadAI</i>	42991–43782	Quaternary ammonium compound resistance
<i>dfrAI</i>	43875–44348	(truncated)
<i>aacA7</i>	44480–44938	Aminoglycoside adenylyl transferase
<i>blaVIM-1</i>	45032–45832	Dihydrofolate reductase
<i>intII-C</i>	45999–47012	Aminoglycoside acetyl transferase
<i>tnpA</i> of IS26	47154–47858	Metallo- β -lactamase
Δ <i>orf6</i> of Tn1696	47922–48191	Class 1 integrase
<i>tnpA</i> of IS6100	48387–49151	Transposase of IS26
<i>urf2Y</i>	49390–49602	Unknown
<i>merE</i>	49668–49904	Transposase of IS6100
<i>merD</i>	49901–50266	Unknown
<i>merA</i>	50284–51969	Mercury resistance
<i>merC</i>	52008–52433	Mercury resistance transcriptional repression
<i>merP</i>	52461–52736	Mercury reductase
<i>merT</i>	52752–53117	Mercury transport
<i>merR</i>	53189–53644	Mercury transport
Δ Tn1000-like	53677–53764	Mercury transport
<i>fipA</i> (-5)	53765–54115	Regulation of <i>mer</i> operon
<i>traI</i>	54115–57351	Non coding sequence from Tn1000
<i>traJ</i>	57351–58880	Inhibition of IncP plasmids (truncated)
<i>traK</i>	58882–59298	Nickase and helicase
<i>stbA</i>	59820–60239	DNA processing
<i>stbB</i>	60248–60964	DNA processing
<i>stbC</i>	60966–61334	Prevention of SOS response
<i>orfD</i>	61516–61860	Stable plasmid inheritance
Δ <i>ccgAII</i>	62095–62404	Stable plasmid inheritance
<i>ccgAI</i>	62459–62638	Unknown
<i>ardA</i>	63470–63979	Prevention of RecA over production (truncated)
<i>ccgC</i>	65875–66159	Regulation of <i>ccgAII</i>
<i>ccgD</i>	66584–66880	Inhibition of type I restriction enzymes
<i>ccgEIII</i>	67765–68004	Plasmid stabilization
<i>ardR</i>	68014–68418	Unknown
<i>ardB</i>	68476–68901	Unknown
<i>mucA</i>	69313–69753	Regulation of <i>ccg</i> gene
<i>mucB</i>	69741–71006	Inhibition of host type I restriction enzymes
<i>mpr</i>	71157–71948	UV protection
<i>ardK</i>	71963–72304	UV protection
<i>repA</i>	72864–73583	Unknown (metallo protease)
Iteron region	73631–74992	Regulation of <i>ccg</i> genes
<i>res</i>	75436–76005	Initiation of plasmid replication
EcoRII endonuclease gene	76251–77459	Control of RepA expression
EcoRII methylase gene	77493–78926	Resolvase
Δ <i>insBof IS1</i>	79031–79307	Restriction endonuclease type IIe
		DNA methylase
		InsB product of IS1

Résumé

Dans la présente étude réalisée à l'hôpital de Mila, 30 souches de *Klebsiella pneumoniae* multirésistantes ont été isolées durant l'année 2014-2015 et testées vis-à-vis de la résistance aux antibiotiques. Les résultats ont confirmé qu'il y a une émergence inquiétante et alarmante de la résistance à l'Imipénème (28.57%), le Céfotaxime (33.33%) et la Colistine (21.42%). Par contre, les deux antibiotiques Gentamicine et Ciprofloxacine reste très efficace dans le traitement des infections due aux *K. pneumoniae*, vue leur sensibilité remarquable observés de 100% et 85.71% respectivement.

Mots clés : *K. pneumoniae*, multirésistantes, antibiotiques, ACP.

Abstract

In the present study realized at the hospital of Mila, 30 strains of *Klebsiella pneumoniae* multidrug resistant were isolated during the years 2014-2015 and tested for the there resistance to antibiotics. The results confirmed the disturbing and alarming emergence of resistance to Imipenem (28.57%), Cefotaxime (33.33%) and Colistin (21.42%). However, the two antibiotics Gentamicin and Ciprofloxacin remain efficient against *K. pneumoniae*, regarding the sensitivity demonstrated with 100% and 85.71% respectively.

Key words: *K. pneumoniae*, multidrug- resistant, antibiotics, PCA.

المخلص

في هذه الدراسة التي أجريت في مستشفى ميلة، تم عزل 30 سلالة من الكلبسيلا الرئوية متعددة المقاومة خلال العام 2014-2015، واختبار مقاومتها للمضادات الحيوية. وأكدت النتائج ظهور نسب مقاومة مقلقة لكل من Imipénème (28.57%)، Céfotaxime (33.33%) و Colistine (21.42%). بالمقابل المضادين الحيويين Gentamicine و Ciprofloxacin يبقيان جد فعالين لمعالجة الامراض التي تسببها الكلبسيلا الرئوية نتيجة لحساسيتها المسجلة 100% و 85.71% على التوالي.

الكلمات المفتاحية : الكلبسيلا الرئوية، متعددة المقاومة، المضادات الحيوية، ACP.