



Mémoire

De fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de Master en biologie
Option : Microbiologie appliquée

Thème

***Klebsiella pneumoniae* : Antibiorésistance et
effets des extraits organiques et aqueux d'*Inula
viscosa***

Présenté par :

M^{elle} KEDJAR Karima

M^{elle} RAMDANE CHERIF Sara

Devant le jury :

Président: Mr HOUALI Karim

Professeur UMMTO

Promoteur: Mr BARIZ Karim

Maitre assistant UMMTO

Examineur: Mr MEDJKOUNE Nadir

Assistant UMMTO

Examineur: Mr MOUALEK Idir

Maitre assistant UMMTO

Promotion 2015/2016



Remerciements

Avant de commencer la présentation de ce travail, nous remercions tout d'abord NOTRE BON DIEU du fond du cœur qui nous a donné du courage, de la volonté et du savoir pour réaliser ce modeste travail.

Nous tenons à remercier notre cher promoteur Mr BARIZ. K enseignant et chef de département de BMC à l'université MOULOUD MAMMERI de Tizi-Ouzou pour sa bonne qualité, sa confiance, sa patience, son encouragement, sa disponibilité, son dynamisme et surtout ses judicieux conseils qui ont contribué à alimenter notre réflexion et pour nous avoir guidées durant toute la période du stage malgré ses nombreuses préoccupations. On le remercie vivement pour tout.

Nous remercions le professeur Mr HOUALI. K enseignant et doyen de BIOLOGIE de l'université MOULOUD MAMMERI de Tizi-Ouzou pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider ce mémoire.

Nous remercions également nos enseignants Mr MEDJKOUNE. N et Mr MOUALEK. I qui ont acceptés d'examiner ce travail.

Sans oublier de remercier Mr SEBANNE. H, M^{me} SALMI. D et M^{lle} AILI. D pour leur encouragement et leur aide pendant la période du stage.

Karima & Sara



Dédicace

C'est avec profonde gratitude et sincères mots que je dédie ce modeste travail de fin d'étude à ma chère maman Lynda et mon cher papa Madjid qui ont sacrifié leur vie pour ma réussite, qui m'ont encouragé et éclairé mon chemin par leurs conseils judicieux. Que dieu leurs prête le bonheur et longue vie.

Je dédie ce travail à mes deux chers frères Aziz et Amine et ma chère sœur Cylia.

Je dédie aussi ce travail à mes grand-mères, mes tantes, mes oncles et mes ami(e)s.

Karima





DEDICACES

*Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie que,
Je dédie ce mémoire de fin d'étude À ma chère mère Nacera et
mon cher père Arezki pour leurs patiences illimitées , leurs
amours, leurs soutiens, leurs encouragements et leurs grands
sacrifices ainsi que les efforts fournis jour et nuit pour mon
éducation, ma formation et mon bien être.*

*Vraiment aucune dédicace ne saurait exprimer mon
attachement, mon amour et mon affection.*

*C'est à vous que je dois cette réussite. Puisse Dieu, le tout
puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et
bonheur.*

*Je dédie ce modeste travail à mes très chères sœurs Dania
et Lisa, et à mon cher frère Yanis.*

*Je le dédie également à mes grandes mères, mes tantes et
leurs époux, mes oncles et leurs épouses avec toute mon
affection et mon respect.*

*Sans oublier mon très cher ami Ferhat en témoignage de
l'amitié qui nous uni, ses conseils et ses encouragements, je
dédie ce travail et je le souhaite une vie pleine de santé, de
bonheur et de réussite.*



Sara 

Abréviations

ADN : Acide desoxyribinucleique.

ARNm : Acide ribonucléique messenger.

BEL: Belgium extended-spectrum β -lactamase.

CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute.

DMSO: Diméthylsulfoxyde.

FOX : Gène codant pour une céphalosporinase.

GES: Guyana Extended-Spectrum–lactamase.

gyrA: Gene qui code pour ADN gyrase.

gyrB: Gene qui code pour ADN gyrase.

IBC: Integron Borne Cephalosporinase.

KPC: *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase.

MBL: Métallo- β -lactamase.

MDR: Multi Drug résistant.

MOX : Gène codant pour une céphalosporinase.

NDM : New Delhi métallo-bêta-lactamase.

OXA-48: Oxacillinase (carbapénémase).

PBP : *Penicillin-binding protein*.

PCR : Polymerase Chain Reaction.

PER : *Pseudomonas* extented résistance.

Qnr : Quinolone resistance gene.

SFO : *Serratia fonticola*.

TLA: Tlahuicas - tribu indienne.

VEB: Vietnam extendede spectrum β -lactamase.

Liste des tableaux

Tableau I : Tableau représentant les différents caractères biochimiques de l'espèce <i>Klebsiella</i>	4
Tableau II : Tableau représentant les différentes classes de céphalosporines.	9
Tableau III : Les principaux mécanismes de résistance aux β - lactamines.....	14
Tableau IV : Les principaux mécanismes de résistance aux aminosides et aux quinolones ..	15
Tableau V : Les principaux mécanismes de résistance aux phénicolés et aux sulfamides et tritoprèmes	16
Tableau VI : Classification des β -lactamases d'après Bush-Jacoby-Mrdeiros	18
Tableau : VII structures chimique des flavonoïdes isolés d' <i>Inula viscosa</i>	31
Tableau VIII: Les applications de l'inule visqueuse et ses principes actifs.....	35
Tableau IX : Les différentes souches isolées au niveau de service Bactériologie Parasitologie	43
Tableau X : Résultats de l'identification biochimique par la galerie API 20E.....	63
Tableau XI : Résultats des profils numériques des souches de <i>K.pneumoniae</i>	64
Tableau XII : Résultats des antibiogrammes des souches étudiées (<i>K.pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> K12 et ATCC 25 922)	67
Tableau XIII : Comparaison de la résistance des souches sauvages et transconjugants.....	76
Tableau XIV: Les résultats des activités antibactériens des extraits aqueux et organiques d' <i>Inula viscosa</i>	83

Liste des figures

Figure 1 : Structures de quelques β -lactamines.....	10
Figure 2 : Figure représentant les enzymes modificatrices des aminosides.....	13
Figure 3 : Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle β -lactame.....	16
Figure 4: Les BLSE dérivées de TEM.....	20
Figure 5: Les BLSE dérivées de SHV	21
Figure 6 : Structures chimique des flavonoïdes isolés d' <i>Inula viscosa</i>	30
Figure 7 : Structures chimique des sesquiterpènes lactones isolés d' <i>Inula viscosa</i>	32
Figure 8 : Structures chimique des triterpènes isolés d' <i>Inula viscosa</i>	33
Figure 9 : photo d'inule visqueuse prise au milieu de la récolte.....	42
Figure 10 : Figure représentative de l'aspect macroscopique de <i>Klebsiella pneumoniae</i> sur Mac Conkey	45
Figure 11 : Schéma des différentes étapes de la coloration de Gram.	46
Figure 12 : Figure montrant les germes Gram – et Gram+	46
Figure 13: Représentation de la Galerie biochimique API 20E (Photo prise au Laboratoire)	47
Figure 14 : Figure montrant la lecture de la galerie API20E de <i>K.pneumoniae</i>	48
Figure 15 : Schéma de dépôt des disques d'antibiotique.....	51
Figure 16 : Schéma représentant le contrôle positif des souches <i>K.pneumoniae</i> et <i>E. coli</i> K12 sur MH+AZID MH+CTX.....	52
Figure 17 : Schéma représentatif des étapes de la conjugaison bactérienne entre la souche <i>K. pneumoniae</i> et <i>E. coli</i> K 12	54
Figure 18 : Schéma expliquant les étapes de l'extraction aqueuse et l'étude de l'activité antibactérienne	58
Figure 19 : Schéma expliquant les étapes de l'extraction éthanolique/méthanolique et l'étude de l'activité antibactérienne.....	59
Figure 20 : Aspect macroscopique des colonies de <i>Klebsiella pneumoniae</i> 4683 purifiée sur milieu Mac Conkey (photo prise au laboratoire)	60
Figure 21 : Aspect macroscopique des colonies d' <i>E. coli</i> ATCC 25922 et <i>E. coli</i> K12 purifiées sur milieu Mac Conkey (photo prise au laboratoire)	61
Figure 22 : Aspect microscopique des colonies <i>E. coli</i> ATCC 25922, Kp 4936 et <i>E. coli</i> K12 au grossissement 1000 (photos prises au laboratoire)	61
Figure 23 : Identification d'une souche de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (4328) par la galerie API 20 E (photo prise au laboratoire)	62

Figure 24: Pourcentages de résistance, intermédiaire et sensibilité des souches <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux antibiotiques testés	68
Figure 25 : Figure des antibiogrammes montrant la résistance des souches de <i>K.pneumoniae</i>	69
Figure 26 : Photos des résultats du contrôle positif des souches K.p et K12 sur MH+CTX et MH+AZID.....	74
Figure 27 : Photo montrant le transconjugant 4683 sur MH+AZID+CTX (photo prise au Laboratoire)	75
Figure 28 : pourcentages de résistance, intermédiaire et sensibilité des transconjugants aux antibiotiques testés.....	76
Figure 29 : Photos montrant les antibiogrammes des transconjugant 2042(photos prises au laboratoire)	79
Figure 30 : Photos montrant les antibiogrammes des transconjugant 4328 (photos prises au laboratoire).	80
Figure 31 : Photos montrant les antibiogrammes des transconjugant 4683(photos prises au laboratoire).	81
Figure 32 : Histogramme montrant les écart-types des différents extraits (aqueux, méthanolique et éthanolique)	83
Figure 33 : Photos montrant l'activité antibactérienne des extraits aqueux, éthanoliques et méthanoliques d' <i>Inula viscosa</i> par la méthode de diffusion sur disque (photos prises au Laboratoire)	86

Introduction

Partie bibliographique

Chapitre 1

1. Caractéristiques générales de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	2
2. Classification	3
3. Caractère bactériologique	3
3.1 Caractère morphologique et culturaux	3
4.1 Caractères biochimiques	4
4. Facteurs de pathogénicité de <i>K.pneumoniae</i>	4
4.1. Antigènes de surface	5
4.2. Adhésines	5
4.3. Sidérophores	5
5. Le pouvoir pathogène.....	6
6. Résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux antibiotiques	7
6.1. Les antibiotiques	7
6.1.1. Les classes d'antibiotiques	7
6.1.1.1. Les β - lactamines	7
6.1.1.1.1. Les pénicillines (panâmes)	8
6.1.1.1.2. Les céphalosporines (céphèmes)	8
6.1.1.1.3. Les carbapénèmes (pénèmes)	9
6.1.1.1.4. Les monobactames	9
6.1.1.1.5. Les Inhibiteurs de β - lactamase	10
6.1.1.2. Les aminosides	10
6.1.1.3. Les quinolones	11
6.1.1.4. Les phenicoles	11
6.1.1.5. Sulfamides et triméthoprimine	11
6.2. Phénotype de la résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux antibiotiques	12
6.3 Mécanismes de résistance de <i>K.pneumoniae</i> aux antibiotiques	13
6.3.1. Les Bêta-lactamases	16
6.3.1.1. Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE)	17
6.3.1.1.1. Différents types de BLSE.....	19
6.4. La multirésistance de <i>K.pneumoniae</i> aux antibiotiques	23
6.5. Méthodes de détection de la production de BLSE	24
6.5.1. Méthodes phénotypiques	24

Sommaire

6.5.1.1. Test de synergie	24
6.5.1.2 Bandelettes E-test® BLSE	25
6.5.1.3. Le test Vitek	25
6.5.1.4. Tests complémentaires	25
6.5.2. Méthodes génotypiques.....	26
6.6. Mécanismes génétique de transfert de gènes de résistance	26

Chapitre 2

1. Description de la plante	28
2. Taxonomie.....	29
3. Les principes actifs d'inule visqueuse et leurs activités biologiques	29
3.1. Les flavonoïdes	30
3.2. Les sesquiterpènes lactones	31
3.3. Les terpènes	32
3.4. Les huiles essentielles.....	33
4. Activités des extraits brutes d'Inule visqueuse	34
5. Méthodes d'extraction des principes actifs	36
5.1. Techniques utilisées pour l'extraction des huiles essentielles.....	37

Partie expérimentale

1.1. Matériel	39
1.1.1. Appareillages.....	39
1.1.2. Verrerie et autres matériel	40
1.1.3. Milieux de culture	41
1.1.4. Colorants et réactifs.....	41
1.1.5. Matériel biologique	42
1.1.5.1. Souches étudiées	42
1.1.5.2. Matériel végétal	42

Partie 1 : Etude fondamentale

1.2. Méthodes	
1.2.1 Revivification	44
1.2.2. Vérification de la pureté	44
1.2.3. Détermination de profil de résistance des souches aux antibiotiques	49
1.2.4. Détermination du support génétique de la résistance aux C3G.....	51

Sommaire

Partie 2 : Etude de microbiologie appliquée

1.2.5. Echantillonnage	55
1.2.6. Extraction des principes actifs de la plante	55
1.2.7. Test de l'activité antibactérienne.....	57

2. Résultats et discussion

2.1. Vérification de la pureté	60
2.2. Tests de sensibilité aux antibiotiques (Antibiogrammes)	65
2.3. Détermination du support génétique de la résistance aux C3G	73
2.4. Test de l'activité antibactérienne d' <i>Inula viscosa</i>	82

Conclusion	88
-------------------------	----

Perspectives	89
---------------------------	----

Annexes

Introduction

La résistance bactérienne aux antibiotiques est en perpétuelle évolution. L'augmentation et la dissémination des bactéries multirésistantes représente un sérieux problème de santé publique ce qui mène à des impasses thérapeutiques majeurs et à la croissance du taux de morbidité.

Klebsiella pneumoniae est une entérobactérie qui appartient au genre *Klebsiella* connue pour sa multirésistance et sa virulence. L'évolution génétique des souches et l'utilisation abusive des β -lactamines ont permis l'apparition et la dissémination rapide de résistance enzymatique par production de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) et de carbapénèmases.

Les BLSE sont des protéases à sérine de la classe A d'Ambler. Elles dérivent par mutations ponctuelles au niveau du site actif des pénicillinases à spectre restreint à savoir TEM et SHV. Actuellement, la prévalence de ces enzymes varie selon les pays et les hôpitaux. Les BLSE type CTX-M (céfotaximase) sont considérées comme le type le plus fréquent au monde (BIALEK-DAVENET *et al.*, 2011 ; ROBIN *et al.*, 2012).

Devant cette situation, la recherche appliquée s'est orientée vers le screening de nouvelles molécules bioactives et à pouvoir antimicrobiens de diverses sources. Les plantes médicinales représentent une excellence source naturelle de principes actifs à visée antimicrobienne.

Inula viscosa est une plante aromatique largement utilisée en phytothérapie du fait de sa richesse en composés organiques naturels qui inhibent la croissance des micro-organismes pathogènes (PAGES, 2003 ; HAMILTON-MILLER, 2004).

Dans ce travail nous nous sommes fixés comme objectifs en premier lieu l'étude de la résistance aux antibiotique de dix souches de *K. pneumoniae* issues des prélèvements cliniques des patients hospitalisés au CHU NEDIR Mohammed de tizi-ouzou et en deuxième lieu l'étude de l'effet des extraits organiques et aqueux d'*Inula viscosa* sur ces souches. Les étapes de notre étude sont les suivantes :

- Etude de profil de résistance des souches de *K. pneumoniae* vis-à-vis de cinq familles d'antibiotiques suivie de la détection phénotypique de BLSE ;
- Détermination du support génétique de la résistance aux C3G par des expériences de conjugaisons ;
- Extraction aqueuse et organique des principes actifs des feuilles d'*I. viscosa* par macération.
- Mise en évidence de l'activité antibactérienne des extraits aqueux et organiques vis-à-vis des souches *K.pneumoniae* cliniques.

1. Caractéristiques générales de *Klebsiella pneumoniae*

Les entérobactéries constituent une famille hétérogène de bactéries qui sont des bacilles à Gram négatif, immobiles ou mobiles grâce à une ciliature péritriche. Elles sont aéro- anaérobies facultatifs, se développent sur milieux ordinaires et fréquemment impliquée dans les infections humaines. Une de leurs caractéristiques est de réduire les nitrates en nitrites, et d'acidifier le glucose par voie fermentative avec souvent la production de gaz (AVRIL *et al.*, 2000).

Les différences entre les nombreux genres et espèces sont basées sur des critères morphologiques, biochimiques, immunologiques et moléculaires comme la comparaison des séquences d'acide nucléiques et des protéines.

La famille des Enterobacteriaceae comprend 100 espèces répertoriées. Les espèces les plus communément isolées en bactériologie clinique appartiennent à 12 genres : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia* (NDOYE, 2004).

Parmi ces espèces d'entérobactéries, l'espèce *Klebsiella pneumoniae* anciennement appelé pneumobacille de Friedlander appartient au genre *Klebsiella* et au groupe « KESH » (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Hafnia*), est un bacille à Gram négatif, immobile, capsulée et non sporulée, elle se développe en aéro-anaérobiose. L'espèce *Klebsiella pneumoniae* est subdivisée en trois sous espèces : *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* et *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*.

K. pneumoniae est étroitement apparentée à plusieurs autres genres de la famille des entérobactéries comme *Citrobacter*, *Escherichia* et *Salmonella* (BRISSE et VERHOEF, 2001 ; KUMAR *et al.*, 2011).

C'est une espèce ubiquitaire isolée de l'environnement (eau de surface, eau usée, sol, bois et les végétaux divers), des effluents industriels, des aliments et de la flore commensale des sujets sains retrouvé au niveau de tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud, sa présence dans l'eau peut signer une contamination fécale (BAGLEY *et al.*, 1978; AVRIL *et al.*, 2000).

Klebsiella est un genre opportuniste à l'origine de certaine infection des voies respiratoires comme celles des poumons et plus spécifiquement des branches ainsi que les angines, plus spécifiquement chez les sujets fragilisés comme les diabétiques, les personnes âgées ou encore alcooliques (STONE *et al.*, 2003; SAHLY *et al.*, 2004).

Les bactéries de ce genre possèdent des capacités génétiques leur conférant des résistances multiples vis-à-vis des antibiotiques en utilisant plusieurs mécanismes. Cette résistance est due au fait que *Klebsiella* est l'hôte privilégié de certains éléments mobiles (BINGEN *et al.*, 1993; PENA *et al.*, 2001).

2. Classification

Selon la classification de la 5^{ème} édition Américaine de Bergy's manuel, *K pneumoniae* appartient :

Règne : Bactéria

Embranchement : Protéobactéria

Classe : Gamma Proteobacteria

Ordre : Enterobacteriales

Famille : Enterobacteriaceae

Genre : *Klebsiella*

Espèce : *Klebsiella pneumoniae* (BERGY'S MANUEL, 1994).

3. Caractères bactériologiques

3.1 Caractères morphologiques et culturels

Les bactéries appartenant à l'espèce *Klebsiella pneumoniae* se développent en aéro-anaérobiose sur des milieux classiquement utilisés pour les entérobactéries (gélose nutritive, gélose trypticase soja, gélose au sang, gélose MacConkey, gélose lactosée au pourpre de bromocrésol (BCP), gélose éosine bleu de méthylène (EMB), gélose bleu de bromothymol (BTB), gélose Drigalski, et Hecktoen), après une incubation de 18 h à 24 h à 37°C (GRIMONT F et GRIMONT P, 2005).

L'aspect macroscopique, montre des colonies qui sont rondes, lisses, grandes, ont un diamètre de 3 à 4 mm d'aspect muqueux, plus au moins bombées, brillantes et visqueuses

En microscope photonique les espèces de *K. pneumoniae* sont des bacilles à Gram négatif de 0,3 à 1,0 µm de diamètre sur 0,6 à 6 µm de longueur à l'extrémité arrondie. Elle se

présentent isolées, groupées en diplobacilles ou en courte chainettes souvent enrobée dans la même capsule (AYAN *et al.*, 2003 ; JONAS *et al.*, 2004). La culture dans les milieux contenant un sucre fermentescible favorise la formation d'une capsule. En revanche la culture dans un bouillon bilié à 5% favorise l'évolution vers des formes non capsulées (STRUVE *et al.*, 2008). Les différents caractères biochimiques sont donnés dans le tableau I.

3.2 Caractères biochimiques

Tableau I : Tableau représentant les différents caractères biochimiques de l'espèce *Klebsiella*.

Tests	ONPG	ADH	LDC	Citrate	H ₂ S	Uréase	ODC	TDA	Indole	VP	Gélati- nase
<i>K.pneumoniae</i>											
<i>Klebsiella pneumoniae</i> Subsp pneumoniae	+	-	+	+	-	98%	-	-	-	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> Subsp ozaenae	+	-	variable	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> Subsp rhinoscleromatis	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-

K.pneumoniae est oxydase négative, catalase positive, fermentent de nombreux sucre comme le glucose avec production du gaz entraine la formation d'acétoïne et 2-3 butandiolé (DRANCORT *et al.*, 2001 ; GRIMONT F et GRIMONT P, 2005).

4. Les facteurs de pathogénicité de *K.pneumoniae*

Tout microorganisme produisant une maladie est dit pathogène, sa capacité de provoquer une maladie ou son pouvoir pathogène ou de pathogénicité. *Klebsiella pneumoniae* fait partie de germes qui provoquent des maladies sévères dues à des facteurs de virulence ou de pathogénicité.

Les profils de virulence selon l'origine clinique suggèrent un rôle des sidérophores, les fimbriae F1 et F3 ; la capsule et leurs formation de biofilms semblent être à la base de pathogénicité classique de *K. pneumoniae* (El FERTAS-AISSANI *et al.*, 2012).

4.1. Les antigènes de surface

- **Lipopolysaccharide (LPS) (Antigène somatique O)**

Sont exprimés à la surface de *K.pneumoniae* contribue à la pathogénicité de cette bactérie (CRYZ *et al.*, 1984).

- **Capsule (antigène K)**

D'après HENNEQUIN *et al* (2012) et HSIEH *et al* (2012), la capsule a été le premier facteur de virulence décrit. La majorité des souches de *K.pneumoniae* produisent une capsule de nature polysaccharidique qui est essentielle à la virulence des klebsielles, elle donne aux colonies sur gélose une apparence plus ou moins muqueuse caractéristique. La capsule est une structure qui protège la bactérie de phagocytose (FUNG *et al.*, 2000 ; LAI *et al.*, 2000).

La capsule exopolysaccharide est l'un des composants bactériens essentiels pour la formation de biofilms (HENNEQUIN *et al.*, 2007).

4.2. Les adhésines

Les adhésines jouent un rôle essentiel dans la première étape du processus infectieux. Les propriétés d'adhésion des entérobactéries sont généralement médiées par différents types de pili ou fimbriae. Bien que ces deux termes sont habituellement considérés comme synonymes, ils devraient être différenciés fimbriae pour l'adhésion aux cellules et pili pour la conjugaison (Di- MARTINO *et al.*, 1999; PODSCHUN *et al.*, 2000).

Les deux types de fimbriae type 1 et type 3 sont fréquemment rencontrés chez *K. pneumoniae* en particulier la médiation des infections des voies urinaires (IVU) et la formation du biofilms respectivement (FERTAS-AISSANI *et al.*, 2013; RAMOS *et al.*, 2014).

4.3. Sidérophores

Les sidérophores qui sont des chélateurs de bas poids moléculaire se liant au fer sous la forme de Fe^{3+} dans le milieu extracellulaire, qui sont ensuite captés par des récepteurs de la membrane cellulaire d'où le fer sera libéré dans la cellule.

K.pneumoniae est parmi les bactéries pathogènes qui ont développées des systèmes de captation du fer qui joue un rôle dans l'installation, la croissance bactérienne et la progression de l'infection.

D'après SHON *et al* (2013) et RUSSO *et al* (2011), une souche *K.pneumoniae* hypervirulente possède une plus grande quantité de sidérophores biologiquement actifs.

Les gènes codants pour ces sidérophores comprennent *entB* (entérobactine), *iutA* (aérobactine), *irp1-irp2-ybtS-fyuA* (yersiniabactine) et *iroN* pour (récepteur de ferricatecholates).

5. Le pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène ou pathogénicité d'une bactérie mesure sa capacité à provoquer des troubles chez son hôte. Il varie selon la souche (sérovar), dépend de son pouvoir invasif, pouvoir toxicogène et de sa capacité à se reproduire.

Klebsiella pneumoniae est naturellement présente dans le tube digestif et les voies aériennes supérieures de l'homme et des animaux, et comme elle se retrouve couramment dans les eaux, les sols, les poussières et les végétaux. Elle est à la fois une bactérie commensale de l'organisme, mais également dans certaines conditions devient un agent pathogène (LAU *et al.*, 2008).

Dans le milieu hospitalier *K. pneumoniae* est responsable des infections diverses tels que les infections : suppuratives, urinaires, pulmonaires, respiratoires, septicémies, bactériémies, méningite, hépatique et intra abdominale (CHUNG *et al.*, 1992 ; DONG, 2003 ; BOTELHO, 2007).

La transmission de *K. pneumoniae* est essentiellement manuporté par la manipulation de matériels souillés (cathéter urinaire et veineux, masque à oxygène) et par les mains sales.

L'espèce *K. pneumoniae subsp pneumoniae* est aussi rencontrée dans les milieux communautaires, elle est responsable d'infection urinaire, intra abdominale et respiratoire (broncho-pulmonaire) incluant les pneumonies, les abcès pulmonaires chez les sujets fragilisés tels que les diabétiques ou patients souffrant des maladies respiratoires chroniques. (CARPENTER, 1990 ; JARLIER *et al.*, 2004).

L'espèce *K. pneumoniae subsp ozaenae* est responsable d'une rhinite chronique atrophique décrite sous le nom d'ozène. Cette infection se manifeste par une ulcération chronique de muqueuse nasale.

Cette espèce a été également isolée à partir de surinfection de bronchite chronique, de bactériémie, de méningite, et de surinfection de la plaie, d'infection urinaire et d'ulcères de la cornée (MAC CARTHY *et al.*, 1984 ; TANG *et al.*, 1994).

L'espèce *K. pneumoniae subsp rhinoscléromatis* est responsable de rhinosclérome qui est une infection granulomateuse chronique de voies aériennes supérieures (cavité nasale). Parmi ces infections dont quelque cas ont été rapportées chez des patients infectés par le VIH et un cas est de septicémie (STRAMPFER *et al.*, 1987 ; PORTO *et al.*, 1989).

L'arthrite à *K.pneumoniae* est rare, mais elle peut détruire l'articulation provoquant un handicap définitif (SCHELENZ *et al.*, 2007).

6. Résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux antibiotiques

6.1. Les antibiotiques

Un antibiotique (du grec *anti* : « contre », et *bios* : « la vie ») est une substance naturelle ou synthétique qui détruit ou bloque la croissance des bactéries.

Les antibiotiques agissent de manière spécifique sur les bactéries, en bloquant une étape essentielle de leur développement (synthèse de leur paroi, de l'ADN, des protéines, ou la production d'énergie). Ce blocage se produit lorsque l'antibiotique se fixe sur sa cible, une molécule de la bactérie qui participe à l'un de ces processus métaboliques essentiels (YALA *et al.*, 2001).

6.1.1. Les classes d'antibiotiques

6.1.1.1. Les β - lactamines

Depuis leur découverte en 1928 par ALEXANDER FLEMING et dès leur utilisation durant la Seconde Guerre mondiale, les antibiotiques de la famille des β -lactamines ont été confrontés à l'émergence de la résistance.

Les β -lactamines constituent une famille majeure d'antibiotiques très largement utilisés en clinique, pour le traitement des infections causées par *K.pneumoniae* vue leur diversité, faible toxicité, activité bactéricide et large spectre d'action. Elles comprennent les dérivées de pénicillines, les céphalosporines, les monobactames et les carbapénèmes.

Les β - lactamines inhibent la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane, qui est un polymère majeur spécifique de la paroi des bactéries à Gram négatif et positif.

Les β -lactamines ont toutes en commun un cycle β -lactame qui est la partie réactive de la molécule en créant un intermédiaire acyl-enzyme instable, menant au final à la perte d'un groupement carboxyle. Elles agissent en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne par fixation aux protéines liant les pénicillines (PLP).

Les PLP principalement les D-D-transpeptidases et D-D-carboxypeptidases sont impliquées dans la synthèse du peptidoglycane possédant un site actif à serine et sont regroupées sous le terme de PLPs, Protéines Liant la Pénicilline (ou PBP pour *Penicillin Binding Protein*).

Les β -lactamines présentent une analogie structurelle avec le motif D-Ala-D-Ala, substrat naturel des PLPs. Le cycle β -lactame se lie de manière covalente et irréversible au site actif de l'enzyme provoquant son inactivation qui induit à l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane et du coup arrêt de croissance bactérienne (effet bactériostatique) car le complexe antibiotique-PLPs stimule la production d'autolysines qui digèrent la paroi cellulaire, et cela amène à la lyse de la cellule (effet bactéricide) (MADIGAN et MARTINKO, 2007).

Il existe de nombreuses variétés de β -lactamines elles comprennent les dérivés de pénicilline, les céphalosporines, les carbapénèmes, les monobactames, et les inhibiteurs de β -lactamase :

6.1.1.1.1. Les pénicillines (panâmes)

La pénicilline est un premier antibiotique identifié en 1928 par ALEXANDER FLEMING, elle possède un cycle thiazolidine associé au noyau β -lactame.

Les produits de ce groupe se distinguent par la nature du radical fixé sur le carbone en position 6 (CAVALLO *et al.*, 2004). Ces pénicillines comportent plusieurs groupes (Pénicilline G ; Pénicilline M (Méticilline); Pénicilline A (Aminopénicilline) ; Carboxy-pénicillines (Ticarcilline) ; Uréido-pénicilline (pipéracilline) ; Amidino-pénicilline (pivmécillinam) (LAURNET, 2009).

6.1.1.1.2. Les céphalosporines (céphèmes)

Les céphalosporines noyau centrale céphème associé un cycle β -lactame à un cycle dihydrothiazine (en position 1 on trouve un atome de soufre S). Le tableau II rapporte les différentes classes de céphalosporines classées selon leur date de mise sur le marché et leur spectre d'activité :

Tableau II : Tableau représentant les différentes classes de céphalosporines.

	Antibiotiques	Spectre	Références
C1G	Céfalotine, céfazoline, céfapirine.	Gram positif : <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Streptococcus pneumoniae</i> , entérobactéries <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> spp et <i>Klebsiella</i> spp non céfalosporinase.	(CAVALLO <i>et al.</i> , 2004).
C2G	Céfoxitine, céfamandole, céfuroxime et céfotétan.	Gram positif, Gram négatif et les souches productrices de β -lactamases.	(JARLIER et NORDMANN, 2000).
C3G	Céfotaxime, céftazidime et céftriaxone.	Bacilles à Gram négatif, Cocci à Gram positif: Pneumocoque, Streptocoque (sauf Entérocoque), Cocci à Gram négatif et sur <i>Pseudomonas</i> .	
C4G	Céfépime et céfpirome.	Cocci à Gram positif, <i>P. aeruginosa</i> .	(CAVALLO <i>et al.</i> , 2004)

6.1.1.1.3 Les carbapénèmes (pénèmes)

Les carbapénèmes sont caractérisés par un noyau pénème et dérivent de la thiénamycine produite naturellement par *Streptomyces cattleya*.

Elles sont subdivisées en quatre groupes : Imipénèmes, méropénème, donpénème et ertapénème (CAVALLO *et al.*, 2004).

Ces carbapénèmes sont des antibiotiques bactéricides possèdent un large spectre antibactériens incluant les bactéries a Gram négatifs (entérobactéries) et les Gram positifs sauf staphylocoques et les entérocoques (WOLFF *et al.*, 2008).

6.1.1.1.4 Les monobactames

Le seul représentant de ce genre est l'aztréonam, ils constituent le groupe le plus récent des β - lactamines. Ils se caractérisent par la présence du noyau monocyclique azétidine limité au cycle monobactam.

Seule la molécule d'aztréonam est prescrite, elle a une activité sur les bacilles à Gram négatif sécrétrices des β - lactamase comparable à celles des céphalosporines de 3^{ème} génération, mais elle est inactive sur les bactéries à Gram positif et les anaérobies (CAVALLO *et al.*, 2004).

6.1.1.1.5. Les Inhibiteurs de β - lactamase

Ce sont des pénames sans activité notable, car ils n'inhibent pas les PLP. Ils se fixent de façon irréversible aux β - lactamases bactériennes ce qui protège les β - lactamines de l'inactivation et les rend efficaces sur des bactéries productrices de β - lactamases. Ces inhibiteurs sont : clavane (acide clavulanique) et les pénicillines-sulfones (sulbactam et tazobactam) (CAVALLO *et al.*, 2004). La figure 1 montre les différentes structures de quelques β -lactamines.

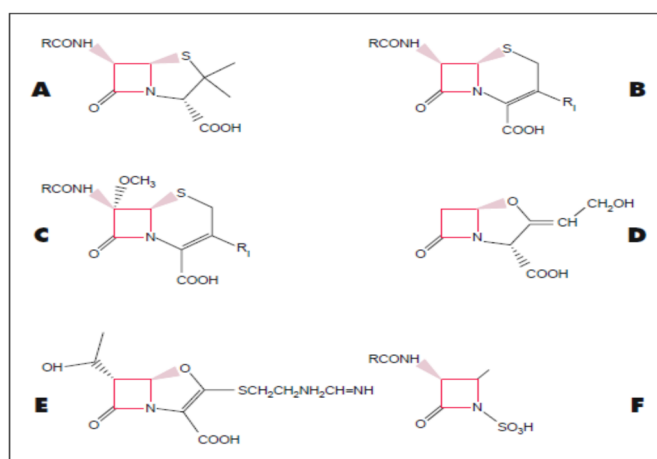


Figure 1 : Structures de quelques β -lactamines (CHARLIER *et al.*, 1998).

A : pénicillines ; **B :** céphalosporines; **C :** céphamycines ; **D :** acide clavulanique ; **E :** Imipénème (carbapénème); **F :** monobactames.

6.1.1. 2. Les aminosides

Les aminosides sont des antibiotiques bactéricides à large spectre, de la famille aminoglycosides, c'est-à-dire sont des hétérosides naturels formés par un ou plusieurs glycosides liés à un aminocyclitol.

Les principales molécules sont : Streptomycine, Gentamicine, Nétilmicine, Tobramycine et l'Amikacine. Le spectre d'action des aminosides est large, agissant sur les bacilles Gram

négatifs aérobies notamment les entérobactéries et les bacilles à Gram positif (*Listeria*). Ils sont actifs sur les *Staphylococcus aureus* sécréteurs de pénicillinase et sur les Cocci à Gram négatif. Ces antibiotiques sont inactifs sur les streptocoques, pneumocoques, les entérocoques et les anaérobies strictes.

Les aminosides fixent de façon irréversible sur le ribosome des bactéries et inhibent la traduction en provoquant des erreurs de lecture de l'ARN messager ce qui entraînant la destruction bactérienne (YALA *et al.*, 2001 ; ARCHAMBAUD et CLAVE, 2008).

6.1.1.3. Les quinolones

Les quinolones sont des antibiotiques bactéricides à large spectre, ils sont efficaces contre les bactéries entériques comme *E.coli*, *K.pneumoniae* et d'autre bactérie pathogène à Gram négatifs, ainsi les bactéries Gram positifs tels que les *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogène* et *Mycobacterium tuberculosis*.

Parmi ces quinolones on distingue les antibiotiques de 1^{ère} génération (acide nalidixique) ; 2^{ème} génération (Fluroquinolones : norfloxacin, ofloxacin et ciprofloxacine) ; 3^{ème} génération (Lévofloxacine, Moxifloxacine) (PRESCOTT *et al.*, 2007).

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

6.1.1.4. Les phenicoles

Les phenicoles sont des antibiotiques bactériostatiques à large spectre. Ils sont très efficaces pour le traitement de la fièvre typhoïde. Les antibiotiques de cette famille sont actifs sur une grande variété de germes à Gram positif et à Gram négatif. Dans ce groupe on distingue les chloramphénicols et les thiamphénicols.

La fixation des chloramphénicols à la sous unité 50S du ribosome empêchent l'attachement des amino-acyles-ARNt au site A du ribosome, ce qui inhibe la phase d'élongation et bloque le transfert des acides aminés aux chaînes peptidiques (SINGLETON, 2005).

6.1.1.5. Sulfamides et triméthoprime

Les sulfamides sont des analogues de l'acide para-aminobenzoïque. Ils inhibent la synthèse des folates en inhibant la dihydroptéroate synthétase (DHPS), d'où leur action sur la

synthèse des acides nucléiques et des acides puriques. Ils sont peu utilisés actuellement en raison de leurs nombreux effets secondaires et la fréquence des souches résistantes.

Le triméthoprim inhibe la synthèse des folates, des acides nucléiques et des acides puriques en inhibant la dihydrofolate réductase (DHFR). C'est un agent à large spectre, utilisé essentiellement en association avec un sulfamide (effet synergique).

Les Sulfamides et triméthoprim sont des antibiotiques à large spectre touchant les bactéries à Gram positifs et Gram négatifs sauf *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus* qui possède une résistance naturelle (SINGLETON, 2005).

6.2. Phénotype de la résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux antibiotiques

Au sein de chaque espèce on distingue le phénotype sauvage, déterminé par les mécanismes naturels de résistance et les phénotypes résistant déterminés par des mécanismes acquis de résistance.

- **Résistance naturelle**

K. pneumoniae possède naturellement un gène codant pour une pénicillinase chromosomique avec plusieurs variant tels que SHV qui lui confère une résistance à bas niveau aux pénicillines. Cette pénicillinase est sensible à l'action des inhibiteurs (acide clavulanique, tazobactam).

Le phénotype sauvage de *K. pneumoniae* est caractérisé par une résistance vis-à-vis des antibiotiques suivants : Amoxicilline, Ampicilline, Ticarcilline et la Piperacilline et une sensibilité vis-à-vis des associations amoxicilline (ou ticarcilline) + acide clavulanique et pipéracilline + tazobactam ainsi qu'à l'ensemble des céphalosporines. Elle est également sensible aux céfamycines, à l'aztréonam et aux carbapénèmes (COURVALIN *et al.*, 2006).

K. pneumoniae est aussi sensible aux autres antibiotiques tels que les aminosides, fluoroquinolones, la fosfomycine et au cotrimoxazole (CHRISTENSEN *et al.*, 1972).

- **Résistance acquise**

K. pneumoniae a toujours joué un rôle majeur dans l'apparition et la dissémination des mécanismes de résistance, en particulier vis-à-vis des β -lactamines. Ainsi, dans les années 1970, ces bactéries ont été les pionnières concernant l'apparition de la résistances aux aminosides (CHRISTENSEN *et al.*, 1972).

A partir des années 1980, *K. pneumoniae* a largement contribué à la dissémination hospitalière des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) qui leur confèrent une résistance aux céphalosporines de 3eme génération (C3G). Cette espèce occupe une position importante dans l'émergence et la dissémination de certaines enzymes conférant la résistance aux carbapénèmes (KPC, OXA-48) et céphalosporinase à large spectre (SIROT, 1995; PATERSON *et al.*, 2005).

6.3 Mécanismes de résistance de *K.pneumoniae* aux antibiotiques

K.pneumoniae est caractérisée par la présence de plusieurs types de mécanismes moléculaire de résistance. Les principaux mécanismes de résistance aux β -lactamines, aminosides et autres antibiotiques élucidés chez cette espèce son rapportés dans le tableau III, IV et V. La figure 2 rapporte le mode d'action des enzymes hydrolysant les aminosides.

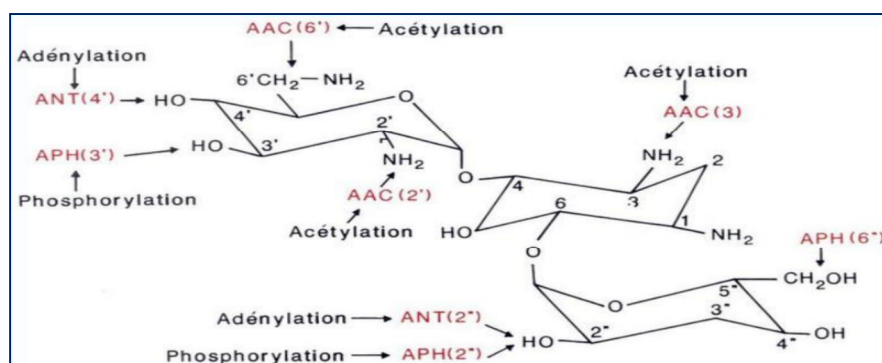


Figure 2: Figure représentant les enzymes modificateur des aminosides (COURVALIN *et al.*, 2006).

Tableau III : Les principaux mécanismes de résistance β -lactamines

β -lactamines	Mécanismes	Mécanismes moléculaire	Antibiotique ciblé	Références
	Diminution de la perméabilité	- Mutation des porines (modification structurelle d'une porine essentielle ; diminution quantitative et qualitative des porines).	Céfépime ; ceftirome et l'ertapénème	(KUMAR et SCHWEIZER, 2005; NORDMANN <i>et al</i> , 2010 ; GRALL <i>et al</i> ., 2011).
	Hyper production de système d'efflux	- Mutation dans la région régulatrice des opérons de système d'efflux multidrogues.	C2G	
	Modification des PLP	- Mutation dans le gène chromosomique codant pour les PLPs - Acquisition de gène étranger codant pour nouveaux PLPs ayant une affinité différente aux β - lactamines	Imipénème ; mécillinam (très rare chez Kp)	(GEORGOPAPADAKOU, 1993).
	Inactivation enzymatique	Pénicillinase bas niveau : chromosomique SHV-1	Ampécilline, ticarcilline, pipéracilline et amoxicilline.	(JARLIER et NORDMANN, 2000; JOLY et REYNAUD, 2002).
		Pénicillinase haut niveau (chromosomique ou plasmidique).	Ampécilline, ticarcilline, pipéracilline et amoxicilline associés aux inhibiteurs de β - lactamase ; C1G;C2G.	
		BLSE (plasmidique ou chromosomique)	Toutes les β - lactamines sauf céphamycine et les carbapénèmes.	
		Céphalosporinases bas niveau : chromosomique	Aminopénicilline, C1G et résistants aux inhibiteurs de β - lactamases.	(PHILIPPON <i>et al.</i> , 2002),
		Céphalosporinases plasmidique case : (+ de 20 variant) - Par l'acquisition de gène ampC ; - Mutation dans les gènes du métabolisme du peptidoglycane ampD.	C1G, C2G, C3G et l'aztréonam, cephameycine (céfoxitine, cefotetan), et celle aux associations avec les inhibiteurs de β - lactamases.	(PHILIPPON <i>et al.</i> , 2002; HANSON, 2003 ; NAKANO <i>et al.</i> , 2004 ; BIRKETT <i>et al.</i> , 2007 ; UZUNOVIC <i>et al</i> ., 2015).
		Carbapénémases 12 variant : - Mécanisme chromosomique. - Production d'enzyme hydrolysant les carbapénèmes qui sont codées par des éléments mobiles.	Toutes les β - lactamines à l'exception des céftazidime et la céphamycine qui sont peu hydrolysées.	(LAUPLAND <i>et al.</i> , 2005 ; SCHWABER <i>et al.</i> , 2008 ; LESPRIT <i>et al.</i> , 2009 ; MARILYSE, 2015).

Tableau IV : Les principaux mécanismes de résistance aux aminosides et aux quinolones.

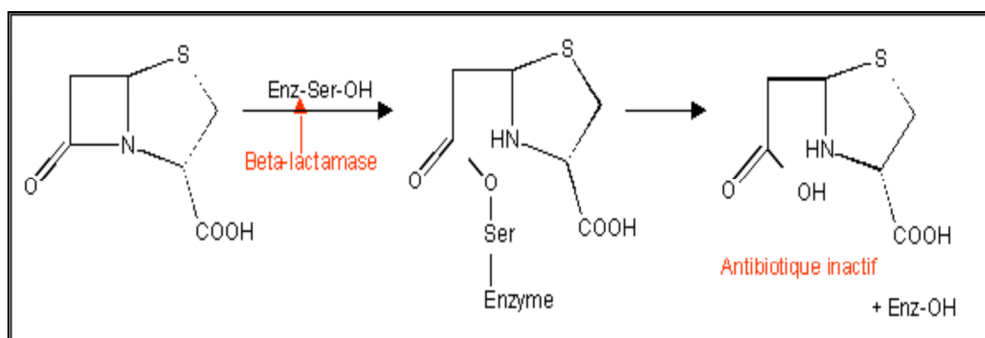
	Mécanismes	Mécanismes moléculaire	Antibiotique ciblé	Références
Aminosides	Altération de la cible	Changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale	(amikacine, gentamicine, kanamycine, nétilmicine et tobramycine).	(HMAMOUCI <i>et al.</i> , 2005).
	Modification enzymatique de l'antibiotique	- Phosphorylation ; - Nucléotidylation ; - Acétylation.	tobramycine, la nétilmicine, l'amikacine, gentamicine.	(ARCHAMBAUD et CLAVE, 2008 ; RAMIREZ, 2010).
	Piégeage de l'antibiotique	La phosphotransférase neutralise l'action des aminosides par liaison affine	Kanamycine et tobramycine	(MENARD <i>et al.</i> , 1993).
	modification du transport de l'antibiotique	Les mutations qui affectent le système actif de transport	Tous les aminosides	(ARCHAMBAUD et CLAVE, 2008).
Quinolones	- Diminution de l'affinité de la cible. - Diminution d'accumulation intracellulaire de l'antibiotique	Mutation chromosomique dans le gène <i>gyrA</i> ; <i>gyrB</i>	Fluoroquinolones et acide nalidixique	(LEWIN <i>et al.</i> , 1991)
	Protection de la cible (l'ADN gyrase)	Résistance plasmidique haut niveau	- Acide nalidixique (haut niveau) - Fluoroquinolones (bas niveau)	(JACOBY <i>et al.</i> , 2003)
	surexpression de pompes d'efflux	Mutations dans les gènes régulateurs	la norfloxacin et la ciprofloxacine (bas niveau).	(QUENTINE <i>et al.</i> , 2004; MAMMERI, 2008).
	Inactivation enzymatique	Acétyltransférase (résistance plasmidique).	fluoroquinolones et aminosides.	(ROBICKSKET <i>et al.</i> , 2006).

Tableau V : Les principaux mécanismes de résistance aux phénicolés et aux associations sulfamides et triméthoprimes

	Mécanismes	Mécanismes moléculaire	Antibiotique ciblé	Références
Phénicolés	Inactivation enzymatique	Résistance plasmidique : production d'une chloramphénicol-acétyl-transférase	(chloramphénicol, thiamphénicol)	(JEHL <i>et al.</i> , 2003)
	Diminution de la perméabilité	Résistance chromosomique		
	Système d'efflux	Résistance plasmidique		
Sulfamides et triméthoprimes	Modification enzymatique	- Mutation de la dihydroptéroate synthétase (DHPS) - Mutation de la dihydrofolate réductase (DHFR)	sulfamides et triméthoprimes	FAUCHERE et AVRIL, 2002)

6.3.1. Les Bêta-lactamases

Les β -lactamases ont été identifiées en 1940 par Abraham et Chain, qui ont mis en évidence une enzyme capable d'empêcher l'action de la pénicilline chez *E. coli* ; ils la nommèrent pénicillinase (ABRAHAM et CHAIN, 1940). Les β -lactamases sont des enzymes qui hydrolysent le noyau β -lactame, structure de base des β -lactamines, en donnant selon la cible des acides inactifs. Ces enzymes sont localisées au niveau de l'espace périplasmique chez les bactéries Gram négatif (MEDEIROS, 1984). La figure 3 montre le mode d'action des β -lactamases.

**Figure 3 :** Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle β -lactame (BARRIAL et SCOTET, 2006).

Les β -lactamases sont classées selon deux types de classification, l'une moléculaire qui est basée sur les similitudes des structures primaires des enzymes (Ambler) et l'autre fonctionnelle basée sur le spectre d'hydrolyse des enzymes (Bush). Les deux types de classification sont montrées dans le tableau VI.

6.3.1.1. Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE)

Au début des années 1980, la première BLSE plasmidique, dérivant de la pénicillinase SHV-1, fut identifiée en Allemagne dans une souche de *K. pneumoniae* (KNOTHE *et al.*, 1983).

Jusqu'à la fin des années 90, d'autre BLSE étaient principalement identifiées dans des souches de *K. pneumoniae* en milieu hospitalier. Ces BLSE dérivait des pénicillinases à spectre restreint TEM et SHV, dont le spectre d'hydrolyse était élargi par la sélection de mutations ponctuelles localisées au niveau du site actif de l'enzyme (ARLET *et al.*, 1994 ; CARRER et NORDMANN, 2011).

Classiquement, les BLSE sont définies comme des enzymes appartenant à la classe A (à l'exception des BLSE de type OXA classe D) de la classification d'Ambler, capables d'hydrolyser les pénicillines, céphalosporines de première, deuxième, troisième et quatrième génération et l'aztréonam. Elles sont inhibées *in vitro* par les inhibiteurs des β -lactamases (acide clavulanique, tazobactam et sulbactam). Par contre, les BLSE sont sensibles aux céphamycines (céfotétan et cefoxitine) ainsi qu'aux carbapénèmes. Une co-résistance avec les aminosides, les tétracyclines et les fluoroquinolones est fréquente (LIVERMORE, 1995).

Les bactéries possédant des BLSE sont dites multirésistantes. Il s'agit d'un mécanisme de résistance de type plasmidique, et donc transmissible à d'autres bactéries. La présence de ce type de mécanisme de résistance au sein de souches pathogènes fait peser un risque majeur d'inadéquation thérapeutique et donc d'échec thérapeutique et est également un facteur de diffusion. Au sein des entérobactéries, *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* sont les deux espèces les plus fréquemment porteuses de ces mécanismes de résistance. Toutefois, ces enzymes ont été retrouvées au sein de nombreuses autres espèces bactériennes, entérobactéries et bacilles non fermentant (tels que *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*) (JACOBY et MUNOZ-PRICE, 2005 ; SCHWABER et CARMELI, 2007).

Tableau VI : Classification des β -lactamases d'après Bush-Jacoby-Mrdeiros.

Classe moléculaire(Ambler)	Groupes fonctionnelles (Bush et al 2010)	Type de β lactamase et exemples représentatifs	Bactéries impliquées	Inhibition par l'acide clavulanique	Inhibition par L'EDTA	β lactamines hydrolysées	β lactamines stables
β- lactamases à sérine active Classe A	2a	Pénicillinasés	Bactéries à Gram positif	++	-	Pénicillines sauf pénicillines M	pénicillines M, C1G, carbapénèmes
	2b	β - lactamases à large spectre TEM-1 et 2, et SHV1 plasmidique s et chromosomiques	Bactéries à Gram négatif	++	-	Amino, carboxy et uréido-penicillines, C1G, C2G	Céphamycines, C3G, moxalactam, aztréonam.
	2be	β - lactamases à spectre élargi aux C3G et à l'aztréonam SHV2 à 9, TEM3 à 29, VEB1 plasmidique	Entérobactéries, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	++	-	Idem 2b + C3G et aztréonam	Céphamycines, moxalactam, aztréonam
	2br	β - lactamases à large spectre résistant à l'acide clavulanique TRI : dérivé de TEM30 à 41, plasmidique	Entérobactéries	-	-	Idem 2b + association aux inhibiteurs de β -lactamases	Idem 2b
	2c	Carbénicillinasés PSE1, PSE3, PSE4 plasmidique	Bactéries à Gram négatif	+		Idem 2b	Idem 2b
	2e	Céphalosporinasés chromosomiques, cefuroximase	Bactéries à Gram négatif	++	-	Amino, carboxy et uréido-penicillines, C1G, C2G certains C3G	Ceftazidime, céphamycines, Aztréonam, carbapénèmes.
	2f	Carbapénémases à site actif sérine, IMI -1, NMC -A, chromosomique	Entérobactéries	+		Idem 2b + aztréonam, carbapénèmes, certains C3G	Certaines C3G
Classe C	1	Céphalosporinase AmpC chromoso (entérobactéries, Pseudomonas,) plasmidiques (CMY, FOX, MOX, MIR1...)	Bactéries à Gram négatif	-	-	Toutes les β lactamines sauf les carbapénèmes	carbapénèmes
Classe D	2d	Oxacillinasés OXA1 à 20 plasmidiques et chromos	Bactéries à Gram négatif	V	-	Idem 2b parfois C3G aztréonam ou carba	
Pas de classe attribuée	4	Enzymes indéterminées, Ex : enzymes chromos <i>C.jejuni</i> , <i>C.cepacia</i>	Espèces variées		-	variable	Variable
β- lactamases Zinc – dépendances Classe B	3	métallo β lactamases IMB1/3 chromo ou plasmidique	Bactéries à Gram négatif	-	++	Large profil de substrat dont les carba	Variable

Les BLSE sont devenues un problème important car ils sont généralement codés par plasmide, ce qui facilite un taux élevé de transfert horizontal entre les différents espèces bactériennes (BOUCHILLON *et al.*, 2004).

6.3.1.1.1. Différents types de BLSE

Elles sont classées selon leurs types moléculaires, les plus fréquents étant les types TEM, SHV, CTX-M :

- **BLSE de type TEM (Temoneira)**

La première β -lactamase plasmidique de type TEM (TEM-1) a été isolée en 1965, en Grèce, à partir d'une souche d'*E. coli* isolée chez une patiente nommée Temoneira, d'où la nomination. TEM est l'élément génétique primaire impliqué dans l'évolution des mécanismes de résistance BLSE.

Des substitutions d'acides aminées peuvent entraîner une importante modification de l'affinité de l'enzyme. La majorité des BLSE de ce type dérivent par quatre à sept mutations ponctuelles de l'enzyme originale (TEM-1 ou TEM-2). Ces mutations touchant le gène *bla*_{TEM} rendent l'enzyme capable d'hydrolyser les C3G, mais sensible à l'action des inhibiteurs tel que l'acide clavulanique.

Cependant, d'autres mutations peuvent conférer la résistance aux inhibiteurs. Ces variant sont appelées TRI (TEM résistantes aux inhibiteurs). Les enzymes dérivées par mutations permettant d'hydrolyser à la fois les C3G et les inhibiteurs sont de plus en plus fréquentes (RODRIGUEZ-VILLALOBOS et STRUELENS, 2006).

Actuellement, il y a plus de 220 variant de *bla*_{TEM} qui ont été identifiés. Les plus fréquents TEM-3, TEM-5, TEM-10 ; TEM-12, TEM-26 et TEM-52. Aux États-Unis, les variant à spectre étendu de type TEM les plus courants sont TEM-10, TEM-12 et TEM-26 (MUNOZ-PRICE et JACOBY, 2013). La figure 4 montre les différentes BLSE dérivées de TEM.

NEWIRE *et al* (2013) ont démontrés la présence SHV-12, SHV-5 et variant SHV-2 pour la première fois en Egypte. SHV-12 est associée à une résistance de haut niveau pour céftazidime chez *K. pneumoniae*.

Les différents points de substitution des différents variant sont représentés dans la figure 5. Le résidu sérine à la position 238 ainsi que le résidu lysine à la position 240 sont indispensables à l'hydrolyse de la céfotaxime et de la céftazidime respectivement (ELHANI, 2012). Les variant les plus répandus au niveau mondial sont SHV-5 et SHV-12 (MUNOZ-PRICE et JACOBY, 2013). La figure 5 montre les différents types de BLSE dérivées de SHV

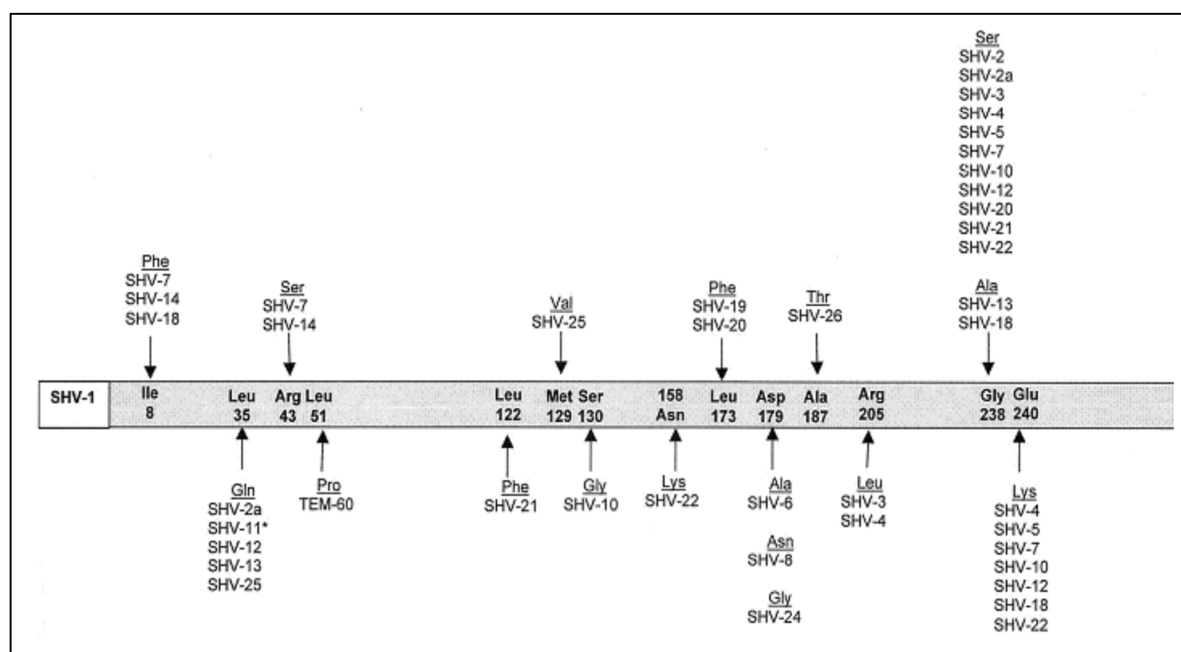


Figure 5 : Les BLSE dérivées de SHV (BRADFORD, 1999).

- **BLSE de type CTX-M (Cefotaximase-Munich)**

Les nouvelles β -Lactamases à spectre élargi non TEM non SHV dénommées CTX-M d'origine de l'espèce *klyuvera* (entérobactérie de l'environnement) avec BLSE chromosomique, ont été décrites initialement au Japon en 1986 (FEC-1) pour « Fecal *E. coli* », encore en Allemagne et France en 1989 (CTX-M-1) caractérisée chez une souche *E. coli* résistante au céfotaxime. Les CTX-M ont été nommées en raison de leurs spectre d'activité, elles hydrolysent préférentiellement la céfotaxime, d'où leur nom de céfotaximases que des autres céphalosporines de troisième génération (BONNET, 2004).

Les CTX-M sont classés en 6 groupes phylogénétiques distincts : CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 et CTX-M-45 (ROSSOLINI *et al.*, 2008). Le variant CTX-M-15 appartient au sous-groupe CTX-M-1 et dérivé de CTX-M-3. Sa séquence protéique présente une mutation ponctuelle en position 240 qui conduit à une plus forte hydrolyse de la céftazidime comparée à celle du céfotaxime. Les CTX-M sont plus fortement inhibées par le tazobactam que par l'acide clavulanique. Les CTX-M-15 concernent maintenant l'ensemble des Entérobactéries, notamment *K. pneumoniae* (POIREL *et al.*, 2002 ; ELHANI, 2012).

La dissémination horizontale des gènes codant pour les enzymes CTX-M s'effectue via des plasmides conjugatifs mais aussi via d'autres éléments génétiques comme les intégrons et les séquences d'insertion ISEcp1. Cette propriété explique la dissémination facile de ces enzymes dont l'importance augmente par rapport aux autres types de BLSE notamment TEM et SHV (BRADFORD, 2001 ; ARPIN *et al.*, 2007).

Nombreuses études ont déjà été rapportées au Nord d'Algérie, sur la présence de β -lactamases CTX-M-3 et CTX-M-15 : à Tlemcen, Oran, Alger, Bejaïa, Tizi-Ouzou, Sétif, Constantine et Annaba (NAAS *et al.*, 2005 ; RAMDANI-BOUGUESSA *et al.*, 2006 ; IABADENE *et al.*, 2008 ; MESSAI *et al.*, 2008 ; IABADENE *et al.*, 2009 ; MERADI *et al.*, 2011 ; GHAROUT-SAIT *et al.*, 2012).

Plus de quarante membres de CTX-M ont été récemment identifiés CTX-M-14, CTX-M-3 et CTX-M-2 sont les plus répandus (HUANG *et al.*, 2015 ; BAEZ *et al.*, 2016 ; KIM *et al.*, 2016).

Des études antérieures de caractérisation moléculaire sur TEM, SHV, les gènes CTX-M et de leurs dérivés, par exemple bla_{TEM-1} et bla_{SHV-12}, ont montré qu'ils sont épidémiologiquement liés, et sont à la fois portés par un plasmide (BAGATTINI *et al.*, 2006).

Avec plus de 220 variants de bla_{TEM} et 172 différents bla_{CTX-M} rapportés à ce jour, ces sites à sérine (bla_{TEM} et bla_{CTX-M}) représentent les β -lactamases les plus répandues parmi les entérobactéries (MUDSSER *et al.*, 2016).

- **Autres BLSE**

D'autres types de BLSE rares ont été découverts principalement chez *Pseudomonas aeruginosa* et à un nombre limité de sites géographiques qui ont une distribution moins large. Elles sont caractérisées par un haut niveau de résistance à la céftazidime et parfois à

l'aztréonam plutôt qu'au céfotaxime. On peut citer PER1 qui est une BLSE fréquente chez les espèces appartenant au genre des *Acinetobacter* multirésistants trouvés dans les isolats cliniques en Turquie, en France et en Italie.

PER1 hydrolyse efficacement les pénicillines, les céphalosporines et sensible à l'inhibition de l'acide clavulanique. VEB 1 et VEB 2 sont d'autres BLSE mineurs qui ont été trouvés en Asie du Sud- Est de même que GES-1, GES-2 et IBC-2 trouvés en Afrique du Sud, France et Grèce dont GES décrites chez *K.pneumoniae* (BRADFORD, 2001 ; ARLET et PHILIPPON, 2003; WELDHAGEN *et al.*, 2003 ; PHILIPPON et ARLET, 2006).

D'autres BLSE très rares, tels que BES-1, IBC-1, SFO-1, et TLA-1, ont été découvert que dans les entérobactéries.

Les BLSE de type OXA de classe D, ont été trouvés principalement chez *P. aeruginosa* en Turquie et en France. Elles ont une grande activité catalytique pour la cloxacilline, l'oxacilline et la méticilline. Les principaux membres de la famille OXA sont relativement insensibles à l'acide clavulanique. Certains d'entre eux ont une résistance principalement à la céftazidime, mais OXA-17 montre une plus grande résistance au céfotaxime et céfépime que de la céftazidime.

Douze BLSE dérivés d'OXA-10, OXA-1 ou OXA-2 par des substitutions d'acides aminés sont actuellement connus (BRINAS *et al.*, 2002 ; VATCHEVA-DOBREVSKA *et al.*, 2013).

6.4. La multirésistance de *K.pneumoniae* aux antibiotiques

La découverte et l'utilisation de nombreux antibiotiques ont été à l'origine de quelques uns des plus grands succès de la médecine. L'usage abusif d'antidotiques a entraîné l'émergence et la diffusion de la multirésistance dans les populations humaines et animales, ce qui constitue un problème de santé publique préoccupante.

K.pneumoniae fait partie des souches cliniques ayant contribué à la dissémination rapide des gènes de résistance. Son génome est le support de plusieurs gènes de résistance.

La résistance aux β -lactamines par système d'efflux est souvent couplée à une diminution de la perméabilité, l'association de ces deux mécanismes peut entraîner une résistance à haut niveau et simultanée vis-à-vis d'antibiotiques structuralement non reliés, constituant ainsi de véritables systèmes de multirésistance (BIALEK-DAVENET *et al.*, 2011 ; ROBIN *et al.*, 2012).

Des souches de *K.pneumoniae* BLSE sont également résistantes fluoroquinolones. Cette résistance était secondaire à des mutations chromosomiques.

Les entérobactéries, sont particulièrement efficaces pour échanger de l'information génétique, et la résistance aux antibiotiques de ces espèces est souvent due à l'acquisition de gènes étrangers. Ces gènes ont été capturés à partir du chromosome d'espèces différentes.

Ces mobilisations impliquent deux types différents d'éléments génétiques mobiles. Ceux qui sont capables de transférer ou de capter des gènes entre les molécules d'ADN tels que les séquences d'insertion, les transposons, ou les cassettes des intégrons et ceux qui permettent de transfert d'ADN entre cellules, tels que les plasmides conjugatifs et mobilisables ou les éléments intégratifs conjugatifs (ICE).

L'apparition et la fréquence croissante de souches sécrétrices de plusieurs β -lactamases constituent un autre phénomène inquiétant. Ainsi, l'enzyme CTX-M-15 est souvent associée à des pénicillinases TEM-1 et/ou OXA-1.

Le plus souvent, les souches qui produisent KPC expriment également d'autres β -lactamases, dont de nombreux types de BLSE (TEM, SHV, CTX-M et possèdent un certain degré de résistance par imperméabilité. Il est de même pour les souches productrices de métallob-lactamases ou d'oxacillinase OXA-48 (KASSIS-CHIKHANI *et al.*, 2006 ; NORDMANN et POIREL, 2011).

6.5. Méthodes de détection de la production de BLSE

La détection de BLSE s'effectue par des différentes techniques qui sont divisées en deux catégories, les méthodes phénotypiques et les méthodes génotypiques.

6.5.1. Méthodes phénotypiques

Différents tests phénotypiques spécifiques ont été mis au point pour détecter la production de BLSE. Le principe est basé sur l'utilisation d'une céphalosporine de 3^{ème} génération et d'un inhibiteur de β -lactamases, généralement l'acide clavulanique (WIEGAND *et al.*, 2007).

6.5.1.1. Test de synergie

Le test consiste à rechercher une image de synergie entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de β -lactamases (Amoxicilline+ Acide clavulanique) entouré à 30 mm d'un disque C3G (céftriaxone, céftazidime et céfotaxime), C4G (cefépime) ou un monobactame (aztréonam).

La présence d'une BLSE est mise en évidence par l'observation d'une image de synergie sous forme dite « bouchon de champagne » (RAHAL, 1999).

6.5.1.2 Bandelettes E-test® BLSE

Les bandelettes Etest® BLSE contiennent un gradient de C3G à une extrémité de la bande et un gradient d'une C3G combinée avec l'acide clavulanique à l'autre extrémité. Le test est positif lorsque la valeur de la CMI de l'antibiotique testé est réduite de plus de trois dilutions en présence de l'acide clavulanique (CORMICAN *et al.*, 1996).

6.5.1.3. Le test Vitek

Il s'agit d'une méthode automatisée pour la détection des BLSE (BioMerieux Vitek, Hazelton, Missouri). La carte Vitek pour BLSE utilise la céftazidime ou le céfotaxime seul (0,5µg/ml) et en combinaison avec l'acide clavulanique (4µg/ml). La réduction de la croissance dans les puits contenant l'acide clavulanique comparée à ceux contenant les céphalosporines seules indique la présence de BLSE. La sensibilité et la spécificité de ce test sont supérieures à 90%.

L'avantage certain de ce test est qu'il peut être facilement intégré dans les différents processus des laboratoires qui utilisent déjà le système Vitek (WIEGAND *et al.*, 2007).

6.5.1.4. Tests complémentaires

- **Test du double disque (appelé aussi test espagnol)**

Ce test est un test de confirmation de la présence d'une BLSE. Une différence de 5 mm de dans le diamètre d'inhibition autour du disque combiné (C3G +Acide clavulanique) comparativement à la C3G seule signifie la présence d'une BLSE (CARTER *et al.*, 2000).

- **Test à la cloxacilline**

Le test cloxacilline est effectué pour identifier une BLSE associée à une céphalosporinase déréprimée. La cloxacilline ajoutée au milieu pour antibiogramme Mueller-Hinton inhibe très fortement toutes les céphalosporinases hyperproduite. La présence d'une BLSE est confirmée s'il y a restauration de l'activité C3G et apparition d'une image de synergie (PHILIPPON et ARLET, 2006 ; DRIEUX *et al.*, 2008).

- **Test du rapprochement des disques**

Lorsqu'un second mécanisme de résistance est susceptible de masquer la présence de l'image de BLSE (exemple : TRI), il est possible de retrouver cette image de synergie en rapprochant du disque contenant l'acide clavulanique et les disques de C3G ou d'aztréonam (15 ou 20 mm centre à centre (RAHAL, 2000)).

6.5.2. Méthodes génotypiques

Plusieurs méthodes génotypiques sont utilisées: l'utilisation des sondes d'acides désoxyribonucléiques, la « Polymerase Chain Reaction » (PCR) avec plusieurs variantes, l'oligotypage, la « Ligase Chain Reaction », et le séquençage des nucléotides.

La PCR en temps réelle est la méthode la plus utilisée pour le diagnostic moléculaire des BLSE. Ces techniques en plus de la détection permettent aussi de caractériser les BLSE (KAMPKE *et al.*, 2001).

6.6. Mécanismes génétique de transfert de gènes de résistance

L'évolution de la résistance aux antibiotiques confère des avantages de survie des micro-organismes (défenses immunitaires, résistances aux biocides et aux antimicrobiens, transfert élevé des plasmides dans l'environnement) ce qui inclut des gènes de résistances aux antibiotiques.

Les éléments génétiques conférant un transfert horizontal facile, en raison de la proximité de ressemblance génétique entre les bactéries de la famille des Enterobacteriaceae (HENNEQUIN *et al.*, 2012 ; SOTO, 2013).

Les gènes de résistances aux antibiotiques sont transportés par des supports génétiques. Il existe trois mécanismes de transfert horizontal de gènes qui se produit dans la nature, ces mécanismes sont la conjugaison, la transduction et la transformation (MOUBARECK *et al.*, 2003).

- **La conjugaison**

La conjugaison c'est le transfert d'ADN au cours d'un contact physique entre bactérie donneuse et receveuse grâce aux pili sexuels. Cette dernière qui a reçu l'ADN d'une cellule donneuse s'appelle un transconjugant.

- **La transduction**

La transduction c'est le transfert d'ADN entre deux cellules bactériennes par l'intermédiaire d'un phage.

- **La transformation**

La transformation c'est l'intégration d'un fragment d'ADN étranger dans une cellule, ce qui peut entraîner une modification héréditaire du phénotype de l'organisme receveur (SINGLETON, 2005).

Actuellement, plusieurs questions se sont soulevées concernant la sécurité et l'efficacité des antibiotiques utilisés en médecine humaine et vétérinaire (ISERIN, 2001 ; MATYAR *et al.*, 2008).

L'usage abusif et inapproprié des antibiotiques ont entraîné la forte adaptabilité des souches bactériennes et la sélection des souches multirésistantes.

Face à ces problèmes de multirésistance, les scientifiques se sont orientés vers la recherche de nouvelles molécules de diverses origines.

Les plantes médicinales constituent la source la plus importante de molécules à activité antimicrobienne. Les principes actifs issus des plantes utilisés sont principalement les composés phénoliques, huiles essentielles, terpènes et les acides.

Inula viscosa est une plante aromatique largement utilisée en phytothérapie du fait de sa richesse en composés organiques naturels qui inhibent la croissance des micro-organismes pathogènes (PAGES, 2003 ; HAMILTON-MILLER, 2004).

1. Description de la plante

Le nom *Inula* viendrait du grec : Inéo qui signifie-je purge (allusion à une propriété thérapeutique de la plante) et *Viscosa* veut dire visqueuse : Aunée visqueuse. Est une plante très anciennement connue, elle a été utilisée au moyen âge jusqu'à nos jours pour ses vertus médicinales variées.

La plante *Inula viscosa* (Aiton. L), définie par Aiton. L dans le guide botanique « Medicinal and Culinary » son synonyme *Dittrichia viscosa* Greuter « compositeae » (FOURNIER, 1947; FAURON *et al.*, 1983).

C'est une plante vivace, elle pousse dans les champs « sauvages » dans les alentours du bassin méditerranéen (Europe, Asie et en Afrique), dans les collines, les zones humides, les bords de la route, les sols secs et calcaires, on la trouve aussi dans les sols salés, et les bords de cours d'eau (BAYTOP, 1984 ; AL-YAHYA, 1998 ; WENQIAO *et al.*, 2004).

Inula viscosa (L) est une plante annuelle, herbacée, visqueuse et glanduleuse, à odeur forte, elle est réputée être un insecticide végétal qui combat la Mouche d'Olivier (*Bactrocera oleae*), elle appartient à la famille des Astéracées (Composées). Elle peut atteindre de 50 cm à 1m de hauteur et présente des capitules à fleurs jaunes très nombreux au sommet de la tige.

La floraison commence à la fin d'été et le début d'automne. Les fleurs périphériques sont liguliformes, celles du centre sont tubulaires. Les fruits sont des akènes velus à aigrette grisâtre.

Les feuilles sont ondulées, entières ou dentées, aiguës, sinuées, les caulinaires amplexicaules, plus largement lancéolées, les capitules assez gros en longues grappes pyramidales (QUEZEL et SANTA, 1963).

2. Taxonomie

Règne : Plantae

Embranchement : Magnoliophyta

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Magnoliopsida

Sous classe : Gamopetales

Ordre : Asterales

Famille : Astéracées (composées)

Genre : inula

Espèce : viscosa- L-AIT

Synonymie : *Dittrichia viscosa*

Nom commun : Inule, aunée visqueuse

Noms vernaculaires : Magramane ou amagramane (FOURNIER, 1947).

3. Les principes actifs d'Inule visqueuse et leurs activités biologiques

Le métabolisme d'*Inula viscosa* donne naissance à une grande variété de métabolites secondaires. Ses feuilles secrètent un mélange de résines tout en long de leur vie. Ces exsudats se composent de plusieurs flavonoïdes aglycones, ainsi que de nombreux terpenoïdes, les huiles

essentielles, sesquiterpènes lactones, les flavonoïdes, alcaloïdes, coumarines, tanins, stérols, et saponosides (STAVRIANAKOU *et al.*, 2006 ; BOUMAZA, 2011).

3.1. Les flavonoïdes

Le nom flavonoïde provient du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange. cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du flavus ; (flavus=jaune) (KARAALI *et al.*, 2004 ; MALESEV ETKUNTC, 2007 ; BRUNETON, 2009).

Les flavonoïdes sont des polyphénols complexes considérés comme des pigments quasi universels des végétaux dont la structure est constituée de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle oxygéné. Ce sont des dérivés du noyau flavone ou 2-phényl chromone portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides. Chez le genre *Inula* on trouve des flavonoïdes glycosylés, et des flavonoïdes aglycones.

Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aurones et les anthocyanes (VERMERRIS et NICHOLSON, 2006). La figure 6 ainsi que le tableau VII montrent les structures chimiques des flavonoïdes isolés d'*Inula viscosa*.

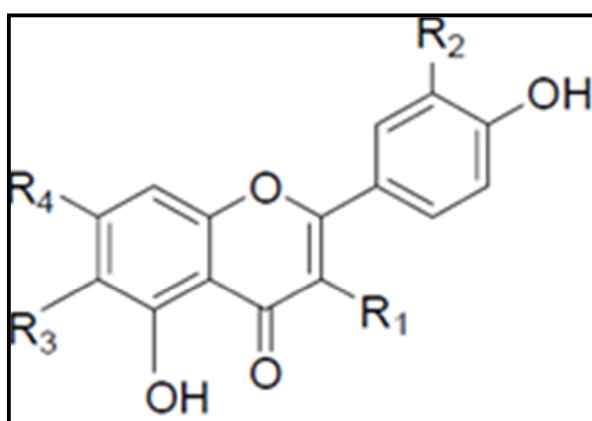


Figure 6 : Structures chimique des flavonoïdes isolés d'*Inula viscosa* (BICHA, 2003).

Tableau VII structures chimique des flavonoïdes isolés d'*Inula viscosa* (BICHA, 2003).

Composés	R1	R2	R3	R4
Apigénine	H	H	H	OH
Quercétine	OH	OH	H	OH
Genkwanine	H	H	H	OCH3
Hispiduline	H	H	OCH3	OH
3-O-méthylquercétine	OCH3	OH	H	OH
3-O-méthylkaempferol	OCH3	H	H	OH

Les flavonoïdes constituent un groupe de substances très importantes présentent un grand intérêt dans beaucoup de domaines. Ils sont connues pour leurs diverses propriétés biologiques telles que antioxydante, anti-inflammatoire, antibactérienne, antifongiques, inhibitrice, antihépatotoxique, antitumorale, antihypertensive, antivirale et antiallergique, ainsi sont destinés à l'utilisation dans les industries pharmaceutiques, agroalimentaires et cosmétiques (ANDERSSON *et al.*, 1996).

Les flavonoïdes d'*Inula viscosa* ont montrés leur efficacité comme substances antibactériennes vis-à-vis des souches *staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus vulgaris*. Cette propriété serait due à une inhibition des enzymes bactériennes, du fait de la réaction d'addition avec le groupement thiol ou amine (PARIS et MOYSE, 1965).

3.2. Les sesquiterpènes lactones

Les sesquiterpènes lactones ont une distribution botanique assez sporadique, présentes chez les angiospermes, et très majoritairement chez les composées (Astéracées).

Sont fréquemment localisées dans les poils sécréteurs situés au niveau des feuilles, des tiges et des bractées de l'inflorescence. Ce sont des sesquiterpènes (classe de terpène formée de 3 unités isoprènes et a comme formule (C₁₅H₂₄) à fonction lactone (BRUNETON, 1993).

Des investigations phytochimiques réalisées sur le genre *Inula* ont permis d'isoler plusieurs sesquiterpènes lactones.

Les sesquiterpènes d'*Inula viscosa*, sont des molécules à pouvoir fongicide ont mis en évidence une action antifongique contre les dermatophytes et *candida albicans* ainsi qu'une action antibactérienne contre certains Gram positifs, Gram négatifs et mycobactéries (DENDOUGUI, 1989; BICHA, 2003). La figure 7 montre les structures chimiques des sesquiterpènes lactones isolés d'*Inula viscosa*.

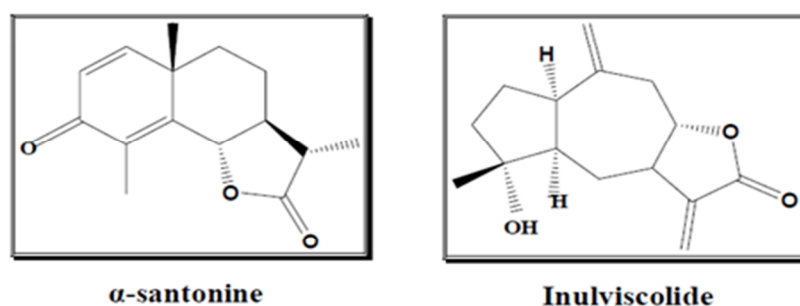


Figure 7 : Structures chimique des sesquiterpènes lactones isolés d'*Inula viscosa* (DENDOUGUI, 1989 ; BICHA, 2003).

3.3. Les terpènes

Les terpènes (Terpénoïdes) sont des constituants habituels des cellules végétales, impliqués ou non dans des fonctions métaboliques essentielles. L'étude de leur métabolisme connaît un regain d'intérêt par suite du développement des méthodes analytiques auxquelles est venu s'ajouter l'outil moléculaire. Ce sont des métabolites secondaires résultant de la condensation d'unités isopréniques à 5 atomes de carbone (PARIS et MOYSE ,1965).

Les terpènes sont présents chez tous les êtres vivants et possèdent des structures, des propriétés physiques et chimiques et des activités biologiques très diverses et plusieurs d'entre eux sont exploités à l'échelle industrielle.

Des travaux effectués sur certaines espèces du genre *Inula* tels que *Inula viscosa* ont permis d'isoler des triterpènes. La figure 8 montre les structures chimiques des triterpènes isolés d'*Inula viscosa*.

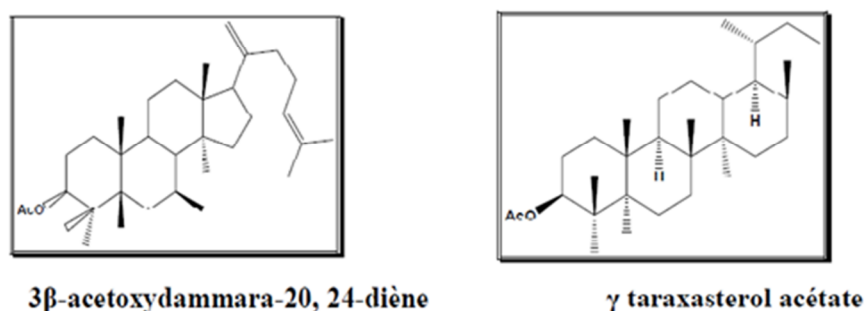


Figure 8 : Structures chimique des triterpènes isolés d'*Inula viscosa* (OKSÖZ, 1976; BOHLMAN, 1977).

3.4. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont volatiles et odoriférantes. Ses caractéristiques joueraient un rôle dans la communication chimique. Elles peuvent également constituer un moyen de défense vis-à-vis des prédateurs donc elles ont des diverses propriétés thérapeutiques.

D'après l'AFNOR et ISO : « l'huile essentielle est le produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe frais de certains agrumes, soit par distillation. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques » (ISO, 1997 ; AFNOR, 2000).

La composition chimique de l'huile essentielle obtenue à partir des parties aériennes fleuries d'*Inula viscosa*, a été analysée par chromatographie CG/MS. Parmi les constituants identifiés qui représentent 60% de l'huile, les sesquiterpènes alcooliques fokienol (38.8%) et (E)-nerolidol (7.1%) sont les principaux composants.

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celles des moisissures et des levures. Leur activité

antimicrobienne est principalement en fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs.

Elles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines. Pour les levures, elles agissent sur la biomasse et la production des pseudomycelium alors qu'elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures.

L'effet antibactérien des huiles essentielles d'inule visqueuse est proportionnel à sa concentration, ont montrées une activité antibactérienne vis-à-vis des souches pathogènes multirésistantes, il s'agit de *K.pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus aureu*, *Staphylococcus epidermidis* et *Lesteria innocua* (STAVRIANAKOU *et al.*, 2006; KHEYAR *et al.*, 2014).

L'activité antifongique des huiles essentielles des feuilles et des fleurs, de la plante entière et de la plante entière sans fleurs d'*Inula viscosa* contre les moisissures, dermatophytes, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton terrestre* et *Candida spp.* La cible principale de cet effet est l'inhibition de la synthèse d'ergostérol et par conséquent, l'inhibition de la synthèse de la chitine constituant de la paroi des dermatophytes (CAFARCHIA *et al.*, 2002 ; FRANCO-MICAN *et al.*, 2008 ; BSSAIBIS *et al.*, 2009).

Ces résultats présentent aussi un intérêt pour l'utilisation de cette l'huile à des applications en phytosanitaire comme un procédé de lutte biologique basé sur les substances naturelles (BOUMAZA, 2011).

Les applications des huiles essentielles dans la vie courante touchent divers domaines en particulier, la cosmétologie, parfumerie et l'industrie agro-alimentaire (MAPOLA, 2003).

4. Activités des extraits brutes d'Inule visqueuse

Les extraits éthanoliques et méthanoliques des feuilles d'inula viscosa ont des activités antibactériennes, ils inhibent efficacement certaines souches résistantes telles que *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* et *Salmonella Paratyphi A*. Les souches de *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* sont présentés la plus grande sensibilité aux extraits divers (LAGHRIFI *et al.*, 2013).

Tableau VIII: Les applications de l'inule visqueuse et ses principes actifs (FOURNIER, 1947 ; NISSIM, 1982; DJERROUMI et NACEF, 2004).

Plaies	L'application des feuilles fraîches, ou leurs poudres sur des plaies ouvertes et des brûlures ont un effet anti hémorragique, antiseptique et anti inflammatoires ainsi favorise une cicatrisation plus rapide.
Les peaux sèches, Rugueuses et mycoses cutanées	La poudre des feuilles <i>Inula viscosa</i> séchées est appliquée à l'extérieur des parties touchées du corps on les mélangeant avec de l'huile.
Hémorroïdes	Une application conçue à base des feuilles broyées, mélangées avec de l'huile a montrée son efficacité contre ce genre de trouble.
L'hypertension artérielle, le diabète et néphropathies	Consommation de l'extrait d' <i>Inula viscosa</i> après décoction.
Bronchites et les infections respiratoires	Consommation de l'extrait d' <i>Inula viscosa</i> après l'infusion.
Contre les maux de tête	chauffer la plante dans un couscoussier, l'asperger d'huile d'olive et l'appliquer, enrouler dans un linge, sur les parties à traiter.
Analgésique dentaire	Mastication des feuilles
Contre les odeurs des pieds	Etaler quelques feuilles à l'intérieur des chaussures avant de les mettre.
Antipyrétique et lutte contre le paludisme	Inule visqueuse est utilisée dans la médecine populaire comme antipyrétique en tisanes ou en bains dans la lutte contre le paludisme.

5. Méthodes d'extraction des principes actifs

Les méthodes d'extraction sont basées sur la séparation sélective d'un ou de plusieurs composés d'un mélange sur la base de propriétés chimiques ou physiques. On distingue l'extraction liquide-liquide et l'extraction solide-liquide.

L'extraction liquide-liquide est une mise en œuvre de l'extraction par transfert entre deux phases liquides. Quant à l'extraction solide-liquide, Il s'agit d'extraire une substance présente dans un solide pour la faire passer dans un solvant. Les cas les plus simples correspondent à la décoction, l'infusion et la macération (GHEORGHIADÉ *et al.*, 2006).

Les principes actifs d'une plante médicinale sont des agents chimiques doués d'une activité biologique. La présence de ces composants souvent en quantité extrêmement faible dans la plante impose des séparations généralement délicates.

La décoction, l'infusion et la macération sont les méthodes de séparation les très utilisées pour l'extraction globale des principes actifs et qui sont suivies par des série de séparation chromatographique pour atteindre une matière pure d'un principe actif.

➤ **Décoction**

La décoction est une méthode d'extraction des principes actifs d'une préparation généralement végétale par dissolution dans un solvant approprié (généralement l'eau), ce qui suppose que ces substances ne soient pas thermolabiles. Le tout est porté à l'ébullition pour en extraire les principes actifs et maintenu à température pendant un temps variable. Elle s'applique généralement aux parties les plus dures des plantes : racines, graines, écorce (LUICITA, 2006).

➤ **Infusion**

L'infusion est une méthode d'extraction des principes actifs ou des arômes d'un végétal par dissolution dans un liquide initialement bouillant que l'on laisse refroidir. Le solvant n'est pas nécessairement de l'eau, cela peut être également une huile ou un alcool (LUICITA, 2006).

➤ **Macération**

La macération consiste à laisser tremper une plante sèche dans un solvant approprié pendant plusieurs heures, jours, voire semaines. L'intérêt de la macération est généralement la conservation des principes actifs durant le procédé (LUICITA, 2006).

5.1. Techniques utilisées pour la séparation des huiles

Les huiles essentielles sont des produits obtenus soit à partir des matières premières naturelles par distillation à l'eau, soit à partir des fruits de citrus par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques.

➤ **Extraction par hydrodistillation**

Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène. Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique. Le mélange « eau + huile essentielle » distille à une température inférieure à 100°C à pression atmosphérique. L'huile essentielle est ensuite séparée par décantation dans une fiole à décanter. La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures (NAIT *et al.*, 2007).

➤ **Extraction par entraînement à la vapeur d'eau**

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles des plantes aromatiques pour l'application en médecine. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter.

La vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange "eau + huile essentielle". Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique (l'huile essentielle) (PARIS et HURABIELLE, 1980).

➤ **Extraction par micro-ondes**

L'extraction par micro ondes est une technique récente d'extraction des huiles essentielles. Son principe repose sur le fait que le micro ondes agit sur certaines molécules, telles que l'eau, qui absorbent l'onde et la convertissent en chaleur. Ainsi dans une plante, les micro ondes sont absorbées par les parties riches en eau telles que les vacuoles, puis convertie en chaleur. Il en résulte une augmentation soudaine de la température à l'intérieur du matériel. La vapeur détruit les cellules végétales et l'huile est entraînée par la vapeur d'eau (LUICITA, 2006).

➤ **Extraction par solvants organique (Soxhlet)**

La technique d'extraction « classique » par solvant, consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique. Il s'agit d'une technique de concentration des principes actifs (LUICITA, 2006).

➤ **Extraction par solvants supercritique**

L'originalité de cette technique repose sur le solvant utilisé: il s'agit du CO₂ ou autres en phase supercritique. A l'état supercritique, le CO₂ n'est ni liquide, ni gazeux, et cela lui confère un excellent pouvoir d'extraction, modulable à volonté en jouant sur la température de mise en œuvre. Les fluides supercritiques comme le CO₂ sont de bons solvants à l'état supercritique, et de mauvais solvants à l'état gazeux (LUICITA, 2006).

1. Matériel et méthodes

Notre étude expérimentale a été réalisée au niveau du Laboratoire de Biochimie Analytique et de Biotechnologie(LABAB), Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Faculté des Sciences Biologique et Agronomique. Cette étude comporte deux parties, une partie d'étude de microbiologie fondamentale et une autre de microbiologie Appliquée.

La partie de microbiologie fondamentale s'est axée sur l'étude du profil de sensibilité ou de résistance aux antibiotiques ainsi que la détermination du support génétique de la résistance aux C3G.

Quant à la partie de microbiologie Appliquée, elle est axée sur l'étude de l'activité des différents extraits d'*Inula viscosa* sur des isolats cliniques de *Klebsiella pneumoniae* multirésistants.

1.1. Matériel

1.1.1. Appareillages

- Autoclave (Pb-INTERNATIONAL) ;
- Bain-marie (MEMMERT) ;
- Etuve 37°(MEMMERT) ;
- Bec-Bunsen ;
- Réfrigérateur (ENIEM) ;
- Spectrophotomètre visible (MEDLINE) ;
- Balance de précision (KERN);
- Vortex (Heidolpb BIOBLOCK) ;
- Agitateur magnétique (RÜHRO MAG) ;
- Microscope photonique à l'objectif 10,40 et 100 (HUND WETZLAR);
- Rebot cuisine (PHILIPS) ;
- Lyophilisateur (CHRIST ALPHA 1-2) ;
- Rotavapor.

1.1.2. Verrerie et autres matériel

- Lames et lamelles ;
- Micropipettes 10, 100 et 1000 ul (Accumex SMART; Accumex PRO) ;
- Tubes à essai à vis stériles ;
- Pipettes Pasteur ;
- Ensemenceurs ;
- Râteaux ;
- Tubes eppendorf 1,5 et 2 ml ;
- Anses à boucle ;
- Boîtes de Pétri en plastique à 90 mm de diamètre ;
- Pipettes graduées stériles à différents volumes ;
- Ecouvillons ;
- Flacons de 200 ml stérile ;
- Spatule ;
- Barreau magnétique ;
- Seringues de 5 et 10 ml ;
- Galeries biochimiques API 20E (Biomérieux) ;
- Erlenmeyers ;
- Entonnoirs ;
- Bêchers ;
- Cristallisoirs ;
- Tubes ECBU ;
- Fioles de 50, 500 et 1000 ml ;
- Disques de papier wattman N° 1 ;
- La laine de verre pour filtration.

1.1.3. Milieux de culture

- **Liquide**
 - ✓ Bouillon nutritif ;
 - ✓ Bouillon Cœur Cerveau.

- **Solide**
 - ✓ Gélose nutritive ;
 - ✓ Mac Conkey ;
 - ✓ Mueller Hinton.

1.1.4. Colorants et réactifs

- ✓ Lugol ;
- ✓ Fushine diluée à 1/10 ;
- ✓ Violet de Gentiane ;
- ✓ Huile d'immersion ;
- ✓ Glycérol (80%) ;
- ✓ Disque d'antibiotiques en cartouche (Liofilchem Italy) ;
- ✓ Antibiotique CTX (poudre) ;
- ✓ Azide de sodium (poudre) ;
- ✓ Eau physiologique 9 ‰ ;
- ✓ Ethanol 90%,96% ;
- ✓ Méthanol 96% ;
- ✓ Eau distillée ;
- ✓ Dimethyl sulfoxyde : DMSO.

1.1.5. Matériel biologique

1.1.5.1. Souches étudiées

Dix souches de *Klebsiella pneumoniae* issues de prélèvements cliniques provenant de patients hospitalisés dans différents services de l'hôpital CHU NEDIR Mohamed de la ville de Tizi-Ouzou, ont été recueillies en 2013 et 2014. Ainsi, des informations concernant chaque prélèvement effectué ont été recueillies de manière prospective : type de service où le patient a été admis, type du prélèvement, la date et le sexe du patient. L'isolement effectué au niveau du Service Bactériologie Parasitologie à partir de divers produits pathologiques (pus, urines, bronchiques) provenant de services différents tels que (hématologie, infectieux, neurochirurgie, et urgences pédiatries).

- Une souche *Escherichia coli* (K12) sans plasmide utilisée comme souche réceptrice pour la conjugaison (AZID^R).
- Une souche de référence *Escherichia coli* ATCC 25922 utilisée pour la validité de l'antibiogramme.
- Une souche de référence *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Les informations concernant les souches pré citées sont représentées dans le tableau **VIII**.

1.1.5.2. Matériel végétal

Au cours de cette étude on s'est intéressé à une plante qui est *Inula viscosa* prévenant du village Ichardiouéne, région de Beni-Douala, Wilaya de Tizi-ouzou. La collecte a été réalisée au cours du mois d'avril de l'année 2016.



Figure 9 : photo d'Inule visqueuse prise au milieu de la récolte.

Tableau IX: Les informations concernant les isolats cliniques.

N° d'identification	Sexe	Service	Type de prélèvement	Date de prélèvement	Interne /externe
Kp 6252	M	Hématologie	Pus	14/07/2014	Interne
Kp 825	M	Infectieux	Urine	28/01/2014	Interne
Kp 1115	F	ND	Bronchique	05/01/2014	Interne
Kp 1895	F	Hématologie	Pus	27 /02/2014	Interne
Kp 4683	M	Neurochirurgie	Pus	20/05/2014	Interne
Kp 2042	F	Urgences pédiatrie	Urine	11/03/2013	Interne
Kp 1212	F	Pédiatrie I	Urine	13/02/2013	Interne
Kp 1766	M	Infectieux	Urine	04/03/2013	Interne
Kp 4328	F	Urgences de chirurgie	Pus	Mai 2014	Interne
Kp 4936	M	Urologie	Pus	Mai 2014	Interne
<i>E. coli</i> K12 <i>E. coli</i> ATCC 25922		Laboratoire génétique de BAB EZZOUAR			
<i>S.aureus</i> ATCC25923		Laboratoire de sécurité sanitaire des aliments, Paris, France.			

1.2. Méthodes

Partie 1 : Etude fondamentale

Les souches utilisées au cours de l'expérimentation ont été conservées avec du glycérol à 80% au congélateur à -18°C. Une étape de revivification est donc indispensable à leur utilisation au cours de l'étude.

1.2.1. Revivification

Cette étape a pour but de remettre les souches dans leur état physiologique normal. Une biomasse bactérienne prélevée à l'aide d'un écouvillon est introduite dans un tube contenant 5 ml du bouillon BHIB.

Une incubation est réalisée à l'étuve à 37°C pendant 24h. Un isolement en surface sur gélose Mac Conkey est ensuite réalisé. Des repiquages successifs sont réalisés dans le cas où la souche n'est pas pure.

1.2.2. Vérification de la pureté

La vérification de la pureté des souches conservées se fait par l'étude macroscopique, microscopique ainsi l'identification biochimique.

➤ Etude macroscopique

L'examen macroscopique est la première étape d'identification. Il a pour but de définir huit critères (aspect, forme, chromogénèse, opacité, élévation, surface, consistance, odeur) de *Klebsiella pneumoniae*.

Lecture

Les colonies apparaissent avec un diamètre de 3 à 4 mm, lisses, lactose positives, bombées, brillantes, muqueuses, parfois filantes à l'anse de platine (LE MINOR et VERON, 1989; FRENEY *et al.*, 2000).

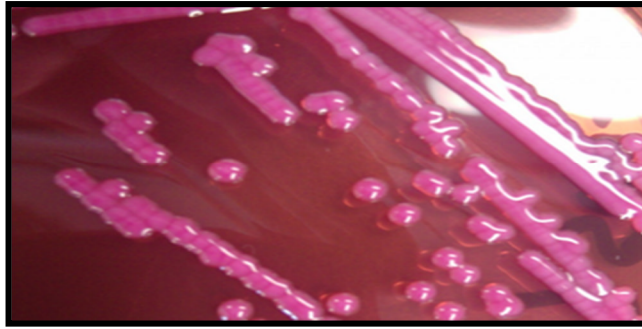


Figure 10 : Figure représentative de l'aspect macroscopique de *Klebsiella pneumoniae* sur Mac Conkey (YU VL *et al.*, 2007).

➤ Etude microscopique

Cette étude est réalisée par l'observation microscopique des cellules bactérienne préalablement fixées sur une lame suivie d'une coloration. L'observation porte sur la forme ainsi que l'agencement des cellules.

➤ Coloration de Gram

C'est une coloration différentielle permet de diviser le monde bactérien en deux groupes distincts qui sont les bactéries à Gram négatif et bactéries à Gram positif.

Principe

La coloration de Gram est une coloration différentielle, elle permet de classer les bactéries en deux groupes sur la base de la perméabilité de leur paroi à l'Alcool. Cette perméabilité dépend de la composition de la paroi bactérienne (épaisseur de la paroi liée à sa richesse en peptidoglycanes) et n'est pas absolue (PHILIPPE *et al.*, 2009).

• Préparation du frottis bactérien

- Déposer une gouttelette d'eau dans la zone délimitée de la lame ;
- Flamber l'anse de platine et prélever une colonie bien isolée sur la gélose ;
- Émulsionner une petite masse de colonie dans la gouttelette d'eau puis sécher sous la flamme ;
- Fixer le frottis.

• Etape de la coloration de Gram

- Recouvrir le frottis avec du violet de Gentiane et laisser agir pendant 1min ;
- Fixer le frottis avec le Lugol deux fois 45s ;

- Décolorer à l'alcool à 90% pendant 30s et rincer abondamment à l'eau de robinet ;
- Recouvrir le frottis avec la Fushine et laisser pendant 1min et rincer à l'eau ;
- Sécher la lame et observer au microscope photonique (objectif à immersion) au grossissement x1000.

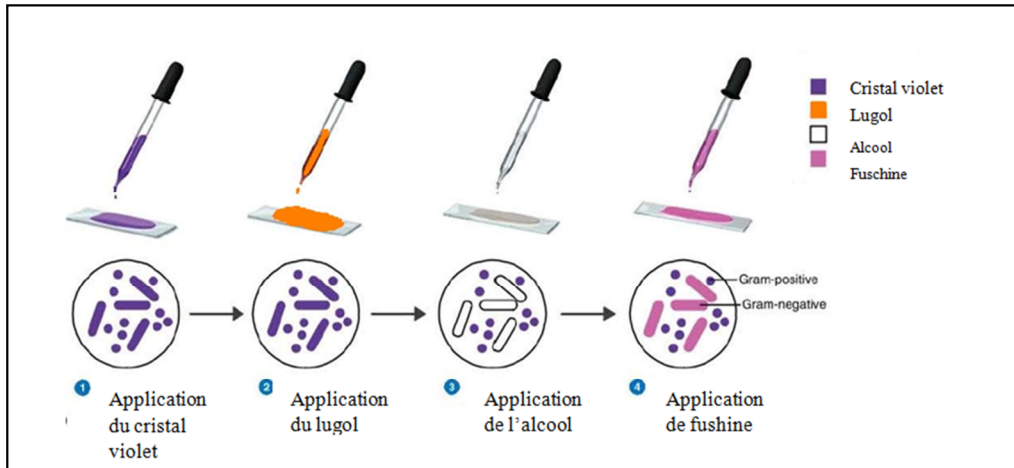


Figure 11 : Schéma des différentes étapes de la coloration de Gram.

Lecture

Les germes à Gram positif se colorent en violet, alors que les germes à Gram négatif se colorent en rose (SINGLETON, 1999).

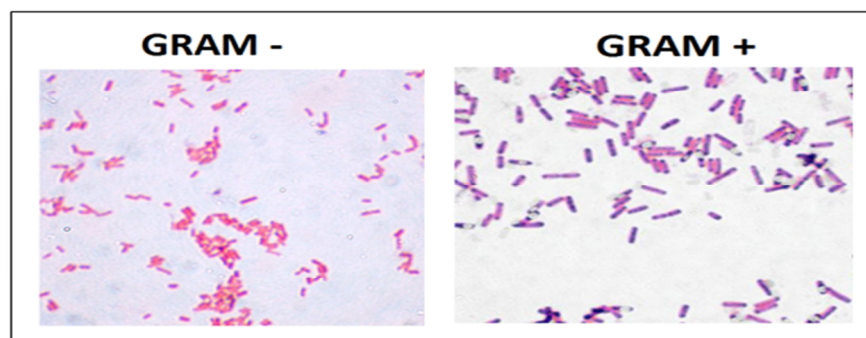


Figure 12 : Figure montrant les germes Gram - et Gram+ (PHILIPPE *et al.*, 2009).

➤ **Identification biochimique des *K. pneumoniae***

Le but de cette étape est de procéder à une identification des souches de Kp conservées à -18°C afin de vérifier l'absence de contamination ainsi que l'apparition d'éventuels mutants de la souche.

Principe

L'identification des souches de *K. pneumoniae* est réalisée par la galerie rapide API système (Analytical profil index). API 20 E est un système standardisé pour l'identification des entérobactéries et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux. Elle comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés standardisés et miniaturisés, qui sont inoculés avec une suspension bactérienne. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (RICHARD, 1994, SIROT *et al.*, 2002).

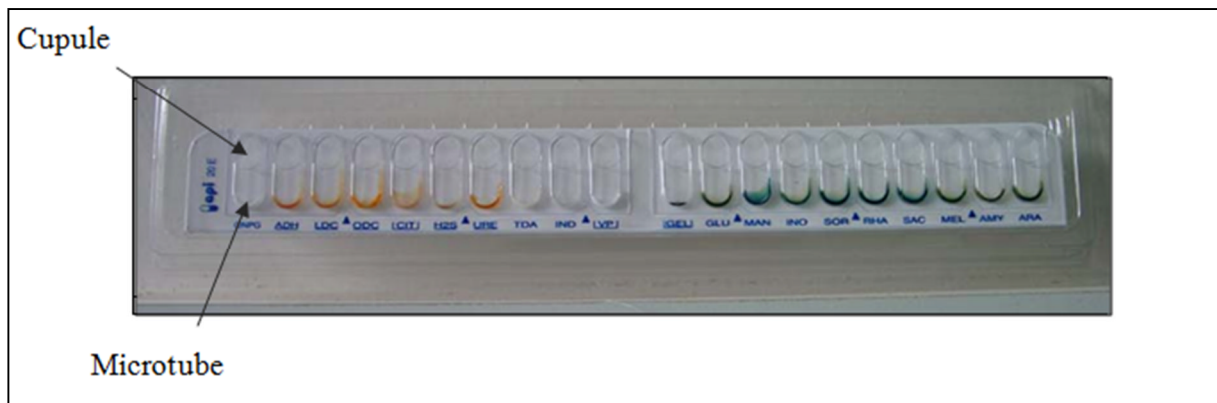


Figure 13: Représentation de la Galerie biochimique API 20E (Photo prise au Laboratoire).

Protocole

➤ **Préparation de la galerie:**

- Répartir environ 5 ml de l'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide (pour ne pas avoir une déshydratation de milieu de culture lors de l'incubation à l'étuve) ;
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte ;

- Sortir la galerie de son emballage dans la zone stérile à l'aide d'une pince stérile ;
- Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

➤ Préparation de l'inoculum

- A l'aide d'une pipette pasteur stérile on prélève quelques colonies bactériennes bien isolées à partir de la gélose Mac Conkey ;
- Réaliser une suspension bactérienne dans un tube qui contient 6ml d'eau physiologique stérile ;
- Standardisation de l'inoculum (0.08 à 0.1) à 625 nm ;
- Remplir à l'aide d'une seringue les tubes et cupules des tests CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne ;
- Remplir uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests ;
- Créer une anaérobiose dans les tests ADH, LDC, ODC, H₂S, URE en remplissant leurs cupules avec l'huile de paraffine ;
- Incuber à 37°C pendant 24h (CRONBERG *et al.*, 1988 ; BIOMERIEUX, 2004).

Lecture

La lecture de la galerie est réalisée en se référant au tableau de lecture (annexe 4) ou avec un logiciel (API web®), noter sur la surface de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs (TDA, IND, VP).

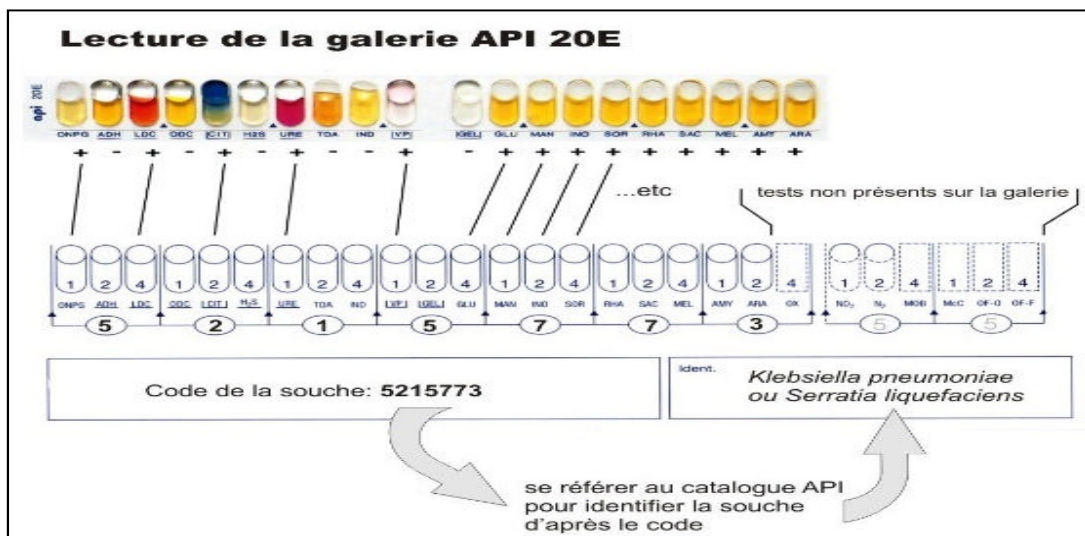


Figure 14 : Figure montrant la lecture de la galerie API 20E de *K.pneumoniae* (RENI, 2004).

1.2.3. Détermination de profil de résistance des souches aux antibiotiques

Principe

L'antibiogramme est la détermination de la sensibilité des bactéries à l'antibiotique en termes d'efficacité clinique. Il permet de catégoriser une souche bactérienne en classes semi-quantitatives : sensible, intermédiaire ou résistante (SCAVIZZI *et al.*, 2000).

L'antibiogramme est réalisé selon la Norme CLSI (Manuel de standardisation de l'antibiogramme à l'échelle National (Médecine Humaine et Vétérinaire) 2011. L'interprétation des diamètres d'inhibition est réalisée selon les Normes CLSI 2013 et 2014.

La technique utilisée est la méthode de diffusion des disques sur gélose Mueller-Hinton (MH). Les bactéries croissent sur toute la surface de la gélose, sauf là où elles rencontrent une concentration d'antibiotique suffisante qui inhibe leurs croissance.

Technique

➤ Préparation de milieu

La gélose Mueller-Hinton liquéfiée, coulée dans des boîtes de Pétri à une épaisseur de 4mm est utilisée.

➤ Préparation de l'inoculum

- Préparation des suspensions bactériennes (les dix souches *K.pneumoniae*, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* K12) en ensemencant 10 ml d'eau physiologique stérile (0,9% NaCl) à partir des cultures de 18 à 24 heures sur (GN) ;
- Standardiser l'inoculum en mesurant la densité optique par le spectrophotomètre afin d'obtenir une culture bactérienne de 0,08 à 0,1 à une longueur d'onde de 625 nm (équivalent à 0,5 Mc Farland) ;
- La densité de l'inoculum peut être ajustée en ajoutant de l'eau physiologique stérile dans le cas où elle est trop chargée, ou bien de la culture bactérienne dans le cas où elle est trop diluée ;

➤ Ensemencement

- A l'aide d'un écouvillon stérile, trempé dans la suspension bactérienne et essoré contre la paroi interne du tube pour le décharger au maximum ;
- Réaliser des stries serrées à la surface d'une boîte de Pétri contenant la gélose MH ;

- Répéter l'opération deux fois en tournant la boîte 60° ;
- Recharger l'écouvillon pour chaque boîte de Pétri.

➤ Application des disques d'antibiotiques

Les antibiotiques utilisés sont les suivants :

Amoxicilline (AML 30µg), l'association Amoxicilline + Acide clavulanique (AUG 30µg), Céfotaxime (CTX 30µg), Céftazidime (CAZ 30µg), Cefépime (FEP 30µg), Aztreonam (ATM 30µg), Ciprofloxacine (CIP 5µg), Imipénème (IMI 10µg), Amikacine (AK 30µg), Gentamicine (CN 10µg), l'association Triméthoprime Sulfaméthaxazole (SXT 25µg), Chloramphénicol (C 30µg), Tétracycline (TE 30µg).

- Déposer les disques d'antibiotiques à tester sur la surface de la gélose MH à l'aide d'une pince stérile ;
- Incuber à l'étuve pendant 18 h à 37°C.

La détection phénotypique de la présence de β -lactamases à spectre élargi consiste à mettre en évidence une image de synergie entre un disque de céphalosporine de troisième génération et l'acide clavulanique. La disposition des disques C3G avec l'AUG permet une éventuelle détection de la production des BLSE par l'appariation d'une zone de synergie.

Lecture

La lecture a été faite par la mesure des diamètres des zones d'inhibition, en comparant ces résultats aux valeurs critiques selon les Normes CLSI (2013 et 2014), les bactéries ont été classées dans l'une des catégories: Sensible, Intermédiaire ou Résistance.

La production des enzymes BLSE se traduit par l'apparition d'une image de synergie (Bouchon de champagne) entre les disques d'AUG et les C3G (JARLIER *et al.*, 1988).

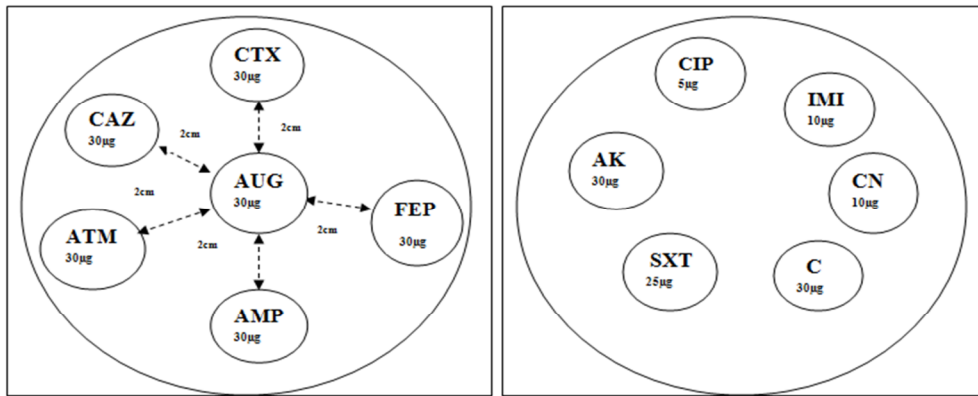


Figure 15 : Schéma de dépôt des disques d'antibiotique.

1.2.4. Détermination du support génétique de la résistance aux C3G

Cette étape d'étude vise à déterminer le support génétique de la résistance aux C3G. Les gènes de résistance peuvent être portés soit par des plasmides soit par le chromosome bactérien.

Des expériences de conjugaison en milieu liquide sont réalisées afin de déterminer si les gènes de la résistance aux C3G sont portés par des plasmides conjuguatifs ou par le chromosome.

➤ Principe de la conjugaison

C'est le transfert d'un plasmide conjuguatif codant pour la résistance à un ou plusieurs antibiotiques d'une souche donatrice (F^+) à une souche réceptrice (F^-). La souche réceptrice doit posséder un caractère de résistance chromosomique vis à vis d'un antibiotique auquel la souche donatrice est sensible.

La reconnaissance entre les deux souches se fait par l'intermédiaire du pili sexuel synthétisé par la bactérie donatrice.

Afin de sélectionner les transconjugants tout en éliminant les bactéries donatrices et les bactéries réceptrices n'ayant pas acquis le plasmide de la donatrice, la sélection s'effectue en présence de 2 antibiotiques : l'un correspond à une des résistances transférées, l'autre correspond à la résistance non transférable de la souche réceptrice (TOUATI *et al.*, 2006).

Protocole

La conjugaison a été réalisée en utilisant comme souche réceptrice la souche de référence *Escherichia coli* K12 résistante à l'Azide de sodium (AZID) et 10 souches de *Klebsiella pneumoniae* isolats clinique MDR (Multi Drug Résistante). Les transconjugants

sont sélectionnés sur gélose Mueller Hinton contenant du céfotaxime (CTX) et de l'Azide de sodium (AZID) à des concentrations finales de 8µg/ml et de 300 µg/ml respectivement.

- Ensemencer Kp et K 12 dans 10 ml BHIB ;
- Incuber 24h à 37°C ;
- Isoler sur gélose Mac Conkey et incuber 24h à 37°C ;
- Ensemencer 5 ml de BHIB par une colonie de chaque souche ;
- Incuber 5h à 37°C ;
- Isoler les souches sur MH+ CTX et MH + Azide de sodium ;
- Incuber 24h à 37°C (ABOUDDIHAJ *et al.*, 2011 ; YA LI *et al.*, 2015).

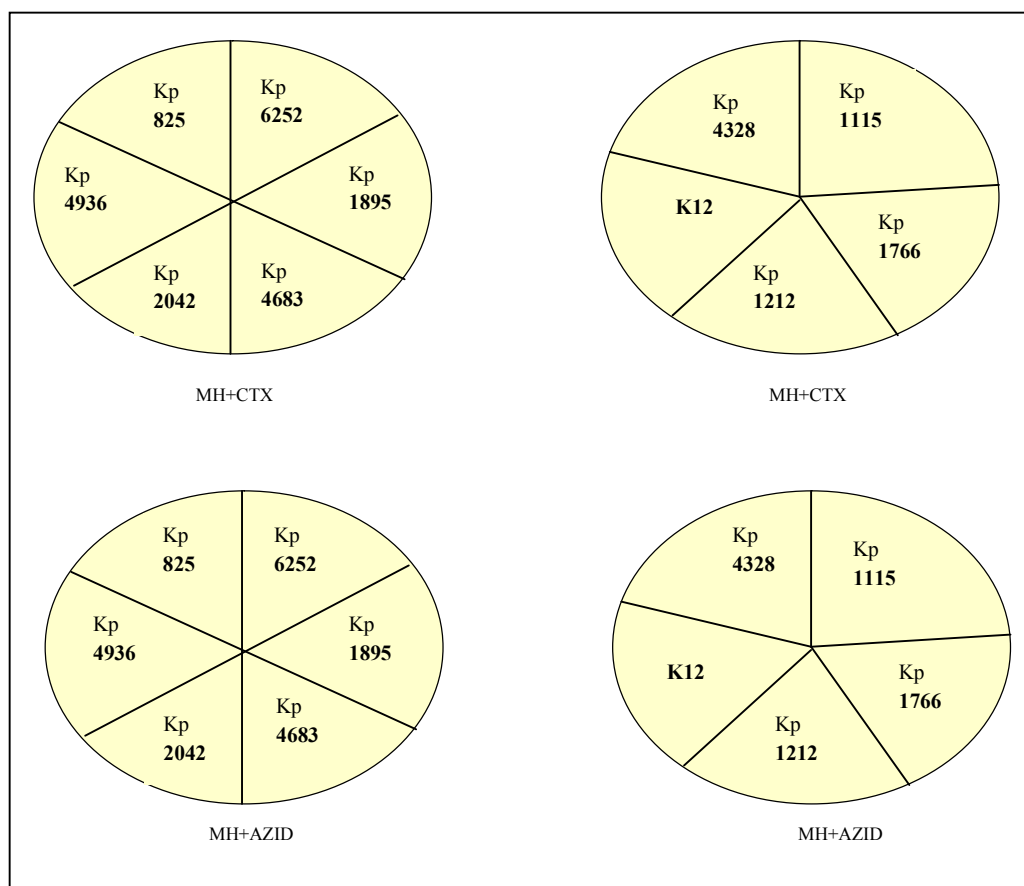


Figure 16 : Schéma représentant le contrôle positif des souches *K.pneumoniae* et *E. coli* K12 sur MH+AZID et MH+CTX.

Lecture

Les souches *K.pneumoniae* sont sensibles à l'azide et résistantes à la CTX ;
E. coli K12 est résistante à l'azide et sensible à la CTX.

- Reprendre les boîtes de Mac Conkey, réaliser une culture des souches sur BHIB ;
- Incuber 16h/ 37°C ;
- Mélanger donatrice-réceptrice dans un rapport 1 :10 respectivement ;
- Incuber 5h à 37°C ;
- Isoler 100µl du mélange en surface sur MH+Azide+CTX ;
- Incuber 24 à 72h à 37°C.

Lecture

La présence de colonies sur MH+Azide+CTX s'explique par l'apparition de transconjugants issus de la conjugaison.

➤ Purification des transconjugants

- Repiquer les colonies de transconjugants sur BHIB+CTX ;
- Incuber 24h/37°C ;
- Isoler sur Mac Conkey +CTX ;
- Incuber 24h/37°C.

A la fin de la purification les transconjugants sont conservés sur gélose nutritive à +4°C. Des antibiogrammes sont réalisés sur les transconjugants.

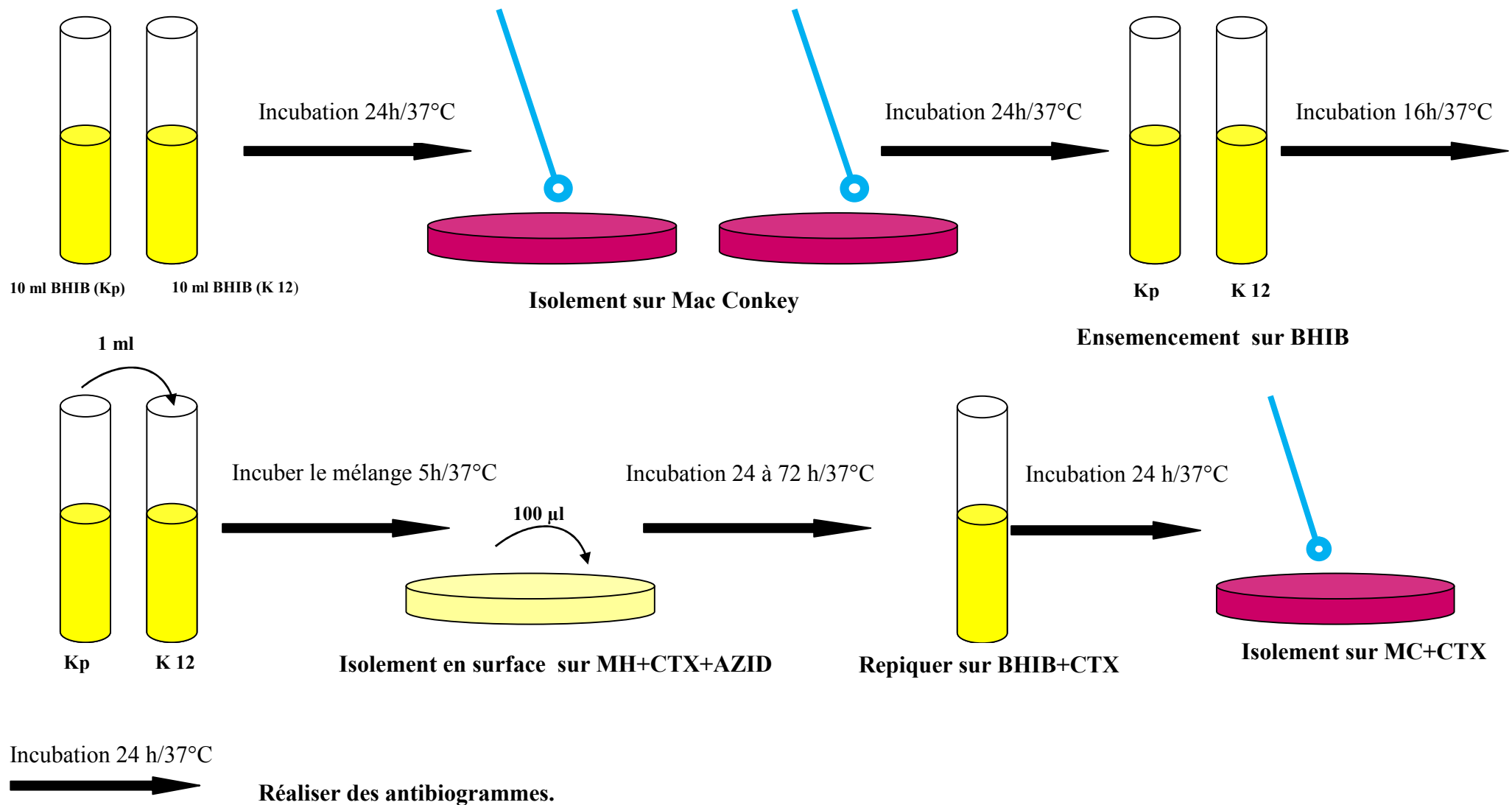


Figure 17 : Schéma représentatif des étapes de la conjugaison bactérienne entre la souche *K. pneumoniae* et *E. coli* K 12.

Partie 2 : Etude de microbiologie appliquée

Dans cette partie nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- Extraction des principes actifs de la plante *I. viscosa* (feuilles) par extraction organique et aqueuse.
- Mise en évidence de l'activité antibactérienne des extraits vis-à-vis des souches étudiées.

1.2.5. Echantillonnage

- La plante *Inula viscosa* a été récoltée le mois d'avril 2016 à 10 h ;
- Séparation des feuilles de la plante ;
- Lavage très soigneusement ;
- Egouttage ;
- Séchage à l'air libre, à l'abri de la lumière et de la chaleur pendant plusieurs jours, jusqu'à l'obtention des feuilles sèches (en changeant le papier kraft 2 à 3 fois par jour ;
- Les feuilles séchées à température ambiante sont broyées et les poudres obtenues sont conservées à l'abri de la lumière et de l'humidité dans des flacons stériles hermétiquement fermés.

Le broyage de la plante permet d'augmenter la surface de contact solvant-échantillon.

1.2.6. Extraction des principes actifs de la plante

L'extraction des principes actifs de l'Inule visqueuse est réalisée en un solvant aqueux qui est l'eau distillée et deux solvants organiques qui sont l'éthanol et le méthanol.

Cette technique s'appelle la macération, il s'agit d'un procédé d'extraction solide-liquide discontinu qui consiste à laisser à température ambiante les feuilles de la plante trempées dans le solvant pendant plusieurs heures (MUSTAFA *et al.*, 2009 ; LAGHRIFI *et al.*, 2013).

➤ Extraction aqueuse

- Peser 16 g de la poudre ;
- Mettre la poudre dans un bécher en ajoutant une quantité de 400 ml d'eau distillée ;
- Couvrir le bécher avec le papier aluminium ;
- Laisser sous agitation douce avec un agitateur magnétique pendant 24 h ;

- L'extrait brute non concentré obtenu est ensuite filtré deux fois par la laine de verre ;
- Mettre le filtrat dans un flacon stérile bien hermétique et le couvrir avec du papier aluminium ;
- Mettre l'extrait obtenu dans 5 cristallisoirs dont chacun contient 25 ml et congeler à - 18°C pendant 24 h;
- Réaliser une lyophilisation (sublimation sous vide) 5 à 6 h jusqu'à obtention d'une poudre ;
- Le lyophilisat obtenu est récupéré dans un tube ECBU bien recouvert (éviter l'humidification) est conservé à +4°C ;
- Une solution mère à 500mg/ml est ainsi préparée.

➤ L'extraction éthanolique et méthanolique

- Peser 16 g de la poudre ;
- Mettre la poudre séparément dans 2 béchers en ajoutant une quantité de 210 ml de solvant (l'éthanol /méthanol) dans chacun ;
- Couvrir les béchers avec le papier aluminium afin d'éviter toute dégradation des molécules par la lumière ;
- Laisser sous une agitation douce pendant 24 h ;
- Les extraits subissent deux filtrations successives par la laine de verre;
- Mettre les filtrats dans des flacons stériles bien hermétiques et recouvrir bien avec le papier aluminium ;
- La concentration des extraits organiques est réalisée par un Rotavapor (élimination de la plus grande partie du solvant) ;
- Le reste (solvant+l'extrait) est laissé à température ambiante pour l'évaporation du solvant;
- Peser la pâte obtenue ;
- Couvrir les tubes correctement avec du papier aluminium, puis le conserver au réfrigérateur à +4°C pour une utilisation ultérieure ;
- Une solution mère à 400mg/ml est ainsi préparée (voir annexe 9).

1.2.7. Test de l'activité antibactérienne

Le but de cette étape est d'étudier l'activité antibactérienne des extraits organiques et aqueux d'*Inula viscosa* vis-à-vis de 12 souches bactériennes (10 souches de *K.pneumoniae*), *E. coli* ATCC 25922 et *S. aureus* ATCC 25923) par la méthode de diffusion de disque en milieu gélosé.

➤ Technique

- **Préparation de la suspension bactérienne**

- Préparation des suspensions bactériennes dans 10 ml d'eau physiologique stérile ;
- Homogénéiser bien la suspension bactérienne à l'aide d'un vortex ;
- Standardiser l'inoculum (0,08 à 0,1) à 625 nm ;
- Diluer les suspensions bactériennes à 1 /10 (10^{-1}).

- **Ensemencement**

- Ensemencer la gélose MH en strie ;
- Déposer les disques de 6mm de diamètre (3 disque pour chaque extrait) ;
- Pipetter 10µl de l'extrait et déposer délicatement sur les disques ;
- Incuber durant 2h à +4°C (favoriser la diffusion) ;
- Incuber 24h à 37°C.

Lecture

L'activité de l'extrait utilisée sur la souche testée se manifeste par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque (MUSTAFA *et al.*, 2009 ; LAGHRIFI *et al.*, 2013).

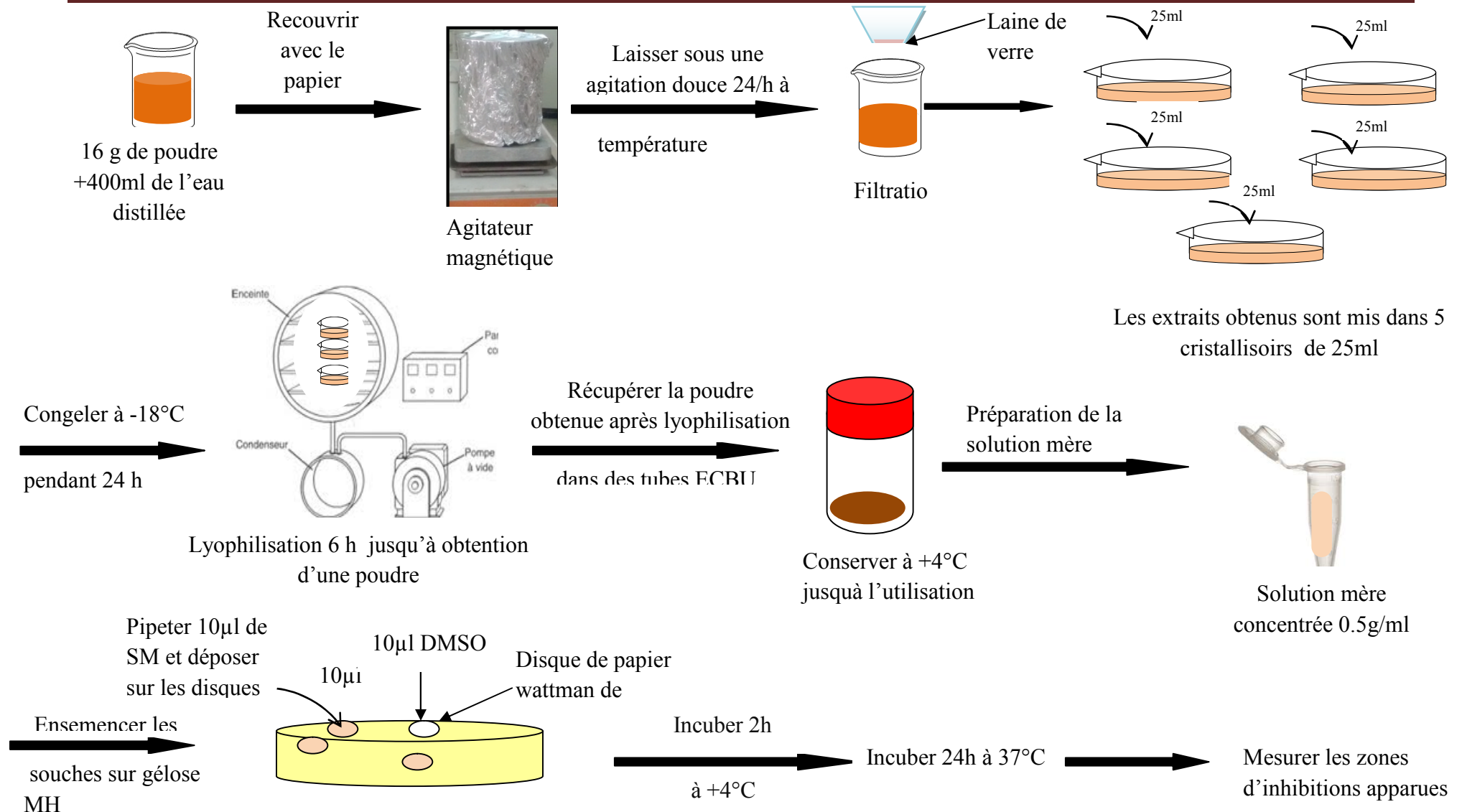


Figure 18 : Schéma expliquant les étapes de l'extraction aqueuse et l'étude de l'activité antibactérienne.

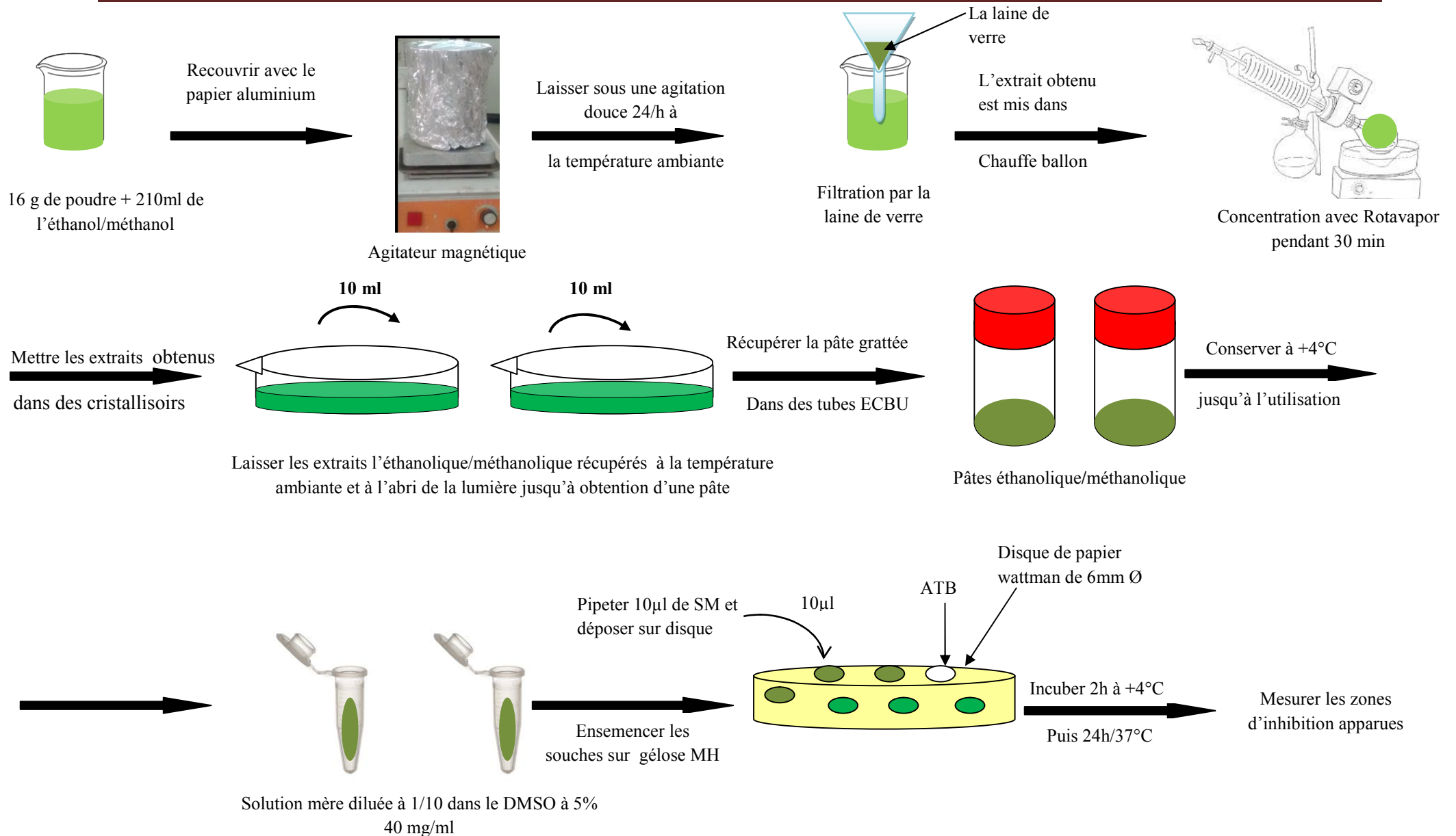


Figure 19 : Schéma expliquant les étapes de l'extraction éthanolique/méthanolique et l'étude de l'activité antibactérienne.

2. Résultats et discussion

Cette partie va concerner l'expression, le développement ainsi que la discussion des résultats obtenus au cours de la partie expérimentale.

2.1. Vérification de la pureté

➤ Etude macroscopique

Les différents critères de l'étude macroscopique nous ont permis d'identifier partiellement toutes les souches de *K.pneumoniae* qui apparaissent avec un aspect non punctiforme (>1mm) ; de forme ronde ; violette et muqueuse; opaque ; bombée ; lisse brillante ; humide et homogène. La figure 20 montre l'aspect de *K.pneumoniae* 4683 repiquée sur gélose Mac Conkey. L'aspect macroscopique des autres souches de *K.pneumoniae* est montré dans (annexe 2).

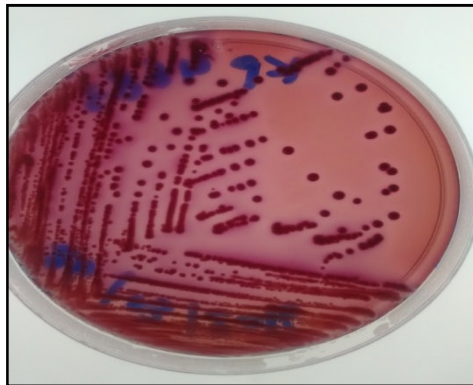


Figure 20 : Aspect macroscopique des colonies de *Klebsiella pneumoniae* 4683 purifiée sur milieu Mac Conkey (photo prise au laboratoire).

Quant à la pureté des souches de références utilisées, Les résultats d'étude macroscopique sont les suivants :

- Aspect non punctiforme (4mm) de forme ronde, de couleur violette; opaque ; légèrement convexe ; sèche et homogène pour *E. coli* ATCC 25922.
- Aspect non punctiforme (4mm) ; de forme irrégulière ; violette ; opaque ; plate ; sèche et homogène pour *E. coli* K12.

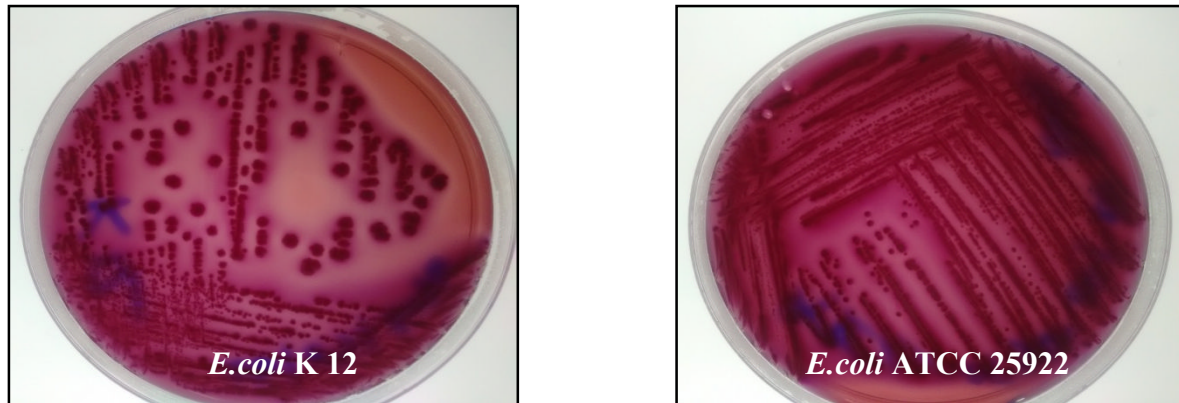


Figure 21 : Aspect macroscopique des colonies de *E. coli* ATCC 25922 et *E. coli* K12 purifiées sur milieu Mac Conkey (photo prise au laboratoire).

Les résultats de l'étude macroscopique sont similaires à ceux rapportés par FORBES *et al* (2007) à savoir un aspect rose foncé et de petites cellules pour les colonies de *E. coli* et un aspect rose foncé mucoïde et de petites cellules pour les colonies de *K.pneumoniae*.

- **Etude microscopique**
 - **Coloration de Gram**

Les résultats de la coloration de Gram et l'observation au microscope photonique, (G 1000), montrent que *K.pneumoniae* sont de petits bacilles à Gram négatif (colonies rose), à extrémités arrondies, isolées ou en diplobacilles.

E. coli ATCC 25922 et K12 sont des petits bacilles à Gram négatif, à extrémités arrondies, isolées ou en diplobacilles.

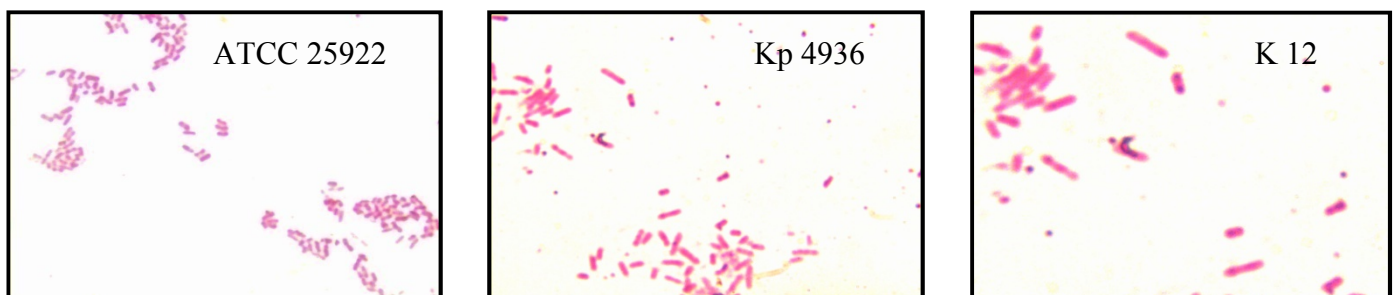


Figure 22 : Aspect microscopique des colonies *E. coli* ATCC 25922, Kp 4936 et *E. coli* K12 au grossissement 1000 (photos prises au laboratoire avec camera microscopique).

- **Identification biochimique des souches étudiées**

L'identification par la galerie API 20^E permet de mettre en évidence les caractères biochimiques. Les espèces *Klebsiella pneumoniae* se caractérisent par la présence de Beta – galactosidase (100%) ; absence d'arginine dihydrolase (0%) ; présence de la lysine décarboxylase (100%) ; absence d'ornithine décarboxylase (0%) ; présence de citrate (100%) ; aucune production d'H₂S (0%) ; présence d'uréase (80%) ; absence de tryptophane désaminase (0%) ; aucune production d'indole (0%) ; production d'acétoine (100%) ; absence de gélatinase (0%) et fermentent de nombreux sucres. La figure 23 montre le résultat d'une des galeries API 20^E après ajout des réactifs de révélation. Les autres galeries sont représentées dans (annexe 3).



Figure 23 : Identification d'une souche de *Klebsiella pneumoniae* (4328) par la galerie API 20 E (photo prise au laboratoire).

Le tableau X montre les résultats des différents critères biochimiques des souches *K. pneumoniae* étudiées.

Des résultats similaires ont été obtenus par FORBES *et al* (2007). Ces résultats montrent que *K.pneumoniae* a des réactions positives pour la production d'uréase, utilisation de citrate, Voges Proskauer positif, indole négatif, H₂S négatif et la fermentation des sucres est variable.

De même que ces résultats ont été confirmés par ARCHANA et HARSH (2011) et DOGAN *et al* (2013).

Tableau X : Résultats de l'identification biochimique par la galerie API 20^E.

Tests Souches	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	UREE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2
Kp 2042	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kp 4683	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kp 1212	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kp 4936	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kp 825	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kp 1766	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kp 1115	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kp 1895	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kp 6252	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kp 4328	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E.coli</i> ATCC 25922	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
<i>E.coli</i> K 12	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+

- **Biotypage des souches *K.pneumoniae* selon les profils numérique API 20^E**

Deux profils différents ont été enregistrés en identifiant les souches *K.pneumoniae* qui ont été isolées au CHU de Tizi ousou. Parmi lesquels, le profil 5215773 (80%) est prédominant suivi du profil numérique 5205773 (20%).

Le tableau suivant montre les profils numériques en API 20^E et les pourcentages de similitudes à *K. pneumoniae* subsp *pneumoniae* des 10 souches *K.pneumoniae* étudiées :

Tableau XI : Résultats des profils numériques des souches de *K.pneumoniae*.

Profils numériques+(%) Souches <i>K.pneumoniae</i>	Profils numériques des souches selon le code des API 20E	Les pourcentages de similitudes à <i>K. pneumoniae</i> subsp <i>pneumoniae</i> (%) selon le logiciel (API web®)
2042, 1212, 1766, 1115, 1895, 6252, 4328, 4683	5215773	97,6 %
4936, 825	5205773	96,7 %

Des études réalisées à Constantine par SEKHRI (2011) sur 170 souches de *K.pneumoniae* rapportent des résultats similaires aux nôtres à savoir la prédominance du profil 5215773 avec une fréquence de (78.23%) suivi par le profil 5205773 uréase négatif (7.64%).

Une autre étude qui a été effectuée au niveau de CHU d'Annaba par BELBAL (2013) a également rapportée cinq profils différents pour les souches *K.pneumoniae* dont le profil 5215773 est le plus fréquent suivi de profil 5205773 pour (uréase-).

2.2 Tests de sensibilité aux antibiotiques (Antibiogrammes)

Les valeurs limitent des diamètres des zones d'inhibition pour la souche de référence *E. coli* ATCC 25922 sont dans les marges rapportées par le manuel de standardisation des antibiogrammes (2011). Ceci signifie que l'antibiogramme a été utilisé dans des conditions exigées par le Manuel (voire annexe 6).

Toutes les souches de *Klebsiella pneumoniae* ont été testées vis-à-vis de 12 molécules d'antibiotiques appartenant à 5 familles différentes dont 7 β -lactamines, 2 aminosides, 1 sulfamide, 1 quinolone, 1 phenicole.

Le test de synergie est positif pour 9 souches de *K.pneumoniae* étudiées. La souche *K.pneumoniae* 825 a montrée un test de synergie négatif.

La figure 25 représente les résultats de l'étude de profil de sensibilité de quelques souches de *K.pneumoniae*. Les autres résultats sont représentés dans les (annexes 5).

K.pneumoniae présente une résistance naturelle à l'amoxicilline. La plupart de ces souches ont acquis des résistances vis-à-vis des antibiotiques utilisés.

Les pourcentages de résistances aux antibiotique des souches de *K.pneumoniae* ont été les suivants : 100% vis-à-vis de (l'amoxicilline, céfotaxime, aztréonam et triméthoprime sulfaméthoxazole) ; 90% vis-à-vis de (céftazidime, la cefépime et la gentamicine) ; 80% vis-à-vis de (l'amoxicilline+ acide clavulanique) ; 50% vis-à-vis de (ciprofloxacine) ; 30% vis-à-vis de (amikacine et chloramphénicol) et 0% vis avis de l'imipénème. Les résultats des antibiogrammes sont représentés dans le tableau XII, dans l'histogramme de la figure 24

Des études des profils de résistance aux antibiotiques qui ont été faites en Inde, sur 13 souches de *K.pneumoniae* ont montrées 100% de résistance vis-à-vis de l'ampicilline, 76.9% vis-à-vis de la céftazidime, 92.3% vis-à-vis de la gentamicine. Nos résultats sont en concordance avec eux. Par contre des résultats supérieurs aux nôtres ont été obtenus 92.3% vis-à-vis de ciprofloxacine et 84.6% vis-à-vis de l'amikacine (RONNI MOL *et al.*, 2016).

Les résultats de tests de sensibilité réalisés par MARIA *et al* (2015) sur 50 souches de *K.pneumoniae* ont obtenus que toutes les souches sont résistantes à l'ampicilline, céftazidime, chloramphénicol et gentamicine ; 89% vis-à-vis de (l'amoxicilline +acide clavulanique et triméthoprim sulfaméthoxazole) ; 16% vis-à-vis de (l'amikacine et la ciprofloxacine), et aucune résistance n'a été observé vis-à-vis de l'imipénème.

Les pourcentages de résistance des souches de *K. pneumoniae* étudiées sont semblables à ceux retrouvés en Inde par SIBHGHATULLA *et al* (2015) et ceux retrouvés à Bangladesh par SOURAV *et al* (2016) , vis-à-vis de l'ampicilline est de (91%) ; l'aztréonam (93%) ; céfotaxime (78%) ; céftazidime (68%) ; cefépime (51%) ; ciprofloxacine (73%) ; gentamicine(78%) ; imipénème (0%), mais supérieurs à ceux rapportés à Tlemcen par HASSAINE (2012).

Tableau XII : Résultats des antibiogrammes des souches étudiées (*K.pneumoniae*, *E. coli* K12 et ATCC 25 922).

Diamètres critiques (mm)		13-18	22-26	14-16	17-21	1418(2013)	17-21	14-17	10-16	19-23	15-21	12-15	12-18
						18-25(2014)							
Antibiotiques		AUG	CTX	AML	CAZ	FEP	ATM	AK	SXT	IMI	CIP	CN	C
Souches													
Kp 825 (2014)		6 (R)	6 (R)	7 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	23 (S)	6 (R)	6 (R)	6 (R)
Kp 6252 (2014)		15 (I)	9 (R)	8 (R)	16 (R)	15 (R)	15 (R)	18(S)	6 (R)	24 (S)	20(I)	27.5 (S)	25 (S)
Kp 4936 (2014)		8 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	18 (S)	6 (R)	23 (S)	12 (R)	6 (R)	20 (S)
Kp 2042 (2013)		8.5 (R)	6 (R)	6 (R)	8 (R)	10 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	23 (S)	21(S)	6 (R)	7 (R)
Kp 4683 (2014)		11 (R)	6 (R)	6 (R)	15 (R)	14.5 (R)	15 (R)	17(S)	6 (R)	23 (S)	30 (S)	9 (R)	25(S)
Kp 1895 (2014)		10 (R)	6 (R)	7 (R)	16 (R)	15 (R)	15 (R)	11 (R)	6 (R)	23 (S)	19 (I)	8 (R)	25(S)
Kp 1115 (2014)		15 (I)	6 (R)	6 (R)	8 (R)	10 (R)	9 (R)	20 (S)	6 (R)	25 (S)	21(S)	6 (R)	25 (S)
Kp 1212 (2013)		12(R)	10 (R)	8 (R)	16 (R)	15 (I)	16 (R)	16 (I)	6 (R)	27 (S)	6 (R)	7.5 (R)	28(S)
Kp 1766 (2013)		11 (R)	6 (R)	9 (R)	8 (R)	10 (R)	6 (R)	17(S)	6 (R)	23 (S)	6 (R)	6 (R)	8 (R)
Kp 4328 (2014)		9 (R)	8 (R)	6 (R)	18 (I)	17(R)	17(R)	16 (I)	6 (R)	23 (S)	15 (R)	6 (R)	24 (S)
E.coli K 12		20 (S)	28 (S)	9 (R)	28 (S)	31(S)	32(S)	20 (S)	21(S)	23 (S)	28(S)	18 (S)	24 (S)
E.coli ATCC 25922	TE 18(S)	19 (S)	28 (S)	7 (R)	27 (S)	28(S)	33 (S)	20 (S)	25(S)	27 (S)	26 (S)	19 (S)	25 (S)

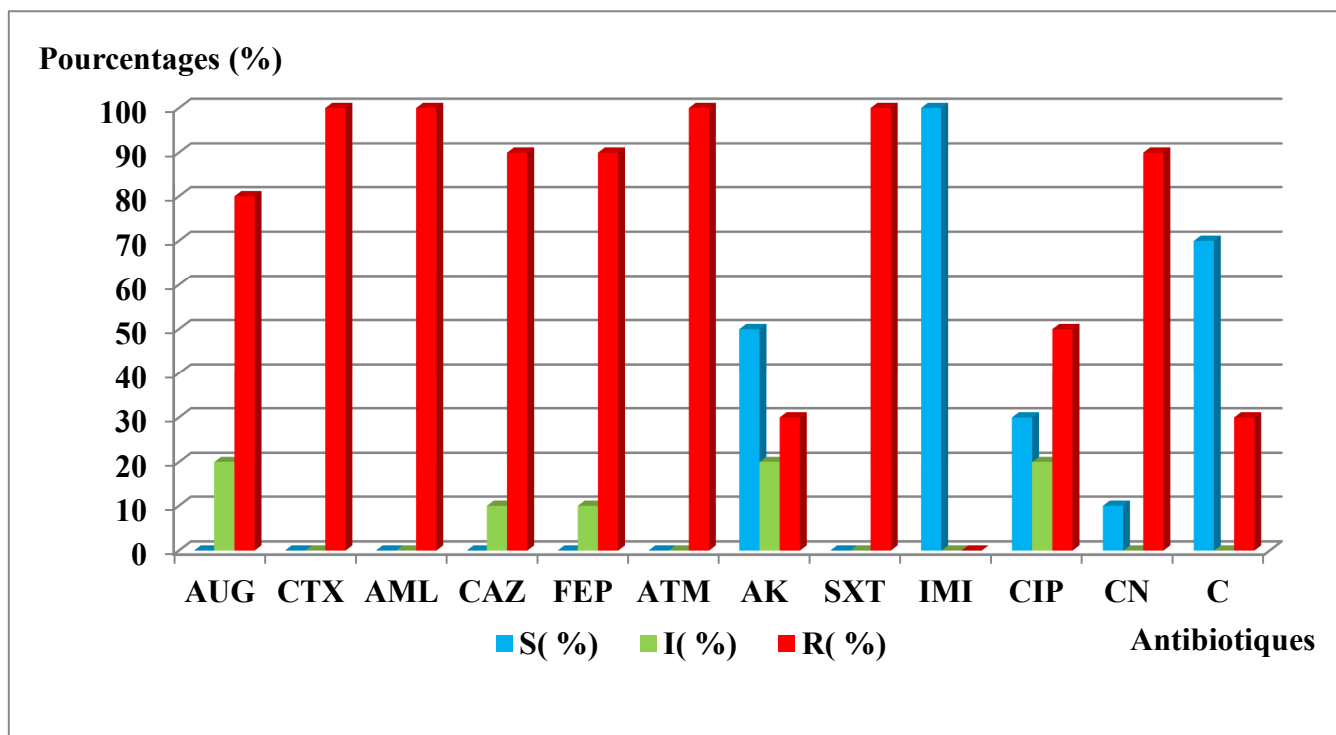
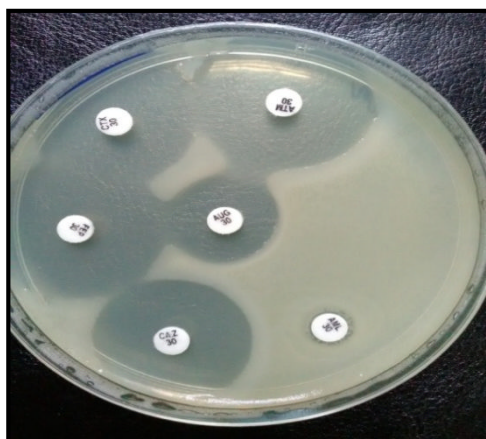
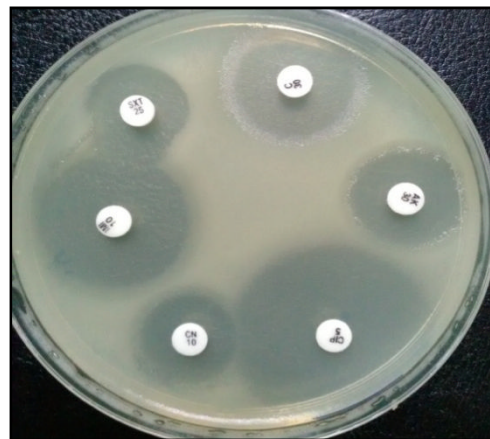


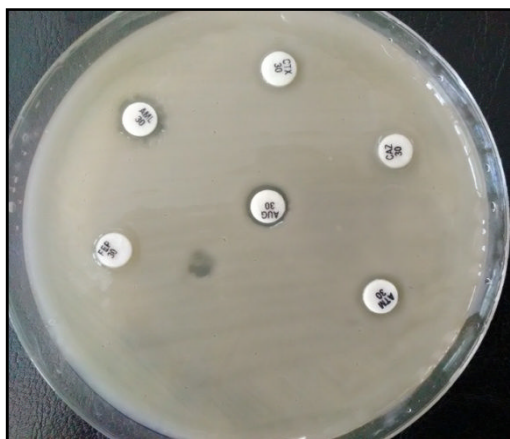
Figure 24: Pourcentages de résistance, intermédiaire et sensibilité des souches *Klebsiella pneumoniae* aux antibiotiques testés.



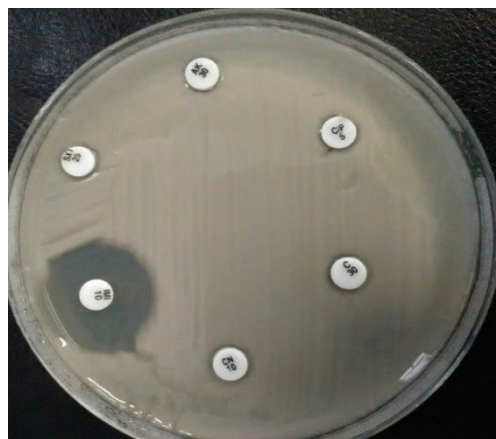
E. coli ATCC 25922



E. coli ATCC 25922



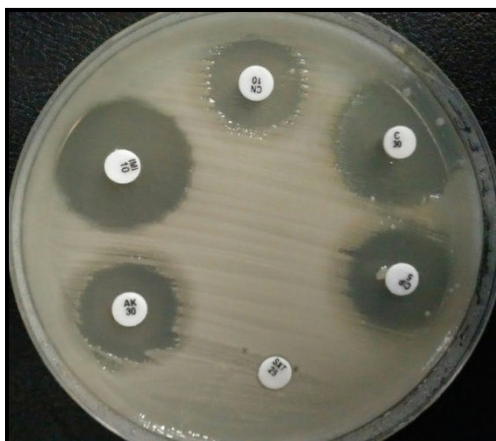
Kp 825



Kp 825



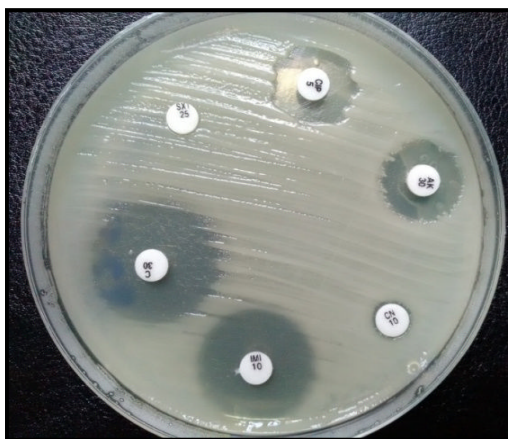
Kp 6252



Kp 6252



Kp 4328



Kp 4328

Figure 25 : Figure des antibiogrammes montrant la résistance des souches de *K.pneumoniae*.

Le profil de sensibilité aux antibiotiques de 10 souches étudiées montre la résistance à toutes les β -lactamines testées mis à part l'imipénème qui reste actif sur toutes les souches, cela indiquant sa place en premier choix dans le traitement des infections sévères pour les bactéries multirésistantes. Les résultats de notre étude montrent un taux élevé de résistance à l'amoxicilline.

Une étude qui a été réalisée à Tlemcen sur 14 souches de *K.pneumoniae* montre un taux de résistance de 23,8 % vis-à-vis de l'amoxicilline+acide clavulanique. Ce résultat est nettement inférieur au résultat présenté dans notre étude (HASSAINE, 2012).

DAVOOD (2016) a rapporté en Iran un taux élevé de résistance vis-à-vis des antibiotiques de la famille des β -lactamines en particulier la pénicilline et les céphalosporines en étudiant 144 isolats de *K.pneumoniae*.

Les résistances observées des souches *K.pneumoniae* aux β -lactamines pourraient s'expliquer par des mécanismes moléculaires tels que la modification des PLPs, modification des porines entraînant une diminution de la perméabilité, hyperproduction du système d'efflux et production de BLSE et probablement de céphalosporinases.

Dans notre étude, l'incidence des souches de *K.pneumoniae* productrices de BLSE étaient de 90% ce qui pourrait entraîner des difficultés thérapeutiques du fait de leur large spectre vis-à-vis des β -lactamines. Cette prévalence correspond à peu près à celle trouvée dans certaines études faites à Tlemcen par BABA *et al* (2013) et à Annaba par NAJAI *et al* (2012).

Des images de synergie sont observées entre l'AUG et les C3G (CTX, CAZ), l'ATM et C4G (FEP). L'apparition de telles images témoignent de la production de BLSE par les souches cliniques étudiées.

Les bactéries productrices de BLSE constituent une préoccupation majeure en milieu hospitalier en raison de leur diffusion épidémique et leur multirésistance aux antibiotiques.

Certaines études ont montrées une prévalence élevée des entérobactéries produisant des BLSE dans les hôpitaux en Afrique du nord y compris Maroc (LABANE *et al.*, 2008 ; AMINE *et al.*, 2009).

Les plasmides codant pour BLSE sont plus rencontrés chez les entérobactéries, mais sont pour des raisons inconnues les plus hébergés par *K. pneumoniae* (JACOBY, 1994).

Les BLSE sont les principales causes de la résistance aux β -lactamines qui sont des agents antimicrobiens, leur prévalence a augmenté partout dans le monde et varié dans les différents pays (PITOUT et LAUPLAND, 2008 ; SAHU *et al.*, 2011 ; SADER *et al.*, 2014).

La production de β -lactamases à spectre élargi est un mécanisme de résistance aux antibiotiques chez *K.pneumoniae*. D'après nos résultats, on a observé une plus grande résistance vis-à-vis de l'ampicilline et aucune résistance n'a été détectée vis-à-vis de l'imipénème ce qui est similaire aux études faites en Iran par MOHAMMED *et al* (2016).

IRAJ et NILUFAR (2010), ont rapporté que toutes les souches de *K.pneumoniae* productrices de BLSE sont sensibles aux carbapénèmes.

SHAIKH *et al* (2015) ; NORDMANN et CARRER (2010) ont suggérés les carbapénèmes comme le médicament de choix pour le traitement des souches productrices de BLSE par ce que ces enzymes ne l'hydrolysent pas, tels que *K.pneumoniae*. Par contre des études réalisées à Iran par DAVOOD (2016) confirment que le traitement combiné (imipénème + amikacine) a été utilisé pour le traitement des infections causées par des BLSE, cette combinaison à une activité bactéricide plus que celle de l'imipénème seul.

Des résistances associées aux aminosides sont retrouvées chez les souches étudiées, ce qui présente un fort risque d'échec thérapeutique. Les souches *K.pneumoniae* présentent un profil de résistance assez marqué de 30% et 90% respectivement pour l'amikacine et la gentamicine.

L'étude de la sensibilité aux autres familles d'antibiotiques a révélée aussi des profils de résistance des souches aux sulfamides (100% vis-à-vis de triméthoprim sulfaméthaxazole) ; aux quinolones (50% vis-à-vis de ciprofloxacine) et aux phénicoles (30% vis-à-vis de chloramphénicol).

Notre attention s'est surtout portée sur *K.pneumoniae* (825) qui n'a pas présentée de zone de synergie mais résistante à tous les antibiotiques testés mis à part l'imipénème.

L'absence de la zone de synergie pourrait s'expliquer soit par l'absence d'une BLSE soit par sa présence mais associée à d'autres mécanismes de résistance tel que production d'une pénicillinase haut niveau, une céphalosporinases plasmidique de type AmpC ou une céphalosporinases à spectre élargi. Un autre cas pourrait expliquer cette absence de zone de synergie, il s'agit de la présence d'une BLSE résistante aux inhibiteurs. Ces hypothèses se confèrent à celles de MOHAMUDHA *et al* (2010).

La résistance aux aminosides est assez marquée pour la gentamicine suivie de l'amikacine. Cette résistance est d'autant très inquiétante puisque l'amikacine est considérée comme un aminoside de premier choix dans le traitement des infections nosocomiales à *K.pneumoniae* et surtout *K.pneumoniae* BLSE (BELBAL *et al.*, 2013).

Au Pakistan, des isolats de *K.pneumoniae* ont été trouvés sensibles vis-à-vis de la gentamicine ULLAHF *et al* (2009). Alors que dans notre étude 90% des souches *K.pneumoniae* sont résistantes à la gentamicine.

Les résistances observées des souches cliniques de *K.pneumoniae* aux aminosides pourraient s'expliquer par des mécanismes moléculaires tels que l'altération de la cible, hydrolyse enzymatique des aminosides par des enzymes tels celles citées dans la synthèse bibliographique, le piégeage de l'antibiotique, modification du transport de l'aminoside.

Les souches exprimant le gène qui code pour la résistance aux quinolones (Qnr B1) rapportées dans l'étude qui a été faite à Annaba par MERADJ *et al* (2011) sont productrices de BLSE.

D'autres part les résultats de MOHAMMAD *et al* (2016) ont montré une faible résistance vis-à-vis de l'imipénème suivi de l'amikacine pour le traitement des infections nosocomiales. Ces résultats sont semblables avec ceux de DAVOOD (2016) dont la résistance vis-à-vis de l'imipénème et l'amikacine est de (15.9%).

Des études réalisées au Maroc par NATOUBI *et al* (2016) et en Tunisie par ALIBI *et al* (2015), ont trouvé des isolats cliniques de *K.pneumoniae* qui sont sensibles à l'amikacine et l'imipénème. Nos résultats sont partiellement semblables à ceux rapportés par ces deux auteurs.

Le développement de la résistance à plusieurs familles d'antibiotiques peut sérieusement compromettre l'utilisation clinique des aminosides ou les quinolones combinés avec les β -lactamines pour traiter les infections dues aux bactéries à Gram négatif (HIDALGO *et al.*, 2013).

Nos souches sont multirésistantes à plusieurs familles d'antibiotique à savoir les β -lactamines, aminosides, quinolones, sulfamides et les phenicols.

Des souches de *K.pneumoniae* qui ont le même profil de résistances sont isolées par LAGHA (2014) à Laghouat. Ces dernières sont également multirésistantes à plusieurs familles d'antibiotiques.

Concernant la résistance aux fluoroquinolones, elle pourrait être éventuellement s'expliqué par des mécanismes qui sont la diminution de l'affinité de la cible et la protection de la cible telle que l'ADN gyrase et l'inactivation enzymatique par acétyl transférase. La résistance aux phenicoles pourrait être expliquée par des mécanismes tels que l'inactivation enzymatique, la diminution de la perméabilité et le système d'efflux.

La résistance vis-à-vis des sulfamides pourrait être expliquée par une modification enzymatique de l'antibiotique tel que l'utilisation de la dihydrofolate réductase mutée.

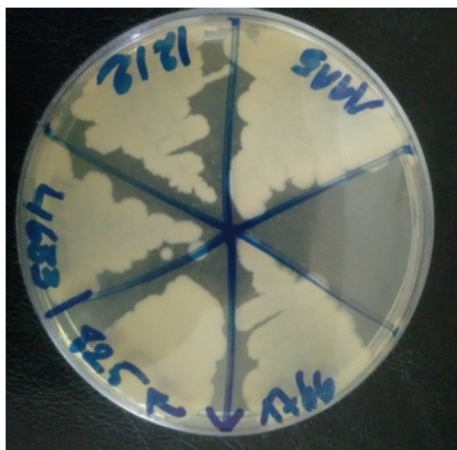
Les isolats qui ont une co-résistance à au moins deux médicaments sont considérés comme MDR. Les antibiotiques concernés sont (C3G, aminosides, fluoroquinolones, et SXT) (RONNI MOL *et al.*, 2016). D'après nos résultats toutes nos souches sont des MDR.

2.3. Détermination du support génétique de la résistance aux C3G

A fin de déterminer le support génétique des souches étudiées, des essais de transfert génétique par conjugaison ont été réalisés.

Les 10 souches de *K.pneumoniae* ont été utilisées comme donneurs putatifs pour la conjugaison en milieu liquide.

La conjugaison a été réalisée en utilisant comme souche réceptrice *E.coli* K12 qui est résistante à l'Azide de sodium et sensible à tous les antibiotiques. Les résultats des contrôles positifs sont montrés par la figure 26. Les transconjugants sont sélectionnés sur MH +Azide + CTX. L'aspect des colonies des transconjugants pour la souche 4683 sont montrés dans la figure 27, les autres sont représentées dans (annexe 9).



MH+CTX



MH+CTX



MH+AZID



MH+AZID

Figure 26 : Photos des résultats du contrôle positif des souches K.p et K12 sur MH+CTX et MH+AZID.

Les résultats des control positifs ont montrés que toutes les souches *K.pneumoniae* cliniques ont poussées sur les boites contenant MH+CTX, mais aucune croissance n'a été observée sur MH+ AZID. Par contre la souche *E. coli* K12 a poussée sur MH+AZID, mais aucune croissance n'a été observée sur MH+CTX. Ce qui confirme que les souches *K.pneumoniae* sont résistantes à la céfotaxime et sensible à l'azide de sodium alors que *E. coli* K12 résistante à l'azide de sodium et sensible à la céfotaxime. Les résultats de ce test confirment le génotype de K12 et des souches *K.pneumoniae* cliniques vis-à-vis de CTX et de l'AZID.

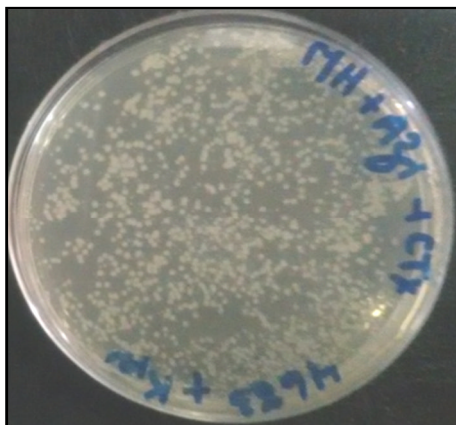


Figure 27 : Photo montrant le transconjugant 4683 sur MH+AZID+CTX (photo prise au Laboratoire).

Parmi les 10 souches de *K.pneumoniae*, 3 transconjugants ont été obtenus (30%) qui ont montrés une résistance vis-à-vis de tous les β - lactamines avec la présence de synergie.

Une résistance co-transférée a été observée 100% vis-à-vis de la gentamicine et 33.33% vis-à-vis de triméthoprine sulfaméthoxazole et la ciprofloxacin. Les résultats des transconjugants sont représentés dans l'histogramme de la figure 28.

Les résultats issus de cette expérience ont montrés que tous les transconjugants ont partiellement exprimés de résistance aux antibiotiques communément utilisés. Le tableau XII nous donne les profils comparatifs des isolats sauvages et leurs transconjugants correspondants. Les photos 29,30 et 31 montrant les antibiogrammes des transconjugant Tr 2042, Tr 4328 et Tr 4683 obtenus.

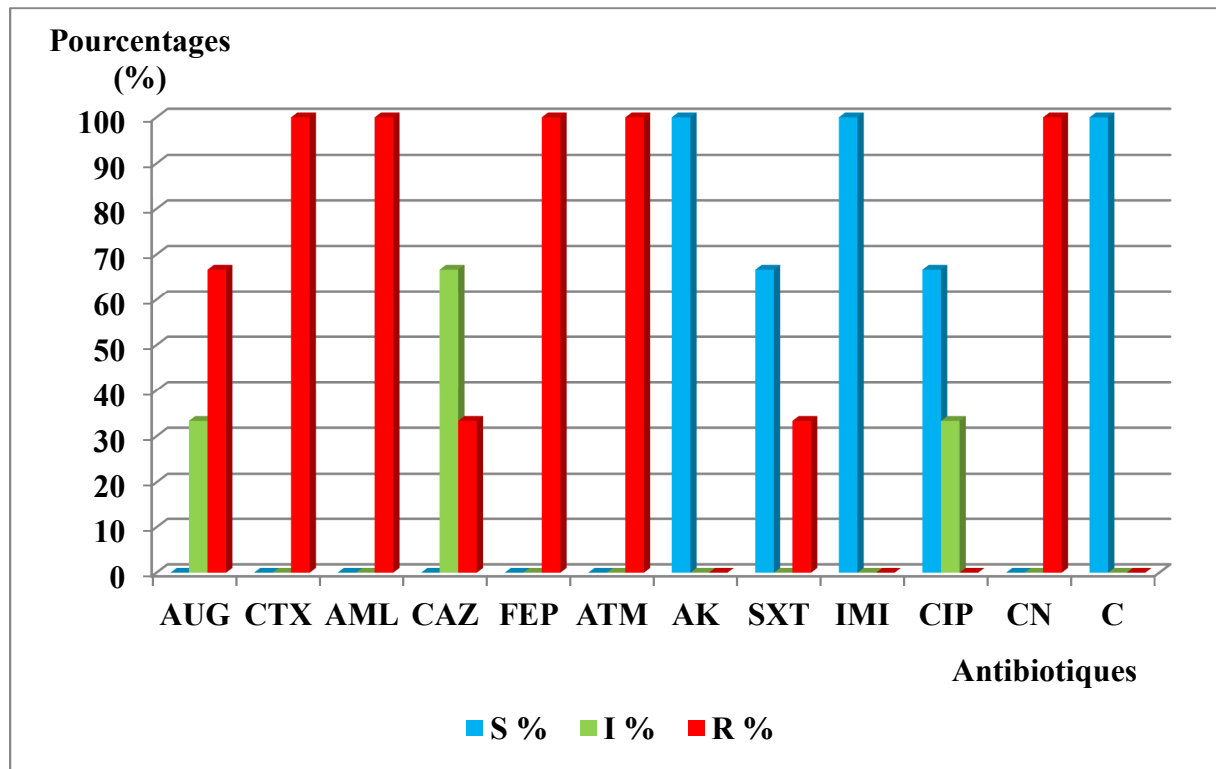


Figure 28 : Pourcentages de résistance, intermédiaire et sensibilité des transconjugants aux antibiotiques testés.

R : Résistance ; S : Sensible ; I : Intermédiaire

Tableau XIII : Comparaison de la résistance des souches sauvages et les transconjugants.

Souches Antibiotiques	K12	Kp 2042	Tr 2042	Kp 4683	Tr 4683	Kp 4328	Tr 4328
AUG	20 (S)	8.5 (R)	15 (I)	11 (R)	13 (R)	9 (R)	13 (R)
CTX	28 (S)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	8 (R)	12 (R)
AML	9 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)
CAZ	28 (S)	8 (R)	15 (R)	15 (R)	20 (I)	18 (I)	18 (I)
FEP	31 (S)	10 (R)	13 (R)	14.5 (R)	12 (R)	17 (R)	16 (R)
ATM	32 (S)	6 (R)	13 (R)	15 (R)	17 (R)	17 (R)	15 (R)
AK	20 (S)	6 (R)	22 (S)	17 (S)	20 (S)	16 (I)	18 (S)
SXT	21 (S)	6 (R)	23 (S)	6 (R)	21 (S)	6 (R)	6 (R)
IMI	23 (S)	23 (S)	23 (S)	23 (S)	23 (S)	23 (S)	25 (S)
CIP	28 (S)	21 (S)	31 (S)	30 (S)	30 (S)	15 (R)	17 (I)
CN	18 (S)	6 (R)	11 (R)	9 (R)	10 (R)	6 (R)	12 (R)
C	24 (S)	7 (R)	27 (S)	25 (S)	25 (S)	24 (S)	26 (S)

Nous avons constaté un co-transfert des gènes qui code pour la résistance aux β -lactamines (BLSE) et les gènes qui codent pour la résistance aux aminosides, quinolones et sulfamides chez tous les transconjugant, ce qui suggère que ces gènes sont portés sur le même plasmide conjugatif. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par BELBAL (2013) concernant le co-transfert entre les β -lactamines et les aminosides et ceux rapportés par NAAS *et al* (2011) qui ont démontrés que les gènes BLSE et les gènes *arm A* (aminoside) sont souvent localisés sur un plasmide conjugatif responsable de nombreuses épidémies.

Les résultats d'une expérience de conjugaison effectuée par MIRNA *et al* (2010) à Croatie sur 162 souches de *K.pneumoniae* avec une souche réceptrice *E. coli* A15R⁻ qui est exempte de plasmide et résistante à la rifampicine. Seulement dix souches résistantes ont pu transférer leur gène de résistance à la souche réceptrice. Les gènes transférés sont la (tétracycline, céfotaxime et triméthoprim sulfaméthoxazole).

Le support de la résistance aux quinolones était supposé être uniquement chromosomique. Les résultats des travaux réalisés par MARADI *et al* (2011) à ANNABA sur 3 souches de *K.pneumoniae* avec une souche réceptrice *E. coli* K12J5 résistante à l'Azide de sodium à fin de déterminer la transférabilité du plasmide portant le gène Qnr. Uniquement un transconjugant obtenu était résistant à l'amoxicilline, céftazidime, céfotaxime, céfoxitime et la céfépime.

Toutes les souches de *K.pneumoniae* sont résistantes aux aminoglycosides, triméthoprim sulfaméthoxazole, céfotaxime, céftazidime et cefépime. Cela pourrait s'expliquer par le fait que le support plasmidique de la résistance aux quinolones est associé à des intégrons portant des déterminants de résistances à plusieurs autres antibiotiques comme β -lactamines et aminosides.

Un co-transfert de la résistance à la gentamicine et à la tétracycline a été observé par ABOUDDIHAIJ *et al* (2011) en étudiant 36 souches de *K.pneumoniae* isolées au Maroc. L'auteur a utilisé *E. coli* K12J5 résistante à l'azide comme souche réceptrice.

Les travaux de LAGHA (2014) sur 112 souches de *K. pneumoniae*, montrent également un co-transfert de la résistance aux β -lactamines, les aminosides et aux fluoroquinolones. De même ceux de MARIA *et al* (2015) sur 19 souches de *K. pneumoniae* BLSE+, montrent que la résistance aux β -lactamines est co-transférée avec la gentamicine et triméthoprim sulfaméthoxazole.

Une expérience de conjugaison a été faite par MESSAI *et al* (2008) en Algérie sur des souches de *K. pneumoniae* BLSE, ont montrés le transfert des gènes qui codent pour CTX-M, aux aminosides et aux sulfamides.

Ces co-transferts de la résistance s'expliquent par la même localisation des gènes de résistances sur le même plasmide conjugatif.

Le potentiel de transmissibilité pour les 7 autres isolats pourrait ne pas être entièrement vérifié, soit sont des souches qui ont des plasmides non conjugatifs soit les gènes sont portés sur le chromosome.

***E. coli* K 12 (Réceptrice)**

***E. coli* K 12 (Réceptrice)**

+

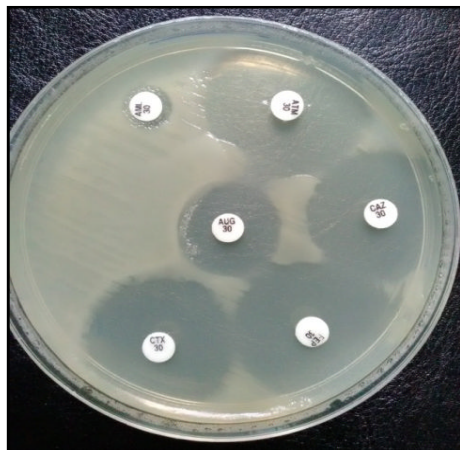
Kp 2042 (Donatrice)

Kp 2042 (Donatrice)

Tr 2042 (Transconjugant)

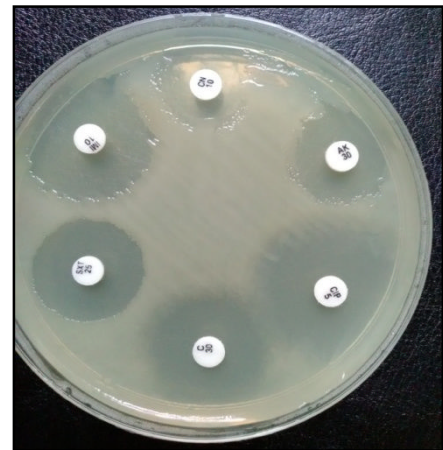
Tr 2042 (Transconjugant)

Figure 29: Photos montrant les antibiogrammes des transconjugant Tr 2042 (photos prises au laboratoire).

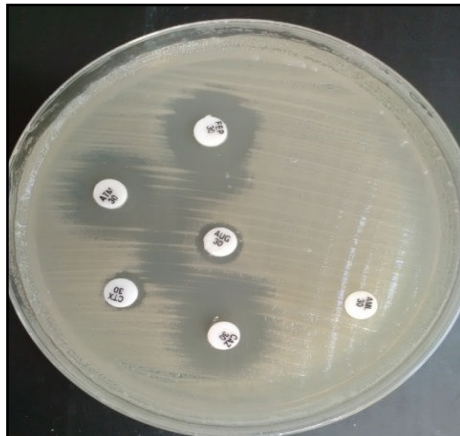


E. coli K 12 (Réceptrice)

+

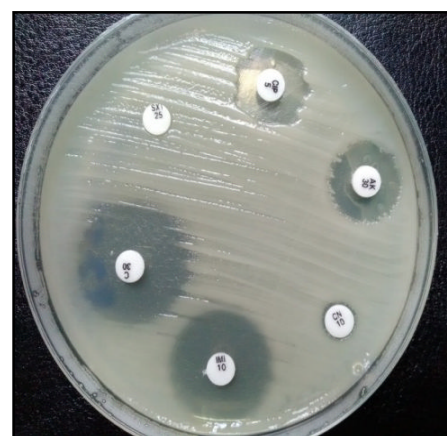


E. coli K 12 (Réceptrice)

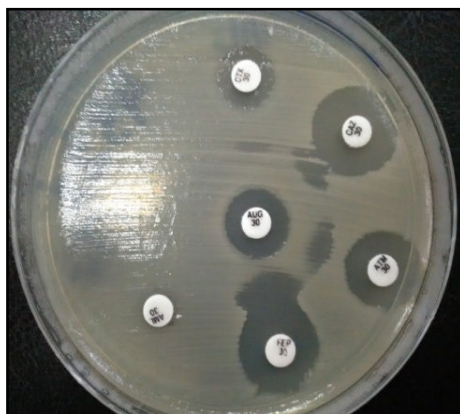


Kp 4328 (Donatrice)

=



Kp 4328 (Donatrice)

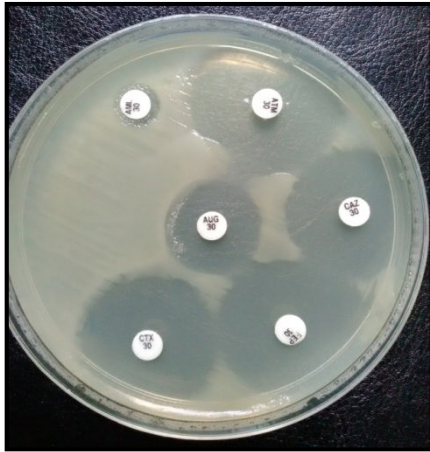


Tr 4328 (Transconjugant)

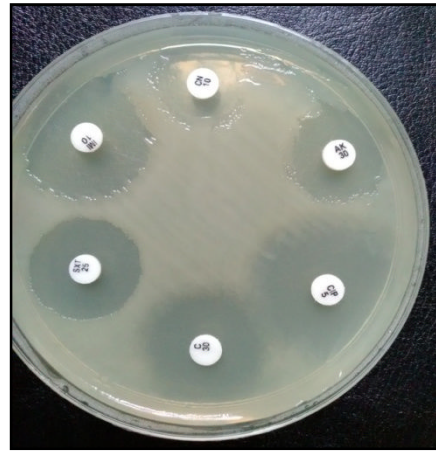


Tr 4328 (Transconjugant)

Figure 30: Photos montrant les antibiogrammes des transconjugant Tr 4328 (photos prises au laboratoire).

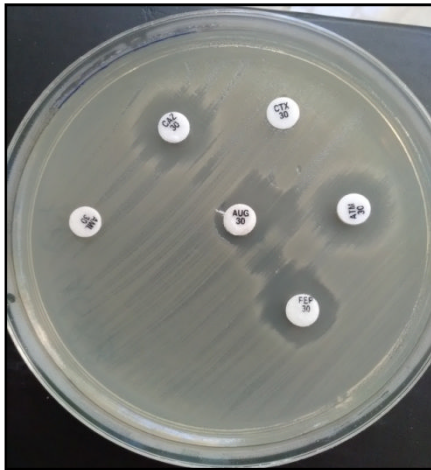


E. coli K 12 (Réceptrice)

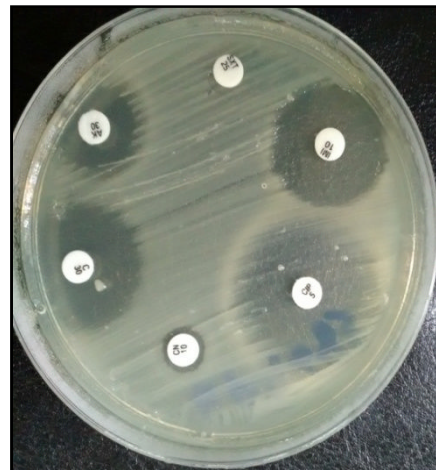


E. coli K 12 (Réceptrice)

+

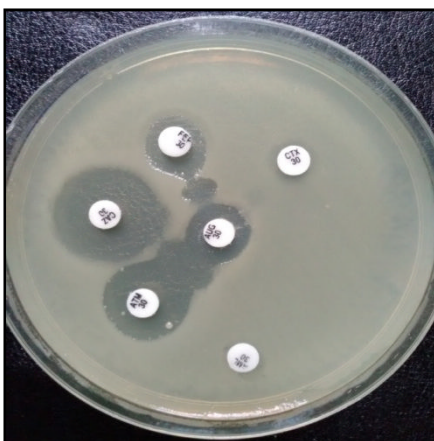


Kp 4683 (Donatrice)

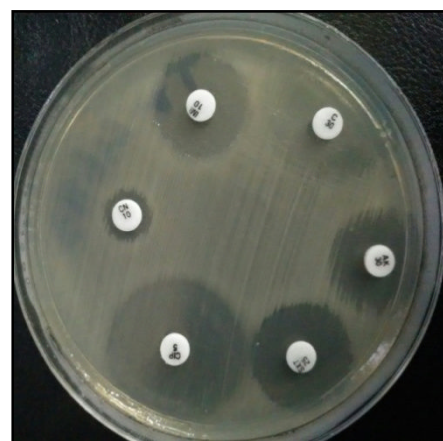


Kp 4683 (Donatrice)

=



Tr 4683 (Transconjugant)



Tr 4683 (Transconjugant)

Figure 31 : Photos montrant les antibiogrammes des transconjugant Tr 4683 (photos prises au laboratoire).

Dans le cas où le transfert de phénotype est intermédiaire, il pourrait s'expliquer que le niveau d'expression de promoteur qui est faible.

Nos transconjugants présentent un phénotype BLSE avec une résistance associée aux β -lactamines et aux aminosides.

Ce phénotype de multirésistance des souches BLSE observé dans notre étude a déjà été décrite où sont souvent associés à des gènes codant pour la résistance aux aminosides. Cela, pourrait être s'expliquée par l'association des gènes codants pour la CTX-M avec des éléments mobiles comme les séquences d'insertion ISE cp1 qui permettent l'acquisition de nombreux gènes de résistance (ECKERT *et al.*, 2006).

Ce qui mène à la prévalence et à la diversité des BLSE en Algérie chez les entérobactéries (MESSAI *et al.*, 2008 ; TOUATI *et al.*, 2008).

Récemment, en 2013, BABA *et al* ont rapportés la présence des associations entre le gène bla_{CTX-M15} et des gènes de résistance aux aminosides.

2.4. Test de l'activité antibactérienne d'*Inula viscosa*

La résistance bactérienne aux antibiotiques est devenue un problème majeur de santé publique. La propagation de la multirésistance nécessite la découverte de nouvelles molécules antimicrobiennes qui inhibent les mécanismes de résistance des souches pathogènes. Ces molécules naturelles dérivées de plantes constituent une nouvelle source d'agents antimicrobiens.

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'effet antibactérien des extraits de plante obtenus. Les résultats des tests de diffusion sur disque en gélose MH montrent que les extraits aqueux et organiques de la plante ont des activités antibactériennes contre toutes les souches de *K.pneumoniae* testées ainsi les souches de références *S. aureus* ATCC 25923 et *E. coli* ATCC 25922. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau XIV et l'histogramme de la figure 32 ainsi sont rapportés par les photos de la figure 33, les autres photos sont représentées dans (annexe 10).

Tableau XIV : Les résultats des activités antibactériens des extraits aqueux et organiques d'*Inula viscosa*.

Extraits Souches	Aqueux	Ethanolique	Méthanolique
Kp 825	10.66 ± 0.57	9 ± 0	8.33 ± 0.57
Kp 1212	10 ± 0	14 ± 0	9.66 ± 0.57
Kp 4936	9.66 ± 0.57	8.66 ± 0.57	12 ± 0
Kp 2042	9.33 ± 0.57	8 ± 0	11 ± 0
Kp 4683	9 ± 0	8.66 ± 1.15	12.33 ± 0.57
Kp 1895	9.66 ± 0.57	8.5 ± 0.86	11 ± 0
Kp 1115	9.66 ± 0.57	9 ± 0	10.66 ± 0.57
Kp 6252	10 ± 0	10 ± 0	11 ± 0
Kp 1766	10 ± 0	9.66 ± 0.57	10 ± 0
Kp 4328	9.33 ± 0.57	9.33 ± 0.57	9.66 ± 0.57
<i>E.coli</i> ATCC 25922	9.16 ± 0.28	8 ± 0	9 ± 0
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	9 ± 1	8.66 ± 0.57	9 ± 0

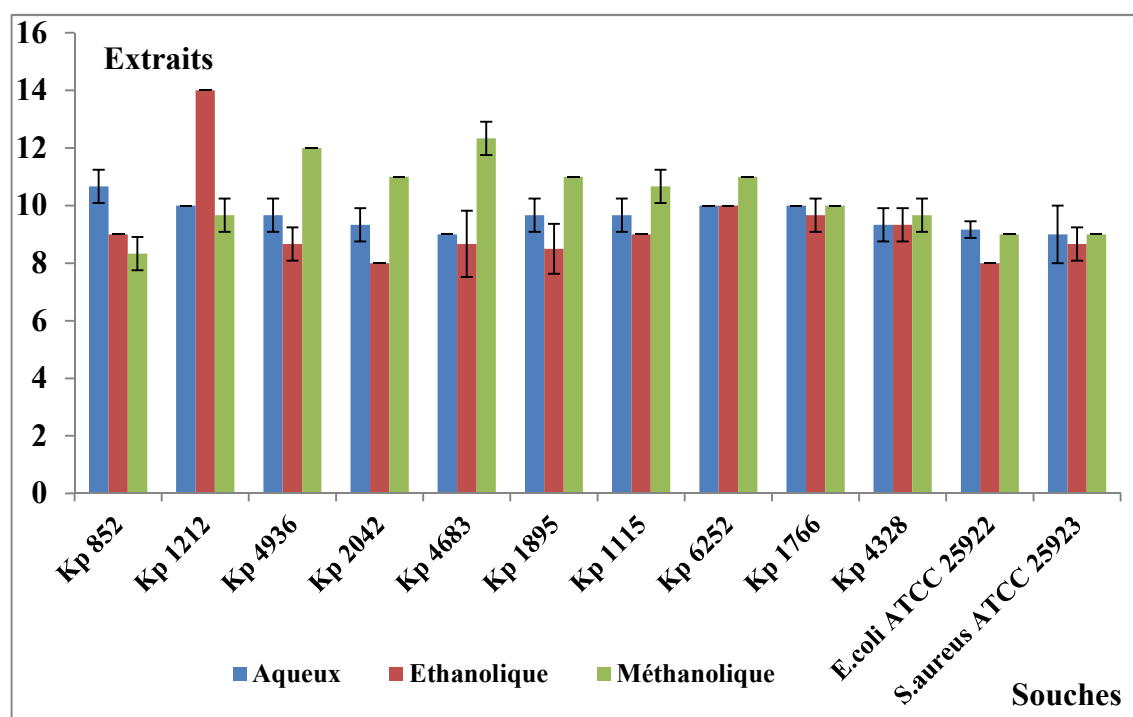
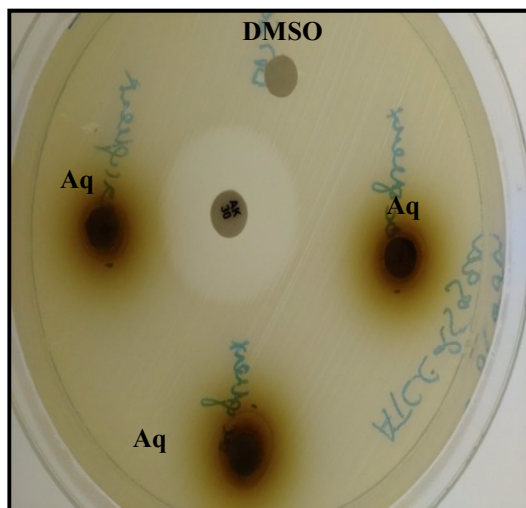
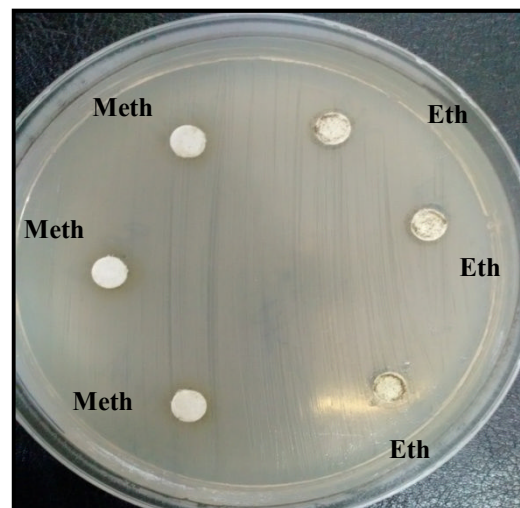


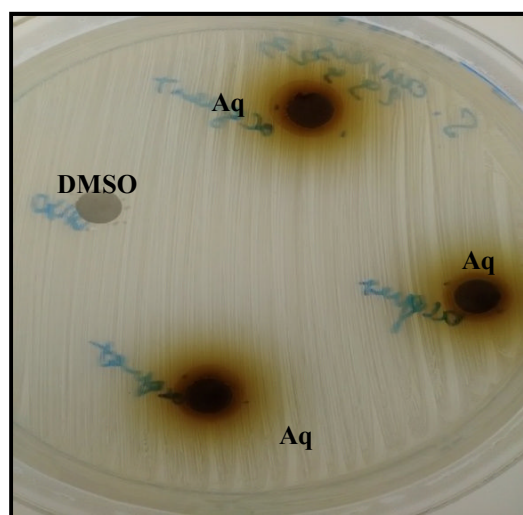
Figure 32 : Histogramme montrant les écart-types des différents extraits (aqueux, méthanolique et éthanolique).



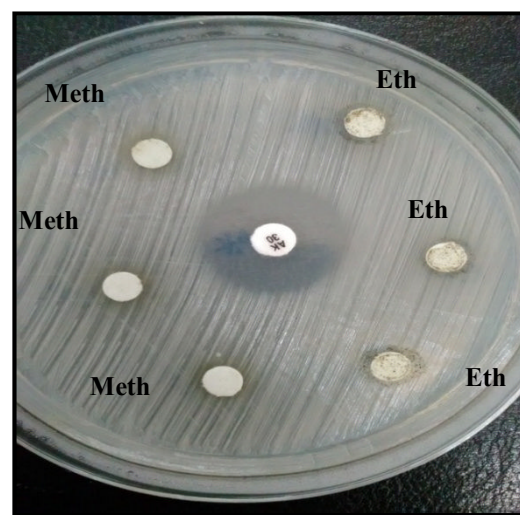
E.coli ATCC 25922



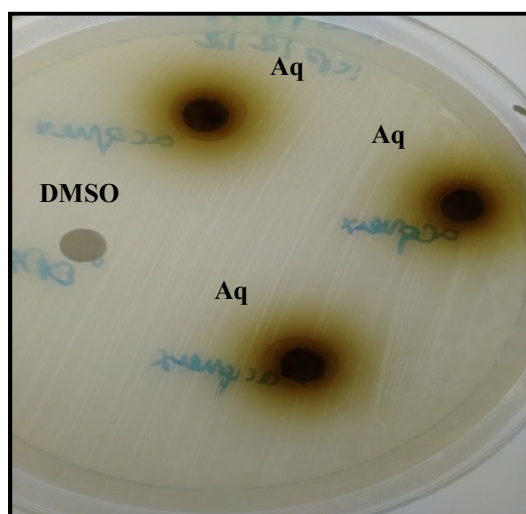
E.coli ATCC 25922



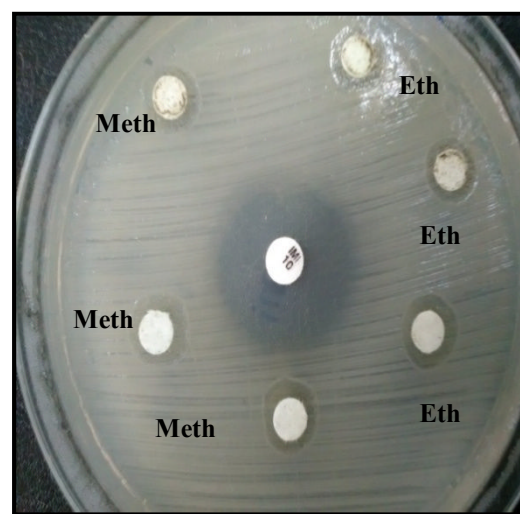
S.aureus ATCC 25923



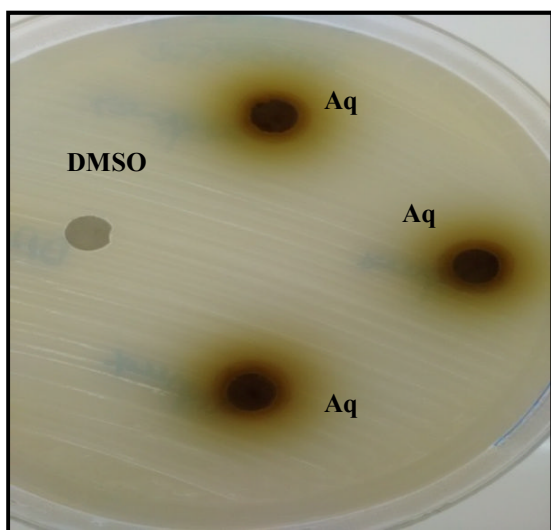
S.aureus ATCC 25923



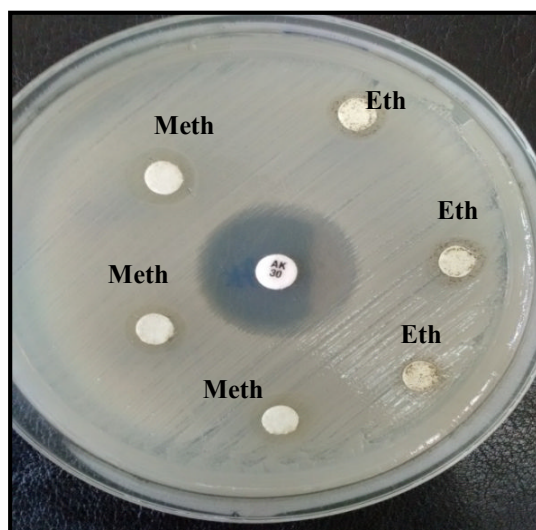
K.p 1212



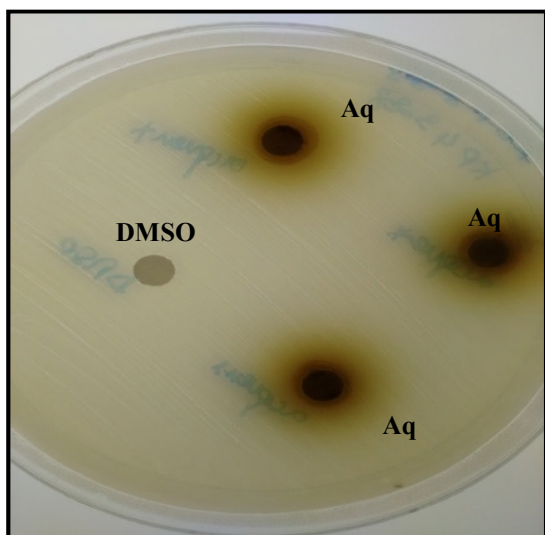
K.p 1212



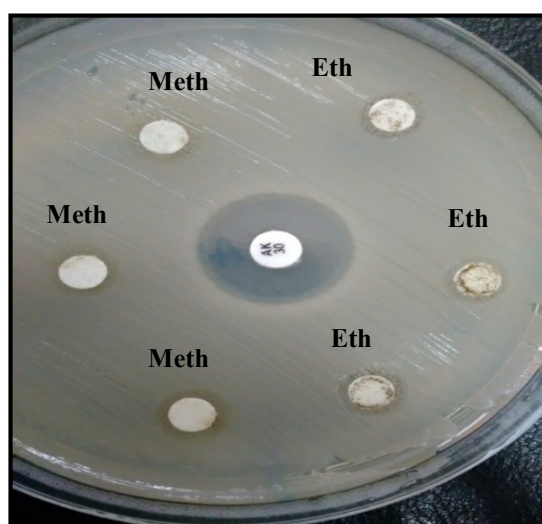
K.p 6252



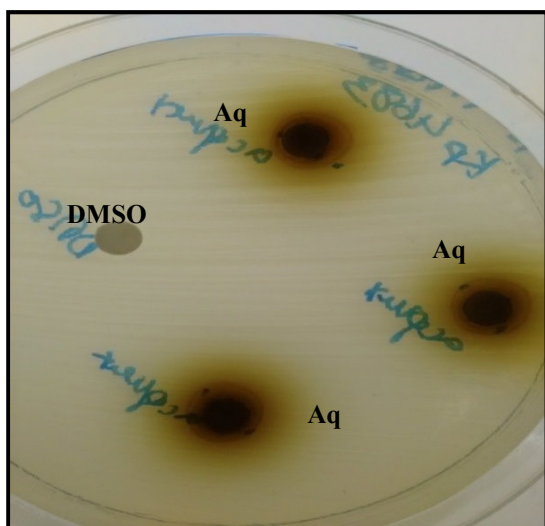
K.p 6252



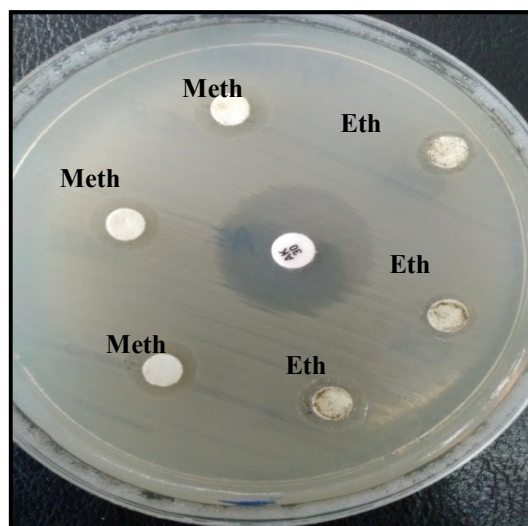
K.p 4328



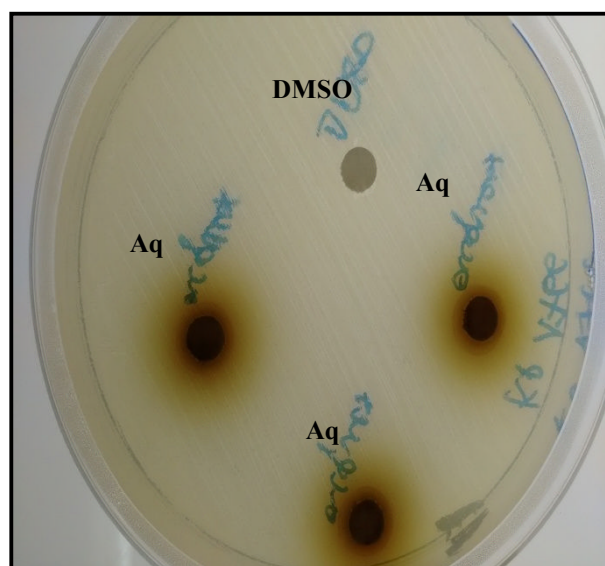
K.p 4328



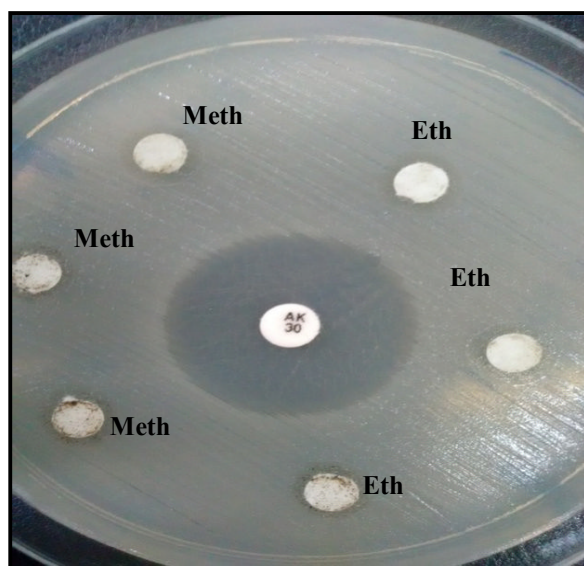
K.p 4683



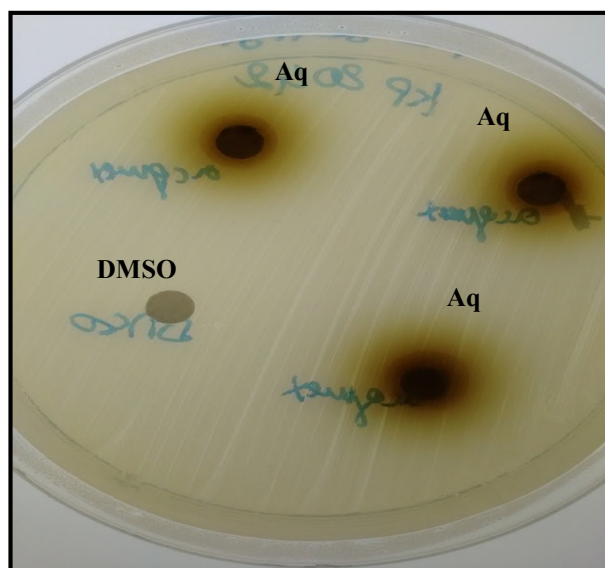
K.p 4683



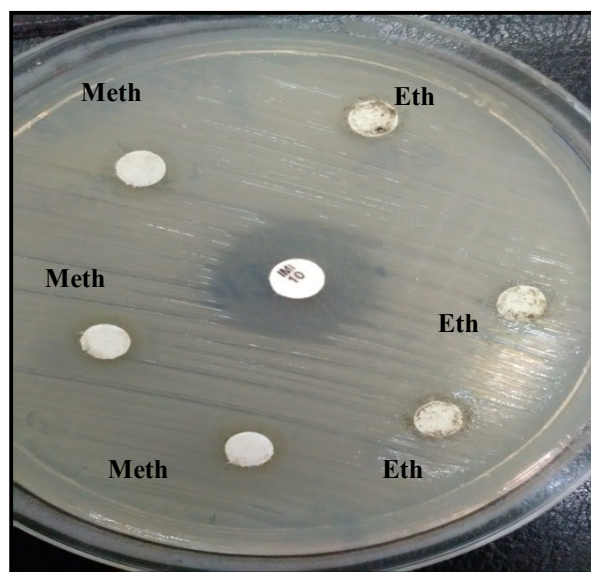
K.p 1766



K.p 1766



K.p 2042



K.p 2042

Figure 33 : Photos montrant l'activité antibactérienne des extraits aqueux, éthanoliques et méthanoliques d'*Inula viscosa* par la méthode de diffusion sur disque (photos prises au Laboratoire).

AQ : extrait aqueux ; **Eth** : extrait éthanolique ; **Meth** : extrait méthanolique.

D'après nos résultats les diamètres des zones d'inhibitions varient de 8 à 9 mm pour les souches de références *E. coli* ATCC 25922 et *S. aureus* ATCC 25923 et de 8 à 14 mm pour les souches *K. pneumoniae*.

Il apparaît que les extraits éthanoliques, méthanoliques et aqueux, ont des actions inhibitrices légères sur la croissance des souches (*E. coli* ATCC25922 et *S. aureus* ATCC25923).

La souche *K. pneumoniae* 1212 semble être sensible vis-à-vis de l'extrait éthanolique et moyennement vis-à-vis d'extrait méthanolique et aqueux et les souches K.p 4683, 4936 apparaissent plus sensibles vis à vis de l'extrait méthanolique que d'autres extraits. De nombreux travaux soulignent cet effet antibactérien des principes actifs naturels (DJAHRA, 2013).

Les différences de sensibilité des microorganismes pourraient être attribuées à des variations des taux de pénétration des constituants des extraits à travers la paroi cellulaire et la membrane cellulaire.

Nos résultats se rapprochent de ceux rapportés par MUSTAFA *et al* (2009) réalisée en Turquie sur l'extrait éthanolique d'Inule visqueuse exerce une activité inhibitrice vis-à-vis souches de *K.pneumoniae* avec un diamètre de 8 mm.

Selon une autre étude qui a été faite par KHADIJA *et al* (2013) au Maroc, les extraits éthanoliques et méthanoliques d'Inule visqueuse ont des activités antibactériennes contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. L'activité concernant l'extrait méthanolique a été la plus efficace contre toutes les souches bactériennes dont les diamètres d'inhibitions varient de 14 à 60 mm. Un diamètre de 57 mm a été observé vis-à-vis de *K. pneumoniae*, 60 mm vis-à-vis d'*E. coli* et 60 mm vis-à-vis de *S. aureus*. L'extrait éthanolique a révélé une activité avec un diamètre de 43 mm vis-à-vis de *K.pneumoniae*, 49mm vis-à-vis de *S. aureus* et 40 vis-à-vis de *E. coli*.

D'après les résultats de notre étude et celle de KHADIJA *et al* (2013), l'extrait méthanolique a montré des activités supérieures à celui de l'extrait éthanolique. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le méthanol peut extraire une dizaine de molécules organiques telles que les anthocyanines, terpènes, saponine, tannins, xanthophylles, lactones et les flavones de la plante (MARJORIE, 1999).

BENSEGUINI-TOUNSI (2001) a constatée que l'extrait hydro-alcoolique à base de méthanol- eau et le chloroforme de l'*Inula viscosa* ont une action inhibitrice légère sur la croissance de *S. aureus* ATCC 25923 et aucun effet n'a été observé sur *E. coli* ATCC 25922. Par contre les extraits à base d'acétate d'éthyle et à base d'hexane sont inactifs sur ces deux germes.

Les travaux de RAMLI (2013) à Oran, montrent que l'extrait hydro-alcoolique (méthanol-eau) lyophilisé d'*Inula viscosa* possède un effet inhibiteur sur les souches à Gram positifs (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 et *Bacillus subtilis* ATCC 6633). Aucune zone d'inhibition n'a été observée pour les bactéries à Gram négatifs (*E. coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14028).

Ces mêmes travaux rapportent l'absence des zones d'inhibition chez les bactéries à Gram négatif résulte que ces bactéries sont résistantes aux substances végétales contenues dans la plante *Inula viscosa*.

Une autre étude qui a été réalisée en Jordanie (2013) par ABOUHAMDAH *et al*, rapporte un effet inhibiteur des extraits méthanoliques d'*Inula viscosa* sur les souches de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et une autre souche *Bacillus subtilis*. Le diamètre de la zone d'inhibition est de 11,16 mm et 14,4mm respectivement.

GÖKBULUT *et al* (2013), rapportent que les extraits méthanoliques d'*Inula viscosa* ont une activité efficace contre les Gram positif tels que *S. aureus* et moins sensibles contre les Gram négatif.

D'autres travaux qui ont été effectués en Allemagne par LAMPRINI *et al* (2014) sur les parties aériennes d'*Inula viscosa* en utilisant deux solvants (acétate d'éthyle et le méthanol) ont trouvés des activités très efficaces contre de nombreux pathogènes à Gram positif et à Gram négatif tels que *E. coli* et *S. aureus*.

De même qu'une étude qui a été réalisée en Turquie par ALBAYRAK *et al* (2015) sur les extraits éthanoliques et méthanoliques d'une plante de même genre *Inula helenium* L. Ont trouvés des inhibitions de croissance de *Klebsiella pneumoniae* avec des diamètres 8mm et 10 mm respectivement.

Les mécanismes d'action des composés naturels sont expliqués de différentes manières selon les auteurs.

Selon CHABOT *et al* (1992) l'activité antimicrobienne est liée à la polarité des substances bioactives.

L'étude phytochimique de la matière végétale d'*Inula viscosa* qui a été réalisée par ULUBELEN et GOUNE en 1986 et BENAYACHE en 1991 ont mis en évidence la présence d'une série importante de flavonoïdes, tritérpènes et plus d'une vingtaine de molécules sesquiterpéniques. Sachant que ces molécules ont une action antibactérienne contre certains Gram positif, Gram négatif et mycobactéries.

De plus la présence des flavonoïdes et l'acide phénolique d'*Inula viscosa* ont montrés leur efficacité antibactérienne qui pourrait être due à une inhibition des enzymes bactériennes, de fait de la réaction d'addition avec le groupement thiol ou amine (SALVADOR, 2007 ; GRANDE, 1992).

Les flavonoïdes peuvent induire une fuite d'ion de potassium au niveau de la membrane et par voie de conséquence des lisions irréversibles au niveau de cette dernière. Cette perméabilité au potassium est un effet précurseur de leur mort (RHAYOUR, 2002).

Les composants biologiquement bioactifs sont soupçonnés de perturber la perméabilité de la membrane cytoplasmique ce qui provoque la fuite d'éléments nutritifs et la mort de la cellule (AL-DISSI, 2001 ; ALARCON, 1993).

Il a été démontré par TALIB *et al* (2012), qu'un composant d'*Inula viscosa* nommé 3,3'-di-O-methylquercetin peut détériorer les membranes cytoplasmiques après sa pénétration dans la paroi bactérienne. La différence entre les activités des extraits pourrait s'expliquer par la différence des composés chimiques extraits.

Conclusion

Les infections à *Klebsiella pneumoniae* productrices de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) représentent une cause importante de morbidité et de mortalité en milieu hospitalier.

Ce travail a été réalisé sur une collection de dix souches cliniques de *K. pneumoniae* isolées en 2013 et 2014 au niveau de différents services de CHU de Tizi-ouzou.

Les résultats de notre étude révèlent que toutes les souches de *Klebsiella pneumoniae* présentent des pourcentages de résistances de 100% vis-à-vis de (l'amoxicilline, céfotaxime, aztréonam et triméthoprim sulfaméthoxazole) ; 90% vis-à-vis de (céftazidime, la cefépime, et la gentamicine) ; 80% vis-à-vis de (l'amoxicilline + acide clavulanique) ; 50% vis-à-vis de (ciprofloxacine) ; 30% vis-à-vis de (amikacine et chloramphénicol), 0% vis-à-vis d'imipénème.

Des images de synergies sont observées pour 9 souches sur 10 entre l'AUG et les C3G (CTX, CAZ), l'ATM et C4G (FEP). L'apparition de telles images témoignent de la production de BLSE par les souches cliniques étudiées. La souche *K.pneumoniae* 825 a montré un test de synergie négatif.

Trois transconjugants ont été obtenus au cours de notre expérimentation, un co-transfert des gènes qui codent pour la résistance aux β -lactamines et les gènes qui codent pour les aminosides, quinolones et les sulfamides a été observé. La présence de ces déterminants de résistance sur des plasmides conjugatifs favorise la dissémination de la résistance surtout dans le milieu hospitalier.

Les extraits aqueux et organiques l'*Inula viscosa* se sont montrés actifs contre les souches étudiés. Les diamètres d'inhibitions pour *E. coli* ATCC 25922 est de 9.16 ± 0.28 mm pour l'extrait aqueux tandis qu'ils sont de 8 et 9 mm pour les extraits éthanoliques et méthanoliques respectivement. Ceux de *S. aureus* ATCC 25923 sont de 9 ± 1 mm pour l'extrait aqueux tandis qu'ils sont de 8 et 9 mm pour les extraits éthanoliques et méthanoliques respectivement. Les diamètres d'inhibitions de *Klebsiella pneumoniae* varient de 9 et 10.66 ± 0.57 mm pour l'extrait aqueux, du 8 à 14 mm pour l'extrait éthanolique et de 8.33 à 12.33 mm pour l'extrait méthanolique.

Ces résultats montrent que l'espèce *Klebsiella pneumoniae* demeure toujours une espèce très résistante aux antibiotiques et le support génétique de cette résistance n'est pas uniquement chromosomique mais également plasmidique. L'inhibition des ces souches multirésistantes par les différents extraits de l'*Inula viscosa* montrent non seulement que cette plante pourrait constituer une source naturelle de principes actifs antimicrobiens mais également la richesse et le potentiel régional en termes de plantes médicinales.

- Isolement et purification des plasmides des transconjugants pour pouvoir les caractériser du point de vue moléculaire ;
- Caractérisation moléculaire des BLSE transférées ;
- Détermination des CMI pour les différents types d'extraits ;
- Détermination de la composition chimique des extraits ;
- Extraction et détermination de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de l'*Inula viscosa*.

A/

- **ABOUDDIHAJ BARGUIGUA., FATIMA EL OTMANI., MUSTAPHA TALMI., FATNA BOURJILAT., FATIMA HAOUZANE., KHALID ZEROUALI. and MOHAMMED TIMINOUNI. (2011).** Characterization of extended-spectrum *b*-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from the community in Morocco. *Journal of Medical Microbiology*, 60, 1344–1352.
- **ABRAHAM E.P. and CHAIN E. (1940).** An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*, 146: 837.
- **AFNOR. (2000).** Huiles essentielles. Monographies relatives aux huiles essentielles. AFNOR, 6ième édition, Tome 2, Paris.
- **ALARCON DE L., C LOPEZ A. and MOTILVA, V. (1993).** Gastroprotection and Prostaglandin E2 generation in rats by flavonoids of *Dittrichia viscosa*. *Planta Medica*, 59: 497-501.
- **ALBAYRAK S., KORKMAZ CINAR A. E., Y PAKSOY M. and A AKSOY. (2015).** An investigation on antioxidant and antimicrobial activities of four *Inula helenium* L. taxa. *Iranian Journal of Science & Technology. IJST (2015), 39A4: 473-483.*
- **AL-DISSI NM, SALHAB AS, AL-HAJJ HA. (2001).** Effects of *Inula viscosa* leaf extracts on abortion and implantation in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 77: 117–121.
- **ALIBI S., A FERJANI. And J BOUKADIDA. (2015).** Molecular characterization of extended spectrum beta-lactamases produced by *Klebsiella pneumoniae* clinical strains from a Tunisian Hospital Caractérisation. *Médecine et maladies infectieuses*, 45 (2015) 139–143 ELSEVIER MASSON.
- **AL-YAHYA M.A., MUHAMMAD I., MIRZA H.H. and EL-FERALY S.F., 1998.** Antibacterial constituents from the rhizomes of *Ferula communis*. *Phytotherapy Research*, 12, 335–339.
- **AMBLER R.P., COULSON A.F.W., FRÉRE J.M., GHUYSEN J.M., JORIS B., FORSMAN M., LEVESQUE R.C., TIRABY A. and WALEY, S.G. (1991).** A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. *Biochemical Journal*, 276: 269-270.
- **ANDERSSON M .C., HALLBERG A. and HOGBERG T. (1996).** *Advances in Drug Research*, 28. 65-180.
- **ARCHAMBAUD M et CLAVE D. (2008).** Fiche technique : *Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae*. Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique. Laboratoire de Bactériologie Hygiène CHU Toulouse. *Fiche technique Bactériologie* 83 EN.FTBAC, 14610611.01. www.ctcb.com/.../Fiches%20techniques/Klebsiella%20pneumoniae%20s.

- **ARCHANA. SINGH SIKARWAR. and HARSH VARDHAN BATRA. (2011).** Challenge to healthcare: Multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *International Conference on Food Engineering and Biotechnology IPCBEE*, vol.9 © (2011) IACSIT Press.
- **ARLET G., ROUVEAU M., CASIN I., BOUVET P.J., LAGRANGE P.H. and PHILIPPON A. (1994).** Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains that produce SHV-4 β -lactamase and which were isolated in 14 French hospitals. *J Journal of Clinical Microbiology*, 32:2553–8.
- **ARLET G. and PHILIPPON A. (2003).** Les nouvelles β -lactamases à l'aube du troisième millénaire. *Revue Française de Laboratoire*, 352 : 41-55.
- **ARPIN C., COULANGE L., DUBOIS V., ANDRÉ C., FISCHER I., FOURMAUX S., GROBOST F., JULLIN J., DUTILH B., COUTURE J.F., NOURY P., LAGRANGE I., DUCASTAING A., DOERMANN H.P. and QUENTIN C. (2007).** Extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae strains in various types of private health care centers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51: 3440–3444.
- **AVRIL J.L., DABERNAT H., DENIS F. et MONTEIL H. (2000).** Bactériologie clinique. 2^{ème} édition. Ellipses. Paris.171-211.
- **AYAN M., KUZUCU C., DURMAZ R., AKTAS E et CIZMECI Z. (2003).** Analysis of three outbreaks due to *Klebsiella* species in a neonatal intensive care unit. *Journal of Infection and Control of Hospital Epidemiology*, 24: 495-50.

B/

- **BABA AHMED-KAZI TANI Z., DECRÉD., GENEL N., BOUCHERIT-OTMANI Z., ARLET G. and DRISSI M. (2013).** Molecular and Epidemiological Characterization of Enterobacterial Multidrug Resistant Strains in Tlemcen Hospital (Algeria) (2008–2010). *Microbial Drug Resistance*, 19(3): 185-190.
- **BAEZ J., HERNANDEZ-GARCIA M., GUAMPARITO C., DIAZ S., OLAVE A., GUERRERO K., CANTON R., BAQUERO F., GAHONA J., VALENZUELA N., DEL CAMPO R. and SILVA J. (2015).** Molecular characterization and genetic diversity of ESBL-producing *Escherichia coli* colonizing the migratory Franklin's gulls (*Leucophaeus pipixcan*) in Antofagasta, North of Chile. *Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology and Disease*, 21:111-116.
- **BAGATTINI M., CRIVARO V., DI POPOLO A., GENTILE F., SCARCELLA A., TRIASSI M., VILLARI P., ZARRILLI R. (2006).** Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57:979–982.
- **BAGLEY S.T., SEIDLER R.J., TALBOT H.W.J. and MORROW J.E. (1978).** Isolation of *Klebsiella* from within living wood. *Applied and Environmental Microbiology*, 36: 178-185.
- **BARRIAL K and SCOTET J. (2006).** Classification raisonnée des β -lactamases chez les bacilles Gram négatif. Perspective d'évolution. *Tigaud de bactériologie*, 3-10.

- **BAUDRY P. J., NICHOL K., DECORBY M., LAGACE' -WIENS P., OLIVIER E., BOYD D., MULVEY M. R., HOBAN D. J. and ZHANEL G. G. (2009).** Mechanisms of resistance and mobility among multidrug-resistant CTX-M-producing *Escherichia coli* from Canadian intensive care units: the 1st report of QepA in North America. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 63, 319–326.
- **BAYTOP T. (1984).** Therapy with Medicinal Plants in Turkey. *Sanal Press, Istambul*, P: 167.
- **BENAYACHE S., BANAYACHE F., DENDOUGH H. and JAY M. (1991).** Les Favomoïdes de *Inula viscosa* L. *Plantes médicinales et phytothérapie*. Tome 25, n° 4 .p 170-176.
- **BENSEGUENI-TOUNSI. (2001).** Etude in vitro de l'activité antibactérienne et antifongique : *d'inula viscosa*, *Lawsonia inermis*, *Asphodelus microcarpus*, *Aloe vera*, *Juniperus oxycedrus*. Diplôme de magistère en médecine vétérinaire.universite de constantine. Constantine.Algerie.
- **BIALEK-DAVENET S., MARCON E., LEFLON-GUIBOUT V., LAVIGNE J.P., BERT F., MOREAU R. and NICOLAS-CHANOINE M.H. (2011).** In vitro selection of ram R and sox R mutants overexpressing 66 efflux systems by fluoroquinolones as well as cefoxitin in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55 (6): 2795–2802.
- **BICHA S. (2003).** Etude de l'effet de la pollution du sol par les métaux lourds sur l'accumulation des métabolites secondaires de l'exsudat chloroforme de *Inula viscosa* (compositae). *Thèse de magister*, Université de Constantine.
- **BINGEN E.H., DESJARDINS P., ARLET G., BOURGEOIS F., MARIANI-KURKDJIAN P. and LAMBERT- ZECHOVSKY NY. (1993).** Molecular epidemiology of plasmid spread among extended broad-spectrum b-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a pediatric hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 31:179–84.
- **BIOMERIEUX S.A. (2004).** Api 20E® Réf. 20 100(25 galleries) Réf.20 160(100galeries). *Système d'identification des bacilles à Gram Négatif*, 1-4.
- **BIRGE E.A. (1994).** Bacterial and Bacteriophage Genetics. Ed Springer, third ed. 8: 174-239; 12: 318-327.
- **BIRKETTC I., H. A LUDLAM. N. WOODFORD., D. F. BROWN., N.M. BROWN. M. T. ROBERTS., N. MILNER. and M. D. CURRAN.(2007).** Real-time TaqMan PCR for rapid detection and typing of genes encoding CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *Journal of Medical Microbiology* ,56:52-55.
- **BOHLMAN F., CZERSON H., S SCHÖNEWEISS. (1977).** New constituents of *Inula viscosa* Ait. *Chemische Berichte*, 110, 1330-1334.
- **BONNET R. (2004).** Growing group of extended-spectrum-beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 1–14.

- **BOTELHO-NEVERS E., GOURIET F., LEPIDI H., COUVRET A., AMPHOUX B., DESSI P. and RAOULT D. (2007).**Chronic nasal infection caused by *Klebsiella rhinoscleromatis* or *Klebsiella ozaenae*: two forgotten infectious diseases. *International Journal of Infectious Diseases*, 11, 423—429.
- **BOUCHILLON S.K., JOHNSON B.M., HOBAN D.J., JOHNSON J.L., DOWZICKY M.J ., WU D.H., VISALLI MA. and BRADFORD P.A. (2004).** Determining incidence of extended spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae, vancomycin-resistant Enterococcus faecium and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 38 centers from 17 countries: the PEARLS study 2001–2002. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24:119–124.
- **BOUMAZA D. (2011).** Séparation et caractérisation chimique de quelques biomolécules actives de deux plantes médicinales : *Inule visqueuse*, *Rosmarinus officinalis* de la région d’Oran, diplôme de Magister en Chimie, université d’Oran, Oran.
- **BRADFORD P.A. (1999).** Automated thermal cycling is superior to traditional methods for nucleotide sequencing of *bla* SHV genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43: 2960-2963.
- **BRADFORD P.A. (2001).** Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology reviews*, 14:933-51.
- **BRINAS L., ZARAZAGA M., SAENZ Y., RUIZ-LARREA F. and TORRES C. (2002).** Beta-lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46:3156-3163.
- **BRISSE S and VERHOEF J. (2001).** Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 915-924.
- **BRUNETON J. (1993).** pharmacognosie, phytochimie des plants médicinales, techniques et documentation, Lavoisier, Paris 268.
- **BRUNETON J. (2009).** *Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales* Éditions médicales internationales, 4e éd, revue et augmentée, Paris, Tec & Doc. p 1288.
- **BSSAIBIS F., Gmira N., Meziane M. (2009).** *Revue of Microbiology*. Ind. San et Environn , Vol 3, N°1. pp 44-55.

C/

- **CAFARCHIA C., DE LAURENTIS N., MILILLO M.A., LOSACCO V. and PUCCINI V. (2002).** Antifungal activity of essential oils from leaves and flowers of *Inula viscosa* (Asteraceae) by Apulian region. *Parassitologia*, 44: 153-156.
- **CARPENTER J. L. (1990).** *Klebsiella* pulmonary infections: occurrence at one medical center and review. *Revuel of Infectious Diseases*, 12:672-682.

- **CARRER A., NORDMANN P. (2011).** *Klebsiella pneumoniae* CTX-M-15 : vers une modification de l'épidémiologie des B-lactamases à spectre étendu. *Pathologie Biologie*, 59 e133-e135.
- **CARTER M.W., OAKTON K.J., WARNER M., LIVERMORE D.M. (2000).** Detection of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiellae* with the Oxoid combination disk method. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 4228-4232.
- **CAVALLO J.D., FABRE R., JEHT F., RAPP C. et GARRABE E. (2004).** 13-lactamines. *EMC Maladies Infectieuses*, 1: 129-202.
- **CHABOT S., BEL-RHLID R., CHÊNEVERT R., PICHE Y. (1992).** Hyphal growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO₂-enriched conditions. *New Phytologist*, 122: 461-467.
- **CHARLIER P., COYETTE J., DEHARENG D., DIVE G., DUEZ C., DUSART J., FONZE E., FRAIPONT C., FRERE J.M., GALLEN M., GOFFIN C., JORIS B., LAMOTTE-BRASSEUR J. et NGUYEN-DISTECHE M. (1998).** Résistance bactérienne aux β -lactamines. *Synthèse. médecine/sciences*, 14 : 544-555.
- **CHRISTENSEN S. C. and B. KORNER. (1972).** An endemic caused by multiresistant *Klebsiella* in an urological unit. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, 6:232-238.
- **CHUNG K.I., LIM T.H., KOH Y., SONG J.H., KIM W.S., CHOI J. and MAND AUSH Y.H. (1992).** Nosocomial pneumonia in medico-surgical intensive care unit. *Journal of Korean Medical Science*, 7: 241- 251.
- **CORMICAN M.G., MARSHALL S.A., JONES R.N. (1996).** Detection of extended-spectrum β -lactamases (ESBL)-producing strains by the Etest ESBL screen. *Journal of Clinical Microbiology*, 34: 1880-1884.
- **COURVALIN P., LECLERCQ R. et BINGEN E. (2006).** *Antibiogramme*, 2:142-162, 227-246, 263-277.
- **CREMET L., CAROFF N., DAUVERGNE S., REYNAUD A., LEPELLETIER D. and CORVEC S. (2011).** Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in ESBL Enterobacteriaceae clinical isolates over a 1-year period in a French hospital. *Pathologie Biologie* (Paris), 59, 151–156.
- **CRONBERGS., BEYTOUT J. et REY.M. (1988).** *Maladies infectieuses*. P1, 49,50, 106, 107, 109, 114, 115,128, 129, Masson, Paris.
- **CRYZ S J. J.R., FURER F. and GERMANIER R. (1984)** .Experimental *Klebsiella pneumoniae* burn wound sepsis: role of capsular polysaccharide. *Infection and Immunity*, 43(1):440-1.

D/

- **DATTA N and KONTOMICHALOU P. (1965).** Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature*, 208: 239-241.

- **DAVID A., MONNER., STAFFAN JONSSON. and HANS G. BOMAN. (1971).** Ampicillin-Resistant Mutants of *Escherichia coli* K-12 with Lipopolysaccharide Alterations Affecting Mating Ability and Susceptibility to Sex-Specific Bacteriophages. *Journal of Bacteriology*, Vol, 107, No. 2 .p. 420-432.
- **DAVOOD MANSURY., MOHAMMAD MOTAMEDIFAR., JAMAL SARVARI. BABAK SHIRAZI. and AZAD KHALEDI. (2016).** Antibiotic susceptibility pattern and identification of extended spectrum β -lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Shiraz, Iran. *Iranian Journal of Microbiology*, Volume 8 Number 1, 55-61.
- **DENDOUGUI H. (1989).** *Thèse de magister*, Université de Constantine, plant. *Medecine of Phytotherapy*, 25 : (4) 170-176, (1991).
- **DI MARTINO P., SIROT D., JOLY A. and DARFEUILLE-MICHAUD A. (1999).** A new fimbrial antigen harbored by CAZ-5/SHV-4 producing *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infection and Immunity*, 64: 2266-2273.
- **DJAHRA ALI BOUTLELIS. (2013).** Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* L. *Thèse de doctorat en science*. Université Badji Mokhtar - Annaba. Annaba. Algérie.
- **DJERROUMI A et NACEF M. (2004).** 100 plantes médicinales d'Algérie .Edd Palais du livre, P. 83.
- **DOGAN OZDEMIR., SHAKO HASSAN. and DURAN KALA.(2013).** Detection of Conjugative Plasmid Encoded Ampicillin and Tetracycline Resistant in *Klebsiella pneumonia*. *International Journal of Biology*, Vol. 5, No. 2.
- **DONG Y., CHELLIUS M.K., BRISSE S., KOZYROVSKA G. and TRIPLIET E.W. (2003).** Comparisons between two *Kiebsiella*: the plant endophyt *K.pneumoniae* 342 and clinical isolate *K.pneumoniae* MGH78578. *Journal of Symbiosis*, 35: 247-259.
- **DRANCOURT M., BOLLET C., CARTA A. and ROUSSELIER P. (2001).** Phylogenetic analysis of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* *Combinatorial Nouvel.*, *Raoultella terrigena* *comb. nov.*, and *Raoultella planticola*. *Combinatorial Nouvel. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51:925–32.
- **DRIEUX L., BROSSIERF., SOUGAKOFFW. and JARLIER V. (2008).** Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clinical Microbiology and Infection*, 14: 90-103.

E/

- **ECKERT C., GAUTIER V. and ARLET G. (2006).** DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla*CTX-M genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57: 14–23.
- **ELHANI D. (2012).** Les bêta-lactamases à spectre étendu : le défi s'accroît. *Annales de Biologie Clinique*, 70(2). 117-40.
- **ET FERTAS-AISSANI R., MESSAI Y., ALOUACHE S. and BAKOUR R. (2012).** Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *Pathologie Biologie*, 3048.

F/

- **FAUCHERE J.L., AVRIL J.L. (2002).** Bactériologie générale et médicale, Ed. 15: 252- 253; 10: 151-176.
- **FAURON R., MOATI R. et DONADIEU Y. (1983)** .Guide pratique de phytothérapie, Ed, MALOINE. pp 811.
- **FERTAS-AISSANI R.E., MESSAI Y., ALOUACHE S. and BAKOUR R. (2013).** Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *Pathologie Biologie*, 61:209–16.
- **FORBES B.A., SAHM D.F. et WEISSFELD A.S. (2007).** Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. St.Louis: Mosby.
- **FOURNIER P. (1947)** .Livre des plantes médicinales et vénéneuses de France. Ed, LECHEVALIER, Tome 1 pp. 176-178.
- **FRANCO-MICAN S.X., CASTRO J. et CAMPOS M. (2008).** Observation du complexe parasitaire de l'inule visqueuse en Espagne et ses méthodes de propagation, *Le Nouvel Olivier*, n°66.
- **FUNG C.P., HU B.S, CHANG F.Y. (2000).** A 5-year study of the seroepidemiology of *Klebsiella pneumoniae*: high prevalence of capsular serotype K1 in Taiwan and implication for vaccine efficacy. *Journal of Infectious Diseases*, 181: 2075-9.

G/

- **GÖKBULUT O., ÖZKAN B., SATILMIS K., BATCIOĞLU S., GÜNAL. And E SARER. (2013).** “Antioxidant and antimicrobial activities, and phenolic compounds of selected inula species from Turkey”. *Natural Product Communications*, vol. 8, no. 4, pp. 475–478.
- **GEORGOPAPADAKOU N.H. (1993).** Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to β - lactams. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 37: 2045-2053.
- **GHAROUT-SAIT A., TOUATI A., BENALLAOUA S., GUILLARD T., BRASME L., MADOUX J., AND DE CHAMPS C. (2012).** CTX-M from community-acquired urinary tract infections in Algeria. *African Journal of Microbiological Research*, 6: 5306-5313.

- **GHEORGHIAD E M., VAN VELDHUISEN D. and COLUCCI W. (2006).** *Contemporary Use of Digoxin in the Management of Cardiovascular Disorders*, 113: 2556 – 2564.
- **GRALL N., ANDREMONT A. et ARMAND-LEFEVRE L. (2011).** Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse. *ANTINF-16*, No. of Pages 16.
- **GRANDE M., TORRES P., PIERA F. and BELLIDO IS. (1992).** Triterpenoids from *Dittrichia viscosa*. *Phytochemical*, 31(5): 1826-1828.
- **GRIMONT PAD et GRIMONT F. (2005).** GENUS XVI KLEBSIELLA. in: **BRENNER DJ., KRIEG NR., STANLEY JT., EDS.** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Springer, New York. pp. 685–693.

H/

- **HAEGGMAN S., LÖFDAHL S., PAAUW A., VERHOEF J. and BRISSE S. (2004).** Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 2400-2408.
- **HAMILTON-MILLER J.M.T. and SHAH S. (2004).** Activity of tea component epicatechin gallate and analogues against methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 46 847-863.
- **HAMMOND D.S., SCHOONEVELDT J.M., NIMMO G.R., HUYGENS F. and GIFFARD P.M. (2005).** *bla*SHV genes in *Klebsiella pneumoniae*: different allele distributions are associated with different promoters within individual isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 256-263.
- **HANSON N.D. (2003).** AmpC beta-lactamases: what do we need to know for the future?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52: 2-4.
- **HASSAINE SAMIYA. (2012).** Etude de la résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux antibiotiques au niveau du CHU de Tlemcen. *Mémoire de Master en Biologie*. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen. Tlemcen .ALGERIE.
- **HENNEQUIN C et FORESTIER C. (2007).** Influence of capsule and extended-spectrum beta-lactamases encoding plasmids upon *Klebsiella pneumoniae* adhesion. *Research in Microbiology*, 158: 339-347.
- **HENNEQUIN C., AUMERAN C., ROBIN F., TRAORE O. and FORESTIER C. (2012).** Antibiotic resistance and plasmid transfer capacity in biofilm formed with a CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67:2123–30.
- **HENNEQUIN C., ROBIN F., CABROLIER N., BONNET R. et FORESTIER C. (2012).** Characterization of a DHA-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strain Involved in an Outbreak and Role of the AmpR Regulator in Virulence. 0066-4804/12/\$12.00 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. p. 288–294.
- **HIDALGO L., K. L. HOPKINS B., GUTIERREZ C. M., OVEJERO S., SHUKLA S. DOUTHWAITE., PRASAD K.N., WOODFORD N. and B.**

GONZALEZ-ZORN.(2013). Association of the novel aminoglycoside resistance determinant RmtF with NDM carbapenemase in *Enterobacteriaceae* isolated in India and the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

- **HMAMOUCI B., CHAKKOURI K., NEJMI S E., CHLILEK A. (2005).**Épidémiologie de l'infection nosocomiale en réanimation pédiatrique. *Lettres à la rédaction / Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 24 (2005) 697–700.
- **HSIEH P.F., LIN T.L., YANG F.L., WU M.C., PAN Y.J., WU S.H. and WANG J. T. March (2012).** Lipopolysaccharide O1 Antigen Contributes to the Virulence in *Klebsiella pneumoniae* Causing Pyogenic Liver Abscess, | Volume 7 | Issue 3 | e33155.
- **HUANG SY., PAN KY., LIU XQ., XIE XY., DAI XL., CHEN BJ., WU XQ. And LI HY. (2015).** Analysis of the drug-resistant characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolated from the respiratory tract and CTX-M ESBL genes. *Genetic Molecular and Research*, 14:12043-12048.

I/

- **IABADENE H., MESSAI Y., AMMARI H., RAMDANI-BOUGUESSA N., LOUNES S., BAKOUR R. and ARLET G. (2008).** Dissemination of ESBL and Qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62, 133–136.
- **IABADENE H., MESSAI Y., AMMARI H., ALOUACHE S., VERDET C., BAKOUR R. and ARLET G. (2009).** Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* in Algiers hospitals. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34: 340-342.
- **IRAJ A and NILUFAR Y.N (2010).** Antibigram of extended spectrum bêtalactamases (ESBL) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from hospital samples, Bangladesh. *Journal of Medical Microbiology*, 4 (1), 32–36.
- **ISERINP. (2001).** Encyclopédie des plantes médicinales, Edition VUEF, p. 8 50.
- **ISO. (1997).** Norme ISO 9235 : Matières premières d'origine naturelle - Vocabulaire, 2p.

J/

- **JACOBY. G.A. (1994).** Genetics of extended spectrum beta-lactamases. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious*, 13: 2-11.
- **JACOBY G. A., CHOW N. And WAITES K. B. (2003).** Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47:559-562.
- **JACOBY G.A and MUNOZ-PRICE L.S. (2005).** The new β -lactamases. *ENGLISH Journal of Medical*, 352: 380- 391

- **JACOBY G., BUSH K. (2013).**β-Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes. <http://www.lahey.org/Studies/>.
- **JARLIER V., NICOLAS M.H., FOURNIER G. and PHILIPPON A. (1988).** Extended-broad-spectrum β-lactamases conferring transferable resistance to newer β-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Reviews Infectious Diseases*, 10: 867–878.
- **JARLIER V et NORDMANN P. (2000).** Entérobactéries et β-lactamines. In Freney J, Renaud F, Hansen W, Botler C. Précis de bactériologie clinique. Ed Paris ; ed ESKA 649-665.
- **JARLIER V., CARBONNE A., ASTAGNEAU P. et COIGNARD B. (2004).** Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN). Editions In VS. p 84.
- **JEHL F., CHOMARAT M., WEBER M. et GERARD A. (2003).** De l'antibiogramme à la prescription, Ed., Biomérieux. 31-64.
- **JOLY B et REYNAUD A. (2002).** Entérobactéries. *Systématique et méthodes de diagnostic*, P : 79-80-83.
- **JONAS D., SPITZMÜLLER B., DASCHNER F.D., VERHOEF J. and BRISSE S. (2004).** Discrimination of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* phylogenetic groups and other *Klebsiella* species by use of amplified fragment length polymorphism. *Journal of Research in Microbiology*, 155: 17-23.

K/

- **KÄMPKE T., KIENINGER M. and MECKLENBURG M. (2001).** Efficient primer design algorithms. *Bioinformatics*, 17(3), 214-225.
- **KARAALI A., BOYACIOALU D., GUNEZ G., OZÇELIK B. (2004).** Flavonoids in fruit and vegetables: their impact on food quality, nutrition and health—STREP or CA. European commission's the 6th framework programme for research. *Istanbul technical university. Turkey*.
- **KASSIS-CHIKHANI N., DECRE D., GAUTIER V., BURGHOFFER B., SALIBA F., MATHIEU D., SAMUEL D., CASTAING D., PETIT J.C., DUSSAIX E. and ARLET G. (2006).** First outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*VIM-1 and *bla*SHV-5 in a French university hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57: 142-5.
- **KHADIJA LAGHRIFI., MOSTAFA EL IDRISSE., YOUSSEF MAKOUDI. and RACHAD ALNAMER.(2013)** *in vitro* antibacterial activity of the methanolic and ethanolic extract of *Inula viscosa* used in Moroccan traditional medicine. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Volume 2, Issue 5, 3963-3976. ISSN 2278 – 4357.
- **KIM J.S., YUN Y.S., KIM S.J., JEON S.E., LEE D.Y., CHUNG G.T., YOO C.K. and KIM J. (2016).** Rapid Emergence and Clonal Dissemination of CTX-M-15-

Producing Salmonella enterica Serotype Virchow, South Korea. *Emerging Infectious Diseases*, 22:68-70.

- **KNOTHE H., SHAH P., KRCMERY V., ANTAL M. and MITSUHASHI S. (1983).** Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*, 11:315-7.
- **KUMAR A. and SCHWEIZER H.P. (2005).** Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57: 1486-1513.
- **KUMAR V., SUN P., VAMATHEVAN J., LI Y., INGRAHAM K., PALMER L., HUANG J. et BROWN J.R. (2011).** Comparative genomics of *Klebsiella pneumoniae* strains with different antibiotic resistance profiles. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55:4267-76.

L/

- **LAGHA NOURIA Ep BENMESMOUDI. (2014).** Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) isolées de l'hôpital de Laghouat. *Thèse de Doctorat*. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen .Algérie.
- **LAHLOU AMINE I., CHEGRI M. and L'KASSMI H. (2009).** Epidemiology and antibiotic resistance of Enterobacteriaceae isolated in urinary tract infections at the Moulay-Ismaïl Military Hospital of Meknes. *Antibiotiques*, 11, 90-96.
- **LAI YC., YANG S.L., PENG H.L. and CHANG HY. (2000).** Identification of genes present specifically in a virulent strains of *Kiebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 68:7149- 7151.
- **LAMPRINI KARYGIANNI., MANUEL CECERE., ALEXIOS LEANDROS SKALTSOUNIS., AIKATERINI ARGYROPOULOU., ELMAR HELLWIG., NEKTARIOS ALIGIANNIS., ANNETTE WITTMER. and ALI AL-AHMAD.(2014).** High-Level Antimicrobial Efficacy of Representative Mediterranean Natural Plant Extracts against Oral Microorganisms. *Biomedical Research International*, Volume 2014, Article ID 839019, 8 pages.
- **LAU H et al. (2008)** .Host and microbiota factors that control *Klebsiella pneumoniae* mucosal colonization in mice. *Microbes and Infection*, 10 (12-13): 1283 1290.
- **LAUPLAND K.B., PARKINS M.D. and CHURCH D.L. (2005).** Population-based epidemiological study of infections caused by carbapenem- resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: importance of metallo-beta lactamases (MBL) produ- cing strains. *Journal of Infectious Diseases*, 192:1606-12.
- **LAURENT. F. (2009).** Principales β -lactamines : Pénicillines G, A, M, inhibiteurs de β - lactamases, Uréidopénicillines, Carboxypénicillines C1G, C2G, C3G, Monobactames Carbapénèmes. Groupement Hospitalier .Nord Lyon. P 8.
- **LE MINOR L et VERON M. (1989).** Bactériologie médicale. Médecine-Sciences, 2^{ème} édition, Flammarion, 2:428-432 Paris.

- **LESPRIT P., DUONG T. and GIROU E. (2009).** Impact of a computer-generated alert system prompting review of antibiotic use in hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63: 1058-63.
- **LEWIN C. S., B. M. HOWARD. and J. T. SMITH. (1991).** Protein- and RNA-synthesis independent bactericidal activity of ciprofloxacin that involves the A subunit of DNA gyrase. *Journal of Medical Microbiology*, 34:19-22.
- **LIVERMORE D.M. (1995).** "Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance." *Clin Microbiol Rev Clinical Microbiology reviews*, 8(4): 557-584.
- **LUICITA LAGUNEZ RIVERA. (2006).** Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffé par induction thermomagnétique directe. Pour obtenir le titre de docteur de l'institut national polytechnique de Toulouse spécialité. sciences des agroressources. Toulouse.

M/

- **MADIGAN M et MARTINKO. J. (2007).** Biologie de Micro-organismes. Université Carbondale de l'Illinois du sud .11^e édition. P 702,705, 711,860, 862.
- **MALEŠEV D and KUNTIC V. (2007).** Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the serbian chemical society*, 72 (10) : 921-939.
- **MAMMERI H. (2008).** Mécanismes de résistance aux antibiotiques dus à l'antibiothérapie. Service de Bactériologie-Hygiène, CHU Amiens. Université de Picardie Jules verne. P 16-18.
- **MAPOLA G. (2003).** Variations individuelle et saisonnière de la teneur et de la composition des huiles essentielles de *E. Citriodora* acclimaté à Pointe- Noire (Congo Brazzaville), Université de Marien Ngouabi. Domaine : Sciences exactes, Naturelles et de l'Ingénieur. Spécialité: Chimie et Technologie Alimentaires.
- **MARIA J. PONS., DELFINO VUBIL., ELISABET GUIRAL., DINIS JAINTILAL., OSCAR FRAILE., SARA M. SOTO., BETUEL SIGAUQUE., TACILTA NHAMPOSSA., PEDRO AIDE., PEDRO L., ALONSO., JORDI VILA., INACIO MANDOMANDO. and JOAQUIM RUIZ. (2015).** Characterisation of extended-spectrum β -lactamases among *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteraemia and urinary tract infection in Mozambique. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 3 (2015) 19–25.
- **MARJORIE MURPHY COWAN. (1999).** Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical microbiology reviews. *American Society for Microbiology*, p. 564–582 Vol. 12, No. 4.
- **MATYAR A., KAYA A. and DINÇER S. (2008).** Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay. *Turkey Science of The Total Environment*, 15: 279-285.

- MCCARTHYV P and HUBBARD V. S. (1984). *Klebsiella ozaenae* in a patient with cystic fibrosis. *Archives of Internal Medicine*, 144:408-409.
- MEDEIROS A.A. (1984). β -lactamases. *Bnt. Medical. Buli*, 40: 18-27.
- MENARD R., MOLINAS C., ARTHU M., DUVAL J., COURVALIN P. and LECLERCQ R. (1993). Overproduction of 3'-aminoglycoside phosphotransferase type I confers resistance to tobramycin in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37:78-83.
- MERADI L., DJAHOUDI A., ABDI A. BOUCHAKOUR M., PERRIER GROS CLAUDE J. D . and TIMINOUNI M.(2011). [Qnr and aac (6')-Ib-cr types quinolone resistance among *Enterobacteriaceae* isolated in Annaba, Algeria]. *Pathology Biology*. (Paris), 59:e73-e78.
- MESSAI Y., IABADENE H., BENHASSINE T., ALOUACHE S., TAZIR M., GAUTIER V., ARLET G. (2008).and BAKOUR, R. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). *Pathologie Biologie*, (Paris). 56: 319-325.
- MIRNA VRANIC-LADAVAC. ZRINKA BOSNJAK., NATASA BEADER., NADA BARISIC., SMILJA KALENIC. and BRANKA BEDENIC. (2010). Clonal spread of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Croatian hospital. *Journal of Medical Microbiology*, 59, 1069–1078.
- MOHAMMAD REZA SHARIF., BABAK SOLTANI., ALIREZA MORAVVEJI., MAHZAD ERAMI. and NIKA SOLTANI. (2016). Prevalence and Risk Factors associated with Extended Spectrum Beta Lactamase Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Hospitalized Patients in Kashan (Iran). *Electronic Physician*, Volume: 8, Issue: 3, Pages: 2081-2087.
- MOHAMUDHA P. R., HARISH B. N. and PARIJA S. C. (2010). AMPC b-lactamases among Gram negative clinical isolates from a tertiary hospital, South India. *Brazilian Journal of Microbiologie*, 41, 596–602.
- MOUBARECK C., BOURGEOIS N. et DOUCET-POPULAIRE F. (2003).L'utilisation des antibiotiques en pratiques vétérinaire et ses risques pour la santé humaine. *Environnement, Risques et santé*, N°2, Vol.2, pp .97-104.
- MUDSSER AZAM., ARIF T. JAN. and QAZI M R. HAQ.(2016). *bla*_{CTX-M-152}, a Novel Variant of CTX-M-group-25, Identified in a Study Performed on the Prevalence of Multidrug Resistance among Natural Inhabitants of River Yamuna, India. *Front Microbiology*, 2016, 7: 176.
- MUNOZ-PRICE L.S et JACOBY G.A. (2013). Extended-spectrum beta-lactamases. <http://www.uptodate.com/contents/extended-spectrum-betalactamases#H3>.

N/

- **MUSTAFA OSKAY., DILEK OSKAY. and FATIH KALYONCU. (2009).** Activity of Some Plant Extracts Against Multi-Drug Resistant Human Pathogens. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 8 (4): 293-300.
- **NAAS T. C., BENTCHOUALA G., CUZON S., YAOU A., LEZZAR F., SMATI, and P NORDMANN. (2011).** Outbreak of *Salmonella enterica* serotype Infantis producing ArmA 16S RNA methylase and CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase in a neonatology ward in Constantine, Algeria. *International Journal of Antimicrob. Agents*, 38:135-139.
- **NAAS T., LEZZAR A., BENTCHOUALA C., SMATI F., SCHEFTEL J.M., MONTEIL H. and NORDMANN P. (2005).** Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Senftenberg isolates producing CTX-M beta-lactamases from Constantine, Algeria. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 56: 439-440.
- **NAIT SAID N. (2007).** Etude phytochimique des extraits chloroformiques des plantes *Pituranthos chloranusthus* et *Marrubium vulgare*, *Mémoire de magister à l'université de Batna*.
- **NAKANO R., OKAMOTO R., NAKANO Y., KANEKO K., OKITSU N., HOSAKA Y. et INOUE M. (2004).** CFE-1, a novel plasmid encoded AmpC beta-lactamase with an *ampR* gene originating from *Citrobacter freundii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 1151-8.
- **NAWEL KHEYAR., DAHIA MERIDJA. et KAMEL BELHAMEL. (2014).** Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula viscosa*, *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* de la région de Bejaia, *Faculté des Sciences de la Nature et de la vie*, Université de Bejaia ; *Algerian Journal of Natural Products ; Laboratoire des Matériaux Organiques, Faculté de Technologie, Université de Bejaia* ; page 18-26.
- **NDOYE R. (2004).** Algorithme d'identification des Entérobactéries et des bacilles gram négatifs non fermentaires. *Thèse Pharm. n° 83*.
- **NEDJAI S., BARGUIGUA A., DJAHMI N., JAMALI L., ZEROUALI K., DEKHIL M. and TIMINOUNI M. (2012).** Prevalence and characterization of extended spectrum beta-lactamases in *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group bacteria, in Algeria. *Medecine et Maladies Infectieuses*, 42: 20-29.
- **NEWIRE E.A., AHMED S.F., HOUSE B., VALIENTE E. and PIMENTEL G. (2013).** Detection of new SHV-12, SHV-5 and SHV-2a variants of extended spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Egypt. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobial*, 12:16.
-
- **NISSIMKRISSPIL et HERBES POUCH. (1982).** traduit de l'original hébreu), *Jérusalem: Kana éditeurs*.
- **NORDMANN P. et CARRER A. (2010).** Les carbapénèmes des entérobactéries. *Archives de pédiatrie*, 17 :S154-162.

- **NORDMANN P., POIREL L., WALSH TR. and LIVERMORE D.M. (2011).** The emerging NDM carbapenemases. *Trends in Microbiology*, 19 (12): 588-595.
- O/**
- **OKSÖZ S. (1976).** Taraxasterol acetate from *Inula viscosa*. *Plantamed*, 29(4): 343-345.
- P/**
- **PAGESJ M. (2003).** Porines bactériennes et sensibilité aux antibiotiques. *Medicine Science*, 20 346-351.
 - **PARIS R.R., MOYSE H. (1965).** Abrégé de matières médicales. Collection de pharmacie sous la direction de JAMOT, tome 1.Ed, Masson, pp. 78-79-453.
 - **PARIS M., HURABIELLE M. (1980).** Abrégé de Matière Médicale (Pharmacognosie), *Tome 1 Paris*. d'extraits de plantes aromatiques sélectionnées, *Thèse de l'Institut National Polytechnique de Toulouse. Toulouse, France*.
 - **PATERSON D.L., HUIER K.M., HUIER A.M., YEISER B., BONOMO M.D., RICE LB and BONOMO R.A. (2003).** Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: Dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47:3554-3560.
 - **PATERSON D. L. and R. A. BONOMO. (2005).** Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology*, Rev. 18:657-686.
 - **PENˆA. C., PUJOL M., ARDANUY C., RICART A., PALLARÉ S.R. and LINˆARES J. (2001).** An outbreak of hospital-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia, including strains producing extended-spectrum b-lactamase. *Journal of Hospital Infection*, 47:53–9.
 - **PHILIPPE GILLET ., LUC BOEL . et JAN JACOBS. (2009).** Note pratique de bacteriologie medicale tropicale. Postgraduat en medecine tropicale et sante internationale. *Institut de Médecine Tropicale*.
 - **PHILIPPON A and ARLET G. (2006).** β-Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel ! *Annales de Biologie Clinique*, 64(1): 37-5
 - **PHILIPPON A., ARLET G. et JACOBY GA. (2002).** Plasmid-determined AmpC-type slactamases. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*, 46:1-11.
 - **PITOUT J.D and LAUPLAND K.B (2008).** Extended-spectrum β-lactamaseproducing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infectious Diseases*, 8:159-166.
 - **POIREL L., GNIADKOWSKI M. and NORDMANN P. (2002).** Biochemical analysis of the ceftazidime- hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. *Journal of Antimicrobial Chemotherap*, 50:1031 4.

- **PORTO R., O. HEVIA., G. T. HENSLEY. and P. R. MEYER. (1989).** Disseminated *Klebsiella rhinoscleromatis* infection. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 113:1381-1383.
- **PRESCOTT., HARLEY. et KLEIN. (2007).** Microbiologie, 2e édition française. P 806, 807, 813, 819.

Q/

- **QUENTIN C., ARPIN C., DUBOIS V., ANDRE C., LAGRANGE I., FISCHER I., P BROCHET J., GROBOST F., JULLIN J., DUTILH B., LARRIBET G. and NOURY P. (2004).** Antibiotic resistance rates and phenotypes among isolates of *Enterobacteriaceae* in French extra-hospital practice. *Eur. Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 23:185-193.

- **QUEZEL P et SANTA S. (1963).** Nouvelle flore de L'Algérie et des régions désertiques méridionales. *Editions du Centre National de la recherche scientifique*, Tome II.

R/

- **RAHAL J.J. (2000).** Extended-spectrum β -lactamases: how big is the problem? *Jornal Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 6 (Suppl 2): 2-6.
- **RAHAL K. (1999).** *Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale selon les recommandations de l'O.M.S., I.N.S.P. Algérie.*
- **RAMDANI-BOUGUESSA N., MENDONCA N., LEITAO J., FERREIRA E., TAZIR M. and CANICA M. (2006).** CTX-M-3 and CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamases in isolates of *Escherichia coli* from a hospital in Algiers, Algeria. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 4584-4586.
- **RAMIREZ M. S. and M. E. TOLMASKY. (2010).** Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, 13:151-171.
- **RENI MOREDA. (2004).** Réseau STI-Biotechnologie. Galerie photo/image/schéma. ACADEMIE D'AIX-MARSEILLE.
- **RHAYOUR K. (2002).** Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium Fortuitum*. *Thèse de doctorat*. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès. Maroc.
- **RICHARD C. (1994).** A propos de la définition des *Enterobacteriaceae*. *Techniques et Biologie*, 4: 96-103.
- **ROBIN F., GIBOLD L. and BONNET R. (2012).** Résistances naturelles et acquises aux β -lactamines chez les entérobactéries : comment les identifier en pratique quotidienne. *Revue Francophone des laboratoires*, 445 : 47-58.
- **RODRIGUEZ-VILLALOBOS H and STRUELENS M.J. (2006).** Résistance bactérienne par β -lactamases à spectre étendu: implications pour le réanimateur. *Revue of Réanimation*, 15. (3): 205–213.

- **RONNI MOL P., APARNA Y., TAKPERE. and PRASHANT K. PARANDEKAR. (2016).** Multiple drug resistance (MDR) and phenotypic detection of extended spectrum β -lactamases (ESBL) and metallo β -lactamases (MBL) producing enterobacteriaceae isolates of neonatal sepsis. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(2):145-148.
 - **ROSSOLINI G.M., D'ANDREA M.M., MUGNAIOLI C. (2008).**The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. *Clinical Microbiology and Infection*, 14 (Suppl. 1):33-41.
 - **RUSSO T.A., SHON A.S., BEANAN J.M., OLSON R., MACDONALD U. and POMAKOV A.O. (2011)** .Hypervirulent *K. pneumoniae* secretes more and more active iron-acquisition molecules than “classical” *K. pneumoniae* thereby enhancing its virulence. *PloS ONE*, 6: e 26734.
- S/
- **SADER H.S., FARRELL D.J., FLAMM R.K. and JONES R.N. (2014).** Antimicrobial Susceptibility of Gram-Negative Organisms Isolated from Patients Hospitalized in Intensive Care Units in United States and European Hospitals (2009-2011). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **78**, 443-448.
 - **SAHLY H., ANCKEN H., BENEDI V.J., FORESTIER C., FUSSING V., HANSEN D.S., OFEK I. and PODSHUN R. (2004).** Impairment of Respiratory Burst in polymorphonuclear Leukocytes by Extended-Spectrum Beta-lactamase-Producing Strains of *Klebsiella pneumoniae*. *European Journal of Clinical Microbiology of Infectious Diseases*, 23: 20-26.
 - **SAHU S.K., DALAL A.S . and BANSAL G (2011).** Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *E. coli* and *Klebsiella* species from Udaipur Rajasthan. *Biomedical. Research*, 22(3): 367-373.
 - **SALVADOR M., VICTORIANO H., ROSA-MARÍA G., JOSÉ-LUIS R. and MARÍA CR.(2007).**Inhibition of pro *Inula viscosa* inflammatory enzymes by inuviscolide, a sesquiterpene lactone. *Fitoterapia*, 78: 329–331.
 - **SAMIRA NATOUBI., ABOUDDIHAI BARGUIGUA., SANAA BOUHALI ZRIOUIL., NEZHA BAGHDAD., MOHAMMED TIMINOUNI., ABDERRAOUF HILALI, SOUAD AMGHAR. and KHALID ZEROUALI. (2016).** Scientific Research Publishing. *Advances in Microbiology*, 2016, 6, 152-161.
 - **SAWSAN ABUHAMDAH., RUSHDIE ABUHAMDAH., SULEIMAN AL-OLIMAT. and PAUL CHAZOT.(2013).** Phytochemical Investigations and Antibacterial Activity of Selected Medicinal Plants from Jordan. *European Journal of Medicinal Plants*, 3(3): 394-404.
 - **SCAVIZZI M., LABIA R., PETITJEAN O. et ELBHAR A. (2000).** L'antibiogramme de l'analyse des populations bactériennes à la thérapeutique. *Journal of Antibiotiques*, 2: 122-134.

- **SCHELENZ S. and BRAMHAM K. (2007).** Septic arthritis due to extended spectrum F3- lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*. *Revue de Rhumatisme*, 74-491 495.
- **SCHWABER M.J and CARMELI Y. (2007).** Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae bacteraemia: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* , 60: 913-920.
- **SCHWABER M.J., KLARFELD-LIDJIS., NAVON-VENEZIAS. et al (2008).**Predictors of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52: 1028 -33.
- **SEKHRI-ARAF NEDJOUA. (2011).** Fréquence et marqueurs épidémiologiques de *Klebsiella pneumoniae* dans les services à haut risque infectieux au niveau du CHU Benbadis de Constantine. *Pour l'obtention du Grade de Docteur en Sciences*. Université Mentouri de Constantine. Algérie
- **SHAIKH S., FATIMA J., SHAKIL S., RIZVI SM. and KAMAL MA. (2015).**Risk factors for acquisition of extended spectrum beta lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in North-Indian hospitals. *Saudian Journal of Bio Science*, 22(1): 37.
- **SHON A.S., BAJWA R.P. and RUSSO T.A. (2013).** Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* a new and dangerous breed. *Virulence*, 4:1–12.
- **SIBHGHATULLA SHAIKH., JAMALE FATIMA., SHAZI SHAKIL., SYED MOHD., DANISH RIZVI .and MOHAMMAD AMJAD KAMAL. (2015).** Risk factors for acquisition of extended spectrum beta lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in North-Indian hospitals. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22, 37–41.
- **SINGLETON P. (1999).**Bactériologie .Ed. Dunod.4^{ème}, Paris.
- **SINGLETON P. (2005).** Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies. Sciences SUP, 6ème édition, Ed Dunno, Paris.15: 464-467.
- **SIROT D. (1995).** Extended-spectrum plasmid-mediated beta-lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 36 Suppl A:19-34.
- **SIROT J., NICOLAS-CHANOINE M.H., CHARDON H., AVRIL J.L., CATTOEN C., CROIX J.C., DABERNAT H., FOSSE T., GHNASSIA J.C, LECAILLON E. et MARMONIER A. (2002).**Susceptibility of Enterobacteriaceae to β -lactam agents fluoroquinolones: a 3- year survey in France. *Journal of Clinical Microbiology Infectious* ,8: 207-213.
- **SOURAV CHAKRABORTY., KANIZ MOHSINA., PALASH KUMAR SARKER., ZAHANGIR ALAM MD., M ISMAIL ABDUL KARIM. and ABU**

SAYEM S M. (2016). Prevalence, antibiotic susceptibility profiles and ESBL production in *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* among hospitalized patients. *Periodicum Biologorum*, VOL. 118, No 1, 53–58.

- **STAVRIANAKOU S., LIAKOPOULOS G et KARABOURNIOTIS G. (2006).** *Environmental and Experimental Botany*. Vol.56. 293–300.
- **STONE P.W., GUPTA A., LOUGHREY R.N., DELLA-LATTA P.H., CIMIOTTI R.N., LARSON E., RUBENSTEIN D. and SAIMAN L. (2003).** Attributable Coast And Length Of Stay Of An Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Outbreak In A Neonatal Intensive Care Unit, 24: 601-606.
- **STRAMPFER., M. J., P. E. SCHOCH. and B. A. CUNHA. (1987).** Cerebral abscess caused by *Klebsiella ozaenae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 25:1553-1554.
- **STRUVE C., BOJER M. and KROGFELT K.A. (2008).** Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Journal of Infection and Immunity*, 76(9): 4055-65.

T/

- **TALIB H., M. H., ABU ZARGA W. and M MAHASNEH A. (2012).** “Antiproliferative, antimicrobial and apoptosis inducing effects of compounds isolated from *Inula viscose*” *Molecules*, vol. 17, no. 3, pp. 3291–3303.
- **TANG L. M. and CHEN S. T. (1994).** *Klebsiella pneumoniae* meningitis: prognostic factors. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 26:95-102.
- **TIMOFTE D., MACIUCA I.E., EVANS N.J., WILLIAMS H., WATTRET A., FICK J.C. and WILLIAMS N.J. (2014).** Detection and molecular characterization of *Escherichia coli* CTX-M-15 and *Klebsiella pneumoniae* SHV-12 beta-lactamases from bovine mastitis isolates in the United Kingdom. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58:789-794.
- **TOUATI A., BENALLAOUA S., FORTE D., MADOUX J., BRASME L. et DE CHAMPS C. (2006).** First report of CTX-M-15 CTX-M-3 β -lactamase among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Béjaia, Algeria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27: 397-402.
- **TOUATI A., BRASME L., BENALLAOUA S., MADOUX J., GHAROUT A. and DE CHAMPS C. (2008).** Enterobacter cloacae and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing CTX-M-15 recovered from hospital environmental surfaces from Algeria. *Journal of Hospital Infection*, 68:183–5.
- **TZOUVELEKIS L.S, BONOMO R.A. (1999).** SHV-type beta-lactamases. *Current Pharmaceutical Design*, 5:847-864.

U/

- **ULLAH F., MALLIK S. A. and AHMED J. (2009).** Antimicrobial susceptibility pattern in *Klebsiella pneumonia* from urinary tract infections in North-West of Pakistan. *African Journal of Microbiology*, 3: 676-680.
- **ULUBELEN A and GOUN S. (1986).** Sesquiterpene acids from *Inula viscosa*. *Phytochemistry*. vol 26 n° 4 pp 1223-1224.
- **UZUNOVIC S., BEDENIC B., BUDIMIR A., IBRAHIMAGIC A., KAMBEROVIC F., FOLIC Z., RIJNDERS MI. et STOBBERINGH EE. (2015).** Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), extended-spectrum (ESBL) and plasmid-mediated AmpC ss-lactamase -producing Gram-negative bacteria associated with skin and soft tissue infections in hospital and community settings. *Medical Glas (Zenica)*, 12:157- 168.

V/

- **VATCHEVA-DOBREVSKA R., MULET X., IVANOV I., ZAMORANO L., DOBREVA E., VELINOV T., KANTARDJIEV T. and Oliver A. (2013).** Molecular epidemiology and multidrug resistance mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Bulgarian hospitals. *Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology and Disease*, 19:355-361.
- **VERMERRIS W et R NICHOLSON. (2006).** phenolic compound biochemistry, Ed Springer. 6-15.

W/

- **WELDHAGEN G.F., POIREL L. and NORDMANN P. (2003).** Ambler class A extended-spectrum β - lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 2385-2392.
- **WENQIAO WANG B. H and BEN DANIEL ET YIGAL COHEN. (2004).** Control of Plant Diseases by Extracts of *Inula viscosa*, *Phytopathology*, PP: 1042-1047.
- **WIEGAND I., GEISS H.K., MACK D., STURENBURG E., SEIFERT H. (2007).** Detection of extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures. *Journal of Clinical Microbiology*, 45: 1167-1174.
- **WOLFF M., JOLY-GUILLOU M.L. et PAJOT O. (2008).** Le point sur les carbapénèmes. *Réanimation*, 17,242-250.

Y/

- **YA LI, BO ZHENG., YUN LI., SAINAN ZHU., FENG XUE. et JIAN LIU. (2015).**Antimicrobial Susceptibility and Molecular Mechanisms of Fosfomycin Resistance in Clinical *Escherichia coli* Isolates in Mainland China. PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0135269.
- **YALA D., MERAD A.S., MOHAMED D. et OUAR KORICH M.N. (2001).** Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb* n°91.
- **YU V.L., HANSEN D.S., KO W.C., SAGNIMENI A., KLUGMAN P VON GOTTFERG A., GOOSSENS H., WAGENER M.M. et BENEDI V.J. (2007).**

International Klebsiella Study Group. Virulence characteristics of Klebsiella and clinical manifestations of *K. pneumoniae* bloodstream infections. *Emerging Infectious Diseases*, 13: 986- 993.

Z/

- **ZINEB BELBEL. (2013).** Evaluation de la résistance aux antibiotiques des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées dans les hôpitaux de la ville d'Annaba. *These de doctorat en microbiologie*. Université Badji Mokhtar Annaba. Annaba .ALGERIE.

Annexe 1

Composition des milieux utilisés:

➤ Bouillon BRAIN HEART INFUSION (BHIB)

- Protéose- peptone 10g
- Infusion de cervelle de veau 12.5g
- Infusion de cœur de bœuf..... 5g
- Chlorure de sodium..... 5g
- Hydrogénophosphate de sodium 2,5g
- Glucose 2g
- pH 7.4, répartir en tubes à essai et autoclaver 15 min à 120°C.

➤ Bouillon nutritif

- Peptone 15g/L
- Extrait de viande..... 10g/L
- Extrait de levures..... 2g/L
- pH 6,8-7,6, répartir en tubes à essai et autoclaver 15min à 120°C.

➤ Eau physiologique stérile

- Eau distillée..... 1L
- NaCl..... 9g
- Répartir dans des tubes à essai (10 ml) et stériliser à 120°C pendant 15 min.

➤ Gélose Mac Conkey

- Peptone de caséine 15g/L
- Extrait de viande 3 g/L
- Lactose..... 10g/L
- Sels biliaires..... 5g/L
- Cristal violet..... 0,001g/L
- Rouge neutre 0,07g/L
- Chlorure de sodium..... 5g/L
- Agar..... 20g/L
- pH 7,1 Autoclaver 15min à 120°C.

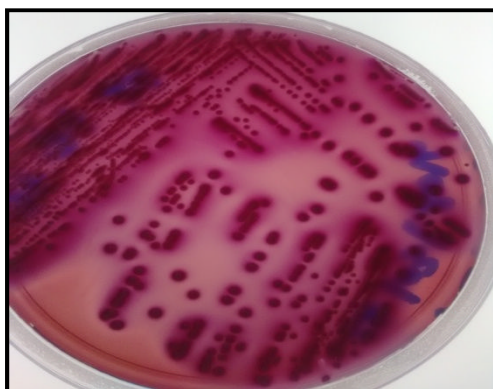
➤ **Gélose nutritive**

- Extrait de viande..... 3g/L
- Extrait de levure 3g/L
- Peptone 10 g/L
- NaCl 5 g/L
- Agar..... 18 g/L
- Ajuster le pH 7,4 puis stériliser à 120°C pendant 15 min.

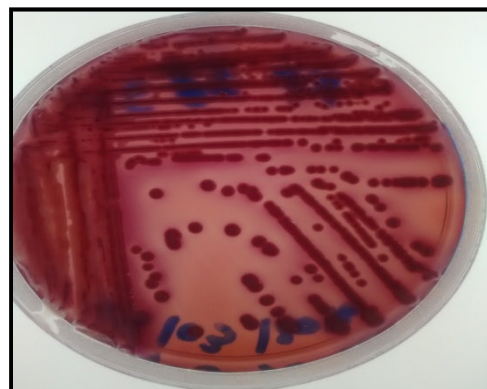
➤ **Mueller-Hinton**

- Extrait de viande 3g/L
- Amidon 1,5g/L
- Hydrolysate acide de caséine 17,4g/L
- Chlorure de sodium..... 40 g/L
- Agar..... 16g/L
- Ajuster le pH à 7.4. Autoclaver 15min à 115°C.

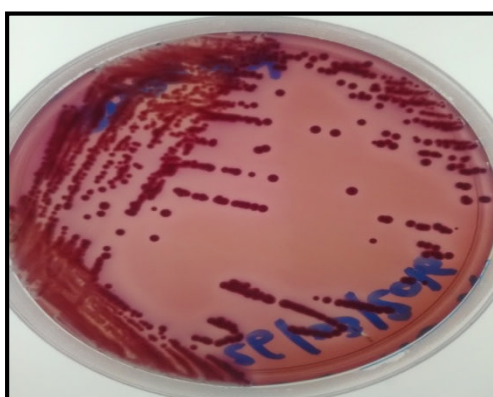
Annexe 2



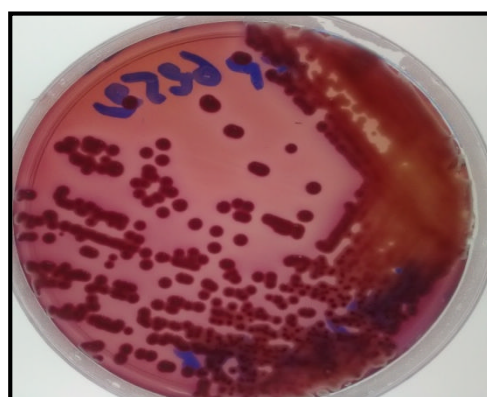
K.p 1212



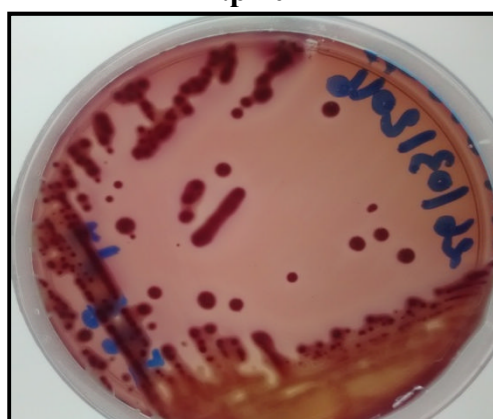
K.p 1895



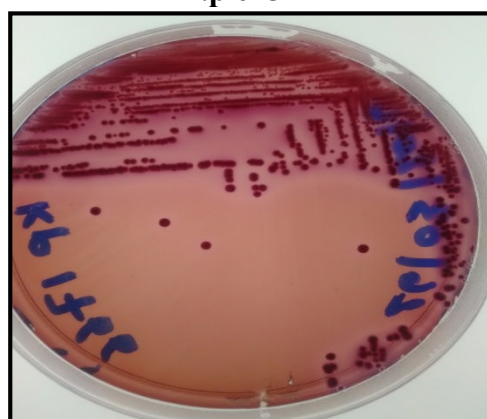
K.p 2042



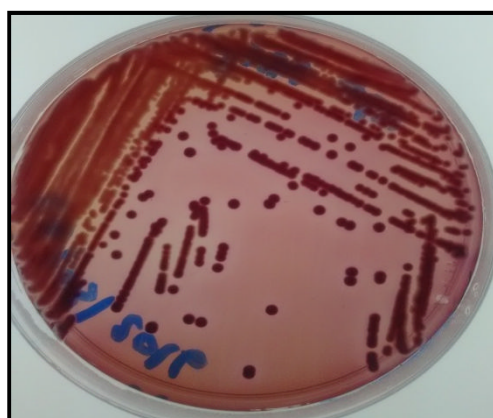
K.p 6252



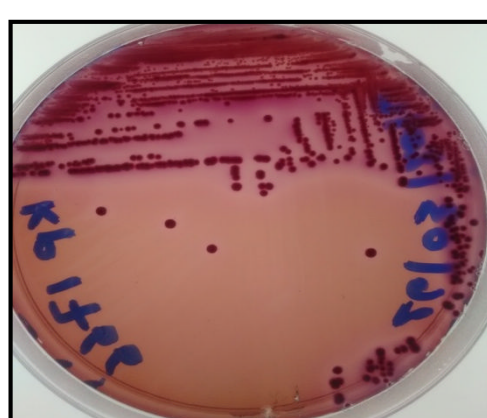
K.p 825



K.p 1766

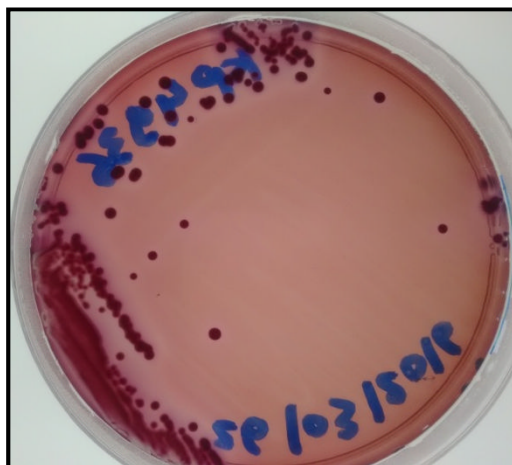


K.p 1115



K.p 1766

Annexe 3



K.p 4683

Aspect macroscopique des colonies de *Klebsiella pneumoniae* purifiées sur milieu Mac Conkey (photos prises au laboratoire).



Annexe 3



Identification des souches de *Klebsiella pneumoniae* par la galerie API 20 E (photos prises au laboratoire).

Annexe 4

Tableau d'identification du catalogue analytique API20 E

TABLEAU D'IDENTIFICATION / IDENTIFICATION TABLE / PROZENTABELLE / TABLA DE IDENTIFICACION / TABELLA DI IDENTIFICAZIONE / QUADRO DE IDENTIFICAÇÃO
 ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ / IDENTIFIKATIONSTABELL / IDENTIFIERINGSTABELL / TABELA IDENTYFIKACYJNA

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

API 20 E																						V4.0	
DNFG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SCR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX			
100	0	0	85	25	0	0	0	0	0	0	100	100	0	1	99	0	92	99	100	0			
99	99	0	99	75	0	0	0	0	89	0	100	100	10	0	0	100	0	100	1	0			
99	99	0	0	75	0	0	0	0	90	0	100	99	0	0	0	0	1	100	1	0			
50	45	0	99	75	81	1	0	4	0	0	100	100	1	100	100	1	91	99	99	0			
90	24	0	0	75	75	1	0	1	0	0	100	99	25	99	99	99	82	40	99	0			
99	75	0	100	97	0	1	0	99	0	0	100	100	25	99	99	1	1	98	99	0			
99	2	0	100	25	0	1	0	99	0	0	100	100	1	99	99	99	80	99	99	0			
100	50	0	1	80	30	0	1	0	1	0	100	100	0	95	100	1	0	25	100	0			
0	0	100	99	50	94	0	0	99	0	0	100	100	0	0	1	100	0	0	1	0			
0	0	100	99	1	75	0	0	99	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
99	0	99	98	82	0	1	0	0	85	0	99	99	99	99	99	99	99	99	99	0			
99	25	0	99	40	0	0	0	0	75	0	100	100	0	1	100	99	99	99	99	0			
99	80	0	99	80	0	0	0	0	75	0	100	100	0	99	100	1	99	99	99	0			
100	25	0	99	80	0	0	0	0	10	0	100	99	25	100	0	99	0	100	100	0			
100	75	0	99	99	0	0	0	0	89	0	100	100	0	1	100	1	1	100	100	0			
98	82	1	92	90	0	1	0	0	85	0	99	99	12	90	85	96	90	99	99	0			
99	0	32	100	75	0	99	0	0	90	0	100	99	23	1	100	99	100	99	100	0			
99	0	0	99	1	0	0	0	0	2	0	100	97	0	88	99	40	100	99	99	0			
100	96	0	91	94	0	1	0	25	91	10	100	100	75	8	99	99	99	99	99	0			
90	1	74	70	0	1	3	0	89	0	0	99	98	1	91	82	36	75	3	99	0			
26	1	45	20	0	1	1	0	50	0	0	99	90	1	42	30	3	3	1	70	0			
96	1	99	100	1	0	0	0	99	0	0	100	99	1	0	87	0	1	99	99	0			
100	0	1	100	1	0	0	0	99	0	0	100	100	0	0	99	25	0	1	99	0			
100	30	50	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	1	95	7	95	95	99	0			
98	0	0	0	75	0	0	0	0	95	1	99	99	0	0	1	1	0	1	50	1			
75	0	99	98	50	0	10	0	0	50	0	99	99	0	1	99	0	0	25	99	0			
50	0	99	99	1	1	0	1	0	10	0	99	98	0	1	1	1	0	0	1	0			
100	0	99	99	99	0	85	0	100	65	0	100	99	100	99	100	100	100	100	100	0			
99	0	80	0	88	0	78	0	99	80	0	100	100	99	100	99	99	100	100	100	0			
94	18	25	1	18	0	1	0	0	1	0	99	96	57	65	53	20	80	97	85	0			
99	0	73	0	86	0	75	0	0	0	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	0			
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	96	57	65	53	20	80	97	85	0			
100	0	98	6	52	0	0	0	0	75	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	0			
95	0	25	99	60	0	0	0	0	80	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	0			
99	0	0	0	0	0	1	0	0	99	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	0			
97	0	0	0	40	0	0	0	0	15	1	100	99	0	2	100	53	99	99	100	0			
1	0	10	98	1	1	99	93	99	0	0	99	0	0	0	0	1	0	0	0	0			
85	1	0	0	13	0	1	0	1	9	1	100	98	1	26	1	98	26	59	61	0			
99	1	0	0	99	0	1	0	53	62	4	100	99	36	82	90	98	81	99	99	0			
99	1	0	0	21	0	1	0	1	86	15	100	99	34	1	97	93	23	65	97	0			
86	1	0	0	23	0	1	0	59	1	1	99	100	10	32	59	72	89	99	99	0			
1	0	0	99	50	75	99	98	1	1	82	98	0	0	0	0	1	0	0	0	0			
1	0	0	0	1	20	100	99	0	0	50	99	0	0	0	0	100	0	1	0	0			
1	0	0	0	12	83	99	99	92	0	74	99	1	1	0	1	89	0	65	1	0			
1	0	0	0	80	0	100	99	0	0	99	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0			
1	0	0	0	74	0	99	99	90	0	0	98	82	78	1	50	25	0	40	1	0			
1	0	0	0	85	0	30	98	95	0	0	98	3	80	0	0	15	0	0	0	0			
100	0	0	0	50	0	1	0	99	0	0	100	99	0	88	99	100	97	100	98	0			
98	75	97	98	75	99	0	1	0	0	0	100	100	0	99	99	1	78	0	99	0			
0	15	99	99	6	64	0	0	0	0	0	100	99	0	98	99	0	20	0	0	0			
0	1	100	0	0	75	0	0	0	0	1	100	100	0	0	1	0	0	0	100	0			

Annexe 4

API 20 E	V4.0	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
<i>Salmonella paratyphi A</i>	0	5	0	99	0	99	0	1	0	0	0	0	100	99	0	99	98	0	96	0	99	0
<i>Salmonella pullorum</i>	0	1	75	100	0	100	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	100	0	0	0	75	0
<i>Salmonella typhi</i>	0	1	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	99	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella spp.</i>	1	56	82	93	65	65	83	0	0	1	0	1	99	100	40	99	86	1	90	1	99	1
<i>Serratia ficaria</i>	99	0	0	0	0	100	0	0	0	0	40	90	100	100	50	99	74	99	99	100	99	0
<i>Serratia fonticola</i>	99	0	73	99	75	0	0	0	0	0	0	0	100	99	80	97	100	30	99	99	99	0
<i>Serratia liquefaciens</i>	95	1	78	98	80	0	0	2	0	0	58	65	100	99	80	99	2	99	72	97	97	0
<i>Serratia marcescens</i>	94	0	95	95	96	0	0	25	0	1	70	87	100	99	85	98	1	99	88	97	25	0
<i>Serratia odorifera 1</i>	95	0	95	99	95	0	0	0	0	99	50	99	100	99	99	99	99	99	99	99	99	0
<i>Serratia odorifera 2</i>	95	0	96	1	95	0	0	0	0	99	50	99	100	99	99	99	99	1	99	99	95	0
<i>Serratia plymuthica</i>	99	0	0	0	65	0	0	0	0	0	65	50	100	90	70	70	1	99	85	98	98	0
<i>Serratia rubidica</i>	99	0	30	0	92	0	0	1	0	0	71	82	99	99	75	1	3	99	95	99	99	0
<i>Shigella spp.</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	0	23	0	0	99	63	0	7	7	1	20	0	50	0
<i>Shigella sonnei</i>	96	0	0	93	0	0	0	0	0	0	0	0	99	99	0	1	75	1	1	0	99	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	80	0	0	90	0	0	0	98	0	50	5	0	99	99	25	98	1	99	4	75	75	0
<i>Yersinia frederiksenii/intermedia</i>	99	0	0	75	1	0	99	0	99	0	99	1	100	98	25	99	98	99	1	99	99	0
<i>Yersinia kristensenii</i>	80	0	0	80	0	0	0	99	0	97	0	0	100	99	10	99	0	0	0	99	99	0
<i>Yersinia pestis</i>	68	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	99	99	0	70	0	0	0	30	30	0
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	98	0	0	0	1	0	99	0	0	0	0	0	99	97	0	0	75	0	50	25	50	0
<i>Aeromonas hydrophila gr. 1</i>	98	90	25	1	25	0	0	0	0	85	25	90	99	99	9	3	5	97	1	75	75	100
<i>Aeromonas hydrophila gr. 2</i>	99	97	80	1	80	0	0	0	0	85	80	97	97	99	9	9	1	80	1	75	5	100
<i>Aeromonas salmonicida ssp. salmonicida</i>	1	60	1	0	0	0	0	0	0	1	0	75	50	54	0	0	0	0	0	1	0	100
<i>Photobacterium damsela</i>	1	99	75	0	1	0	98	0	0	0	10	1	50	0	0	0	0	1	0	0	0	100
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	95	99	100	100	0	0	0	0	0	100	0	0	99	0	99	0	0	0	0	0	0	100
<i>Vibrio alginolyticus</i>	0	0	98	75	60	0	1	0	0	100	10	75	99	100	0	1	0	100	0	10	1	100
<i>Vibrio cholerae</i>	98	1	94	97	75	0	0	0	0	99	58	92	98	98	0	0	0	94	0	5	0	100
<i>Vibrio fluvialis</i>	95	99	0	0	0	1	0	0	0	80	0	75	75	80	0	1	0	75	0	36	75	100
<i>Vibrio holisae</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	94	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	100
<i>Vibrio mimicus</i>	99	0	99	99	50	0	0	0	0	99	1	99	99	99	0	0	0	0	0	0	0	100
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0	0	100	99	50	0	0	1	0	100	1	75	100	99	0	0	1	1	0	12	50	100
<i>Vibrio vulnificus</i>	99	0	91	90	25	0	0	0	0	99	1	99	99	75	0	0	0	1	0	90	0	99
<i>Pasteurella aerogenes</i>	99	0	0	80	0	0	0	99	0	0	0	0	99	0	97	0	1	99	0	0	75	75
<i>Pasteurella multocida 1</i>	4	0	0	25	0	0	0	0	0	99	0	0	29	1	0	1	0	75	0	0	0	99
<i>Pasteurella multocida 2</i>	7	0	0	45	0	0	0	0	0	99	0	0	44	99	0	99	0	99	0	0	0	89
<i>Pasteurella pneumotropicalis</i>	60	0	1	10	0	0	0	25	0	15	7	3	35	12	12	12	1	35	1	2	1	80
<i>Acetobacter baumannii/calacaelus</i>	0	0	0	0	51	0	0	1	0	0	5	5	99	0	0	0	0	0	99	1	99	0
<i>Bordetella/Alcaligenes/Moraxella spp. *</i>	0	0	0	0	52	0	14	1	0	25	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	95
<i>Burkholderia cepacia</i>	50	0	25	16	78	0	0	0	0	0	1	43	60	1	0	0	13	0	0	7	20	90
<i>Chromobacterium violaceum</i>	0	99	0	0	75	0	0	0	0	14	0	99	99	0	0	0	0	10	0	0	0	99
<i>Chryseomonas luteola</i>	86	75	0	0	94	0	0	0	0	0	25	13	84	0	1	0	1	15	1	85	0	0
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	5	0	0	0	12	0	90	0	0	75	0	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	77	0	0	0	20	0	1	0	0	85	0	90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99
<i>Eikenella corrodens</i>	0	0	75	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0
<i>Flavimonas oryzaeblabris</i>	0	0	0	0	89	0	0	0	0	0	25	1	10	0	1	0	1	0	10	0	45	0
<i>Mycoides/Chryseobacterium indologenes</i>	0	0	0	0	60	0	75	0	0	0	1	75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	15	0	0	0	30	0	25	1	0	15	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	10	90
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	89	0	0	92	0	25	0	0	0	1	75	50	0	0	0	1	10	1	25	97	0
<i>Pseudomonas fluorescens/burdoi</i>	0	75	0	0	0	0	0	0	0	0	10	27	25	0	0	0	0	0	25	1	20	99
<i>Non-fermenter spp.</i>	1	1	0	0	37	0	1	0	0	15	9	9	9	0	0	0	1	1	1	1	1	93
<i>Shewanella putrefaciens</i>	0	0	0	80	75	75	1	0	0	0	0	75	1	0	0	0	0	1	0	0	2	99
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	70	0	75	1	75	1	1	0	0	0	0	90	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1

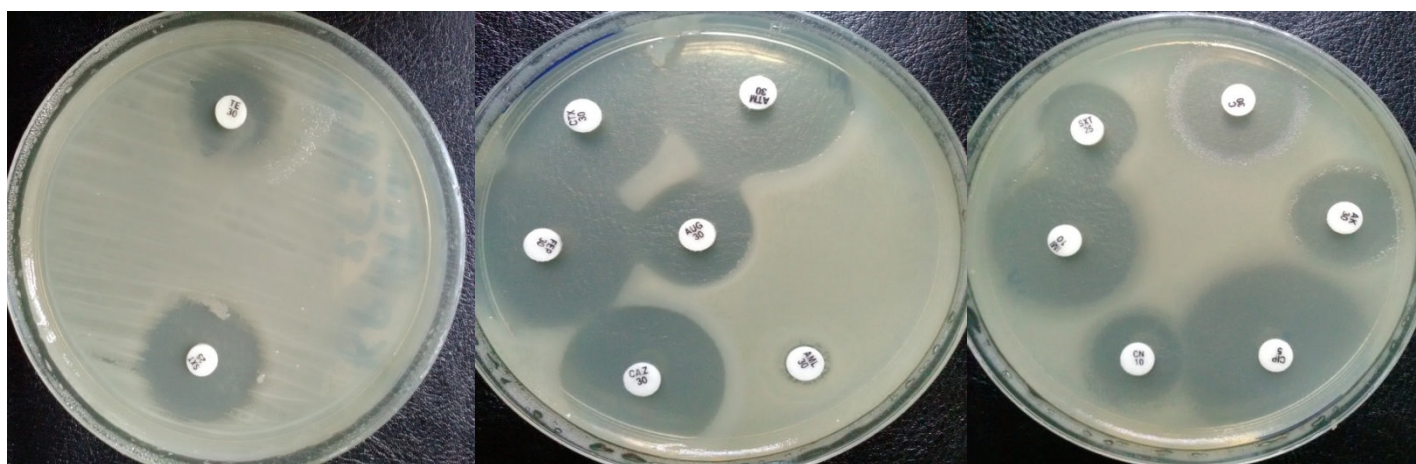
NO2	N2	MCB	McC	OF10	OF1F
100	0	95	100	100	100
100	0	0	100	100	100
100	0	97	100	100	100
100	0	95	100	100	100
92	0	100	100	100	100
99	0	91	100	100	100
100	0	95	100	100	100
95	0	97	100	100	100
99	0	100	100	100	100
99	0	100	100	100	100
99	0	50	100	100	100
100	0	85	100	100	100
100	0	0	100	100	100
100	0	0	100	100	100
98	0	2	100	100	100
98	0	5	100	100	100
98	0	5	100	100	100
47	0	0	99	100	100
95	0	0	100	100	100
97	0	95	99	99	99
97	0	95	99	99	99
98	0	1	99	99	99
100	0	25	99	99	99
99	0	95	99	99	99
47	0	100	99	94	94
96	0	100	96	99	99
100	0	100	99	99	99
100	0	0	99	99	99
100	0	0	99	99	99
63	0	100	98	99	99
54	0	100	99	99	99
100	0	0	100	100	100
90	0	0	2	23	23
90	0	0	2	23	23
99	0	0	9	33	33
3	0	0	90	98	0
62	1	75	75	0	0
40	0	99	88	97	0
75	0	99	99	99	99
30	0	100	91	94	0
20	0	0	57	90	10
6	0	0	48	93	6
95	0	1	1	49	49
7	0	100	99	99	0
0	0	0	84	2	2
42	60	99	99	47	0
12	56	97	100	98	0
26	0	100	96	93	0
48	35	99	85	49	0
96	0	100	96	9	0
26	1	100	91	49	0

Annexe 4

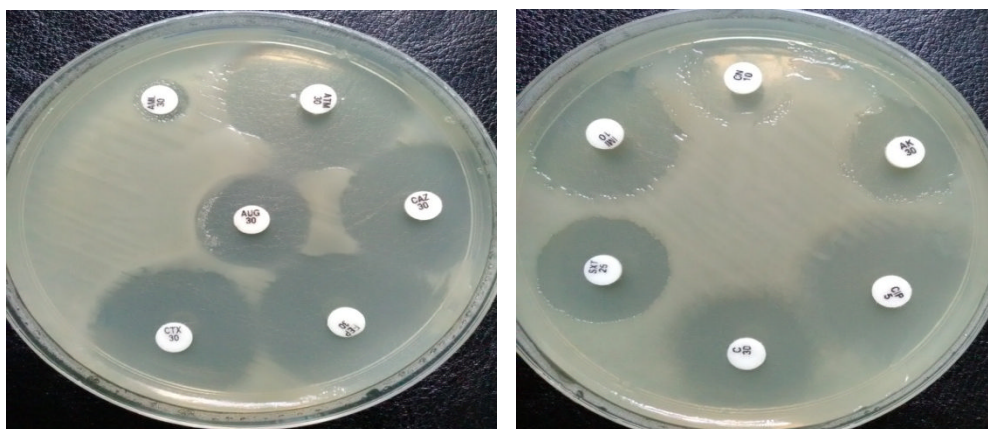
Tableau de lecture des résultats de la galerie API 20E

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	Positif
ONPG	Ortho-nitro-phenyl galactoside	Beta-galactosidase	Incolore	Jaune
<u>ADH</u>	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/orangé
<u>LDC</u>	Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Rouge/orangé
<u>ODC</u>	Ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orangé
<u>CIT</u>	Citrate de sodium	Utilisation du citrate	Vert pâle/jaune	Bleu-vert/vert
<u>H2S</u>	Thiosulfate de sodium	Production d'H2S	Incolore/grisâtre	Dépôt noir/ fin liseré
<u>URE</u>	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orangé
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA Immédiat	
			jaune	Marron foncé
IND	Tryptophane	Production d'indole	IND /2 min maxi	
			jaune	Anneau rouge
<u>VP</u>	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / 10 min	
			incolore	Rose-rouge
<u>GEL</u>	Gélatine de Kohn	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	Glucose	Fermentation/oxydation	Bleu/ bleu-vert	Jaune
MAN	Mannitol	Fermentation/oxydation	Bleu/ bleu-vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation/oxydation	Bleu/ bleu-vert	Jaune
SOR	Sorbitol	Fermentation/oxydation	Bleu/ bleu-vert	Jaune
RHA	Rhamnose	Fermentation/oxydation	Bleu/ bleu-vert	Jaune
SAC	Saccharose	Fermentation/oxydation	Bleu/ bleu-vert	Jaune
MEL	Melibiose	Fermentation/oxydation	Bleu/ bleu-vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation/oxydation	Bleu/ bleu-vert	Jaune
ARA	Arabinose	Fermentation/oxydation	bleu/ bleu-vert	Jaune

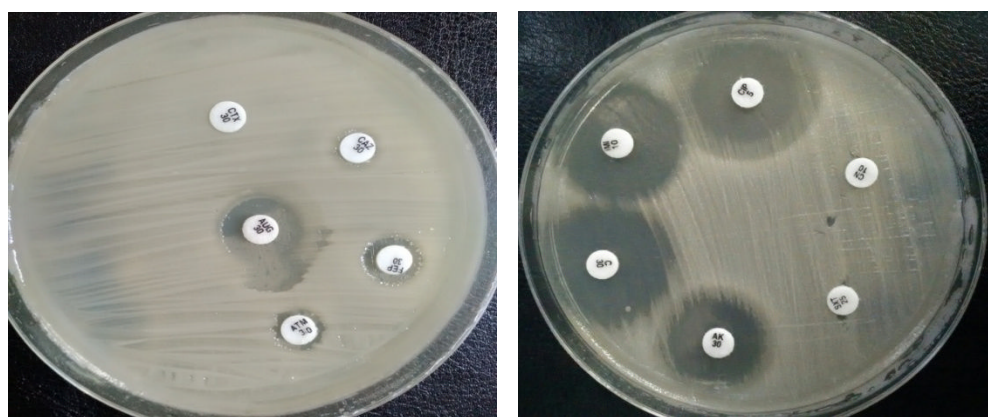
Annexe 5



E.coli ATCC 25922



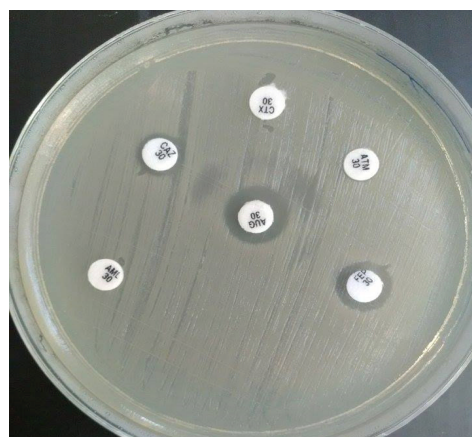
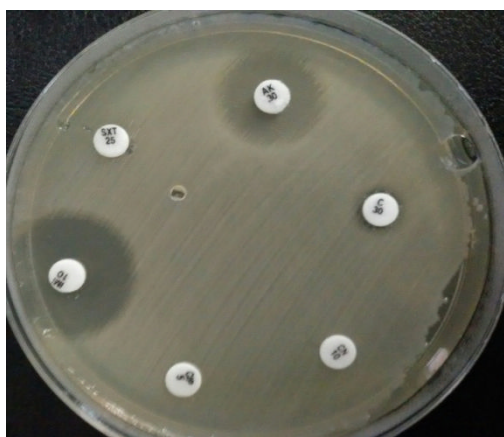
E.coli K12



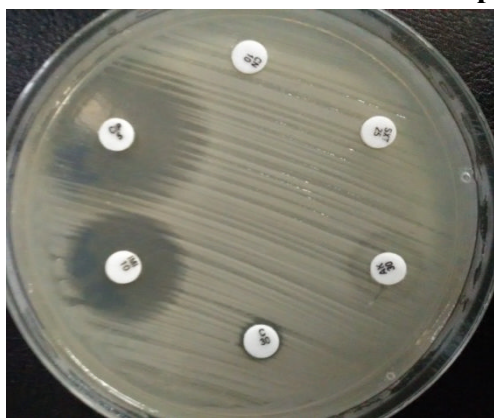
Kp 1115



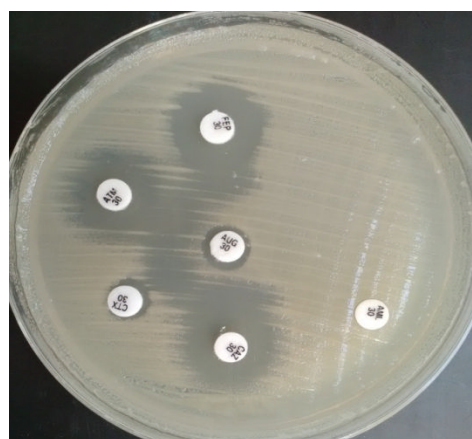
Kp 1212



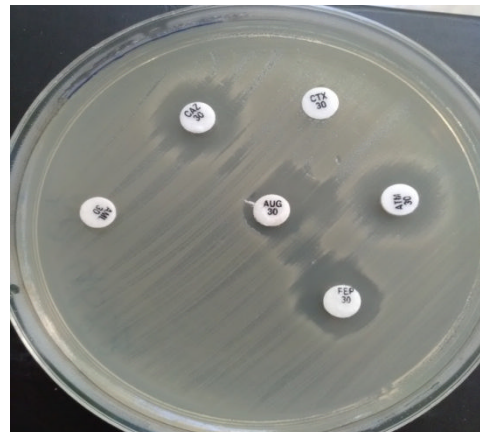
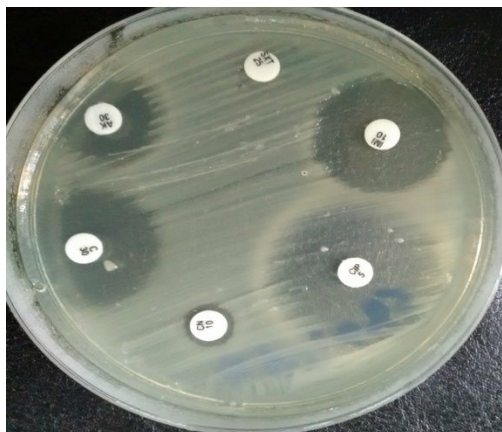
Kp 1766



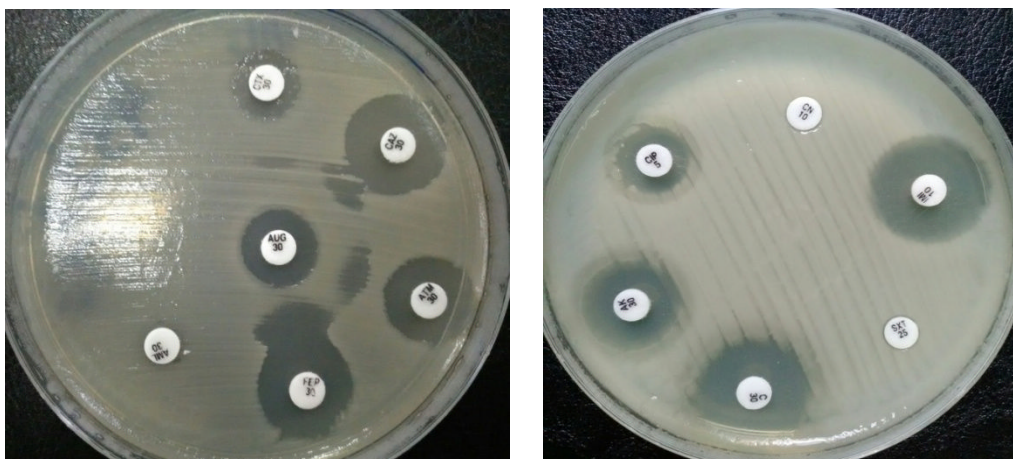
Kp 2042



Kp 4328



Kp 4683



Kp 4936

**Photos des antibiogrammes des souches
étudiées**

Annexe 6

Tableau représentant les valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour les entérobactéries selon le Manuel de standardisation (2011).

Antibiotiques testés	Charge des Disques	Diamètres critiques (mm)		
		R	I	S
Ampicilline	10µg	≤ 13	14 – 16	≥ 17
Amoxicilline +Ac.clavulanique	20/10µg	≤ 13	14 – 17	≥ 18
Céfazoline	30µg	≤ 19	20 – 22	≥ 23
Céfalotine	30µg	≤ 14	15 – 17	≥ 18
Cefoxitine	30µg	≤ 14	15 – 17	≥ 18
Céfotaxime	30µg	≤ 22	23 – 25	≥ 26
Ceftriaxone	30µg	≤ 19	20 – 22	≥ 23
Imipénème/Meropénème	10µg	≤ 19	20 - 22	≥ 23
Ertapénème	10µg	≤ 19	20 - 22	≥ 23
Amikacine	30µg	≤ 14	15 – 16	≥ 17
Gentamicine	10µg	≤ 12	13 – 14	≥ 15
Acide nalidixique	30µg	≤ 13	14 – 18	≥ 19
Ciprofloxacine	5µg	≤ 15	16 – 20	≥ 21
Chloramphénicol	30µg	≤ 12	13 – 17	≥ 18
Colistine	-----	-----	-----	-----
Furanes	300µg	≤ 14	15 – 16	≥ 17
Fosfomycine	200µg	≤ 12	13 – 15	≥ 16
Triméthoprim+ Sulfaméthoxazole	1.25/23.75µg	≤ 10	11 – 15	≥ 16

Annexe 7

Tableau représentant les valeurs limites des diamètres des zones d'inhibition pour les souches de références utilisées pour le control de qualité.

Antibiotiques testés	Charge des disques	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>S.aureus</i> ATCC25922
Amikacine	30 µg	19-26	20-26
Amoxiciline +Ac clavulanique	20/10 µg	18-24	---
Ampicilline	10 µg	16-22	27-35
Aztréonam	30 µg	---	---
Céfotaxime	30 µg	29-35	25-31
Ceftazidime	30 µg	---	---
Ciprofloxacine	5 µg	30-40	---
Chloramphénicol	30 µg	21-27	19-26
Gentamicine	10 µg	19-26	19-27
Imipineme	10 µg	26-32	---
Tétracycline	30 µg	18-25	24-30
Triméthoprim +sulfaméthoxazole	1.25/23.75 µg	23-29	24-32

Annexe 8

➤ Préparation de la solution d'azide de sodium

L'azide est utilisé à une concentration finale de 300µg/ml, le volume final de gélose MH est de 20ml.

- Préparation de la solution mère

La solution mère est préparée en pesant 0,1g d'azide dans 10ml d'eau distillée stérile.

➤ Préparation de la solution CTX

La CTX est utilisée à une concentration finale de 8µg/ml. Le volume final de gélose MH est de 20ml.

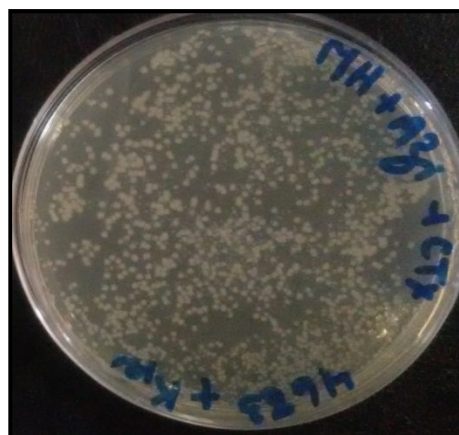
- Préparation de la solution mère

La solution mère est préparée en pesant 0,01g de CTX en poudre dans 10ml d'eau distillée stérile.

Annexe 9



Tr 2042



Tr 4683

Photos représentant les transconjugants sur MH+AZID +CTX (photos prises au Laboratoire).

➤ **Préparation des solutions et diluées des extraits organiques et aqueux :**

✓ **Extrait organique (méthanolique et éthanoliques)**

Une solution mère est préparée en pesant 0.4g de l'extrait dans 1ml d'éthanol/méthanol.

La dilution de la solution mère est réalisée dans le DMSO à 5%. 1 ml de la solution mère est dilué dans 9ml de DMSO de telle manière à avoir une solution concentrée à 40mg/ml.

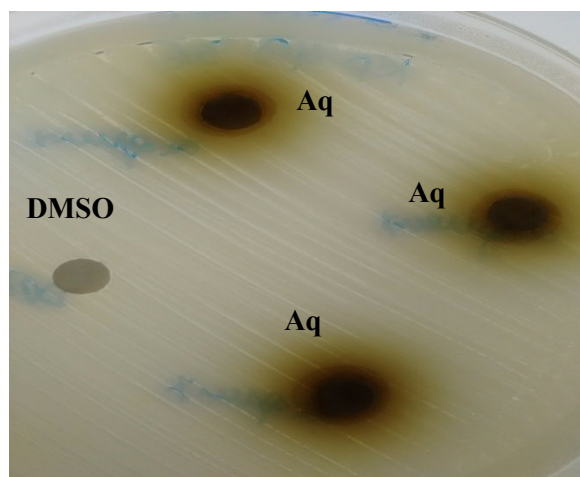
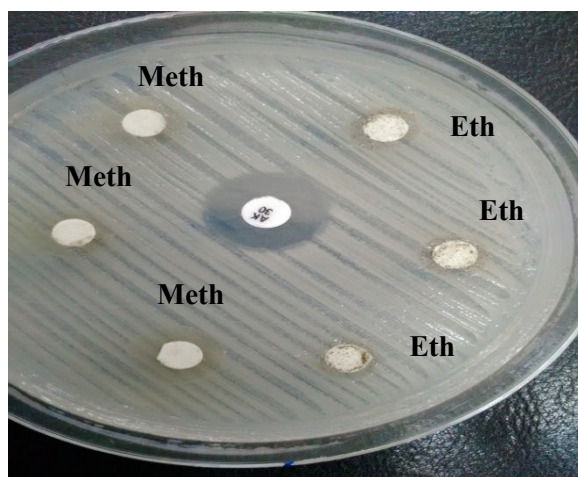
✓ **Préparation de la solution DMSO à 5%**

Mélanger 0,5 ml de DMSO pure d'une concentration 99,5% avec 9,5 ml d'eau distillée stérile.

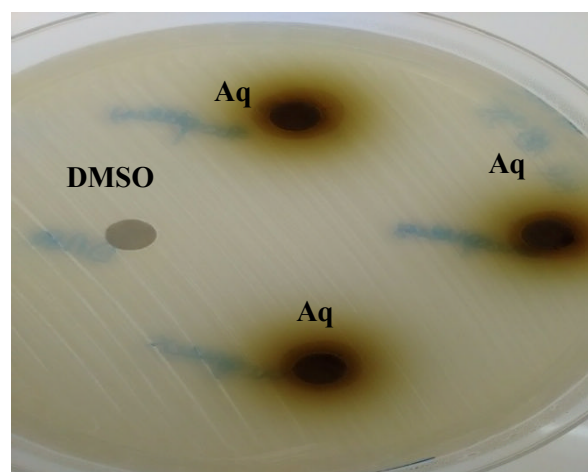
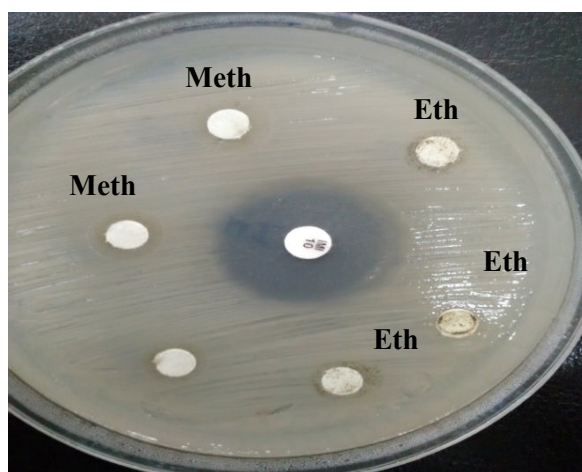
Cette solution diluée est utilisée pour réaliser les tests d'inhibition.

✓ **La solution mère de l'extrait brut aqueux** est préparée en pesant 0.5g de la poudre lyophilisée dans 1ml d'eau distillée.

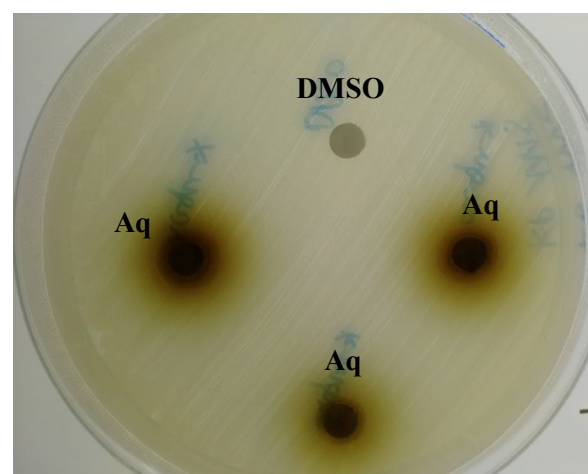
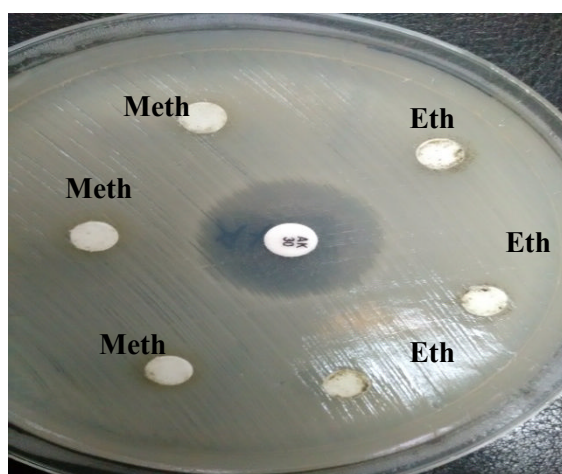
Annexe 10



Kp 4936

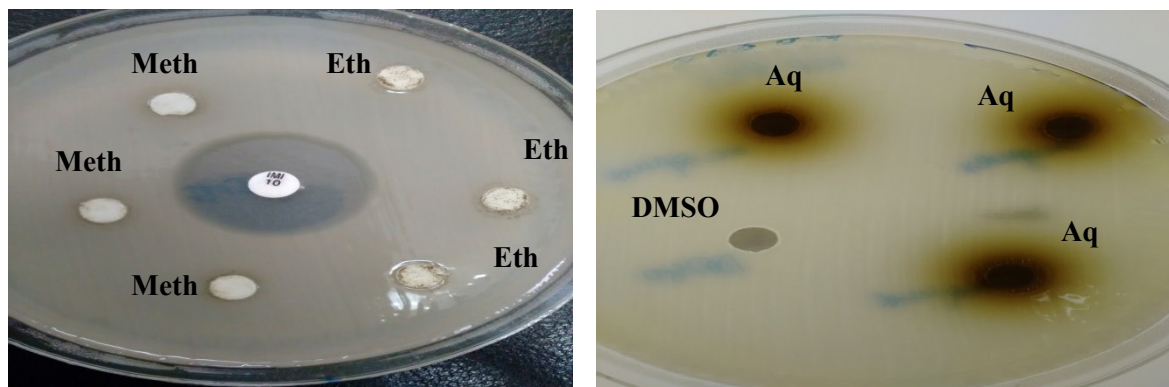


Kp 1895



Kp 1115

Annexe 10



Kp 825

Photos montrant les activités des différents extraits (aqueux (Aq), éthanoliques (Eth), méthanoliques (Meth)) contre les souches étudiées.

Résumé

Klebsiella pneumoniae est une bactérie qui appartient au genre *Klebsiella* connue pour sa multirésistance et sa virulence. L'évolution génétique des souches et l'utilisation abusive des β -lactamines ont permis l'apparition de résistance enzymatique par production de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) et de carbapénémases.

Dans notre étude la sensibilité vis-à-vis de 12 molécules d'antibiotiques appartenant à 5 familles différentes dont 7 β -lactamines, 2 aminosides, 1 quinolone, 1 phenicol et 1 sulfamide a été évaluée pour 10 souches de *Klebsiella pneumoniae* provenant du CHU de Tizi-ouzou par la méthode de diffusion sur disques en milieu gélosé, selon les normes du CLSI. Les fréquences de la résistance chez cette espèce présentent des pourcentages de résistances de 100% vis-à-vis de (l'amoxicilline, céfotaxime, aztréonam et triméthoprim sulfaméthoxazole) ; 90% vis-à-vis de (céftazidime, la cefépime, et la gentamicine) ; 80% vis-à-vis de (l'amoxicilline + acide clavulanique) ; 50% vis-à-vis de (ciprofloxacine) ; 30% vis-à-vis de (amikacine et chloramphénicol), 0% vis-à-vis de l'imipénème, ainsi que nos résultats montrent que 90% de nos souche productrices de BLSE.

Un co-transfert des gènes qui codent pour la résistance aux β -lactamines, aminosides, quinolones et les sulfamides a été observé. La présence de ces déterminants de résistance sur des plasmides conjugatifs favorise la dissémination de la résistance surtout dans le milieu hospitalier.

Les extraits aqueux et organiques d'*Inula viscosa* se sont montrés actifs contre les 10 souches de *Klebsiella pneumoniae* (8-14mm) ainsi que les souches de références *S. aureus* ATCC 25923(8,66 $\pm$ 0,57-9 $\pm$ 1mm) et *E. coli* ATCC 25922(8-9,16mm). L'inhibition des ces souches multirésistantes par les différents extraits d'*Inula viscosa* montrent non seulement que cette plante pourrait constituée une source naturelle de principes actifs antimicrobiens mais également la richesse et le potentiel régional en termes de plantes médicinales.

Mots clés: *Klebsiella pneumoniae*, BLSE, *Inula viscosa*, activité antibactérienne.

Abstract

Klebsiella pneumoniae is an bacteria in the genus of *Klebsiella* known for its multi resistance and virulence. The large use of β -lactamines and the genetic evolution of this strain allowed the appearance of enzymatic resistance mediated by the production of BLSE and carbapenemases.

In this study we have evaluated the sensitivity of 10 *Klebsiella pneumoniae* strains provided by CHU of Tizi-Ouzou against 12 antibiotics within 5 families (7 β -lactamines, 2 aminosides, 1 quinolone, 1 phenicol et 1 sulfamide) using the disc diffusion in agar medium essay according to the CLSI standards.

The resistance frequency of this bacteria was estimated at 100% against (amoxicilline, céfotaxime, aztréonam and triméthoprim sulfaméthaxazole); 90% against (céftazidime, cefépime, and gentamicine); 80% against (amoxicilline + acide clavulanique); 50% against (ciprofloxacine); 30% against (amikacine and chloramphénicol), 0% against imipénème. In addition our result shows that 90% of our bacteria strains produce BLSE.

A co-transfert of genes encoding the β -lactamines resistance, aminosides, quinolones and sulfamides was observed. The presence of these resistance determinants on the plasmid conjugates enables the resistance dissemination especially in the hospital environment.

Interestingly we found that the aqueous and organic extracts of *Inula viscosa* exhibit a high anti-microbial activity against 10 *Klebsiella pneumoniae*(8-14mm) strains as well as other reference strains like *E. coli* ATCC 25922(8-9,16mm) and *S. aureus* ATCC 25923(8,66 $\pm$ 0,57-9 $\pm$ 1mm). The inhibition of these multi-resistance strains using different *Inula viscosa* extracts illustrate that this plant represent a promising resource for the development of new anti-microbial agents and also demonstrate the potential of our region in term of medicinal plant research and discovery.

Keys words: *Klebsiella pneumoniae*, BLSE, *Inula viscosa*, antibacterial activity.