



**UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP**



**FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE**

ANNEE 2018

N° 136

**Caractérisation moléculaire de la résistance aux fluoroquinolones des souches de *Klebsiella pneumoniae* uropathogènes BLSE isolées en 2017 au Laboratoire de Biologie Médicale de l'Institut Pasteur de Dakar.**

**Mémoire**

**Du diplôme de Master de Microbiologie  
Fondamentale et Appliquée 2017-2018**

Présenté et soutenu publiquement le 30 Juillet 2018

par

**Komla Mawunyo DOSSOUVI**

---

**MEMBRES DU JURY**

**Président : Mme. Ndèye Coumba TOURE-KANE, Professeur**

**Membres :**

**Mme. Halimatou DIOP-NDIAYE, Maître de Conférences Agrégé**

**M. Makhtar CAMARA, Maître de Conférences Agrégé**

**M. Abdoulaye SECK, Maître-Assistant**

**Directeur de mémoire : Cheikh SAAD BOUH BOYE, Professeur**

**Co-Directeur: M. Abdoulaye SECK, Maître Assistant**

## Dédicaces

Je dédie ce travail :

- ❖ A mon cher père céleste, l'Eternel des armées, à mon Seigneur Sauveur et Ami Jésus-Christ et à mon compagnon de tous les jours le Saint-Esprit.
- ❖ A mon cher père Kokou DOSSOUVI
- ❖ A ma chère mère Ama DOSSOUVI DUSI
- ❖ A mon grand frère Dodzi SOGA
- ❖ A ma petite sœur Landrine DOSSOUVI
- ❖ A mon petit frère Kossi Jean DOSSOUVI
- ❖ A mes frères et collègues Kossivi ATIKAKO, Yves VIGBEDOR et Kodjo AKAKPO
- ❖ A tous mes collègues du MFA promotion 2016-2018
- ❖ A tous mes amis de près et de loin
- ❖ A toute la JTE

## Remerciements

Tous mes remerciements et gratitude vont à toi mon Cher Vénéré père céleste, l'Éternel des armées, à mon Seigneur, Sauveur et Ami Jésus-Christ et à mon compagnon de tous les jours le Saint-Esprit.

Je remercie Monsieur le **Professeur Cheikh SAAD BOUH BOYE** d'avoir accepté m'encadrer dans la réalisation de ce travail. Je vous remercie également pour cette opportunité de formation que vous offrez aux étudiants Africains et votre contribution à l'évolution de la Microbiologie en Afrique. Vous êtes notre référence. Que Dieu vous garde et vous bénisse.

Je remercie Madame le **Professeur N'deye Coumba TOURE-KANE** d'avoir bien voulu présider le jury de ce travail. Merci également pour vos enseignements et conseils tout au long de la formation. Vous êtes un modèle pour nous. Que Dieu vous garde et vous bénisse.

Je remercie Monsieur le **Dr Abdoulaye SECK** d'avoir accepté être le Co-Directeur de notre travail. Vous êtes ce modèle qui nous motive tous les jours. Votre rigueur scientifique, humilité, disponibilité, nous ont tellement impacté. Vos enseignements, votre passion pour la recherche et vos conseils nous suivront pour toujours. Que Dieu vous garde et vous bénisse.

Je remercie Monsieur **Babacar MBENGUE**, Maître de Conférences Agrégé. Votre humilité, nous a beaucoup impacté. Votre rigueur scientifique et votre pédagogie nous ont tellement marqué. Merci également pour vos conseils tout au long de la formation. Que Dieu vous garde et vous bénisse.

Je remercie Madame **Dior DIENG-CISSE** et Monsieur le **Dr. Assane DIENG**, pour vos conseils et disponibilités permanentes.

Je remercie son excellence **M. Daugbey Blewoussi** Consul honoraire de la République du TOGO au Sénégal.

Mes sincères remerciements s'adressent aussi au **Dr R. Bercion**, Chef de Service du LBM-IPD et à tout le personnel du LBM-IPD.

Mes sincères remerciements s'adressent à tout le personnel de l'Unité de Bactériologie Expérimentale et à tout le personnel du laboratoire d'Anatomo-Pathologique de l'IPD.

Mes remerciements à toute ma famille, à toute la JTE, à Sylvestre ATIKAKO à tous mes collègues de MFA 2016-2018.

## Liste des abréviations

- aac** : *Aminoglycoside acétyltransférase*
- aac (6') - Ib-cr** : *Acétylase en 6' isoforme Ib pour ciprofloxacine résistante*
- ADH** : *Arginine-Dihydrolase*
- ADN** : *Acide désoxyribonucléique*
- ATB** : *Antibiotique*
- BCP** : *Bromo Crésol Pourpre*
- BET** : *Bromure d'Ethidium*
- BGN** : *Bacille Gram Négatif*
- BLSE** : *Bêta-Lactamase à Spectre Elargi*
- CA-SFM** : *Comité d'antibiogramme-société française de microbiologie*
- CIP** : *Ciprofloxacine*
- CMI** : *Concentration minimale inhibitrice*
- E. coli** *Escherichia coli*
- ECBU** : *Examen Cyto-Bactériologique des Urines*
- EMB** : *Eosine Methyl Blue Agar, : Eosine Methyl Blue Agar*
- EUCAST** : *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
- FQ** : *Fluoroquinolones*
- G + C** : *Guanosine + Cytosine*
- Gyr** *Gyrase*
- H<sub>2</sub>S** : *Sulfure d'Hydrogène*
- IPD** : *Institut Pasteur de Dakar*
- ITU** : *Infection du Tractus Urinaire, : Infection du Tractus Urinaire*
- K. pneumoniae** : *Klebsiella pneumoniae*
- KCN** : *Cyanure de Potassium*
- LBM** *Laboratoire de Biologie Médicale*
- LDC** : *Lysine-Décarboxylase*
- LPS** : *Lipo-polysaccharide*
- MH** : *Mueller- Hinton*
- MT** : *Marqueur de taille*
- ODC** : *Ornithine- Décarboxylase*
- OMS** : *Organisation Mondiale de la Santé*

**ONPG** : *Orthonitrophényl-B-D- Galactopyranoside*

**ParC** : *Topoisomérase IV C*

**ParE** : *Topoisomérase IV E*

**Pb** : *Paires de Bases*

**PCR** : *Polymerase chain reaction*

**PMQR** : *Plasmid mediated quinolone resistance*

**QepA** : *quinolones efflux pomp A*

**qnr** : *Quinolone resistance*

**Qnr** : *Protéine codée par le gène qnr*

**QRDR** : *Quinolone resistance determining region*

**RAM** : *Résistance aux antimicrobiens*

**SAMS** : *Staphylococcus aureus méticilline sensible*

**SOS** : *Save Our Souls*

**TAE** : *Tris Acétate EDTA*

**TBE** : *Tris Borate EDTA*

**TDA** : *Thyptoplane- Desaminase*

**UBE** : *Unité de Bactériologie Expérimentale*

**VP** : *Voges-Proskauer*

# Table des matières

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Objectif</b> .....	1
<b>Première partie :</b> .....	2
<b>Revue bibliographique</b> .....	2
I. Généralités sur <i>K. pneumoniae</i> .....	3
I.1. Historique .....	3
I.2. Taxonomie .....	3
I.3. Caractères bactériologiques .....	3
I.4. Facteurs de pathogénicité .....	5
I.5. Epidémiologie.....	6
I.6. Pouvoir pathogène .....	7
II. Fluoroquinolones (FQ).....	7
II.1. Définition .....	7
II.2. Classification.....	8
II.3. Mécanisme d'action des fluoroquinolones sur <i>K. pneumoniae</i> .....	9
III. Mécanismes de résistance de <i>K. pneumoniae</i> aux Fluoroquinolones .....	9
III.1. Résistance d'origine chromosomique de <i>K. pneumoniae</i> aux FQ .....	10
III.2. Résistance plasmidique de <i>K. pneumoniae</i> aux FQ .....	11
IV. Détection des gènes de résistance par technique moléculaire .....	13
IV.1. Polymerase Chain Reaction (PCR).....	13
IV.2. Séquençage .....	14
<b>Deuxième partie :</b> .....	15
<b>Travail expérimental</b> .....	15
I. Objectifs.....	16
II. Cadre de l'étude .....	16
III. Souches bactériennes .....	16
IV. Matériels et méthode.....	16
IV.1. Matériels .....	16
IV.2. Méthodologie.....	17
V. Résultats .....	22
VI. Discussion.....	27
<b>Recommandations</b> .....	28
<b>Conclusion</b> .....	29
<b>Références bibliographiques</b> .....	30



## Liste des figures

<b>Figure 1: Aspect de <i>K. pneumoniae</i> encapsulés au microscope optique après coloration de Gram</b> .....	3
<b>Figure 2: Aspect des colonies muqueuses de <i>K. pneumoniae</i> sur le milieu BCP</b> .....	4
<b>Figure 3: Principaux facteurs de pathogénicité de <i>K. pneumoniae</i> [48].</b> .....	6
<b>Figure 4: Structures chimiques des fluoroquinolones et quinolone [26, 39]</b> .....	8
<b>Figure 5: Différentes fonctions des différentes parties du pharmacophore des FQ [33, 41]</b> .....	9
<b>Figure 6: Mécanismes de résistance de <i>K. pneumoniae</i> aux FQ. En noir : les mécanismes chromosomiques (modification des cibles, efflux, imperméabilité). En rose : les mécanismes plasmidiques (Qnr, QepA, aac(6)-Ib-cr) [35]</b> .....	12
<b>Figure 7: Les étapes de la PCR [34]</b> .....	13
<b>Figure 8: Automate pour évaluer la pureté de l'ADN: NanoDrop Lite.</b> .....	17
<b>Figure 9: Dépôt des amplicons sur gel d'agarose.</b> .....	20
<b>Figure 10: Répartition des différents gènes QRDR chez les souches de <i>K. pneumoniae</i> analysées.</b> .....	22
<b>Figure 11: Photographie du gel de migration de la PCR en duplex <i>gyrA</i> et <i>parE</i></b> .....	22
<b>Figure 12: Photographie du gel de migration de la PCR en duplex <i>gyrB</i> et <i>parC</i></b> .....	23
<b>Figure 13: Répartition des différents gènes PMQR chez les souches de <i>K. pneumoniae</i> analysées.</b> .....	23
<b>Figure 14: Photographie du gel de migration de la PCR en duplex de <i>qnrA</i> et <i>qnrB</i>.</b> .....	24
<b>Figure 15: Photographie du gel de migration de la PCR en simplex du gène <i>aac(6')-Ib</i></b> .....	24
<b>Figure 16: Répartition des gènes <i>aac(6')-Ib</i> et <i>qepA</i> chez les souches de <i>K. pneumoniae</i> analysées.</b> .....	25
<b>Figure 17: Répartition des souches en fonction du nombre de gènes portés par souche</b> .....	25



## Liste des tableaux

<b>Tableau I: Tableau récapitulatif des mécanismes de résistance de <i>K. pneumoniae</i> aux FQ.....</b>	<b>12</b>
<b>Tableau II: Tableau des amorces pour la recherche des gènes de résistance aux FQ.....</b>	<b>18</b>
<b>Tableau III: Composition du mélange réactionnel pour une PCR simplex .....</b>	<b>19</b>
<b>Tableau IV: Composition du mélange réactionnel pour PCR multiplex à trois gènes .....</b>	<b>19</b>
<b>Tableau V: Tableau des programmes PCR des gènes de résistance recherchés.....</b>	<b>20</b>
<b>Tableau VI: Récapitulatif des gènes identifiés en fonction des souches .....</b>	<b>26</b>

## Introduction

Selon l'OMS, la résistance aux antibiotiques est une des graves menaces sur la santé mondiale. Aujourd'hui, elle provoque dans le monde environ 700 000 décès/an dont la grande majorité en Afrique et en Asie [54]. Ce fléau planétaire prend de l'ampleur chaque année et s'il n'est pas maîtrisé, l'antibiorésistance causera à partir de 2050 environ 10 millions de décès chaque année dont 4,1 millions en Afrique et 4,7 millions en Asie. Outre la perte considérable en ressources humaines qu'elle causera, l'antibiorésistance coûtera à partir de 2050 environ 100 000 milliards de Dollars par an à l'humanité (2% à 3,5% du PIB mondial) [54].

Des bactéries multirésistantes ont été rapportées ces dernières années à travers le monde dont *K. pneumoniae* qui est responsable de diverses infections graves comme les Infections du Tractus Urinaires (ITU) et les pneumonies [61]. Des souches de *K. pneumoniae* résistantes aux fluoroquinolones (FQ) et aux bêta-lactamines voire les carbapénèmes ont été décrites. La résistance aux FQ pose la problématique de l'utilisation de cette famille antibiotique comme premier choix dans le traitement empirique des ITU. Plusieurs mécanismes de résistance sont impliqués dans la résistance de *K. pneumoniae* aux FQ: les mécanismes chromosomiques conférés par les QRDR (Quinolone Resistance Determining Region) et les résistances plasmidiques conférés par les gènes PMQR (Plasmid mediated quinolone resistance), *aac (6')-Ib-cr*, *qepA* et *oqxAB* [2, 45, 52].

A Dakar, nous assistons depuis une décennie à une augmentation inquiétante du pourcentage de résistance de *K. pneumoniae* aux FQ (de 3,6% en 2002 à 54% en 2015), mais aussi de leur prévalence dans l'implication dans les ITU (de 9,1% en 2002 à 17,9% en 2015) [16, 18, 38].

## Objectif

C'est dans ce cadre que nous avons mené cette étude dont l'objectif était de caractériser les gènes de résistance aux FQ des souches de *K. pneumoniae* productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) isolées au LBM de l'Institut Pasteur de Dakar (IPD) en 2017.



**Première partie :**  
**Revue bibliographique**

# I. Généralités sur *K. pneumoniae*

## I.1. Historique

Le genre *Klebsiella*, a été nommé par Trevisan en 1885 en l'honneur du microbiologiste allemand Edwin Klebs (1834-1913). L'espèce type est *K. pneumoniae* décrit pour la première fois par le microbiologiste allemand Carl Friedländer en 1882, raison pour laquelle *K. pneumoniae* était autrefois connu sous le nom de bacille de Friedländer [10].

## I.2. Taxonomie

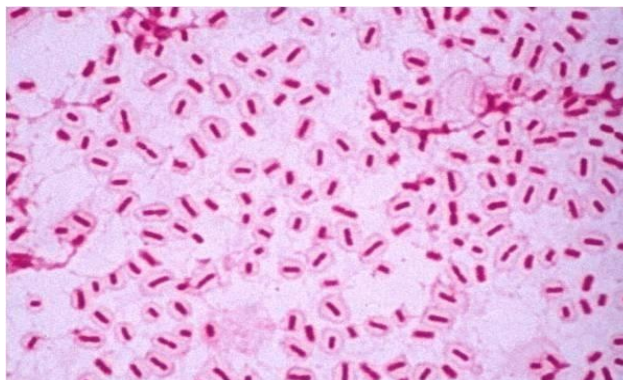
L'espèce *K. pneumoniae* appartient au règne des *Bacteria*, à l'embranchement des *Proteobacteria*, à la classe des *Gamma Proteobacteria*, à l'ordre des *Enterobacteriales*, à la famille des *Enterobacteriaceae* et au genre *Klebsiella*. Le genre *Klebsiella* compte deux espèces : *K. pneumoniae* et *Klebsiella oxytoca*.

L'espèce *K. pneumoniae* a trois sous-espèces : *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae* et *Klebsiella pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* [7, 15].

## I.3. Caractères bactériologiques

### I.3.1. Caractères morphologiques

*K. pneumoniae* est un bacille à Gram-négatif, non mobile, non sporulé, très souvent encapsulé (Cf. **figure 1**). Il se présente de manière isolée ou groupée par deux ou en courtes chaînes. Sa taille est de 0,3 à 1,0 µm de large et 0,6 à 6,0 µm de long. Leur poids moléculaire est d'environ  $3,36 \cdot 10^9$  daltons [15].



**Figure 1:** Aspect de *K. pneumoniae* encapsulés au microscope optique après coloration de Gram

(<https://www.pinterest.fr/grupodemicrobio/klebsiella-pneumoniae>, consulté le 13/06/2018)

### I.3.2. Caractères cultureux

*K. pneumoniae* est facilement cultivable sur les milieux de culture classiques pour entérobactéries (MH, Mac Conkey, BCP, EMB). Sur des milieux riches en glucides, *K. pneumoniae* donne des colonies luisantes, extrêmement muqueuses de 3 à 4 mm de diamètre (Cf. **Figure 2**). Leur température optimum de culture se situe à environ 35°C [7, 15].



**Figure 2: Aspect des colonies muqueuses de *K. pneumoniae* sur le milieu BCP**

(<http://mcavalla.free.fr/galerie/picture.php?keywords:klebsiella>, consulté le 17 Mai 2018.)

### I.3.3. Caractères biochimiques

*K. pneumoniae* est une bactérie aéro-anaérobie facultative. *K. pneumoniae* est positif au test de Voges-Proskauer (VP +), à l'orthonitrophényl-β-D-galactopyranoside (ONPG+) et à la lysine-décarboxylase (LDC+). Il attaque le glucose en produisant beaucoup de gaz et ne produit pas d'indole (IND -). *K. pneumoniae* possède une nitrate réductase, n'hydrolyse pas l'ADN et ne produit pas d'hydrogène sulfuré (H<sub>2</sub>S-). La majorité des souches de *K. pneumoniae* possède une uréase (Uréase +). Les souches de *K. pneumoniae* uréase (-) sont parfois confondues avec *Enterobacter aerogenes* qu'on peut différencier avec la mobilité et l'ODC [7, 15, 22].

### I.3.4. Caractères antigéniques

Chez *K. pneumoniae*, l'antigénicité est conférée par des lipopolysaccharides à longue chaîne (antigènes somatiques O) et des antigènes capsulaires (K).

Douze (12) types d'antigènes somatiques O sont actuellement connus, bien que le typage de l'antigène somatique puisse être gêné par la capsule. Certains antigènes O sont identiques ou apparentés aux antigènes O des entérobactéries.

Environ 80 types d'antigènes capsulaires ont été décrits chez *K. pneumoniae* et les types K1, K2 sont les plus impliqués dans les infections humaines [7].

## **I.4. Facteurs de pathogénicité**

*K. pneumoniae* possède plusieurs facteurs de pathogénicité qu'il utilise en fonction du type d'infections et du mode d'infectivité : la capsule, la production de sidérophores, la production de lipopolysaccharides (LPS), les facteurs d'adhérence et la production d'uréase (**Cf. figure 3**).

Les souches présentant un phénotype d'hypermucoviscosité sont définies comme hypervirulentes [61].

### **I.4.1. Capsule**

La majorité des souches de *K. pneumoniae* produit une capsule de nature polysaccharidique ; elle donne aux colonies sur gélose une apparence plus ou moins muqueuse. La capsule est essentielle à la virulence de *K. pneumoniae*. Les souches hypervirulentes de *K. pneumoniae* produisent des hypercapsules [12]. La capsule de *K. pneumoniae* forme d'épais faisceaux couvrant la surface bactérienne en couche épaisse et dense qui protège *K. pneumoniae* de la phagocytose par les polynucléaires neutrophiles d'une part, et de l'effet bactéricide des facteurs sériques d'autre part. En outre, la capsule de *K. pneumoniae* inhibe la différenciation et les capacités fonctionnelles des macrophages [5, 48, 61]. Elle permet aussi de faciliter la formation de biofilms.

### **I.4.2. Sidérophores**

Un facteur de pathogénicité important de *K. pneumoniae* est sa possibilité de chélater le fer environnant grâce des structures particulières, les sidérophores. En effet, la captation du fer est essentielle à la croissance et la réplication de *K. pneumoniae* et joue un rôle primordial dans l'installation et la progression de l'infection. *K. pneumoniae* produit quatre types de sidérophores : aérobactine, salmocheline, entérobactine, yersiniabactine [46, 49].

### **I.4.3. Facteurs d'adhésion (adhésines)**

Les adhésines sont des structures protéiques non flagellaires et filamenteuses formant des appendices à la surface des bactéries. Ils sont impliqués dans l'adhérence de *K. pneumoniae* aux cellules hôtes mais aussi dans la formation de biofilms. *K. pneumoniae* produit différents types d'adhésines : les fimbriae (fimbriae KPF-28), les pili (pili du type 1 et 3) et les adhésines non fimbriales (adhésines non fimbriale CF29K) [46, 49].

### **I.4.4. Les Lipopolysaccharides (LPS)**

Les LPS sont constitués de trois domaines : le lipide hydrophobe A, l'oligosaccharide de noyau et le polysaccharide de longue chaîne. Le LPS permet à *K. pneumoniae* d'éviter les facteurs de destruction

du sérum [22, 48]. Les chaînes polysaccharidiques terminales (antigène O) du lipopolysaccharide protègent *K. pneumoniae* de l'activation du complément et des anticorps spécifiques. Le lipide A (endotoxine) est doué de propriétés toxiques. Sa libération massive dans la circulation au cours des bactériémies conduit au choc endotoxinique [57].

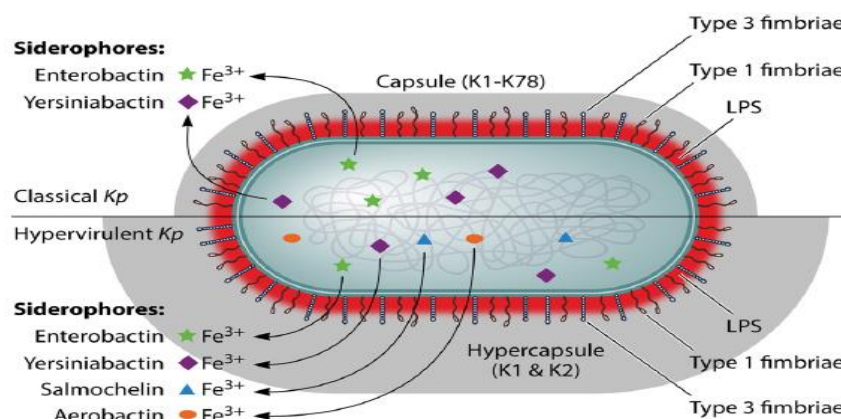


Figure 3: Principaux facteurs de pathogénicité de *K. pneumoniae* [48].

## I.5. Épidémiologie

### I.5.1. Habitat

*K. pneumoniae* est une espèce ubiquitaire. Il est présent dans l'environnement (sols, eaux usées, eaux de surfaces, végétaux), chez les animaux et chez les humains dont il colonise de façon commensale les muqueuses digestives et nasopharyngées [50].

### I.5.2. Réservoir

Les principaux réservoirs pour la transmission de *K. pneumoniae* sont les muqueuses digestives et nasopharyngées et les mains du personnel soignant des hôpitaux. Les porteurs sains constituent un réservoir important et assurent la transmission continue qui rend la propagation difficile à contrôler et les épidémies difficiles à arrêter [50].

### I.5.3. Mode de transmission

*K. pneumoniae* peut être transmis par contact cutané avec des objets ou des surfaces contaminées par l'environnement, le matériel médical et les produits sanguins. La possibilité d'une transmission fécale a également été avancée pour certains cas de bactériémies causés par *K. pneumoniae*. Il a été observé que *K. pneumoniae* est souvent présent sur les mains du personnel hospitalier où il peut survivre plusieurs heures, ce qui contribue probablement à la propagation nosocomiale. *K. pneumoniae* est aussi

présent naturellement dans le tube digestif et les voies aériennes supérieures de l'homme et des animaux, et dans l'environnement (eau, sols et poussière) facilitant la transmission et la contagiosité des souches pathogènes [50].

## **I.6. Pouvoir pathogène**

*K. pneumoniae* a été identifié comme pathogène commun dans les infections des voies urinaires (6 à 17%), les septicémies néonatales (3 à 20%), les pneumonies nosocomiales (7 à 14%), les septicémies (4 à 15%), les suppurations des plaies (2 à 4%) [50]. *K. pneumoniae* peut également causer des infections hépatiques, et des souches ont été isolées dans un certain nombre d'infections inhabituelles (les endocardites, les abcès médiastinaux, les péritonites, les cholécystites aiguës, myonécroses, pyomyosites, fasciites nécrosantes, abcès musculaires, les abcès du cou et les arthrites septiques). Des souches entérotoxigènes et entéroagréгатives de *K. pneumoniae* ont également été impliquées comme causes potentielles de gastro-entérites infantiles [7, 15, 22]. *K. pneumoniae* est également des agents pathogènes opportunistes importants, en particulier chez les immunodéprimés. *K. pneumoniae* est incriminé dans la survenue de diarrhée chronique chez les adultes infectés par le VIH en Afrique.

Au Sénégal, selon une étude réalisée en 2015, *K. pneumoniae* vient en seconde position après *E. coli* en termes de prévalence d'implications dans les ITU avec 17,96 % des ITU [16].

## **II. Fluoroquinolones (FQ)**

### **II.1. Définition**

Les FQ sont des antibiotiques synthétiques bactéricides largement utilisés dans le monde [13] ; ceci à cause de leur large spectre d'activités, leur pharmacocinétique, leur excellente biodisponibilité et leur tolérance clinique satisfaisante. Les FQ constituent la seule classe actuelle d'antibiotique qui inhibe directement la synthèse de l'ADN bactérien [28].

Les FQ sont une classe synthétique d'antimicrobiens dont les racines se trouvent dans les médicaments antipaludiques mépacrine et chloroquine [25]. La première quinolone, l'acide nalidixique, était synthétisée après qu'il a été noté que les distillats de sous-produit dans la fabrication de la chloroquine antipaludique avaient des propriétés antimicrobiennes. En 1980, Koga et ses collaborateurs [32] ont procédé à l'amélioration de l'absorption et de l'activité avec l'ajout d'un fluor en position 6 au pharmacophore des quinolones et une nouvelle classe d'antibiotique est née et est appelée fluoroquinolone. L'ajout de cet atome de fluor en position 6 du pharmacophore leur confère une action plus puissante (activité 100 à 1000 fois plus élevée que celle des quinolones de 1<sup>ère</sup> génération) et un



spectre d'activité plus large incluant des bactéries pathogènes à Gram positif et à Gram négatif (Cf. figure 5) [25, 6, 41].

## II.2. Classification

L'acide nalidixique (quinolone de première génération), (Cf. figure 4a) a servi à la synthèse de la structure chimique commune encore appelé pharmacophore des FQ (Cf. figure 4b). De différentes substitutions ont engendré diverses générations de FQ (Cf. figure 4). Plus la génération des FQ est récente, plus elle a un spectre plus large d'activité et plus d'efficacité [25, 6, 41].

Les FQ constituent la classe d'ATB de premier choix dans le traitement empirique des ITU. On distingue les quinolones hydrophobes (Ofloxacin, lévofloxacin, moxifloxacin) et des quinolones hydrophiles (norfloxacin et ciprofloxacin) [25, 41].

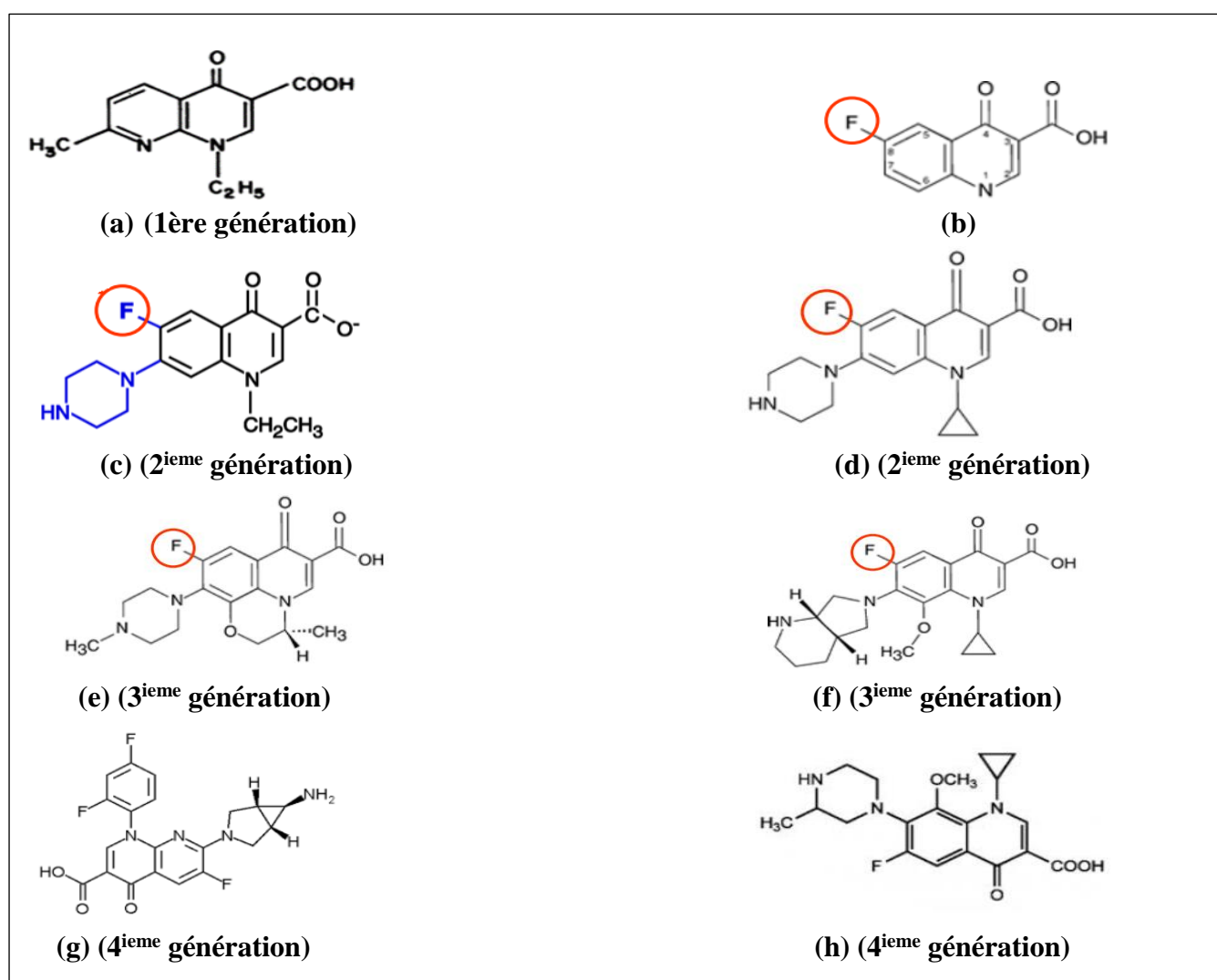


Figure 4: Structures chimiques des fluoroquinolones et quinolone [26, 39]

(a) acide nalidixique ; (b) pharmacophore des fluoroquinolones ; (c) norfloxacin ; (d) ciprofloxacin ;  
 (e) Lévoﬂoxacin ; (f) moxifloxacin ; (g) Trovaﬂoxacin ; (h) Gatifloxacin

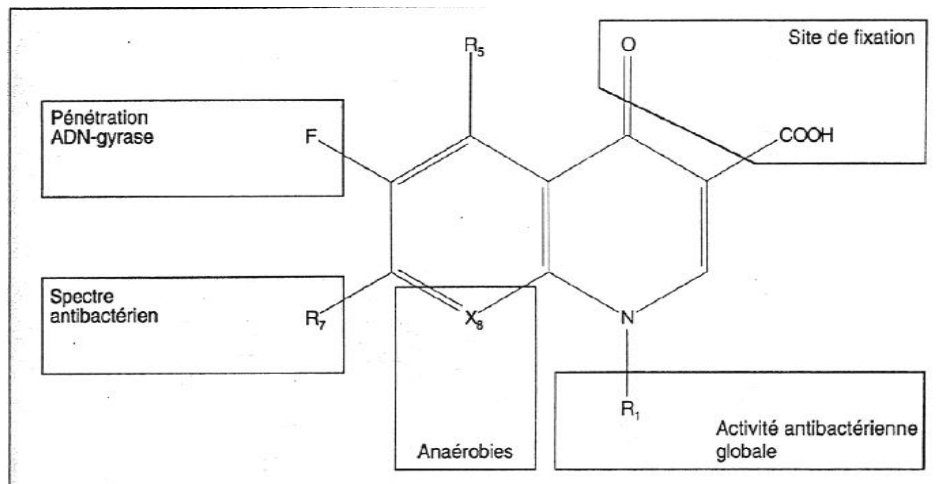


Figure 5: Différentes fonctions des différentes parties du pharmacophore des FQ [33, 41]

### II.3. Mécanisme d'action des fluoroquinolones sur *K. pneumoniae*

Les FQ ont une action bactéricide sur les bactéries. Ils ont un mode d'action intracytoplasmique. Les FQ inhibent certaines enzymes du métabolisme de l'ADN. Après avoir franchi la paroi de la bactérie, les FQ se fixent sur les complexes formés entre l'ADN bactérien et la topoisomérase II (ADN gyrase) ou la topoisomérase IV, qui sont respectivement responsables du surenroulement négatif de la molécule d'ADN et de la séparation des brins néoformés au cours de la réplication. Ce complexe devient irréversible et conduit, d'une part, à l'immobilisation des enzymes qui entraînent la bactériostase et, d'autre part, à la libération des cassures double brin de l'ADN activant le système SOS ou produisant un effet toxique pour les bactéries, responsable de la bactéricidie intense des fluoroquinolones. L'effet bactéricide varie en fonction de la molécule de FQ utilisée [35, 25, 51].

L'action des FQ sur l'ADN gyrase est le mécanisme d'action primordial des FQ sur les bactéries à Gram négatif comparativement à l'action sur la topoisomérase IV [25, 51].

Chez la bactérie, les quinolones hydrophiles pénètrent grâce aux porines ; par diffusion passive en fonction de leur degré d'hydrophobicité et de leur poids moléculaire. Les quinolones hydrophobes pénètrent par un passage direct à travers la bicouche phospholipidique [12, 40].

### III. Mécanismes de résistance de *K. pneumoniae* aux Fluoroquinolones

La résistance de *K. pneumoniae* aux FQ est classée en deux types selon leur origine:

- Résistance d'origine chromosomique de *K. pneumoniae* aux FQ
- Résistance d'origine plasmidique de *K. pneumoniae* aux FQ (Cf. figure 6).

### **III.1. Résistance d'origine chromosomique de *K. pneumoniae* aux FQ**

La résistance d'origine chromosomique de *K. pneumoniae* aux FQ provient des mutations localisées dans des gènes qui conduisent soit à :

- La perte d'affinité des FQ pour leurs cibles
- Une augmentation de l'excrétion des FQ hors du cytoplasme de *K. pneumoniae*
- Une diminution de la perméabilité membranaire aux FQ [2, 42, 52].

#### **III.1. 1. Perte d'affinité des FQ pour leurs cibles**

Elle provient de modifications structurales dans une région de la topoisomérase appelée QRDR (Quinolone Résistance Determining Region).

Les mutations dans les QRDR consistent en des substitutions d'acides aminés, modifiant la structure de la protéine cible des FQ et, par la suite, l'affinité de liaison de l'enzyme aux FQ diminue, conduisant à une résistance aux FQ. Il s'agit des mutations dans les gènes *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*.

Dans le gène *gyrA*, des mutations se produisent habituellement au niveau des nucléotides 201 à 320, des acides aminés codés entre la position 67 et 106, en particulier au niveau de la sérine 83 et de l'aspartate 87. Les mutations aux codons 426 et 447 de *gyrB* font habituellement un faible niveau de résistance aux FQ. Des mutations dans les positions 78, 80 et 84 de l'acide aminé du gène *parC* chez *K. pneumoniae* résistant aux FQ ont également été rapportées à travers le monde mais avec des niveaux de résistance différents [35, 42, 52].

Les mutations dans le gène *gyrA* sont plus fréquentes que celles observées dans le gène *gyrB* et les *K. pneumoniae* hautement résistants aux FQ portent typiquement une combinaison de mutations dans les gènes *gyrA* et *parC* [2, 35, 51].

L'effet de ces mutations sur l'activité des FQ dépend de leur type, de leur nombre et de la molécule concernée. Ainsi, la résistance s'établit par paliers successifs par accumulation d'évènements mutationnels avec des mutants de 1<sup>e</sup> niveau, puis de 2<sup>e</sup> niveau et enfin de 3<sup>e</sup> niveau [13]. Par exemple, une mutation sur la QRDR du gène *gyrA* entraîne une résistance de haut niveau à l'acide nalidixique, alors que pour l'ofloxacin et la ciprofloxacine, il en faut respectivement deux et trois mutations [13].

#### **III.1.2. Augmentation de l'excrétion des FQ hors du cytoplasme de *K. pneumoniae***

Elle est due à une surexpression des systèmes d'efflux. L'exposition de *K. pneumoniae* aux FQ peut sélectionner des mutants qui surexpriment les systèmes d'efflux à la suite de mutations dans les réseaux régulateurs normaux qui contrôlent les niveaux d'expression de ces systèmes. La surexpression de l'efflux confère une résistance élevée aux FQ [45, 51, 52]

### **III.1.3. Diminution de la perméabilité membranaire**

Elle résulte d'un déficit quantitatif ou qualitatif de synthèse des porines. Ce qui entraîne l'entrée d'une faible quantité de FQ à l'intérieur de *K. pneumoniae*. Elle a moins d'impact sur le degré de résistance comparé aux mutations dans les QRDR.

## **III.2. Résistance plasmidique de *K. pneumoniae* aux FQ**

La résistance d'origine plasmidique de *K. pneumoniae* aux FQ survient par trois mécanismes :

- Protection de la cible des FQ
- Inactivation des FQ
- Surexpression des pompes efflux [2, 45, 52].

### **III.2.1. Protection de la cible des FQ**

La protection de la cible des FQ est due à la protéine Qnr qui se lie à la topoisomérase, ce qui empêche physiquement l'intercalation des FQ avec l'enzyme cible.

La protéine Qnr est codée par des gènes de résistance aux quinolones à médiation plasmidique (PMQR : Plasmid-Mediated Quinolone Resistance), le gène PMQR archétypal est *qnr*. On distingue *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC* et *qnrD* [45, 35, 52]. Les protéines Qnr confèrent souvent une résistance de bas niveau aux FQ.

### **III.2.2. Inactivation des FQ**

L'inactivation des quinolones est un mécanisme qui n'existait pas avant la description du gène *aac(6')-Ib-cr* codant un aminoside 6'-N-acétyltransférase plasmidique bi-fonctionnelle capable d'acétyler les FQ. Le FQ pénètre dans *K. pneumoniae* et atteint une concentration intracellulaire normale, mais est inactivée partiellement par une enzyme : *aac(6')-Ib-cr*. Cette enzyme est caractérisée par deux mutations (Trp104Arg et Asp181Tyr) qui entraînent d'une part une diminution de la résistance aux aminosides, et d'autre part d'une résistance à la ciprofloxacine et à la norfloxacine par N-acétylation du groupement amine secondaire du cycle pipérazinyl [35, 51, 52].

### **III.2.3. Surexpression des pompes efflux**

La troisième classe de gènes plasmidiques de résistance aux FQ comprend les gènes *oqxAB* et *qepA*, qui codent pour des transporteurs capables d'exporter des molécules de FQ hors de *K. pneumoniae*.

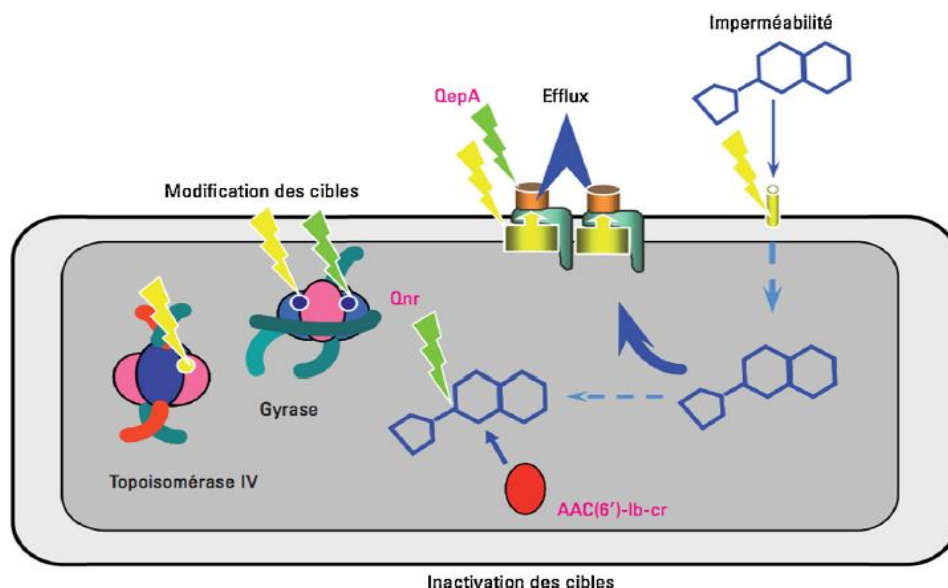
Le gène *qepA* provoque un haut niveau de résistance aux FQ hydrophiles [45, 42, 52].

Les souches de *K. pneumoniae* peuvent présenter un ou une association de mécanismes de résistance. L'association de divers mécanismes de résistance a un effet additif sur l'élévation des CMI des FQ.

Les différents gènes et mécanismes de résistance de *K. pneumoniae* aux FQ sont résumés dans le tableau ci-dessous (Cf. **Tableau I**).

**Tableau I: Tableau récapitulatif des mécanismes de résistance de *K. pneumoniae* aux FQ [42]**

Origines	Mécanismes de résistance	Gènes impliqués
<b>Chromosomique</b>	Perte d'affinité des FQ pour leurs cibles	<i>gyrA, gyrB, parC, parE</i>
	Augmentation de l'excrétion des FQ hors du cytoplasme des Kp	Pas de gènes impliqués
	Diminution de la perméabilité membranaire	Pas de gènes impliqués
<b>Plasmidique</b>	Protection de la cible des FQ	<i>qnr (qnrA, qnrB, qnrC, qnrD, qnrS)</i>
	Inactivation des FQ	<i>aac (6')-Ib-cr</i>
	Surexpression des pompes efflux	<i>oqxAB, qepA</i>



**Figure 6: Mécanismes de résistance de *K. pneumoniae* aux FQ. En noir : les mécanismes chromosomiques (modification des cibles, efflux, imperméabilité). En rose : les mécanismes plasmidiques (*Qnr*, *QepA*, *aac(6)-Ib-cr*) [35]**

## IV. Détection des gènes de résistance par technique moléculaire

### IV.1. Polymerase Chain Reaction (PCR)

#### IV.1.1. Définition

La PCR a été conçue au début des années 80 par Kary Mullis, et permet d'amplifier *in vitro* un fragment d'ADN de petite taille en grand nombre. Elle permet le diagnostic rapide des infections causées par des bactéries difficiles à cultiver. C'est une technique alliant rapidité, une bonne sensibilité et reproductibilité [30].

#### IV.1.2. Principe de la PCR en point final

La PCR est une technique *in vitro* pour amplifier des séquences d'ADN recherchées en utilisant des amorces spécifiques en présence de la Taq polymérase, des désoxyribonucléotides (dNTP), du chlorure de magnésium (MgCl<sub>2</sub>) et des tampons de réaction à des concentrations optimales [34].

Elle permet d'obtenir, à partir d'un échantillon faible, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. L'ordre de grandeur est celui du million de copies en quelques heures. Chaque cycle de PCR est constitué de trois phases différentes à trois températures différentes : la dénaturation, l'hybridation et l'élongation (Cf. figure 7).

Grâce à des amorces spécifiques, la PCR en point finale peut être utilisée pour détecter et amplifier des gènes de résistance de *K. pneumoniae* aux FQ.

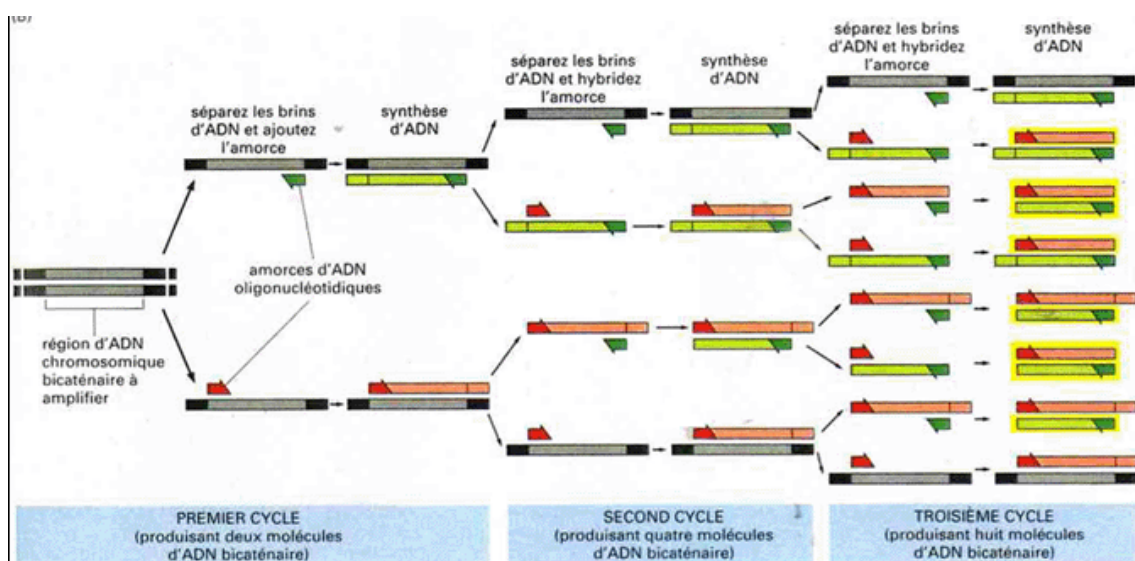


Figure 7: Les étapes de la PCR [34]

## IV.2. Séquençage

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN donné. Cette technique utilise la réaction de polymérisation de l'ADN avec une enzyme (anciennement le fragment de Klenow) « la sequenase » synthétisée complètement artificiellement et des didésoxyribonucléotides (ddNTP).

La séquence d'ADN contient l'information nécessaire aux bactéries pour survivre et se reproduire.

La détermination de cette séquence permet de:

- Etablir les arbres phylogéniques des bactéries en circulation
- Compléter et approfondir les résultats de la PCR.
- Détecter des gènes de résistance aux antibiotiques et des mutations dans des gènes cibles des antibiotiques qui confèrent des résistances.
- Diagnostiquer et investiguer des épidémies et confirmer une transmission (directe de patient à patient ou d'une source environnementale commune à des patients).
- Déterminer les différences entre les génomes des souches responsables des épidémies en quantifiant le nombre de mutations entre les organismes bactériens [24].



**Deuxième partie :**  
**Travail expérimental**



## I. Objectifs

L'objectif principal de notre étude était de caractériser les gènes de résistance aux fluoroquinolones des souches de *Klebsiella pneumoniae* uropathogènes isolées au LBM de l'IPD.

Les objectifs spécifiques étaient de déterminer la présence des:

- ✓ QRDR: Gènes de résistance chromosomique de *K. pneumoniae* aux FQ (*gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE*)
- ✓ Gènes de résistance plasmidique de *K. pneumoniae* aux FQ: PMQR (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*); *aac (6')-Ib* et *qepA*).

## II. Cadre de l'étude

Cette étude prospective a été réalisée au Laboratoire de Biologie Médicale (LBM) en collaboration avec l'Unité de Bactériologie Expérimentale (UBE) de l'Institut Pasteur de Dakar (IPD) entre Mai 2018 et Juillet 2018.

## III. Souches bactériennes

Notre étude a porté sur cinquante (50) souches de *Klebsiella pneumoniae* productrices de BLSE uropathogènes et résistantes au moins à un FQ (NOR, OFX, CIP) isolées de patients reçus au LBM-IPD pour un ECBU. Les souches sélectionnées étaient d'origine hospitalière et communautaire.

## IV. Matériels et méthode

### IV.1. Matériels

#### IV.1.1. Matériels pour identification et antibiogramme des souches *K. pneumoniae*

- ✓ Anses calibrés
- ✓ Milieu de culture BCP et MH
- ✓ Galeries ID API 20<sup>E</sup>
- ✓ Disques d'antibiotiques
- ✓ Étuve
- ✓ Automate ADAGIO®

#### IV.1.2. Matériels pour la Biologie moléculaire

- ✓ Cônes 10 µl, 200 µl, 1000µl
- ✓ Tube et bouchon PCR.
- ✓ Tampon TAE 1X, Tampon TBE
- ✓ BET (bromure d'éthidium)

- ✓ Micropipettes réglables et fixes.
- ✓ Master mix
- ✓ Amorces des gènes recherchés
- ✓ Thermocycleur AB 2720®
- ✓ Nanodrop Lite® Thermo Scientific
- ✓ Chambre d'électrophorèse + Générateur Mupid-One ®
- ✓ appareil photographique Doc print VX2
- ✓ Centrifugeuse SIGMA® 2K15
- ✓ Hotte LAF Lab-vent control HOLTEN 1.5 LaminAir

## IV.2. Méthodologie

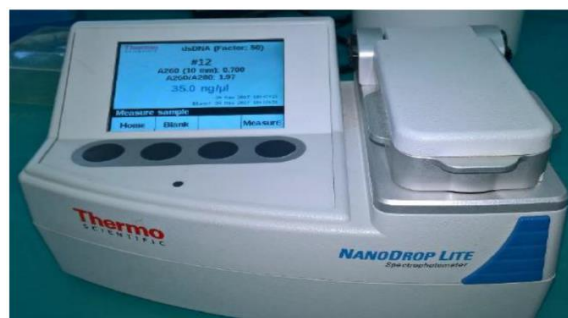
### IV.2.1. Echantillonnage des souches de *K. pneumoniae* BLSE uropathogènes

Cinquante (50) souches de *K. pneumoniae* ont été étudiées au cours de notre étude et sélectionnées au hasard parmi des souches de *K. pneumoniae* isolées d'ECBU au LBM-IPD, productrices de BLSE et résistantes phénotypiquement aux FQ.

Chaque souche de *K. pneumoniae* sélectionnée avait été ré-identifiée à partir des caractères morphologiques, cultureux et biochimiques et un antibiogramme a été réalisé par la technique de diffusion sur le milieu MH selon les recommandations du CASFM/EUCAST (2018).

### IV.2.2. Extraction des ADN

Chaque souche de *K. pneumoniae* sélectionnée a été repiquée sur le milieu MH. Deux colonies de culture pure ont été mises en suspension dans un tube Eppendorff® contenant 4ml d'eau physiologique stérile. Les tubes Eppendorff® contenant les suspensions de Kp ont été placés dans un bain-marie à une température de 100°C pendant 12 min. Les tubes étaient ensuite centrifugés à 4°C (centrifugation réfrigérée), à la vitesse de 10 000 tr/min pendant 10min. Le surnageant contenant l'ADN a été recueilli et la pureté de l'ADN a été évaluée au Nanodrop Lite® (Cf. **figure 8**).



**Figure 8:** Automate pour évaluer la pureté de l'ADN: NanoDrop Lite

### IV.2.3. Préparation du mix réactionnel de PCR

Les mix réactionnels de PCR étaient composés de l'ADN de la souche *K. pneumoniae* analysée, des paires d'amorces (*Inquaba Biotec West Africa Ltd*) du ou des gènes de résistance recherchés (Cf. **Tableau II**), de l'eau PCR (Reaction buffer B Solis BioDyne) et du master mix (Master Mix FIREPol® Solis Biodyne). Le master mix était composé de: Taq polymérase (FIREPol® DNA polymerase), le mélange des quatre désoxyribonucléotides (1mM dNTP), du chlorure de magnésium (12,5 mM MgCL<sub>2</sub>).

Nous avons procédé par des PCR simplex et multiplex en fonction de la taille des amplicons attendue. La composition du mix réactionnel de la PCR est fonction du nombre de gènes recherchés.

**Tableau I: Tableau récapitulatif des mécanismes de résistance de *K. pneumoniae* aux FQ**

**Tableau II: Tableau des amorces pour la recherche des gènes de résistance aux FQ**

Gènes	Primers	DNA séquences (5'→3')	Taille (pb)
<i>gyrA</i>	gyrA-F	5'- TACACCGGTCAACATTGAGG -3'	647
	gyrA-R	5'- TTAATGATTGCCGCGTCGG-3'	
<i>gyrB</i>	gyrB-F	5'- TGAAATGACCCGCCGTAAAGG-3'	309
	gyrB-R	5'- GCTGTGATAACGCAGTTTGTCCGGG-3'	
<i>parC</i>	parC-F	5'- GTCTGAACTGGGCCTGAATGC -3'	248
	parC-R	5'-AGCAGCTCGGAATATTTTCGACAA -3'	
<i>qnrE</i>	parE-F	5'-ATGCGTGCGGCTAAAAAAGTG -3'	289
	parE-R	5'-TCGTCGTCAGGATCGATAC -3'	
<i>qnrA</i>	qnrA-F	5'- TACACCGGTCAACATTGAGG -3'	657
	qnrA-R	5'- TTAATGATTGCCGCGTCGG-3'	
<i>qnrB</i>	qnrB-F	5'- TACACCGGTCAACATTGAGG -3'	469
	qnrB-R	5'- TTAATGATTGCCGCGTCGG-3'	
<i>qnrS</i>	qnrS-F	5'- ACGACATTCGTCAACTGCAA-3'	417
	qnrS-R	5'- TAAATTGGCACCCCTGTAGGC-3'	
<i>qnrC</i>	qnrC-F	5'- GGGTTGTACATTTATTGAATCG-3'	307
	qnrC-R	5'- CACCTACCCATTTATTTTCA -3'	
<i>qnrD</i>	qnrD-F	5'-TGTGATTTTTTCAGGGGTTGA -3'	520
	qnrD-R	5'-CCTGCTCTCCATCCA ACTTC -3'	
<i>aac(6')-Ib</i>	aac(6')-ib-F	5'-TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA -3'	482
	aac(6')-ib-R	5'-CTCGAATGCCTGGCGTGTTT -3'	
<i>qepA</i>	qepA-F	5'-AACTGCTTGAGCCCGTAGAT -3'	596
	qepA-R	5'-GTCTACGCCATGGACCTCAC -3'	

#### IV.2.3.1. Mix pour PCR simplex

Les gènes *QepA* et *aac (6')-Ib* ont été détecté par PCR simplex. Pour une réaction, la PCR en simplex nécessite deux volumes 0,5µl de primers (Forward et reverse) + un volume 12,5µl d'H<sub>2</sub>O + un volume

de Mix PCR répartis sous 17,5 µl. Le mélange réactionnel est complété par un volume de 2,5 µl d'ADN matriciel (Cf. **Tableau III**). Le volume du mélange réactionnel total était de 20µl.

**Tableau III: Composition du mélange réactionnel pour une PCR simplex**

Réactifs	Volume par puits (µl)	Volume pour 50 réactions
Mix PCR	4	200
Amorce sens	0,5	25
amorce antisens	0,5	25
H <sub>2</sub> O	12,5	625
Répartir sous	17,5	875
DNA de la souche analysée	2,5	125
Volume final	20	1000

#### IV.2.3.2. Mix pour PCR Duplex :

Pour deux gènes à amplifier, il faut un volume cumulé H<sub>2</sub>O + Primers + Master Mix réparti sous 17,5 µl correspondant aux six amorces. Soit 0,5µl x 2 x 2 pour 11,5µl d'eau (Cf. **Tableau IV**). Le volume de Master Mix étant identique à celui d'une PCR simplex.

**Tableau IV: Composition du mélange réactionnel pour PCR en Duplex**

Réactifs	Volume par puits (µl)	Volume pour 50 réactions (µl)
Master mix	4	200
Amorce sens gène 1	0,5	25
Amorce antisens gène 1	0,5	25
Amorce sens gène 2	0,5	25
Amorce antisens gène 2	0,5	25
H <sub>2</sub> O	11,5	525
Répartir sous	17,5	875
DNA	2,5	125
Volume final	20	1000

#### IV.2.4. Amplification des gènes de résistance

Pour chaque souche de *K. pneumoniae* testée ainsi que les contrôles, 20µl de Mix réactionnels (17,5µl master mix + 2,5 ADN de la souche testée) a été réparti dans des tubes PCR 0,2 ml placés dans un thermocycleur (Thermocycleur 2720 Applied Biosystems) programmé selon les gènes de résistance recherchés (Cf. Tableau V).

Tableau V: Tableau des programmes PCR des gènes de résistance recherchés

Paramètres	<i>gyrA/B</i>	<i>parC/E</i>	<i>qnr A/B/C</i>	<i>qnrD/S</i>	<i>qepA</i>	<i>aac(6')-Ib</i>
Dénaturation initiale	94°C/5'	94°C/5'	94°C/5'	94°C /5'	94°C/5'	94°C/5'
Dénaturation	94°C/30''	94°C/30''	94°C/30''	94°C/30''	94°C/30''	94°C/30''
Appariement	60°C/1'	60°C/1'	55°C/1'	55°C/1'	55°C/1'	55°C/1'
Elongation	72°C/1'	72°C/1'	72°C/1'	72°C/1'	72°C/1'	72°C/1'
Élongation Finale	72°C/10'	72°C/10'	72°C/10'	72°C/10'	72°C/10'	72°C/7'
Nombre de cycles	30	30	30	30	30	30

(') = minute

('') = seconde

#### IV.2.5. Migration des amplicons de PCR

Des gels d'agarose à 1 % ont été préparés à partir de 1g de poudre d'agarose contenu dans 100 ml de tampon TBE 1X (10 ml de TBE 10X + 90ml H<sub>2</sub>O) ou du tampon TAE 1X (2 ml de TAE 50X dans 100 ml de H<sub>2</sub>O) et 10µl de BET à 0,5 mg/l. La migration des produits PCR ainsi que des marqueurs de tailles a été réalisée sous une tension de 120 volts pendant 45 min avec le générateur Mupid-One ® (Cf. figure 9).

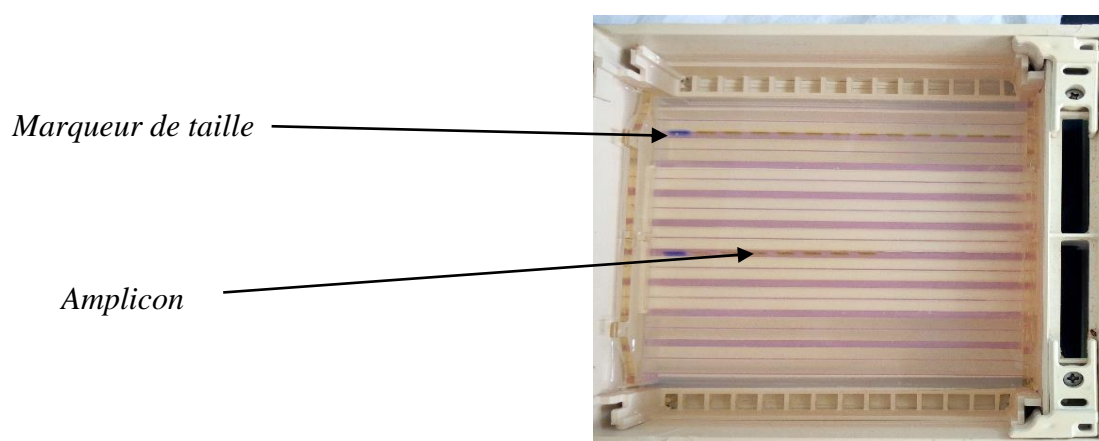


Figure 9: Dépôt des amplicons sur gel d'agarose

#### **IV.2.6. Révélation**

L'appareil photographique Doc printer nous a servi à visualiser sous UV des bandes au niveau du gel contenant du bromure d'éthidium (BET). Le marqueur de taille (*100 bp DNA Ladder- Solis BioDyne*) et les mix ADN témoins positifs et négatifs (ADNs de Référence UBE) ont été utilisés pour valider la PCR et identifier les gènes de résistance recherchés en fonction de leur taille.

## V. Résultats

Les gènes d'origine chromosomique ont été trouvés chez 03/50 Souches (06%). Au moins un gène d'origine plasmidique a été retrouvé chez 47/50 souches sur cinquante (94%).

### V.1. Détection des gènes QRDR

Les gènes *gyrA* 02% (01/50), *parC* 02% (01/50) et *parE* 06% (03/50) ont été détectés. Le gène *gyrB* n'a pas été détecté (Cf. figures 10, 11, 12).

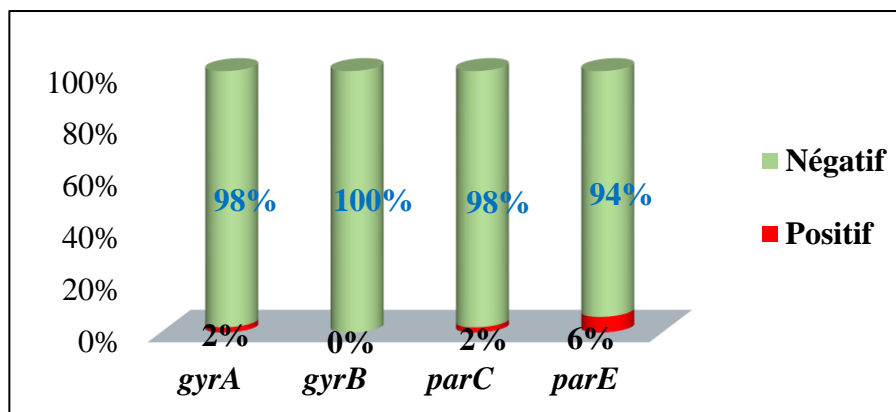


Figure 10: Répartition des différents gènes QRDR chez les souches de *K. pneumoniae* analysées

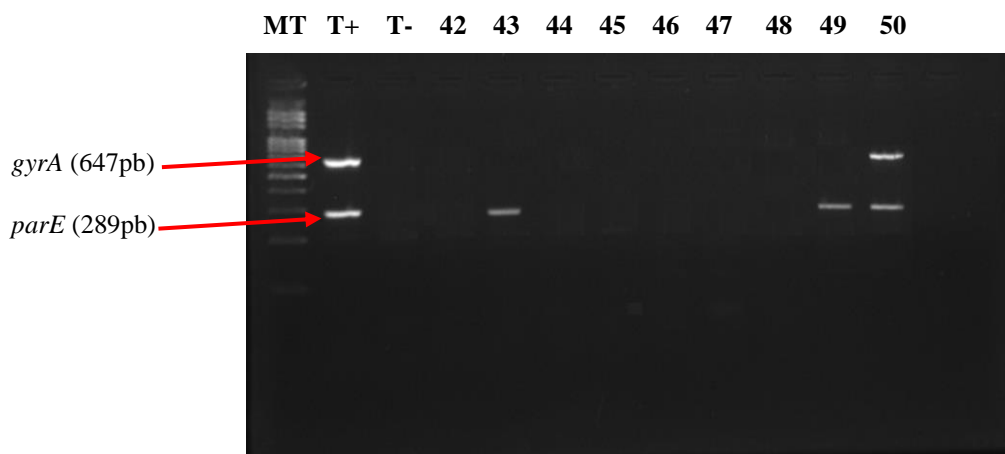
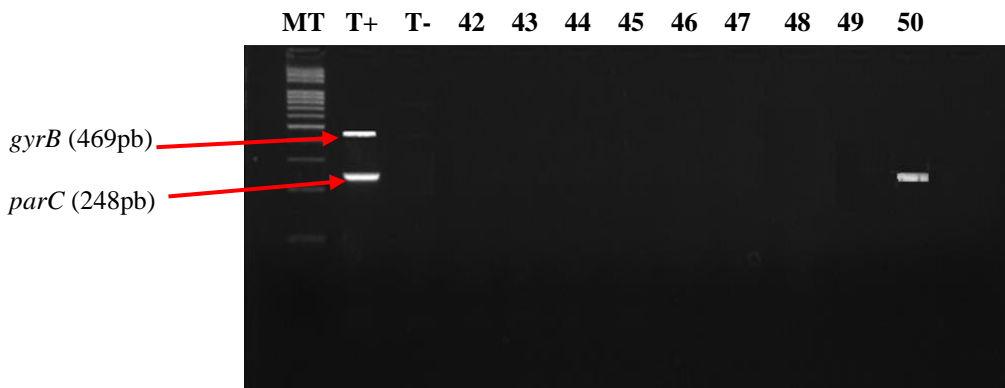


Figure 11: Photographie du gel de migration de la PCR en duplex *gyrA* et *parE*

MT : Marqueur de taille T+ : Témoin positif T- : Témoin Négatif 42-50=souches testées

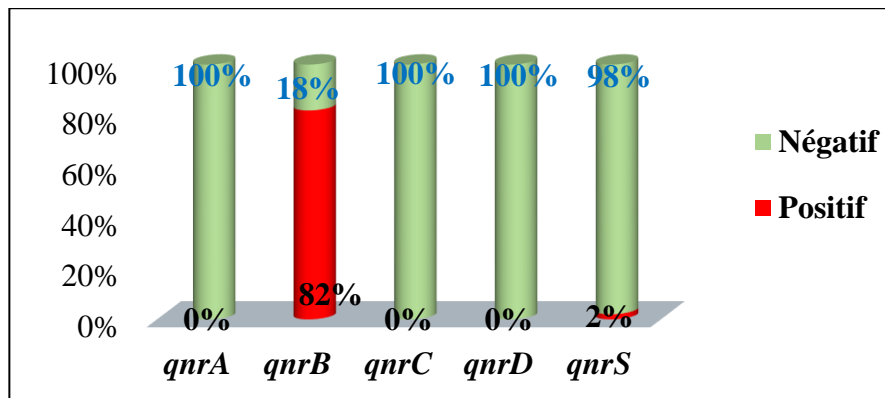


**Figure 12: Photographie du gel de migration de la PCR en duplex *gyrB* et *parC***

MT : Marqueur de taille T+ : Témoin positif T- : Témoin Négatif 42-50=souches testées

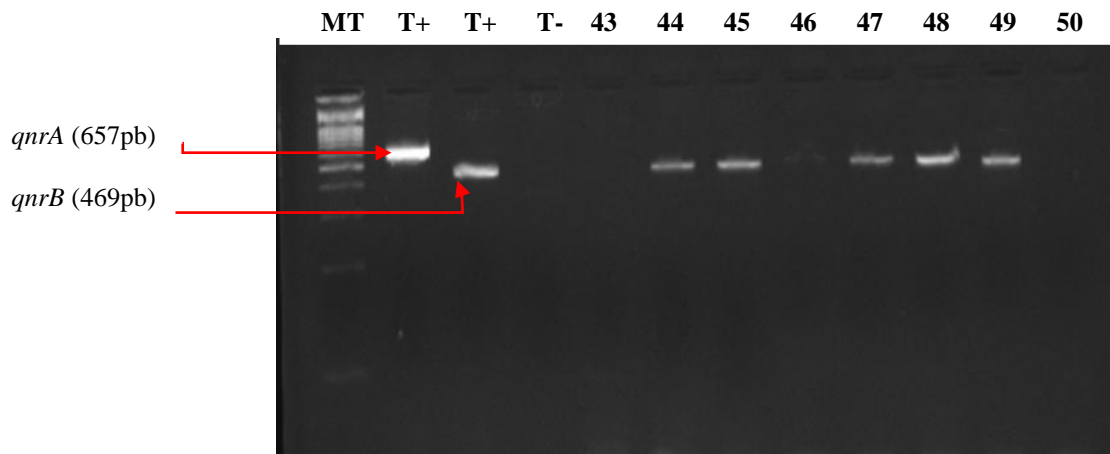
## V.2. Détection des gènes PMQR

Les PMQR ont été détectés chez 42 des isolats (82%). Le gène *qnrB* a été détecté chez 41 des souches (82%) testées et le gène *qnrS* a été détecté chez une seule souche (02%). Les gènes *qnrA*, *qnrC* et *qnrD* n'ont pas été détectés (Cf. figure 13, 14).



**Figure 13: Répartition des différents gènes PMQR chez les souches de *K. pneumoniae* analysées**



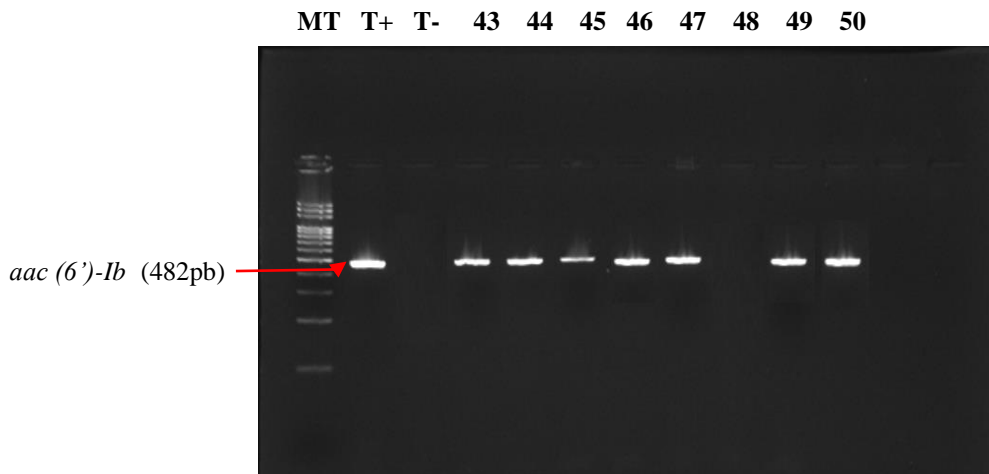


**Figure 14: Photographie du gel de migration de la PCR en duplex de *qnrA* et *qnrB***

MT : Marqueur de taille    T+ : Témoin positif    T- : Témoin Négatif    43-50=souches testées

### V.3. Détection des gènes *aac (6')-Ib*

Le gène *aac (6')-Ib* a été détecté chez 88% (44/50) des souches sur cinquante (**Figure 15, 16**).



**Figure 15: Photographie du gel de migration de la PCR en simplex du gène *aac(6')-Ib***

MT : Marqueur de taille    T+ : Témoin positif    T- : Témoin Négatif    43-50=souches testées

### V.4. Détection des gènes *qepA*

Le gène *qepA* n'a pas été retrouvé chez aucune des cinquante souches analysées (**Cf. Figure 16**).

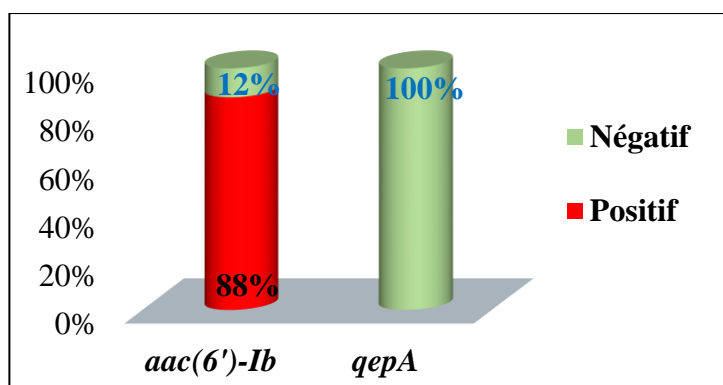


Figure 16: Répartition des gènes *aac(6')-Ib* et *qepA* chez les souches de *K. pneumoniae* analysées

### V.5. Répartition des souches en fonction du nombre de gènes portés par une souche

Notre étude a montré qu'une seule souche hébergeait 4 gènes de résistance (*gyrA* + *parC* + *parE* + *aac(6')-Ib*), et une autre souche hébergeait 3 gènes de résistance (*parE* + *qnrB* + *aac(6')-Ib*). 40 souches (80%) hébergeaient 2 gènes de résistance (*aac(6')-Ib*+*qnrB* = 38/50 ; *aac(6')-Ib*+*qnrS* = 1/50 ; *aac(6')-Ib*+*qnrB*, = 1/50). Cinq des souches hébergeaient un seul gène de résistance (*aac(6')-Ib* = 3/50 et *qnrB* = 2/50) et aucun gène n'a été retrouvé chez 3 souches (Cf. figure 17).

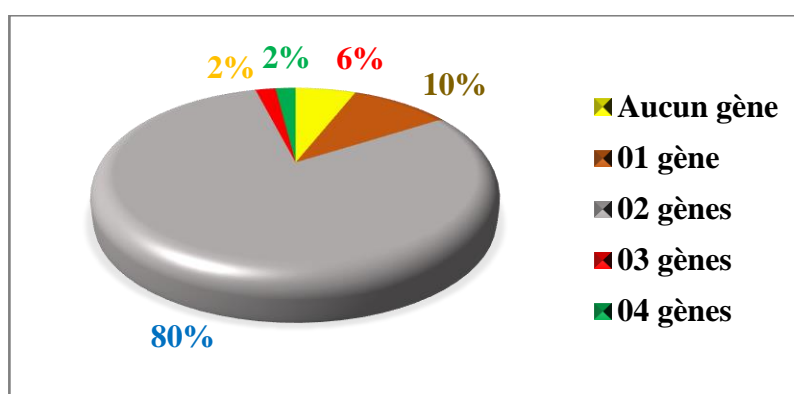


Figure 17: Répartition des souches en fonction du nombre de gènes portés par souche

### V.6. Distribution des gènes en fonction des souches analysées

La distribution des divers gènes de résistance recherchée chez les 50 souches de notre étude est résumée dans le (Tableau VI).

**Tableau 2: Récapitulatif des gènes identifiés en fonction des souches**

No	QRDR				PMQR						
	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrC</i>	<i>qnrD</i>	<i>qnrS</i>	<i>qepA</i>	<i>aac(6')-Ib</i>
1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
3	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
4	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
5	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
6	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
7	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
8	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
9	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
10	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
11	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
12	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
13	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
16	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
17	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
19	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
20	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
21	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
22	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
23	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
24	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
25	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
28	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
31	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
32	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
33	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
35	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
36	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
38	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
39	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
40	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
41	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
42	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
43	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
44	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
45	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
47	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
48	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
49	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
50	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+

## VI. Discussion

Notre étude a porté sur 50 souches de *K. pneumoniae* uropathogènes productrices de BLSE et résistantes aux fluoroquinolones. Les gènes de résistance aux fluoroquinolones (QRDRs, PMQR, *aac(6')-Ib*) ont été détectés chez 94 % (47/50) des souches. Seules 3 souches n'hébergeaient pas les gènes recherchés bien qu'elles présentaient un profil de résistance aux fluoroquinolones.

Parmi les QRDRs, seuls les gènes *gyrA* (n=1) ; *parC* (n=1) et *parE* (n=3) ont été détectés. Le gène *gyrB* n'a pas été détecté. Les mutations des gènes QRDR détectés n'ont pas été recherchées. Ces résultats sont différents des résultats obtenus lors d'une étude réalisée à Dakar dans le même laboratoire en 2017 au cours de laquelle sur 50 souches, *gyrB* et *parE* étaient détectés chez une souche et *gyrA* et *parC* n'avaient pas été détectés [44]. La très faible détection des QRDRs au cours de notre étude contraste avec une étude réalisée en Sierra-Leone en 2016 au cours de laquelle sur 17 souches *K. pneumoniae*, 9 possédaient le gène *gyrA* (avec une mutation au niveau de la Sérine 83) et 09 possédaient également le gène *parC* (avec une mutation au niveau de la sérine 80) [36]. Ailleurs, au cours d'une étude en Corée en 2013 portant sur 21 souches de *K. pneumoniae*, les gènes QRDRs ont été fortement détectés avec la présence de *gyrA* chez 19 souches (avec une mutation dans la Sérine 83); *parC* chez 14 souches avec mutation dans la Sérine 80 [43].

Au cours de notre étude, l'analyse des déterminants plasmidiques (PMQR, *aac(6')Ib* et *qepA*) a montré la présence des gènes *qnrB* et *qnrS* respectivement chez 41 isolats (82%) et une souche (02%). Le gène *aac(6')-Ib* a été détecté chez 44 souches (88%). Le séquençage de ces gènes n'a pas été réalisé pour identifier les sous-types des gènes *qnr* et le variant *aac(6')-Ib-cr* qui code à la fois la résistance aux fluoroquinolones et aux aminosides. Les gènes *qnrA*, *qnrC*, *qnrD* et *qepA* n'ont pas été détectés. L'étude réalisée à Dakar en 2017 sur 50 souches a montré une plus faible présence du gène *qnrB* (n=30) associée à une présence de *qnrA* (n=1) ; le gène *qnrS* n'avait pas été détecté lors de cette étude [44]. Une autre étude réalisée à Ouagadougou au Burkina-Faso en 2015 sur treize (13) souches *K. pneumoniae* avait montré une distribution plus basse du gène *qnrB* (n=7) [41]. Une autre étude réalisée en 2008 à Abidjan chez 66 souches de *K. pneumoniae* a montré une faible présence du gène *qnrB* (n=8) et le séquençage a permis de détecter les sous-types *qnrB1* (07/66) et *qnrB4* (01/66) [23]. Le gène *aac(6')-Ib* a été très fortement détecté au cours de notre étude 88% (44/50). Ces résultats sont comparables à la forte détection à 72% (36/50) du gène *aac(6')-Ib* observée au cours de l'étude de 2017 à Dakar [44]. le variant *aac(6')* a été retrouvé chez la totalité (13/13) des souches étudiées en 2015 à Ouagadougou [41]. Ailleurs, dans le monde, une autre étude réalisée à Alep en Syrie en 2015 sur 24 souches *K. pneumoniae* a révélé aussi une forte présence du gène *aac(6\_-)Ib* à 75% (n=18) [03].

Le variant *aac(6<sub>-</sub>)-Ib-cr* a été détecté chez 20 souches (90,9%) au cours de l'étude réalisée en Corée en 2014 chez 22 souches *K. pneumoniae* [60].

L'absence du gène *qepA* observée au cours de notre étude a été aussi observée au cours de l'étude réalisée à Dakar en 2017 [44] ainsi qu'au cours de l'étude réalisée en Corée 2014 [60].

03 des souches n'hébergeaient aucun des gènes recherchés bien qu'elles présentaient un profil de résistance aux fluoroquinolones. La résistance de ces trois souches ne portant aucun des gènes recherchés pourraient être due à des gènes de résistance que nous n'avons pas recherché lors de notre étude ; comme le gène *oqxAB*. En effet, le gène *oqxAB* a été détecté chez toutes les 17 souches *K. pneumoniae* étudiées en Sierra-Leone en 2016 [36] et sa variante *oqxB* a été retrouvée chez toutes les 21 souches *K. pneumoniae* étudiées à Durban Afrique du Sud en 2017 [47].

La réalisation du séquençage des gènes détectés permettra d'identifier: la présence ou non de mutations au niveau des gènes QRDR, les sous-types des gènes *qnr* et la présence de la variante *aac(6')-Ib-cr*.

La très forte présence des gènes plasmidiques *aac(6')-Ib* et *qnrB* pourrait être source de transferts conjugatifs de ces gènes à d'autres bactéries, surtout en milieu hospitalier. Le personnel hospitalier doit alors veiller à plus d'hygiène afin d'éviter les infections nosocomiales à bactéries multirésistantes. Une étude des déterminants plasmidiques de résistance aura une grande importance dans la compréhension du mode de dissémination des gènes de résistance.

Vue le fort taux de résistance des *K. pneumoniae* aux FQ observée, les FQ doivent être proscrits comme traitement de première intention dans le traitement des ITU.

Il faut aussi adapter constamment les algorithmes d'antibiothérapie par rapport à l'écologie bactérienne.

## Recommandations

- ❑ Proscrire les fluoroquinolones comme traitement de première intention dans le traitement des ITU.
- ❑ Collaboration des acteurs autour de l'utilisation des antibiotiques est primordiale pour lutter contre la résistance aux antimicrobiens (RAM) avec la notion "One Health".

## Conclusion

Notre étude a porté sur 50 souches de *K. pneumoniae* uropathogènes productrices de BLSE et résistantes aux FQ isolées au LBM de l'IPD en 2017.

94% (47/50) des souches possédaient au moins un des gènes de résistance aux FQ (QRDR, PMQR, *aac(6')-Ib*). Trois souches possédaient un gène QRDR (*gyrA*, n=1 ; *parC*, n=1 ; *parE*, n=3). Le gène *gyrB* n'a pas été détecté. 42 souches sur 50 possédaient un gène PMQR (*qnrB*, n= 41 ; *qnrS*, n= 1) et 88% (44/50) des souches hébergeaient le gène *aac(6')-Ib*. Les gènes *gyrB*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* et *qepA* n'ont pas été détectés.

Notre étude a montré qu'une seule souche hébergeait 4 gènes de résistance (*gyrA* + *parC* + *parE* + *aac(6')-Ib*), et une autre souche hébergeait 3 gènes de résistance (*parE* + *qnrB* + *aac(6')-Ib*). 40 souches (80%) hébergeaient 2 gènes de résistance (*aac(6')-Ib+qnrB* = 38/50 ; *aac(6')-Ib+qnrS* = 1/50 ; *aac(6')-Ib+qnrB*, = 1/50). Cinq des souches hébergeaient un seul gène de résistance (*aac(6')-Ib* = 3/50 et *qnrB* = 2/50) et aucun gène n'a été retrouvé chez 3 souches. La réalisation du séquençage des gènes détectés permettra d'identifier: la présence ou non de mutations au niveau des gènes QRDR, les sous-types des gènes *qnr* et la présence de la variante *aac(6')-Ib-cr*.

Une étude des déterminants plasmidiques de résistance pourra nous renseigner sur l'implication des mêmes déterminants dans la résistance à plusieurs antibiotiques.

## Références bibliographiques

- [1]. Abbott, S. L. Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and other Enterobacteriaceae. *Manual of Clinical Microbiology* **9**, 639–657 (2007).
- [2]. Akyu, A., Lorestani, R. C., Elahi, A. & Ghadiri, K. The Impact of Mutations in Topoisomerase Genes and the Plasmid-Mediated Quinolone Resistance (PMQR) Determinants on the Resistance to Fluoroquinolones in *Klebsiella pneumoniae*. *Archives of Clinical Infectious Diseases* **12**, (2017).
- [3]. Alheib, O., Kayali, R. A. & Abajy, M. Y. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance (PMQR) Determinants Among Extended Spectrum Beta-Lactamases (ESBL)-Producing Isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Aleppo, Syria. *Archives of Clinical Infectious Diseases* **10**, 1–5 (2015).
- [4]. Al-Marzooq, F., Mohd Yusof, M. Y. & Tay, S. T. Molecular analysis of ciprofloxacin resistance mechanisms in Malaysian ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates and development of mismatch amplification mutation assays (MAMA) for rapid detection of *gyrA* and *parC* mutations. *Biomed Res Int* **2014**, 601630 (2014).
- [5]. Amako, K., Meno, Y. & Takade, A. Fine structures of the capsules of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* K1. *J Bacteriol* **170**, 4960–4962 (1988).
- [6]. Asif, M. A Mini Review on the Study of New Broad-Spectrum Antimicrobial Fluoroquinolone JNJ-Q2. **1**, 5 (2014).
- [7]. Avril JL, Dabernat H, Denis F et al. *Bactériologie clinique*. 2<sup>e</sup> éd. Paris: ellipses ; 1992, 552 p.
- [8]. Boukadida, J., Salem, N., Hannachi, N., Monastiri, K. & Snoussi, N. Exploration génotypique d'une bouffée épidémique nosocomiale néonatale à *Klebsiella pneumoniae* productrice de bêtalactamase à spectre étendu. *Archives de Pédiatrie* **9**, 463–468 (2002).
- [9]. Briaies, A. *et al.* Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6')*-Ib-cr in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Spain. *Int. J. Antimicrob. Agents* **39**, 431–434 (2012).
- [10]. Brisse, S., Grimont, F. & Grimont, P. A. D. The Genus *Klebsiella*. in *The Prokaryotes* 159–196 (Springer, New York, NY, 2006). doi:10.1007/0-387-30746-X\_8.
- [11]. Brogan, D. M. & Mossialos, E. A critical analysis of the review on antimicrobial resistance report and the infectious disease financing facility. *Globalization and Health* **12**, 8 (2016).

- [12]. Cambau, E. & Guillard, T. Antimicrobials that affect the synthesis and conformation of nucleic acids. *Rev. - Off. Int. Epizoot.* **31**, 77–87, 65–76 (2012).
- [13]. Courvalin P, Leclercq R. Antibiogramme. 3<sup>e</sup> éd. Paris: ESKA; 2012, 800p.
- [14]. Dalhoff, A. Global Fluoroquinolone Resistance Epidemiology and Implications for Clinical Use. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* **2012**, 1–37.
- [15]. Denis, F. & Barraud, O. *Bactériologie médicale: techniques usuelles*. (Elsevier Masson, 2011).
- [16]. Dia, M. L., Chabouny, H. & Diagne, R. Profil antibiotypique des bactéries uropathogènes isolées au CHU de Dakar. *Revue Africaine d' Urologie et d'Andrologie* **1**, (2015).
- [17]. Doi, Y. *et al.* Whole-Genome Assembly of *Klebsiella pneumoniae* Coproducing NDM-1 and OXA-232 Carbapenemases Using Single-Molecule, Real-Time Sequencing. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 5947–5953 (2014).
- [18]. Dromigny, J. A., Nabeth, P. & Perrier Gros Claude, J. D. Distribution and susceptibility of bacterial urinary tract infections in Dakar, Senegal. *Int. J. Antimicrob. Agents* **20**, 339–347 (2002).
- [19]. Ebongue, C. O. *et al.* Evolution de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées à l'Hôpital Général de Douala de 2005 à 2012. *Pan African Medical Journal* **20**, (2015).
- [20]. Everest, P. The Enterobacteria, 2nd Edition. *Gut* **56**, 1331 (2007).
- [21]. Ferjani, S., Saidani, M., Amine, F. S. & Boutiba-Ben Boubaker, I. Prevalence and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in a Tunisian hospital. *Microb. Drug Resist.* **21**, 158–166 (2015).
- [22]. Gillespie, S. H. Principles and Practice of Clinical Bacteriology Second Edition. 15 (2005).
- [23]. Guessennd, N. *et al.* [Qnr-type quinolone resistance in extended-spectrum beta-lactamase producing enterobacteria in Abidjan, Ivory Coast]. *Pathol. Biol.* **56**, 439–446 (2008).
- [24]. Heather, J. M. & Chain, B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* **107**, 1–8 (2016).
- [25]. Higgins, P. G., Fluit, A. C. & Schmitz, F. J. Fluoroquinolones: structure and target sites. *Curr Drug Targets* **4**, 181–190 (2003).
- [26]. Holstein, J., Hubschle, C. & Dittrich, B. Electrostatic properties of nine fluoroquinolone antibiotics derived directly from their crystal structure refinements. *CrystEngComm* (2011). doi:10.1039/C1CE05966A.



- [27]. Holt, K. E. *et al.* Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, E3574-3581 (2015).
- [28]. Hooper, D. C. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis.* **31 Suppl 2**, S24-28 (2000).
- [29]. Institut de veille sanitaire. Morbidité et mortalité des infections à bactéries multi-résistantes aux antibiotiques en France en 2012. Maladies infectieuses. Étude Burden BMR, rapport – Juin 2015; 24 pages.
- [30]. Jatou, K. & Greub, G. [PCR in microbiology: from DNA amplification to results interpretation]. *Rev Med Suisse* **3**, 931–932, 934–938 (2007).
- [31]. Kidd, T. J. *et al.* A *Klebsiella pneumoniae* antibiotic resistance mechanism that subdues host defences and promotes virulence. *EMBO Mol Med* **9**, 430–447 (2017).
- [32]. Koga, H., Itoh, A., Murayama, S., Suzue, S. & Irikura, T. Structure-activity relationships of antibacterial 6,7- and 7,8-disubstituted 1-alkyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acids. *J. Med. Chem.* **23**, 1358–1363 (1980).
- [33]. Kohanski, M. A., Dwyer, D. J. & Collins, J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol* **8**, 423–435 (2010).
- [34]. La police scientifique et l'ADN. Available at: <http://tpe-le-role-de-l-adn-dans-la-police-scientifique.e-monsite.com/pages/ii-la-police-scientifique/ii-b-la-police-scientifique-et-l-adn.html>. (Accessed: 7th July 2018).
- [35]. Lastours, V. & Fantin, B. *Résistance aux fluoroquinolones en 2013 : quel impact pour l'interniste ?* **35**, (2014).
- [36]. Leski, T. A. *et al.* Prevalence of Quinolone Resistance in Enterobacteriaceae from Sierra Leone and the Detection of qnrB Pseudogenes and Modified LexA Binding Sites. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 6920–6923 (2016).
- [37]. Lin, C.-J., Siu, L. K., Ma, L., Chang, Y.-T. & Lu, P.-L. Molecular epidemiology of ciprofloxacin-resistant extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Microb. Drug Resist.* **18**, 52–58 (2012).
- [38]. Lo, S. Sensibilité aux antibiotiques des Entérobactéries isolées d'urines au Centre Hospitalier Régional de Saint Louis (Sénégal) de juin 2011 à juillet 2012. *Revue du CAMES : Science de la santé* **2**, (2015).
- [39]. Mandell, L. & Tillotson, G. Safety of fluoroquinolones: An update. *Can J Infect Dis* **13**, 54–61 (2002).

- [40]. Mérens, A. & Servonnet, A. Mécanismes et épidémiologie de la résistance aux fluoroquinolones en 2010. *Revue Francophone des Laboratoires* **2010**, 33–41 (2010).
- [41]. Moumouni Aissatou. Caractérisation des gènes de résistance aux fluoroquinolones chez les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi isolées chez les enfants de 6 à 59 ans, dans la région de Maradi au Niger. Mémoire de Master II de Biologie Moléculaire et de Génétique Moléculaire Appliquées. Université de Ouagadougou. Ouagadougou, 2015, 64 p.
- [42]. Muylaert, A. & Mainil, J. G. Quinolones and fluoroquinolones: decades of development and use. The veterinary molecules. Part 1: the viewpoint of the bacteriologist. *Annales de Médecine Vétérinaire* **157**, 72–81 (2013).
- [42]. Muylaert A, Mainil JG. Résistances aux fluoroquinolones : la situation actuelle. *Ann. Méd. Vét.* 2013; 157, 15-26.
- [43]. Nam, Y. S. *et al.* Investigation of mutation distribution in DNA gyrase and topoisomerase IV genes in ciprofloxacin-non-susceptible Enterobacteriaceae isolated from blood cultures in a tertiary care university hospital in South Korea, 2005-2010. *Int. J. Antimicrob. Agents* **41**, 126–129 (2013).
- [44]. Ndjoukou Siawaya R.O. Caractérisation moléculaire de la résistance aux fluoroquinolones des souches de *Klebsiella pneumoniae* uropathogènes BLSE isolées au laboratoire de Biologie Médicale de l'Institut Pasteur de Dakar. Mémoire du diplôme de Master 2 en Microbiologie Fondamentale et Appliquée. Dakar : Université Cheikh Anta Diop, 2018, 54 pages.
- [45]. Nordmann, P. & Mammeri, H. Résistance plasmidique aux quinolones. *Antibiotiques* **9**, 246–253 (2007).
- [46]. Okeke, I. N., Lamikanra, A. & Edelman, R. Socioeconomic and behavioral factors leading to acquired bacterial resistance to antibiotics in developing countries. *Emerging Infect. Dis.* **5**, 18–27 (1999).
- [47]. Osei Sekyere, J. & Amoako, D. G. Genomic and phenotypic characterisation of fluoroquinolone resistance mechanisms in Enterobacteriaceae in Durban, South Africa. *PLoS ONE* **12**, e0178888 (2017).
- [48]. Paczosa, M. K. & Meccas, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **80**, 629–661 (2016).
- [49]. Park, D. J., Yu, J. K., Park, K. G. & Park, Y.-J. Genotypes of Ciprofloxacin-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Korea and Their Characteristics According to the Genetic Lineages. *Microbial Drug Resistance* **21**, 622–630 (2015).
- [50]. Podschun, R. & Ullmann, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy,

- typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 589–603 (1998).
- [51]. Redgrave, L. S., Sutton, S. B., Webber, M. A. & Piddock, L. J. V. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol.* **22**, 438–445 (2014).
- [52]. Rodríguez-Martínez, J. M., Cano, M. E., Velasco, C., Martínez-Martínez, L. & Pascual, A. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J. Infect. Chemother.* **17**, 149–182 (2011).
- [53]. Sharma, N., Gupta, A. K., Walia, G. & Bakhshi, R. A retrospective study of the changing trends of antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from urine samples over last 3 years (2012-2014). *J Nat Sci Biol Med* **7**, 39–42 (2016).
- [54]. Soubelet H, Guillaume Morel G. Antibiorésistance et environnement. Ministère de l’environnement, de l’énergie et de la mer, en charge des relations internationales sur le climat. Février 2017, 4p.
- [55]. Snitkin, E. S. *et al.* Tracking a hospital outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with whole-genome sequencing. *Sci Transl Med* **4**, 148ra116 (2012).
- [56]. Trivedi, M. K. *et al.* Antibigram Typing and Biochemical Characterization of *Klebsiella pneumoniae* after Biofield Treatment. *Journal of Tropical Diseases & Public Health* **3**, 1–6 (2015).
- [57]. Vinogradov, E. *et al.* Structures of lipopolysaccharides from *Klebsiella pneumoniae*. Elucidation of the structure of the linkage region between core and polysaccharide O chain and identification of the residues at the non-reducing termini of the O chains. *J. Biol. Chem.* **277**, 25070–25081 (2002).
- [58]. Williams, P., Lambert, P. A., Brown, M. R. & Jones, R. J. The role of the O and K antigens in determining the resistance of *Klebsiella aerogenes* to serum killing and phagocytosis. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 2181–2191 (1983).
- [59]. Xue, G. *et al.* High Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Pediatric Patients in China. *Microb. Drug Resist.* **23**, 107–114 (2017).
- [60]. Yang, H. Y., Nam, Y. S. & Lee, H. J. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes among ciprofloxacin-nonsusceptible *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from blood cultures in Korea. *Can J Infect Dis Med Microbiol* **25**, 163–169 (2014).
- [61]. Zheng, J. *et al.* Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia Strains Was Found to be Associated with CC23 and the Presence of *wcaG*. *Front Cell Infect Microbiol* **8**, (2018).
- [62]. Zhong, H., Zhang, S., Pan, H. & Cai, T. Influence of induced ciprofloxacin resistance on efflux pump activity of *Klebsiella pneumoniae*. *J Zhejiang Univ Sci B* **14**, 837–843 (2013).

## Résumé

**Introduction :** Les fluoroquinolones (FQ) constituent le premier choix dans le traitement empirique des infections du tractus urinaire dans lesquelles *Klebsiella pneumoniae* vient en seconde position en termes de fréquence d'implication. Nous assistons à une augmentation inquiétante de la résistance des Kp aux FQ. Cette résistance se fait grâce à des mutations chromosomiques et à l'acquisition et expression de gènes plasmidiques.

**Objectif :** l'objectif de notre étude était de caractériser des gènes de résistance aux FQ des souches de Kp productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE), isolées dans les urines au Laboratoire de Biologie Médicale (LBM) de l'Institut Pasteur de Dakar (IPD).

**Méthodologie:** Notre étude a porté sur Cinquante (50) souches de Kp BLSE. Après extraction des ADN, des amorces spécifiques des gènes *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qepA* et *aac(6')Ib* ont été utilisés pour l'amplification par la technique de la PCR en point finale. Des gènes de résistance ont été identifiés et révélés par électrophorèse sur gel d'agarose.

**Résultats :** Les gènes plasmidiques *aac(6')-Ib* et *qnrB* ont été les gènes majoritairement détectés au cours de notre étude respectivement chez (88% ; 44/50), (82% ; 41/50). Le gène *qnrS* a été détecté chez (02% ; 1/50) des isolats. Les gènes chromosomiques *gyrA*, *parC* et *parE* ont été détectés respectivement chez (02%, 02% et 06%) des souches. Les gènes *gyrB*, *qnrA*, *qnrC*, *qnrD* et *qepA* n'ont pas été détectés.

**Conclusion :** Afin de remédier à cette résistance croissante et inquiétante des Kp aux FQ, des actions rapides doivent être entreprises comme la réglementation de la consommation abusive des FQ, l'amélioration de l'hygiène hospitalière, la recherche d'autres alternatives thérapeutiques et l'adaptation des algorithmes d'antibiothérapie en fonction de l'écologie bactérienne. Des études ultérieures avec des méthodes de diagnostic moléculaires plus poussées seront d'une grande utilité.

**Mots clés :** *Klebsiella pneumoniae*, Résistance, Fluoroquinolones, PCR.

## Summary

**Introduction:** Fluoroquinolones (FQs) are the first choice in the empirical treatment of urinary tract infections (UTIs) in which *Klebsiella pneumoniae* (Kp) comes second in terms of frequency of involvement. We are witnessing a worrying increase in the resistance of Kp to FQ. This resistance is achieved through chromosomal mutations and the acquisition and expression of plasmid genes.

**Objective:** The objective of our study was to characterize FQ-resistant genes of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) -producing Kp strains isolated in urine at the Institut Pasteur's Laboratory of Medical Biology of Dakar.

**Methodology:** Our study focused on fifty (50) strains of Kp ESBL. After extraction of the DNAs, primers specific for the *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qepA* and *aac (6') Ib* genes were used for the amplification by the final point PCR technique. Resistance genes were identified and revealed by agarose gel electrophoresis.

**Results:** The plasmid genes *aac (6') - Ib* and *qnrB* were the mainly genes detected during our study in (88%, 44/50), (82%, 41/50) respectively. The *qnrS* gene was detected in (02%, 1/50) isolates. The chromosomal genes *gyrA*, *parC* and *parE* were each detected respectively in (02%, 02% and 06%) of the strains. The genes *gyrB*, *qnrA*, *qnrC*, *qnrD* and *qepA* were not detected.

**Conclusion:** In order to remedy this increasing and worrying resistance of Kp to FQ, rapid actions must be undertaken such as the regulation of FQ abuse, the improvement of hospital hygiene, the search for other therapeutic alternatives and adaptation and the antibiotic algorithms based on bacterial ecology. Further studies with more advanced molecular diagnostic methods will be of great value.

**Key words:** *Klebsiella pneumoniae*, Resistance, Fluoroquinolones, PCR.

