

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie-Microbiologie



Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Option : **Microbiologie Appliquée**

Thème

Etude de comportement d'*Escherichia coli* vis-à-vis des antibiotiques, responsable d'infection du tractus urinaire au niveau de l'EPH de Larbaa Nath Irathen.

Réalisé par :

M^r. AZZOUZ Lyes

Encadré par :

Mr. MEDJKOUN. N

Soutenu devant le jury composé de :

Président : Mr. SEBBANE. H

Maitre-assistant classe (A), UMMTO

Examineurs : Mme HELLAL. Z

Maitre-assistante classe (A), UMMTO

Mr MOUALEK. I

Maitre-assistant classe (B), UMMTO

Promotion : 2014-2015

REMERCIEMENTS

Au terme de notre travail ;

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères et les plus profonds tout d'abord au bon Dieu éternel le plus puissant.

Mes remerciements s'adressent également à :

*J'adresse ma profonde gratitude à Monsieur **MEDJKOUN N**, Maitre-assistant classe (A) à l'université MOULOUD MAMMERI de Tizi Ouzou, d'avoir accepté la charge de m'encadrer. Je vous remercie vivement pour ton aide précieuse, pour tes conseils éclairés au long de ce travail et pour la qualité de ton encadrement si sérieux. C'était vraiment un très grand plaisir de travailler avec vous.*

A tout le personnel de Laboratoire Central de Microbiologie Médicale du CHU Mustapha- Alger, Merci pour votre aide et votre soutien durant ce moment.

Au personnel du Laboratoire Central de Biologie de l'EPH de Larbaa Nath Irathen.

*J'adresse mes vifs remerciements à Monsieur **SEBBANE H**, Maitre-assistant classe (A) à l'université MOULOUD MAMMERI de Tizi Ouzou. Vous me faites le grand honneur d'avoir accepté de présider ce jury.*

*J'adresse mes sincères remerciements à Madame **HELLAL Z**, Maitre-assistante classe (A) à l'université MOULOUD MAMMERI de Tizi Ouzou. Je vous remercie de m'honorer par votre présence en tant qu'examinatrice et pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire.*

*J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur **MOUALEK I**, Maitre-assistant classe (B) à l'université MOULOUD MAMMERI de Tizi Ouzou. Je vous remercie de m'honorer par votre présence en tant qu'examineur et pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire.*

*J'aimerais remercier beaucoup **Dr BACHTARZI**, Maitre-assistant en Microbiologie clinique au Laboratoire Central de Microbiologie du CHU Mustapha Pacha-Alger, qu'il m'a conseillé, aidé avec patience, merci pour votre sympathie.*

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à toute personne qui a participé de près ou de loin à l'accomplissement de ce modeste travail.

Dédicaces

Ce modeste travail, achevé avec l'aide de L'ETERNEL, DIEU le tout puissant,

" Je ne te laisserai point et je ne t'abandonnerai point ".

Je le dédie à toutes les personnes que j'aime :

A mes très chers parents« symbole de reconnaissance ».

Maman, Si je t'appelle affectueusement " mon bijou " c'est parce que tu l'es pour moi.

Merci maman pour ta patience, ta rigueur et la sévérité avec laquelle tu nous as éduqués. Je reste fasciné par ta forte personnalité et ton savoir-faire.

Certes on ne choisit pas ses parents mais s'il fallait le faire, je vous aurais choisi toi et papa.

A mes frères : Djamal et Malik dit : Zino

***In Memoriam : A MES GRANDS PARENTS PATERNELS ET A MON GRAND PERE
MATERNEL***

Je vous dédie ce modeste travail en regrettant que vous ne puissiez être avec nous, mais sachez que nous vous aimons et que vous resterez toujours vivants dans nos cœurs.

Que Dieu vous garde en sa sainte miséricorde.

A ma grande mère adorée OUIZA GUERS, Dieu vous guérisse "AMEN"

A mes amis de laboratoire central de Biologie de l'EPH de Larbaa Nath Irathen

A mon meilleur ami MOH ZIANI de la promotion Master Contrôle de Qualité et Analyse

A tous mes amis de la promotion Microbiologie Appliquée 2014/2015.

Lyes Maestro

Glossaire

Immunocompétent

C'est un organisme au système immunitaire normal.

Immunosuppression

Déficit immunitaire.

Morbidité

Nombre de personnes souffrant d'une maladie donnée pendant un temps donné, en général une année, dans une population.

Mortalité

Nombre de décès rapporté dans une population pour un temps donné.

Prophylactique

Qui préserve la santé de tout ce qui pourrait lui être nuisible.

SOMMAIRE

Introduction 1

PREMIERE PARTIE : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Généralités sur les infections nosocomiales

1. Historique 2
2. Définition de l'infection nosocomiale 2
3. Epidémiologie des infections nosocomiales 3
4. Physiopathologie de l'infection nosocomiale 4
4.1. Origines des infections nosocomiales 4
4.2. Mécanismes et voies de transmission 4
4.2.1. Auto-infection 4
4.2.2. Hétéro-infection 4
4.2.3. Xéno-infection 5
4.2.4. Exo-infection 5
5. Fréquence des infections nosocomiales 5
6. Facteurs de risque des infections nosocomiales 5

Chapitre 2 : Infection du tractus urinaire

1. Définition 7
2. Classification des infections du tractus urinaire 7
2.1. Infection urinaire basse 7
2.1.1. Cystite 7
2.1.2. Prostatite 7
2.2. Infection urinaire haute 7
2.2.1. Pyélonéphrite 7
2.2.2. Tuberculose urinaire 8
3. Germes rencontrés dans les infections du tractus urinaire 8
4. Pénétration du milieu urinaire par la bactérie 8
4.1. Voie ascendante 8
4.2. Voie hématogène 9
4.3. Voie lymphatique 9
5. Facteurs favorisant l'infection urinaire 9
5.1. Age et sexe 9
5.2. Facteurs liés à la bactérie elle-même 9

5.3.Facteurs liés au terrain.....	10
6. Les facteurs de défense de l'hôte	10
6.1.Anatomie de l'appareil urinaire.....	10
6.2.Les facteurs physicochimiques.....	10
6.3.La composante mécanique	10

Chapitre 3 : *Escherichia coli*

1. Introduction	11
2. Taxonomie.....	11
3. Habitat	11
4. Généralités.....	12
5. Caractères structuraux	12
6. Principaux caractères bactériologiques	14
7. Pouvoir pathogène.....	14
8. Pathogénie d' <i>Escherichia coli</i>	14
8.1.Facteurs de virulence membranaire.....	15
8.2.Facteurs de virulence sécrétés	18
8.2.1. Facteurs de virulence sécrétés via le système de sécrétion de type III (T3SS).....	18
9. Génome d' <i>Escherichia coli</i>	19

Chapitre 4 : *E. coli* et les antibiotiques

1. Définition des antibiotiques	21
2. Etude des antibiotiques in vitro	21
2.1.La concentration minimale inhibitrice (CMI)	21
2.2.La concentration minimale bactéricide (CMB).....	21
3. Classification des antibiotiques selon le site d'action	21
3.1.Les antibiotiques agissant sur la paroi bactérienne	21
3.1.1. Les - lactamines.....	21
3.1.2. Autres antibiotiques agissant sur la paroi bactérienne	22
3.2.Les antibiotiques agissant sur la membrane cytoplasmique.....	22
3.3.Les antibiotiques agissant sur les acides nucléiques	22
3.3.1. Les quinolones.....	22
3.3.2. Les rifamycines	22

3.4.Les antibiotiques agissant sur la synthèse protéique	23
3.4.1. Les aminosides	23
3.4.2. Les tétracyclines	23
3.4.3. Les macrolides.....	23
3.4.4. Les chloramphénicols.....	23
4. Définition de la résistance	24
5. Bases génétiques de la résistance	24
5.1.Résistance naturelle.....	24
5.2.Résistance acquise.....	24
5.3.La multirésistance	25
5.3.1. La multirésistance naturelle.....	25
5.3.2. La multirésistance acquise.....	25
6. Mécanismes généraux de la résistance	25
6.1.Défaut d'affinité	25
6.2.Modification enzymatique.....	25
6.3.Phénomène d'imperméabilité membranaire.....	26
6.4.Résistance par efflux	26
7. Comportement d' <i>Escherichia coli</i> vis-à-vis des antibiotiques.....	26
7.1.Comportement d' <i>Escherichia coli</i> vis-à-vis des -lactamines.....	26
7.2.Comportement d' <i>Escherichia. coli</i> vis-à-vis des aminosides	27
7.3.Comportement d' <i>Escherichia coli</i> vis-à-vis des fluoroquinolones	27
7.4.Comportement d' <i>Escherichia coli</i> vis-à-vis des autres antibiotiques	27

DEUXIEME PARTIE : PARTIE PRATIQUE

Matériel et méthodes

1. Matériel	30
2. Méthodes	30
2.1.Prélèvement des urines.....	30
2.2.Etude macroscopique	31
2.3.Etude microscopique	31
2.3.1. Etat frais	31
2.3.2. La Coloration de Gram.....	31
2.4.Diagnostic bactériologique.....	32

2.4.1. Isolement	33
2.4.2. Identification	33
2.4.2.1. Tests biochimiques	33
2.5. Antibiogramme par diffusion sur milieu solide	40

Résultats et interprétations

1. Résultats de l'étude microscopique	43
1.1 Etat frais	43
1.2 Coloration de Gram	43
2. Résultats du diagnostic bactériologique	43
2.1. Isolement	43
2.2. Identification	46
2.2.1. Tests biochimiques	46
2.3 La place d' <i>E. coli</i> dans l'EPH de Larbaa Nath Irathen	47
2.4 Répartition chronologique des souches d' <i>E. coli</i> isolées dans les différents services	48
2.5 Antibiogramme par diffusion sur milieu solide	49

Conclusion.....	52
------------------------	-----------

Références bibliographiques	53
--	-----------

Annexes

Résumé

L'hygiène hospitalière a pour but de prévenir la survenue des infections urinaires vu qu'il ne sera jamais possible de réduire à zéro ce risque à l'hôpital.

Les bacilles à Gram négatif fermentaires tel qu'*Escherichia coli*, une bactérie pathogène, opportuniste, ubiquitaire et responsable d'infections nosocomiales occupent une place importante.

La fréquence élevée de ce germe au niveau de l'hôpital est due à sa multirésistance aux antibiotiques et de sa non exigence aux conditions du milieu.

Les statistiques réalisées durant notre étude ont portée sur l'année 2015, montrent que les souches d'*Escherichia coli* sont moins multirésistantes que celles d'autres Entérobactéries.

Mots-Clés: infections nosocomiales, infection de tractus urinaire, *Escherichia coli*, antibiorésistance.

Abstract

Hospital hygiene in order to prevent the occurrence of NI for knowing it will never be possible to reduce to zero the risk to the hospital.

The bacilli Gram-negative fermenters such as *Escherichia coli* is a bacterial pathogen, opportunistic, ubiquitous and responsible of nosocomial infections occupy an important place.

The high frequency of this organism at the hospital is due to its multiple antibiotic resistance and its non requirement to environmental conditions.

The statistics made during our study that were given the years from 2015 show that strains multiresistant *Escherichia coli* are less than those of other Enterobacteria.

Keywords: Nosocomial infection, urinary tract infection, *Escherichia coli*, antibiotic resistance.

Abréviations

AAC : aminoside N-acétyl transférase

ANT : aminoside nucléotidyl transférase

APH: aminoside Phospho transférase

ATB : Antibiotique

CDC: Centers of Disease Control

CLIN : comité de lutte contre les infections nosocomiales

IAS : infection associée aux soins

IN : infection nosocomiale

ITU : infection de tractus urinaire

NNIS : National Nosocomial Infection Surveillance Study

Omp F : Outer membrane protein F

Opm C : Outer membrane protein C

pH : potentiel d'Hydrogène

Liste des Tableaux

Tableau I 1 et I 2 : les phénotypes de résistance d' <i>Escherichia coli</i> aux β -lactamines	28
Tableau II : les principaux mécanismes de résistance d' <i>Escherichia coli</i> aux aminosides.....	29
Tableau III : liste des antibiotiques à tester pour l' <i>Escherichia coli</i>	41
Tableau IV : les caractéristiques biochimiques des souches communes d' <i>E. coli</i>	46
Tableau V : les caractéristiques biochimiques des souches communes d' <i>E. coli</i>	46
Tableau VI : les caractéristiques biochimiques des souches communes d' <i>E. coli</i>	47

Liste des Figures

Figure 1 : La paroi d' <i>E. coli</i>	13
Figure 2 : Facteurs de virulence d' <i>E. coli</i>	15
Figure 3 : Structure et assemblage d'un flagelle bactérien	16
Figure 4 : Structure du Pilus de type P d' <i>E. coli</i>	16
Figure 5 : Structure de LPS.....	17
Figure 6 : Système de sécrétion de type III.....	18
Figure 7 : Le génome d' <i>E. coli</i>	19
Figure 8 : Les différents modes d'action des antibiotiques sur les bactéries	24
Figure 9 : Galerie API 20E avant ensemencement	34
Figure 10 : Souche de référence d'un phénotype sauvage d' <i>E. coli</i>	42
Figure 11 : Souche de référence d' <i>Escherichia coli</i> multirésistant.....	42
Figure 12 : <i>E. coli</i> sous microscope optique après coloration de Gram (G×1000).....	43
Figure 13 : Les différents aspects macroscopiques des colonies d' <i>E. coli</i> isolées sur les différents milieux solides.	44
Figure 14 : Pourcentage d' <i>E. coli</i> retrouvé durant notre période d'étude.	47
Figure 15 : Répartition des souches d' <i>E. coli</i> isolées selon les services (%).....	48
Figure 16 : Répartition des souches d' <i>E. coli</i> selon la résistance aux β -lactamines (%).....	49
Figure 17 : Répartition des souches d' <i>E. coli</i> selon la résistance aux aminosides, aux quinolones et autres ATB (%).....	50

Introduction

Le développement de la médecine moderne est associé actuellement à l'apparition de nombreuses pathologies iatrogènes souvent liées à la difficulté d'améliorer simultanément la qualité de toutes les procédures de soins, ce qui explique l'augmentation du taux d'infection au niveau des hôpitaux.

Les infections nosocomiales (IN) constituent un important problème de santé public s'exprimant en termes de morbidité et de mortalité. Ces infections sont dues à la flore hospitalière qui est dominée par les bactéries Gram négatif (60%) parmi laquelle figure *Escherichia coli* (PEBRET, 2003).

Le caractère nosocomial des infections à *E. coli* rend indispensable le suivi de la diffusion des souches à l'hôpital. Cette bactérie est résistante à de nombreux agents antimicrobiens (antibiotiques (ATB) et antiseptiques); elle se montre particulièrement virulente chez les patients aux défenses immunitaires altérées (VEDEL, 1999) et responsable de divers infections notamment les infections du tractus urinaire.

Vue la gravité des infections nosocomiales à *E. coli* dans les divers services hospitaliers et leur impact sur les patients, nous sommes amenées durant notre étude pratique allant de mars à juin 2015 au sein du laboratoire central de Biologie du l'EPH frère HADEBI de Larbaa Nath Irathen à :

- Déterminer la place qu'occupe *E. coli* parmi les autres germes impliqués dans les infections urinaires.
- Etudier le comportement d'*E. coli* vis-à-vis de certains ATB (souches de l'année 2015).

Chapitre 1

1. Historique

Les infections hospitalières existent depuis la création des hôpitaux.

En XVIII^e siècle, l'Ecossais John Pringle (1707-1782) réalisait les premières observations sur les « infections acquises à l'hôpital » et introduisait de grandes réformes sanitaires dans les hôpitaux militaires.

En 1788, Tenon (1724-1816) se préoccupait dans ses *Mémoires sur les hôpitaux de Paris* des « fièvres des hôpitaux » et il prônait pour les combattre, la mise en place de mesures effectives d'hygiène hospitalière (HYGIS, 1998).

Plus tard, en 1874 Louis Pasteur déclarait devant l'Académie des Sciences : « Si j'avais l'honneur d'être un chirurgien, jamais je n'introduirais dans le corps de l'homme un instrument quelconque sans l'avoir fait passer dans l'eau bouillante ou mieux encore dans la flamme ». Il faut dire ici que les propos ne furent pas entendus, comme il l'aurait souhaité, par les chirurgiens de l'époque.

Il aura fallu le drame du sang contaminé, en France, pour que les établissements de santé publics et privés (ceux participant au service public hospitalier) soient tenus réglementairement, en 1988, de constituer un *Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales* (CLIN).

En 2003, Jean-François Mattei a proposé, dans ce cadre, qu'il faudrait « inciter tous les établissements à mieux connaître leurs taux d'infection pour améliorer leur pratique et à mieux diffuser l'information dans le cadre de contrats de transparence, y compris avec les usages » (ELLENBERG, 2005).

2. Définition de l'infection nosocomiale

Dérivé du grec NOSOKOMEONE qui veut dire « Hôpital », l'infection urinaire est une infection contractée dans un établissement de soin, absente lors de l'admission du patient ; elle peut concerner le malade en cours de l'hospitalisation ou le personnel soignant du fait de son activité. Un délai d'au moins 48 heures après l'admission (ou un délai supérieur à la période d'incubation lorsque celle-ci est connue) est communément acceptée pour séparer une infection d'acquisition d'une infection urinaire (VEYSSIER *et al.*, 1998).

L'étiologie de ces infections est attribuée à de très nombreux micro-organismes, incluant les champignons, les parasites, les virus et les bactéries. Cependant, ces dernières sont à l'origine de près de 90% de ces infections (BILLIARD *et al.*, 2008).

Les infections urinaires sont nombreuses et polymorphes, tant par leur localisation que par leur gravité. Elles représentent en particulier la principale cause de morbidité en chirurgie.

Parmi les différents types d'infections urinaires, outre les infections urinaires (en général 40% des infections urinaires), les pneumonies (20%), les infections des plaies opératoires (IPO) (15%), les infections sur cathéters intraveineux (15%), on retrouve les bactériémies primaires (5-10%) et d'autres types d'infections (5%) (PEBRET, 2003).

Pour développer une infection urinaire, il faut que trois éléments soient réunis :

- Un agent infectieux ;
- Un mode de transmission ;
- Un sujet réceptif.

3. Epidémiologie des infections nosocomiales

Les infections urinaires sont reconnues comme un problème majeur de santé public de par leur fréquence, leur coût, leur gravité. Le risque de contracter une infection à l'hôpital est de 7%. Ce chiffre varie en fonction du service dont lequel la personne hospitalisée se trouve. Il peut en effet atteindre 30% dans un service comme la réanimation (PEBRET, 2003).

Aux Etats-Unis le taux global d'infections urinaires est au tour de 5% ; le projet *National Nosocomial Infection Surveillance Study* (NNIS) a permis de connaître la répartition du taux d'infections urinaires dans ce pays, ainsi on note par ordre de fréquence que l'infection de tractus urinaire représente 40% des cas suivie des pneumopathies 20%, les infections du site opératoire (ISO) 17% et les infections sur cathéters est de 5%.

En Europe, la prévalence des infections urinaires varie de 6.1% à 12.1% (ASTAGNEU et BRUCKER, 1999).

En Algérie SOUKEHAL *et al.* (1998), ont effectué une surveillance des infections urinaires dans le CHU de Béni Messous ; sur 222 malades hospitalisés, 80 infections urinaires pour 46 malades infectés ont été retrouvés, soit une incidence $20.7\% \pm 5.43\%$.

4. Physiopathologie de l'infection nosocomiale

Tout sujet entrant à l'hôpital est porteur des flores commensales ou pathologiques qui constituent sa parasitocénose. Au cours de son séjour à l'hôpital ses flores vont changer recevant des apports d'autres patients, du personnel soignant ou de l'environnement hospitalier.

En dehors de toute infection, l'hospitalisation suffit à modifier l'environnement microbien immédiat du malade que constituent ses flores cutanées, digestives, respiratoires... Lui-même apporte ses germes pathogènes ou non, les dissémine autour de lui et participe à la biocénose microbienne hospitalière, dont il est un membre actif (PEBRET, 2003).

4.1. Origines des infections nosocomiales

Toute personne ou tout matériel qui franchit les portes d'un service de soin induit à l'introduction des germes.

Ainsi, quand le patient est infecté par ces propres germes, à la faveur d'un acte invasif et/ou en raison d'une fragilité particulière, cela lui provoque une infection dite endogène. Cette dernière est à l'origine de la majorité des infections hospitalières. Ceci, contrairement à l'infection exogène qui est associée à la colonisation, éventuellement suivie d'infection du patient par des bactéries extérieures, provenant d'autres malades ou de l'environnement. (CICCOTTI, 2007).

4.2. Mécanismes et voies de transmission

Il existe quatre grands modes de transmission :

4.2.1. Auto-infection

Le malade s'infecte avec ses propres germes qui sont ceux de la peau, des muqueuses, du tractus digestif, etc... Les portes d'entrée de ces germes sont les lésions des muqueuses, les lésions cutanées (plaies, brûlures, maladie de la peau) (CICCOTTI, 2007).

4.2.2. Hétéro-infection

Dans ce cas, le germe responsable de l'infection souvent manuportée par le personnel soignant intervenant auprès de plusieurs patients, disséminant ainsi les germes d'une personne à une autre. Ces infections sont dites « croisées ». C'est le mode de contamination le plus fréquemment retrouvé lors d'épidémies (HYGIS, 1998).

4.2.3. Xéno-infection

Ce mode de transmission est peu à part, dans ce cas les agents pathogènes sont transmis par des personnes venant de l'extérieur (personnel soignant, visiteurs, sous-traitants) et présentant eux-mêmes une pathologie infectieuse, déclarée ou en cours d'incubation. Ce mode de transmission n'est cependant pas à négliger, car il peut être dévastateur pour les patients particulièrement fragiles (CICCOTTI, 2007).

4.2.4. Exo-infection

Cette forme étiologique survient suite à des erreurs techniques qui mettent en contact le malade et les germes pathogènes, alors que toutes les précautions sont censés être prises pour les en protéger ; une stérilisation inefficace, une ventilation stérile défectueuse, une eau polluée, peuvent en être la cause (LAVERAN, 1998).

5. Fréquence des infections nosocomiales

La fréquence des infections varie selon :

- Le type des soins prodigués (plus élevée dans les services de soins intensifs, de réanimation) ;
- La durée de l'hospitalisation (plus élevée dans les services de long séjour et de rééducation fonctionnelle en raison de la présence d'escarres, de sondes vésicales à demeure, qui les favorisent) ;
- La vulnérabilité des sujets (maladies aiguës graves, organisme fragilisé par le grand âge ou l'enfance, un cancer, l'alcoolisme chronique, l'immunosuppression liée au sida, aux chimiothérapies anticancéreuses ou aux greffes d'organes) (PEBRET, 2003).

6. Facteurs de risque des infections nosocomiales

Les facteurs de risque des infections urinaires sont multiples et en constante évolution. Aujourd'hui, l'hôpital soigne des malades de plus en plus fragiles, exécute des actes chirurgicaux de plus en plus hardis et utilise des techniques de soins de plus en plus lourdes et invasives qui sont autant de portes d'entrée à l'infection (ABBASSI *et al.*, 2006).

Le risque infectieux est en fonction de plusieurs facteurs dont on évoquera les plus prépondérants :

- Manque d'hygiène ;
- Mobilité et entassement des patients ;
- La pression thérapeutique exercée par les antibiotiques ;
- Les interventions chirurgicales : utilisation de corps étrangers (cathéters intraveineux, greffes...)
- Brûlures et autres traumatismes ;
- Facteurs liés à l'hôte : âge (nouveaux nés, prématurés, vieillards), obésité, malnutrition (ABBASSI *et al.*, 2006).
- Facteurs métaboliques : diabète, insuffisance rénale ;
- La concentration importante des germes en milieu hospitalier ;
- La virulence des micro-organismes ;
- La durée de l'hospitalisation ;
- Le traitement par des immunosuppresseurs, corticoïdes, antibiotiques ;
- La présence de patients contaminés ou infectés par un germe nosocomial (CICCOTTI, 2007).

Chapitre 2

1. Définition

Le terme « infection urinaire », désigne un groupe hétérogène de situations qui ont comme caractéristique commune la présence de bactéries en quantité significative dans les urines. C'est l'agression d'un tissu par un ou plusieurs micro-organismes, générant une réponse inflammatoire, des signes et symptômes de nature et d'intensité variables selon le terrain.

Elle associe au moins un des signes ou symptômes suivants :

- Une fièvre (> 38°C), pollakiurie, brûlures mictionnelles ou douleur lombaire ;
- Une uroculture positive c'est-à-dire : une bactériurie supérieure ou égale à 10^5 germes/ml associée à une leucocyturie d'au moins 10^4 leucocytes/ml (FOXMAN *et al.*, 2001).

2. Classification des infections du tractus urinaire

On classe les infections du tractus urinaire selon leur localisation :

2.1. Infection urinaire basse

2.1.1. Cystite

La cystite touche environ 5% des femmes en période d'activité génitale, mais aussi chez les femmes ménopausées. Dans la cystite aiguë de la femme, on rencontre *E. coli* dans 80 à 90% des cas, *Proteus mirabilis* dans 10% des cas, on peut rencontrer mais plus rarement *Citrobacter* et *Klebsiella* (BRUYERE *et al.*, 2008).

2.1.2. Prostatite

L'infection urinaire chez l'homme est liée dans plus de 90% des cas à une cause sous-jacente dont la prostatite est l'une des plus fréquentes. Les bactéries rencontrées peuvent être : Colibacille, *Proteus*, *Klebsiella*, *Staphylocoque doré*. (BRUYERE *et al.*, 2010).

2.2. Infection urinaire haute

2.2.1. Pyélonéphrite

C'est une inflammation du parenchyme rénal et des cavités excrétrices, initiée par un agent microbien, en général : on trouve *E. coli*, *Proteus* et rarement *Staphylocoque doré*. Il y'a apparition chez le sujet infecté des anticorps sériques et sécrétaires dirigés contre le germe responsable de l'infection (BRUYERE *et al.*, 2009).

2.2.2. Tuberculose urinaire

C'est une maladie touchant au début un seul rein. Chez l'homme, elle se manifeste avec des douleurs testiculaires épидидymites, rarement avec une atteinte prostatique ; chez la femme, elle se manifeste avec l'endométrite et des douleurs pelviennes diffuses (BOILLOT, 2003).

3. Germes rencontrés dans les infections du tractus urinaire

La flore hospitalière est composée de germes présents dans l'environnement (sol, objets, eau...), de ceux apportés par les patients, le personnel soignant et les visiteurs ; chez qui, ils peuvent provenir de la flore cutanée, respiratoire ou digestive (LE HEURT *et al.*, 1998).

Ces germes, qui peuvent être des commensaux, des parasites et éventuellement des pathogènes, subissent des pressions thérapeutiques ou prophylactiques qui vont les remanier et leur donner une spécificité propre à l'environnement hospitalier (LE MINOR et VERON, 1989).

Statistiquement, les germes les plus qualifiés des infections du tractus urinaire sont les Entérobactéries multirésistantes (*Proteus, Klebsiella...*), *Escherichia coli* (qui est l'objectif de notre étude), ainsi que d'autres Gram⁺ (*S. aureus...*).

Les virus et les champignons peuvent aussi être à l'origine des infections du tractus urinaire, cependant ces infections sont moins nombreuses que celles causées par les bactéries (CICCOTTI, 2007).

4. Pénétration du milieu urinaire par la bactérie

Pour pénétrer l'arbre urinaire, la bactérie peut emprunter trois voies :

- la voie ascendante ;
- la voie hématogène ;
- la voie lymphatique.

4.1. Voie ascendante

C'est la voie de pénétration la plus fréquente. Le germe colonise successivement les régions périnéales, vulvo-vaginales, urétrales et remontent à la vessie, aboutissant au haut appareil urinaire.

La longueur de l'urètre masculin et les sécrétions prostatiques acides douées d'un pouvoir bactéricide protège les hommes des infections du tractus urinaire, alors que la brièveté anatomique de l'urètre féminin explique au moins en partie la prédominance des infections du tractus urinaire chez la femme (CHAMPETIER *et al.*, 1998).

4.2.Voie hématogène

Elle est rare. C'est l'ensemencement « primitif » de la vessie par la voie sanguine, Le germe présent dans le sang lors d'état de septicémie ou de bactériémie colonisant le rein lors de la filtration glomérulaire. *E. coli* est moins fréquent de la voie hématogène, (HANNE-DOUCHE,2000).

4.3.Voie lymphatique

C'est une voie controversée pour *E. coli*. La présence des voies pathogènes lymphatiques possibles entre le colon et le rein est suggérée par les faits expérimentaux. Cependant, il n'existe pas de preuves expérimentales formelles. (BAMBA MAMADOU *et al.*, 2003).

5. Facteurs favorisant l'infection urinaire

La prolifération de la bactérie au sein du milieu urinaire est favorisée par divers facteurs.

5.1.Age et sexe

Chez l'homme, l'apparition des maladies de la prostate favorise la stase urinaire et donc la prolifération des bactéries. Chez la femme, l'anatomie du petit bassin (la proximité de l'anus, du vagin et la brièveté de l'urètre) est un facteur favorisant. De plus, certaines périodes de la vie comme la ménopause ou la grossesse, par modification du statut hormonal (MARIANI-KURKDJIAN, 2004).

5.2.Facteurs liés à la bactérie elle-même

Il s'agit d'un phénomène d'adhérence bactérienne qui intervient dans la colonisation des muqueuses aussi bien par les germes pathogènes que par les saprophytes. Cette adhérence peut être non spécifique c'est-à-dire provoquée par des interactions hydrophobes et/ou électrostatiques.

Quand elle est spécifique, elle dépend des récepteurs de surface situés sur les cellules urothéliales et les facteurs spécifiques à chaque bactérie (MARIANI-KURKDJIAN, 2004).

5.3.Facteurs liés au terrain

- Diabète : la glycosurie est un milieu favorable à la culture de la bactérie ;
- Vieillard : du fait de la baisse des mécanismes immunitaires de défense liée à l'âge avancé ;
- Grossesse : Constitue un obstacle urinaire du fait de la compression qu'elle entraîne.

Par ailleurs, au cours de cette période, on note une augmentation du pH au-dessus de 5, ce qui favorise la prolifération de la bactérie.

- Immunodépression : Liée à la corticothérapie, au VIH, aux cancers et/ou traitements immunosuppresseurs, augmente la fréquence et la gravité de l'infection urinaire ; (DWYER *et al.*, 2002).

6. Les facteurs de défense de l'hôte

6.1.Anatomie de l'appareil urinaire

L'appareil urinaire est divisé en deux. Il comprend en effet le bas appareil, composé de l'urètre et de la vessie, et le haut appareil urinaire, composé des uretères et des reins. L'urètre est le premier obstacle à l'invasion des bactéries.

Sa longueur plus grande chez l'homme, explique aussi la moindre fréquence des infections urinaires dans le sexe masculin

De plus, le système anti-reflux entre le rein et la vessie, limite la progression des bactéries vers le haut appareil et donc le risque de pyélonéphrite (HANNEDOUCHE, 2000).

6.2.Les facteurs physicochimiques

L'activité antimicrobienne des urines est liée à plusieurs facteurs :

Le pH acide des urines et la concentration en urée ; ou par la sécrétion d'anticorps ; aussi que chez l'homme, le liquide prostatique possède également un pouvoir bactériostatique (MARIANI-KURKDJIAN, 2004).

6.3.La composante mécanique

Une diurèse fréquente et une vidange vésicale complète aident à lutter contre les infections urinaires en éliminant les bactéries dans le flux urinaire (CARON, 2003).

Chapitre 3

1. Introduction

Découverte en 1885 par Théodore Escherich, *Escherichia coli* est une entérobactérie retrouvée en abondance dans la flore commensale humaine, en particulier dans le tube digestif de l'homme qu'elle colonise dès les premières heures de la naissance. Elle constitue l'espèce dominante de la flore aérobie anaéro-tolérante. (AHOYO *et al.*, 2007).

E. coli est aussi à l'origine d'infections communautaires et hospitalières. C'est l'un des germes le plus fréquent des infections néonatales (QUINET *et al.*, 2010), et en particulier les méningites ou les septicémies néonatales. Ce colibacille se présente sous forme de bâtonnet. (VERHAEGEN. 2004).

Elle est une cause fréquente de bactériémie (MELZER et PETERSEN, 2007). Elle provoque 40% à 50% de toutes les infections nosocomiales. (VERHAEGEN, 2004). L'infection urinaire est considérée comme une infection grave chez le nouveau-né, Le germe le plus fréquemment en cause est l'*E. coli* (60 %) (ATMANI *et al.*, 2007).

2. Généralités

E. coli autrement connu sous le nom de colibacille a été choisi comme modèle bactérien dans le cadre de notre étude.

Le genre *Escherichia* appartient à la famille des Enterobacteriaceae qui regroupe des espèces fréquemment isolées du tube digestif. Cette famille regroupe des bacilles droits à Gram négatif, non acido-résistants, mesurant de 0,3 µm à 1,0 µm de diamètre sur 2,0 µm à 6,0 µm de long. Non sporulé, non encapsulé, il possède une ciliature péritriche pour l'espèce mobile. Il est chimio-organotrophe, aéro-anaérobie facultatif, et possède à la fois un métabolisme respiratoire et fermentatif.

En effet, l'ancienneté de sa découverte et sa culture aisée division cellulaire toutes les 20 minutes à 37 °C dans un milieu riche.

Ce colibacille est capable de croître sur des milieux ordinaires à base de peptone ou d'extraits de viande et non halophile (JOLY et REYNAUD, 2002).

3. Habitat

E. coli est une entérobactérie faisant partie de la flore commensale de l'homme et des animaux à sang chaud. Cet organisme colonise généralement le tractus gastro-intestinal infantile de manière asymptomatique dans les premières heures de la vie et représente par la

suite près de 80% de la flore colique anaérobie facultative humaine (VERNOZY et MONTET,2001).

Le germe se trouve dans les matières fécales. De là, il se répand dans la nature : sol et eaux. Sa présence dans le milieu environnant signe toujours une contamination fécale (PEIFFER ,2008).

4. Taxonomie

Selon BERGEY *et al.* (1974) de 9^{ème} édition du BERGEY'S Manual of determinative bacteriology, *E. coli* est classé comme suit :

Taxonomie d'*E. coli*

Règne : Bacteria

Embranchement : Procaryotae

Division : Proteobacteria

Classe : Gammaproteobacteria

Ordre : Enterobacteriales

Famille : Enterobacteriaceae

Genre : *Escherichia*

Espèce : *coli*

5. Caractères structuraux

La paroi bactérienne d'*E. coli* est typique des bactéries à Gram négatif, composée d'une grande variété de molécules aux fonctions multiples (figure 1).

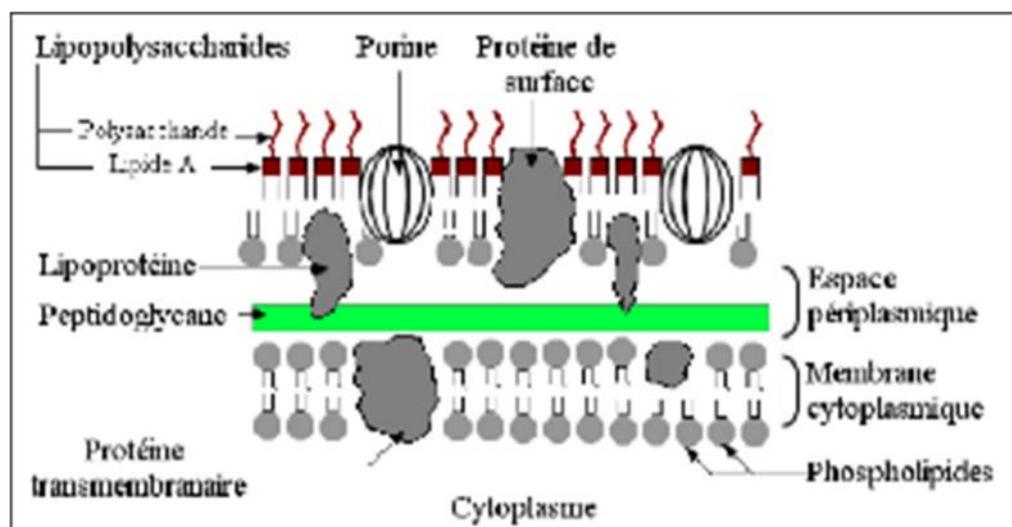


Figure 1 : La paroi d'*E. coli* (LAVIGNE *et al.*, 2007).

La paroi du colibacille est mince par rapport à celle d'une bactérie Gram positif ; elle a une structure stratifiée plus complexe. En plus de la couche fine de peptidoglycane adjacente à la membrane plasmique et qui ne constitue que 5% à 10% du poids de la paroi ; cette paroi est constituée de trois structures polymériques externes ou reliées au peptidoglycane, on distingue :

La membrane externe : qui est constituée d'une bicouche phospholipidique épaisse d'environ 7 à 8 nanomètre où s'insèrent de nombreuses protéines intrinsèques telles que les porines (OmpF et OmpC) qui permettent le passage de petits solutés et de molécules hydrophiles, la lipoprotéine de Braun qui est plus abondante attachée par des liaisons covalentes au peptidoglycane et enfouie dans la membrane externe par son extrémité hydrophobe (AVRIL *et al.*, 2000).

La membrane externe est formée aussi du lipopolysaccharide (LPS) qui a un rôle antigénique et qui est également appelé endotoxine du fait qu'il est fortement lié à la surface cellulaire et n'est libéré qu'après la lyse de la cellule. Il est constitué du lipide A du polysaccharide qui est lui-même composé du core o et de la chaîne latérale.

L'espace périplasmique : cet espace est compris entre les deux membranes (externe et interne), c'est un espace de stockage d'enzymes et de nutriments participants à la synthèse des protéines (CHOMARAT *et al.*, 2004). Il contient une couche mince de peptidoglycane qui confère une rigidité à la paroi d'*E. coli* ainsi que la lipoprotéine de Braun qui permet de relier la membrane externe à la couche fine du peptidoglycane.

La membrane plasmique : contient de nombreux complexes protéiques d'une importance vitale pour l'*E. coli* (comme l'ATP synthase) qui ont des rôles prépondérants dans le métabolisme bactérien (AVRIL *et al.*, 2000).

6. Principaux caractères bactériologiques

Les *E. coli* ont une morphologie habituellement typique, sous forme de bacilles à Gram négatif de 2 à 3 µm de long sur 0,5 µm de large, généralement polymorphes. Ils possèdent des caractères biochimiques particuliers permettant de le différencier des autres espèces (GRINIONT, 1987). Les principaux caractères sont: absence de production d'oxydase, absence d'uréase, fermentation du lactose, production d'indole, absence de croissance sur le citrate et pas de production de H₂S (MINOR et RICHARD, 1993).

La plupart des souches d'*E. coli* se multiplient rapidement (18 à 24 h) sur les milieux habituels. Les colonies ont en moyenne 2 mm de diamètre, elles sont rondes, plates et à bords réguliers.

Ce sont des bactéries mésophiles : la température optimale de croissance est de 37°C et le potentiel d'Hydrogène (pH) optimal est de 7,2 - 7,4. La limite de croissance inférieure se situe aux environs de 7°C (HANES et NONTYPHOID, 2003).

7. Pouvoir pathogène

E. coli est une espèce bactérienne très diverse. Elle regroupe des souches commensales de l'intestin de l'homme et des animaux, des souches responsables de pathologies intestinales et des souches impliquées dans plusieurs infections extra-intestinales importantes de l'homme.

Il est le plus fréquemment impliqué dans les infections urinaires acquises en ville (NEUZILLET *et al.*, 2012). Il est également responsable d'infections nosocomiales, notamment des infections des plaies chirurgicales et des bactériémies (ALAIN et BERNARD, 2002).

8. Pathogénie d'*Escherichia coli*

La pathogénie d'*E. coli* est liée à la production de nombreux facteurs de virulence membranaires et extracellulaires et qui sont des molécules qui lui permettent de survivre, de coloniser et de se multiplier dans différents microenvironnements, ainsi que l'envahissement des tissus de l'hôte (Figure 2) (KADRI *et al.*, 2010).

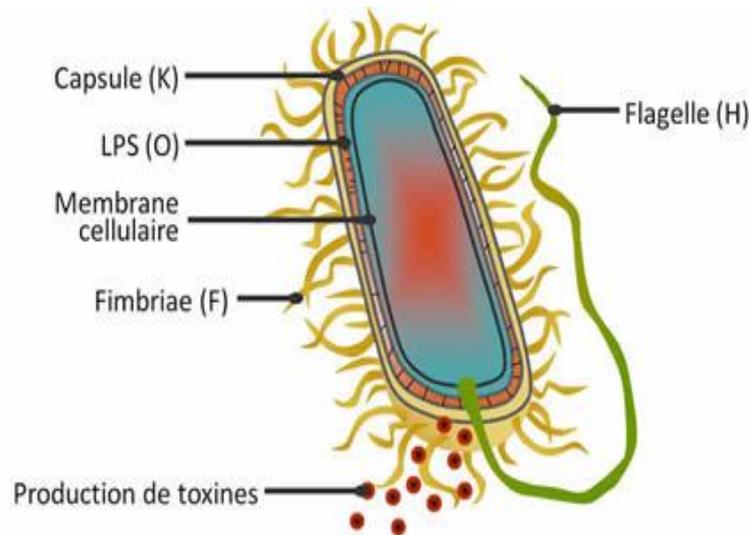


Figure 2 : Facteurs de virulence d'*Escherichia coli*

(HOLZAPFEL *et al.*, 1998).

8.1.Facteurs de virulence membranaire

Parmi les facteurs membranaires, on cite le flagelle, le facteur d'adhésion (pili de type P), le lipopolysaccharide (LPS) et la porine Omp F, et l'OmpC.

Le flagelle : *E. coli* dispose d'une dizaine de flagelles qui tournent comme une hélice de bateau ce qui assure la motilité bactérienne (KADRI *et al.*, 2010). La flagelline est la principale protéine constitutive du flagelle, elle joue un rôle important dans l'induction de la réponse inflammatoire de l'hôte (SZABO, 2003). Le flagelle s'agrandit par l'addition de sous-unités de flagelline à l'extrémité la plus éloignée du corps cellulaire. Ces sous-unités diffusent à travers le domaine creux du flagelle, atteignant ainsi son extrémité. Le flagelle bactérien se compose de trois parties : le filament, le crochet, et le corps basal (Figure 3).

Les pili : *Escherichia coli* possède des pili qui sont impliqués dans la motilité bactérienne. Les pili de type P (figure 4), par leurs propriétés rétractiles, permettant à *E. coli* d'envahir les surfaces hydratées et de coloniser rapidement le tubule rénal. Le pilus facilite aussi l'adhésion bactérienne aux cellules urothéliales du tractus urinaire en se liant au mono-mannose glycosphingolipides et globoseries qui sont indispensables à la virulence d'*E. coli* (XIANG-QI MU, 2006).

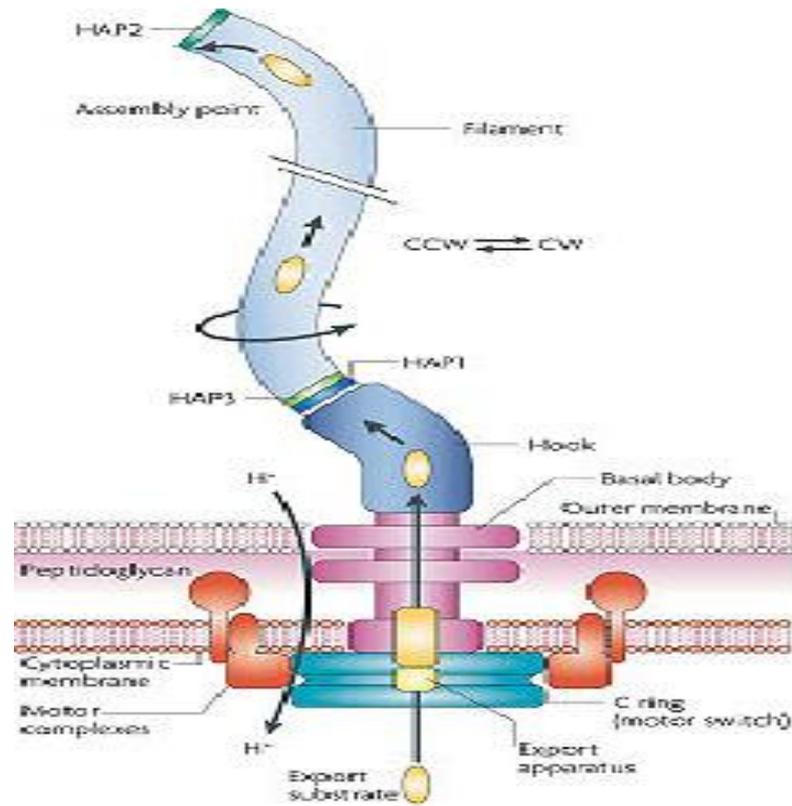


Figure 3 : Structure et assemblage d'un flagelle d'*Escherichia coli*

(JARRELL et MCBRIDE, 2008).

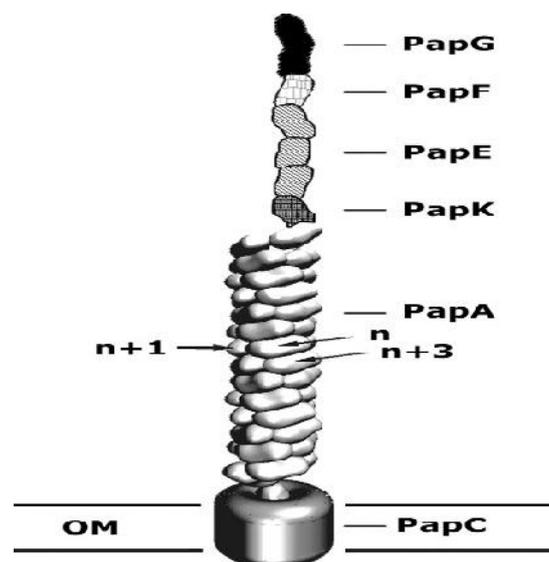


Figure 4 : Structure du Pilus de type P d'*Escherichia coli*

(XIANG-QI MU et ESTHER BULLITT, 2006).

Le LPS : c'est un composant essentiel de la paroi bactérienne d'*E. coli*. Il est constitué de deux parties (Figure 5) :

Lipide A : c'est un polymère glycolipidique composé d'unités disaccharidiques de glucosamine reliées entre elles par des ponts pyrophosphates auxquelles sont rattachés de longues chaînes d'acides gras. Il permet l'ancrage de la structure dans la membrane externe et possède des propriétés toxiques correspondant à l'endotoxine des bactéries Gram négatif responsable d'une stimulation excessive du système immunitaire pouvant provoquer un choc septique et conduire à la mort (GILGENKRANTZ, 2005).

Le polysaccharide : il est composé d'un core oligosaccharidique et de la chaîne latérale polysaccharidique qui porte l'antigène-O. La variabilité de ce dernier est responsable de la spécificité antigénique O au sein d'une même espèce bactérienne.

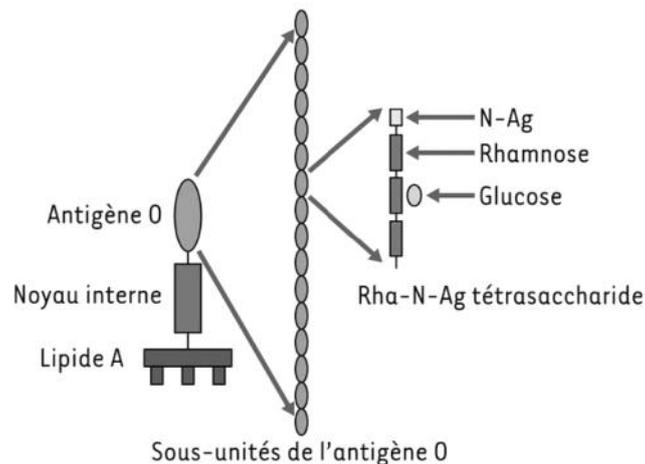


Figure 5 : Structure du LPS
(GILGENKRANTZ, 2005).

Les protéines Omp F et Omp C:

Les porines OmpF et OmpC trimères de la membrane d'*E. coli*. Sont les protéines -baril ayant des canaux étroits qui traversent chaque monomère qui excluent les molécules > 600 Dalton (Da) ; tandis que la médiation de la diffusion passive de nutriments et de petits métabolites à travers la membrane externe. La protéine soluble (> 6 kDa) est délivrée à travers la lumière de ces porines (COWAN *et al.*, 1995).

Après la liaison au récepteur de la vitamine B12 dans *Escherichia coli* à haute affinité, la bactériocine ColE9 recrute OmpF ou OmpC utilisant un domaine de translocation intrinsèquement non structurés pour délivrer un épitope vers le périplasma où elle déclenche l'entrée de la toxine. Les deux partagent les OBS même site de liaison sur OmpF et que la colicine doit abriter, au moins un d'entre eux, pour une activité antibiotique.

Enfin, la structure du complexe OmpF-OBS1 qui montre la colicine liée dans la lumière couvrant la porine de la membrane bicouche (HOUSDEN *et al.*, 2010).

8.2. Facteurs de virulence sécrétés

8.2.1. Facteurs de virulence sécrétés via le système de sécrétion de type III (T3SS)

E. coli utilise un système de sécrétion de type III qui est un déterminant majeur de la virulence et permet à la bactérie d'injecter ses toxines directement dans la cellule hôte. Les protéines sécrétées via le système de sécrétion de type III (ainsi que via le système de sécrétion de type I sont transloquées à travers les deux membranes de l'enveloppe cellulaire en une seule étape sans intermédiaire périplasmique (Figure 6) (BURKINSHAW *et al.*, 2015).

Ce système de sécrétion provoque des infections aiguës et nécessite le contact des pili bactériens à la cellule épithéliale pour être activée.

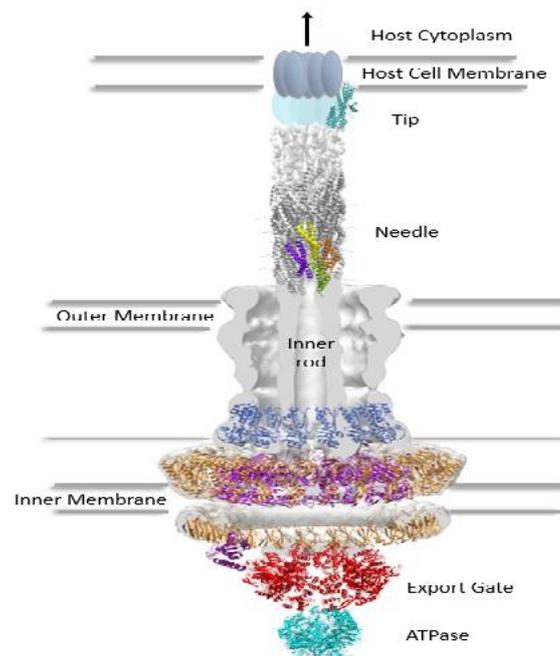


Figure 6 : Système de sécrétion de type III
(BURKINSHAW *et al.*, 2015).

9. Génome d'*Escherichia coli*

Le génome d'*E. coli* K-12 a été complètement séquencé en 1997. Ce génome englobe 4,6 millions de paires de bases codant environ 4 200 protéines. Il contient 466 potentiels cadres de lecture ouverts, dont 187(40%) ont déjà été signalés, 105(23%) sont homologues à d'autres gènes connus, 103(22%) sont identiques à gènes hypothétiques. Ses propriétés de mobilité, son implication dans le métabolisme par différents systèmes, son pourcentage élevé de gènes régulateurs ainsi que la multitude de ses systèmes de transport confèrent à *E. coli* une grande variabilité. Seuls 30 gènes, dont les fonctions sont impliquées dans la biosynthèse des polysaccharides comme les composants de membranes externes.

Un nombre important de gènes d'*E. coli* sont impliqués dans la régulation et les fonctions métaboliques. Cette diversité lui confère la capacité d'utiliser comme source de carbone un grand nombre de composés organiques et de se maintenir dans de nombreuses niches écologiques (BLATTNER *et al.*, 1997).

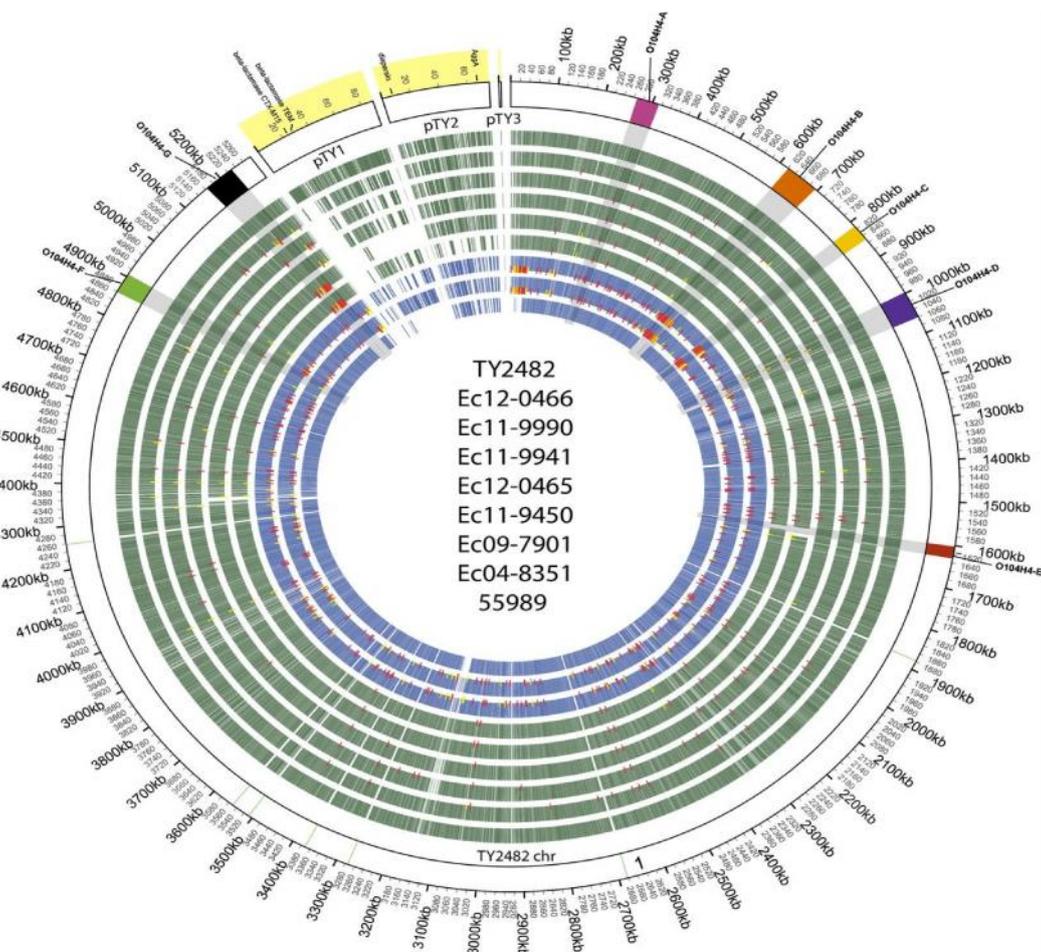


Figure 7 : Le génome d'*Escherichia coli*

(BLATTNER *et al.*, 1997).

Le génome d'*E. coli* est divisé en arcs représentant la séquence du chromosome et les trois plasmides de l'isolat de référence TY2482. L'anneau extérieur montre les coordonnées de séquences de référence, avec les régions jaunes-ombragées représentant les échafaudages plasmidiques.

Les prophages sont indiqués dans les boîtes de couleur (code de couleur correspond à celle de la figure 7), ainsi les ARNr sont en vert clair. Les protéines intrinsèquement non structurées (PINS) sont identifiées comme les tiques rouges et jaunes, avec un codage représentant rouge et jaune non codante (HAYASHI *et al.*, 2006).

Chapitre 4

1. Définition des antibiotiques

En 1994 WAKSMAN définit les antibiotiques comme « toute substance chimique produite par un micro-organisme, champignon ou bactérie pouvant inhiber la croissance ou détruire d'autres micro-organismes » (in JOLY, 1989). Cette définition est aujourd'hui trop restrictive et doit être abandonnée car des antibiotiques peuvent être obtenus par synthèse ou par héli-synthèse. Un antibiotique est donc actuellement défini comme une substance, d'origine biologique ou synthétique agissant spécifiquement sur une étape essentielle du métabolisme des bactéries (SINGLETON, 2005).

2. Etude des antibiotiques in vitro

2.1.La concentration minimale inhibitrice (CMI)

C'est la plus faible concentration d'ATB pour laquelle il n'y a pas de croissance visible après 18 heures de culture à 37°C. La CMI peut être influencée par la taille de l'inoculum bactérien, l'état du milieu (solide ou liquide) et son pH (MOUTON *et al*, 2000).

2.2.La concentration minimale bactéricide (CMB)

Elle est définie comme étant la plus faible concentration d'ATB permettant une réduction de nombre de survivants de la population d'une souche bactérienne au moins égale à 100 survivants/ ml sur 1.000.000 de bactériesensemencées /ml, c'est-à-dire 1 survivant sur 10.000 bactéries de l'inoculum après 18 heures de culture à 37°C de cette souche en présence d'ATB (COHEN et JACQUOT, 2008).

Lorsqu'un ATB a une CMB proche de la CMI, on dit qu'il est bactéricide et lorsque la CMB est beaucoup plus élevée que la CMI on dit qu'il est bactériostatique (COHEN et JACQUOT, 2008).

3. Classification des antibiotiques selon le site d'action (figure 8)

3.1.Les antibiotiques agissant sur la paroi bactérienne

3.1.1. Les -lactamines

Ce sont des inhibiteurs efficaces de la synthèse de la paroi des cellules en croissance (SINGLETON, 2005). Un dispositif important de la synthèse de la paroi cellulaire est l'action de la transpeptidase qui a comme rôle la formation de la liaison entre deux chaînes de peptidoglycane. Du fait que ces transpeptidases sont capables de se fixer à la pénicilline, elles sont appelées PLP et elles perdent leur activité catalytique. En outre, le complexe PLP-pénicilline stimule la production d'autolysines qui digèrent la paroi cellulaire, cela amène

la lyse de la cellule due à la différence de pression osmotique entre l'intérieur et l'extérieur de la bactérie (MADIGAN et MATINKO, 2007), ce qui signifie que ces ATB sont bactéricides (MOUTON *et al*, 2000). Les β -lactamines sont inhibées par l'acide clavulanique qui est un inhibiteur puissant et irréversible, ce qui, a fait qu'on emploie en association avec des pénicillines classiques telle que l'amoxicilline (PATRICK, 2003).

3.1.2. Autres antibiotiques agissant sur la paroi bactérienne

Il existe d'autres ATB qui agissent sur la synthèse du peptidoglycane tels que les glycopeptides (la vancomycine) qui se fixe de manière non covalente sur la partie D-Ala-D-Ala terminale des peptides impliqués dans la phase de polymérisation du peptidoglycane. De ce fait, la polymérisation est inhibée (LOUM, 2005).

3.2. Les antibiotiques agissant sur la membrane cytoplasmique

Les polymyxines de la famille des polypeptides, sont formés de dix acides aminés. Ce sont des ATB qui ont un effet bactéricide ; ils agissent grâce à leur combinaison avec les lipopolysaccharides et les phospholipides en désorganisant ainsi la structure de la membrane et de fait, l'augmentation de la perméabilité de la membrane cytoplasmique. Les lésions produites occasionnent des modifications morphologiques telles que la formation des vésicules au niveau de la membrane externe des bactéries Gram négatif. La membrane cytoplasmique est ensuite atteinte, ce qui entraîne la sortie des constituants intracellulaires et éclatement de la cellule bactérienne (SINGLETON, 2005).

3.3. Les antibiotiques agissant sur les acides nucléiques

3.3.1. Les quinolones

Elles ont une structure générale dérivant de l'acide di-hydro 1,4 oxo-4-quinoléine carboxylique (YALA et MERAD, 2001). Leurs cibles incluent la sous unité A de la gyrase et la topoisomérase N. Leur liaison à la gyrase inhibe l'activité normale de l'enzyme et de la réplication de l'ADN (SINGLETON, 2005).

3.3.2. Les rifamycines

Elles sont constituées d'un noyau macrocycle et d'un cycle aromatique. Ces ATB se lient à la sous unité B de l'ARN polymérase ADN dépendant et inhibent l'initiation de la transcription (YALA et MERAD, 2001).

3.4. Les antibiotiques agissant sur la synthèse protéique

3.4.1. Les aminosides

Ils sont constitués d'un enchainement de sucres aminés reliés entre eux par des ponts osidiques (COHEN et JACQUOT, 2008).

Les aminosides se fixent sur l'ARN ribosomal 16S constituant de la sous-unité 30S, ce qui induit à un changement morphologique de l'ensemble du ribosome et altération de toutes les étapes de la synthèse protéique normale (initiation, élongation, terminaison). Ils occasionnent de nombreuses erreurs de lecture du code génétique provoquant ainsi l'incorporation d'acides aminés qui ne correspondent pas à l'information des codons de l'ARNm. Certains aminosides peuvent se fixer sur plusieurs sites du ribosome (CHOMARAT *et al*, 2004) et sont donc des ATB bactéricides (MOUTON *et al*, 2000).

3.4.2. Les tétracyclines

Ces ATB possèdent un squelette commun : quatre cycles hexagonaux accolés pour former un tétra cycle (KEZZAL, 1993). Ils inhibent la synthèse des protéines en se liant aux ribosomes et en inhibant la fixation des aminoacyl-ARNt au site ribosomique A (BRYSKIER, 1997), ce sont des ATB bactériostatiques (MOUTON *et al*, 2000).

3.4.3. Les macrolides

La molécule est faite d'un grand anneau lactone substitué par un ou plusieurs sucres aminés. Un macrolide important tel que l'érythromycine qui est constitué d'un anneau de 14 atomes liés à de cladinose et à la desosamine (SINGLETON, 2005). Ils inhibent la translocation et bloquent le transfert des acides aminés sur la chaîne peptidique (CHOMARAT *et al*, 2004), ce sont des ATB bactériostatiques (MOUTON *et al*, 2000).

3.4.4. Les chloramphénicols

Sa molécule comporte un noyau nitrobenzène et deux atomes de chlore. On distingue le chloramphénicol et le thiamphénicol (KEZZAL, 1993). Ils inhibent la peptidyltransférase et empêchent la liaison normale de l' aminoacyl-ARNt au site ribosomique A. Ceci a pour conséquence une inhibition de la synthèse des protéines (SINGLETON, 2005), ce qui les classe dans les ATB bactériostatiques (MOUTON *et al*, 2000).

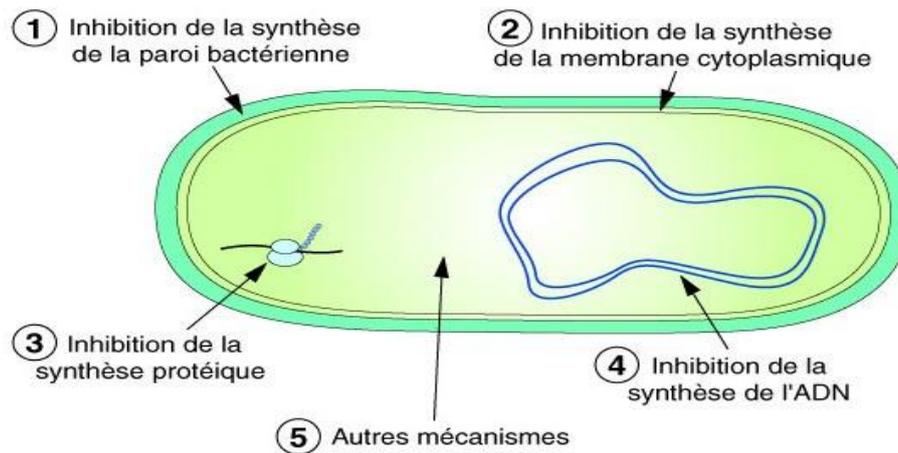


Figure 8 : Les différents modes d'actions des antibiotiques sur les bactéries.

(CHOPRA *et al.*, 2008).

4. Définition de la résistance

Un micro-organisme est dit résistant lorsqu'il est capable de se développer en présence d'un taux d'ATB significativement plus élevé que celui qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce (JONES, 2001).

5. Bases génétiques de la résistance

La résistance bactérienne à un ATB est d'origine génétique. Les gènes de résistance se trouvent soit dans le chromosome (résistance chromosomique), soit dans un élément mobile, comme les plasmides, les éléments transposables ou les intégrons (résistance extra-chromosomique) (CARLE, 2009).

5.1. Résistance naturelle

Elle fait partie du patrimoine génétique habituel de l'espèce, elle est donc présente chez toutes les souches appartenant à la même espèce et contribue à définir le spectre antibactérien (YAMASHITA *et al.*, 2000).

5.2. Résistance acquise

Elle est due à une modification du capital génétique de la souche qui est normalement sensible à un ATB mais par la suite est devenue résistante. Cette modification résulte d'une mutation chromosomique ou bien de l'acquisition de matériel génétique exogène soit par conjugaison, transduction, transformation, ou bien par des transposons ou intégrons (PATRICK, 2003).

5.3. La multirésistance

La multirésistance aux ATB résulte en général de l'association de différents mécanismes de résistance. Ce phénomène peut être inné ou acquis dans une bactérie.

5.3.1. La multirésistance naturelle

La multirésistance d'*E. coli* est liée en grande partie à la très faible perméabilité de sa paroi, à la production d'une céphalosporinase inductible, aux phénomènes d'efflux actifs et enfin à la mauvaise affinité de la cible (ADN gyrase). Lorsque ces mécanismes agissent en synergie, ils confèrent une résistance aux β -lactamines, aux chloramphénicol cycliques et aux quinolones (JARLIER *et al.*, 1996).

5.3.2. La multirésistance acquise

La multirésistance acquise s'exprime chez les souches portant un plasmide. Il est fréquent d'observer des mécanismes de résistance acquise avec des supports génétiques différents réunis dans la même souche comme c'est le cas d'*E. coli* qui présente une résistance aux aminosides (type plasmidique), aux sulfamides et à l'imipénème (par mutation) (JARLIER *et al.*, 1996).

6. Mécanismes généraux de la résistance

Il y'a quatre mécanismes qui permettent à *E. coli* de résister aux ATB.

6.1. Défaut d'affinité

Après la pénétration cellulaire de l'ATB, il existe une étape de reconnaissance de la cible. C'est à ce niveau qu'intervient ce type de résistance. Il s'agit soit d'une résistance naturelle avec la mauvaise affinité de certains ATB pour les cibles, soit d'une résistance acquise avec modification des cibles et perte d'affinité des ATB pour ces cibles (GAUDY et BUXERAUD, 2005). A titre d'exemple, on citera la modification des PLP qui sont des enzymes qui catalysent l'étape finale de la biosynthèse du peptidoglycane et qui sont les cibles des β -lactamines (LOZNIEWSKI et RABAUD, 2010).

6.2. Modification enzymatique

Pour que l'ATB soit actif, il doit arriver intact à sa cible (GAUDY et BUXERAUD, 2005). L'inactivation se traduit par la perte d'affinité de l'ATB pour sa cible ; cette inactivation peut être extracellulaire (les pénicillines et le chloramphénicol sont inactivés dans le milieu de culture par les enzymes sécrétées hors de la bactérie ; par contre les aminosides

sont inactivés dans le cytoplasme de la bactérie par des enzymes qui demeurent intracellulaires comme c'est le cas d'*E. coli* (BEJOT, 2011).

6.3. Phénomène d'imperméabilité membranaire

Les ATB qui agissent sur les bactéries Gram négatif doivent au moins franchir la membrane externe. Cette bicouche lipidique est peu perméable aux molécules hydrophiles et non perméable aux molécules hydrophobes telles que la pénicilline G, les macrolides et les glycopeptides (GAUDY et BUXERAUD, 2005).

La résistance acquise à l'imipénème retrouvée chez *E. coli* est liée à une diminution de la perméabilité par une déficience au niveau de la protéine de la paroi (OmpC) (BINGEN, 2010). L'expression de cette résistance est accompagnée d'une production élevée d'une céphalosporinase (JARLIER *et al.*, 1996).

6.4. Résistance par efflux

Le système d'efflux est un mécanisme de transport actif membranaire lié à la synthèse des protéines transmembranaires. Il a un rôle clé dans la physiologie bactérienne par la préservation de l'équilibre physicochimique du milieu intracellulaire en s'opposant à l'accumulation de substances naturelles ou synthétiques toxiques dans le cytoplasme de la bactérie (CATTOIR, 2009).

Lorsque ce phénomène d'efflux actif s'exprime chez les souches d'*E. coli*, il confère un faible niveau de résistance à la norfloxacine, aux chloramphénicol, et aux -lactamines (TEYSSON *et al.*, 1995).

7. Comportement d'*Escherichia coli* vis-à-vis des antibiotiques

7.1. Comportement d'*Escherichia coli* vis-à-vis des -lactamines

Phénotype sauvage

E. coli produit naturellement une céphalosporinase (AmpC) synthétisée à un niveau relativement faible. La résistance chez *E. coli* peut être associée à l'acquisition d'un gène AmpC transférable sur un plasmide ou autres éléments transférables (porteur de promoteur fort) (MAMMERI *et al.*, 2008). Les céphalosporinases plasmidiques retrouvées chez *E. coli* sont de type CMY2, CMY-8b (SINGTOHIN *et al.*, 2010). Il résiste naturellement aux pénicillines G et M, aux aminopénicillines, aux céphalosporines de 1^{ère} et 2^{ème} génération ainsi à certains céphalosporines de 3^{ème} génération (JEHL *et al.*, 2003).

Phénotypes résistants

Les différents phénotypes qui existent pour *E. coli* sont résumés dans le tableau I₁ et I₂.

7.2. Comportement d'*Escherichia coli* vis-à-vis des aminosides

E. coli est naturellement résistant à la gentamicine et à la streptomycine grâce à son imperméabilité membranaire. Les phénotypes sont générés dans la grande majorité des cas par les enzymes de modification et sont conditionnés par leur spécificité de substrat. Les trois classes d'enzymes modificatrices des aminosides sont impliquées. La distribution de ces enzymes est globalement très spécifique en fonction des bactéries à Gram positif et des bactéries à Gram négatif (LAMBERT *et al.*, 2006).

Phénotype résistants

D'après JEHL (2003), la résistance est acquise chez *E. coli* suite à :

La production d'enzymes de modification des aminosides (AAC, ANT, APH), ou à une absorption réduite ou diminution de la perméabilité cellulaire (résistance non enzymatique), et à l'association des deux mécanismes précédents (voir tableau II).

7.3. Comportement d'*Escherichia coli* vis-à-vis des fluoroquinolones

E. coli présente une résistance à l'égard des quinolones anciennes. Cependant, il reste toujours sensible aux nouvelles quinolones telles que la ciprofloxacine, la pefloxacine et l'ofloxacine (CHOMARAT *et al.*, 2004).

La résistance acquise peut survenir selon trois mécanismes :

La modification de l'affinité de la cible ; les troubles de la perméabilité ; ainsi que l'efflux actif.

7.4. Comportement d'*Escherichia coli* vis-à-vis des autres antibiotiques

La résistance à la fosfomycine est de plus en plus fréquente ; elle est en effet constatée chez 70% à 80% des souches. Cette résistance est liée à des mutations qui affectent les mécanismes de transport actif (PHILLIPPON et GUILLAUME, 1998).

L'imperméabilité des *E. coli* quand elle est associée avec les phénomènes d'efflux actif, conférant une résistance aux tétracyclines et aux chloramphénicols (CHOMARAT *et al.*, 2004).

Tableau I 1 : les phénotypes de résistance d'*E. coli* aux β -lactamines(JEHL *et al.*, 2003).

Antibiotiques	Phénotype sauvage	PBN	PHN
Amino Pénicilline	S	R	R
Amino Pénicilline + IBL	S	S	I/R
Carboxy Pénicilline	S	R	R
CSP I	S	I	I/R
CSP II	S	S	S/R
CSP III	S	S	S
CSP III + IBL	S	S	S
Céphamycines	S	S	S

PBN :pénicillinase bas niveau ;**PHN** : pénicillinase haut niveau.**Tableau I 2**: les phénotypes de résistance d'*E. coli* aux β -lactamines(JEHL *et al.*, 2003).

Antibiotiques	CSPnase	TRI	BLSE	CHN
Amino Pénicilline	R	R	R	R
Amino Pénicilline + IBL	R	R	R	R
Carboxy Pénicilline	S	R	R	R
CSP I	R	S	R	R
CSP II	S	S	R	R
CSP III	S	S	R	R
CSP III + IBL	S	S	S	R
CSP à large spectre	S	S	R	S

TRI : TEM résistantes aux inhibiteurs ;**BLSE** : β -lactamase à spectre élargi ;**CHN** : Carbapénèmase haut niveau.

Tableau II: les principaux mécanismes de résistance d'*E. coli* aux aminosides(JEHL *et al.*, 2003).

Mécanismes	Aminoglycosides concernés
AAC(3).I	Gm ;
AAC(3).VI	Gm, TM ;
ANT (4').II	Akn, TM, Isp ;
AAC(3).IV	Gm, TM, Net ;
ANT (2'').I	Gm, TM ;
AAC (6').I	Akn, Net, TM ;
AAC(3).II	Gm, Net, TM ;
Non enzymatique + AAC (6').I	Gm, Akn, Net, TM, Isp.

Gm : gentamicine ; **Akn** : amikacine ; **Net** : nétilmicine ; **TM** : tobramycine ;

Isp : Isépamycine.

PARTIE PRATIQUE

Matériel et méthodes

Notre étude pratique réalisée au niveau du laboratoire central de Biologie du l'EPH de Larbaa Nath Irathen, durant une période de 4 mois allant de mars à Juin 2015, a consisté :

- Isoler 14 souches d'*E. coli* à partir de prélèvements des urines de malades hospitalisés (de Mars à juin 2015) ;
- déterminer les profils de résistance aux antibiotiques d'une collection de souches d'*E. coli* hospitalières.

1. Matériel

Nous avons eu à utiliser le matériel habituellement employé dans un laboratoire de Microbiologie (Voire annexe N° 1)

2. Méthodes

Le protocole suivi pour l'isolement et l'identification de l'*E. coli* est décrit comme suit.

2.1. Prélèvement des urines

Le prélèvement urinaire est un temps essentiel de l'ECBU. Il doit s'effectuer avec beaucoup de soin car il conditionne la qualité de l'analyse et son résultat. Habituellement, les urines sont recueillies de préférence le matin ou après avoir séjourné au moins 3 heures dans la vessie.

En cas de prise d'antibiotiques, il faut attendre 3 jours après l'arrêt du traitement.

Après avoir lavé les mains au savon, on fait une toilette soignée avec une lingette pour usage intime. On ouvre le pot en posant le couvercle avec la canule vers le haut ; on élimine le premier jet, puis on recueille les urines directement dans le pot.

Le prélèvement est amené le plus tôt possible au laboratoire sinon conservé à +4°C sans dépasser 4 heures. Une fois le prélèvement urinaire arrivé au laboratoire, on procède à un ensemble de manipulation.

2.2. Etude macroscopique :

Elle est effectuée dès la réception des échantillons urinaires. On notera la couleur des urines et surtout l'aspect turbidimétrique. Ainsi une urine claire est considérée d'aspect normal ; par contre une urine légèrement trouble est considérée d'aspect anormal. On notera également après centrifugation des urines, pendant 3 minutes à 2000 tours/min, l'importance du culot qui peut être nul, faible ou important.

Cet examen va être complété par la détermination du pH urinaire. Elle se fait sur papier pH dont la gamme s'échelonne de 1 à 10. Au contact des urines, la couleur du papier sera modifiée et indiquera ainsi la valeur du pH. Les urines seront dites acides, neutres ou alcalines.

2.3. Etude microscopique

Les examens microscopiques des prélèvements d'urines peuvent fournir des informations très précieuses pour le diagnostic et le traitement d'une infection. Dans tous les cas, ils orientent le diagnostic, le choix des milieux de culture et les conditions d'incubation.

2.3.1. Etat frais

C'est un examen microscopique direct qui permet d'évaluer qualitativement et quantitativement la réaction inflammatoire (polynucléaires, les hématies, les cellules épithéliales), ainsi que la présence d'une flore microbienne responsable de l'infection, et sa mobilité.

À partir de l'urine préalablement centrifugée, on dépose une goutte de la suspension entre lame et lamelle, puis on observe au grossissement 400.

Lecture

La présence des polynucléaires nous renseigne sur la présence d'une réaction immunitaire qui est un signe d'une infection.

2.3.2. La Coloration de Gram

La coloration de Gram doit son nom au bactériologiste Danois *Hans Christian Gram* en 1884. Elle permet d'identifier et de classer les bactéries en Gram positif (qui apparaissent en violet) et en Gram négatif (qui apparaissent en rose) (MINOR et RICHARD, 1993).

Elle est basée sur les propriétés de la paroi bactérienne (structure et composition chimique) qui distinguent les bactéries Gram positif dotées d'une simple paroi avec une couche épaisse de peptidoglycane, qui ont la capacité de retenir un complexe de violet de Gentiane-iode lorsqu'elles sont soumises à une action décolorante rapide de l'alcool, contrairement aux bactéries Gram négatif composées d'une fine couche de peptidoglycane et d'une membrane externe qui ne retiennent pas le colorant et peuvent être contre-colorées ensuite avec un autre colorant de couleur différente (la fuchsine).

Préparation du frottis :

Prélèvement : à partir de la culture pure, on met une suspension sur une lame de verre préalablement dégraissée, puis on étale notre souche bactérienne en une couche mince et homogène ;

Séchage : on sèche le frottis par passage au-dessus de la flamme du bec bunsen ;

Fixation : on fixe le frottis par la chaleur par passage 3 à 4 fois dans la flamme.

Pour réaliser ensuite la coloration de Gram, on suit le protocole suivant :

On recouvre le frottis fixé et refroidi de violet de Gentiane et on le laisse agir une minute puis on rejette le colorant ; on recouvre avec du Lugol (fixateur), le laisser agir une minute ; la lame est ensuite tenue inclinée pour être décolorée à l'alcool. La durée de la décoloration est variable selon l'épaisseur du frottis (généralement 30sec) ; on rince à l'eau du robinet ; on recouvre la lame de fuchsine diluée à 1/10 ; on laisse agir pendant une minute, puis on rince à l'eau du robinet et on la sèche ; ensuite on observe à l'immersion au grossissement 1000.

Lecture

Apparition de la couleur violette, cela signifie que c'est une bactérie à Gram positif, ou apparition de la couleur rose signifie une bactérie à Gram négatif.

2.4.Diagnostic bactériologique

Le diagnostic bactériologique est un ensemble de moyens permettant de confirmer telle ou telle étiologie infectieuse d'origine bactérienne. Ces moyens diagnostiques sont variés et caractérisent par la mise en évidence de la bactérie elle-même, donc finalement de sa culture ou de son isolement qui permettra l'identification ainsi que de préciser sa sensibilité aux antibiotiques.

2.4.1. Isolement

L'isolement d'*E. coli* se fait par ensemencement sur différents milieux : gélose nutritive (GN), gélose au sang cuit (GSC), gélose au sang frais (CSF), milieu Hektoen, et milieu au pourpre de Bromocrésol (BCP).

Les boîtes contenant les milieux solides sont ensemencées par la méthode des quadrants puis incubées à 37°C pendant 24 heures.

2.4.2. Identification

L'identification permet en premier lieu de reconnaître les colonies d'*E. coli* selon leurs caractéristiques morphologiques et culturales, puis on procède à des tests biochimiques qui seront réalisés sur une galerie API 20E.

2.4.2.1. Tests biochimiques

L'aspect microscopique et les caractéristiques des colonies ne suffisent pas pour identifier de façon précise les bactéries. Il faut rechercher d'autres caractères, principalement les caractères biochimiques ou métaboliques. Lorsque le germe est obtenu en culture pure, on le réensemence sur divers milieux d'identification qui permettent d'étudier son équipement enzymatique.

Dans notre étude, les tests biochimiques ont été réalisés sur une galerie API 20E.

Cette dernière permet de mettre en évidence plusieurs caractères tels que : l'ADH, urée, ONPG, H₂S, indole, gélatine, production de gaz ainsi que la fermentation des glucides (glucose, arabinose, mannose...) (figure 9).

On prépare une suspension mère en prélevant à l'aide d'une pipette Pasteur stérile quelques colonies bien isolées d'*E. coli* à partir d'une boîte de Pétri positive ; puis on ensemence dans un tube à visse stérile contenant de l'eau physiologique stérile.

La suspension bactérienne bien homogénéisée doit présenter une opacité équivalente à 0,5 Mac Ferland (MF).

Une réaction positive se traduit par un virage de la couleur du milieu ou par la présence d'un trouble soit spontanément après incubation, ou après addition d'un ou de plusieurs réactifs. La lecture des réactions se fait à l'aide du tableau de lecture (voir annexe N°6) et l'identification est obtenue à l'aide d'un catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.

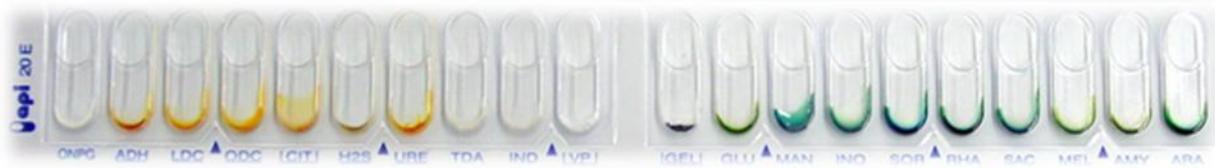


Figure 9: Une galerie API 20E avant ensemencement.

Recherche de l'oxydase

Ce test consiste en la mise en évidence d'une enzyme appelée : oxydase qui a la propriété de catalyser la réaction d'oxydo-réduction par le transfert d'électrons sur la chaîne de cytochrome vers un accepteur final qui est l'oxygène de l'air (germe aéro-anaérobie). On dit qu'une bactérie est oxydase positive si un fragment de culture est capable d'oxyder la forme réduite de dérivés N-méthyles du paraphénylènediamine en semi-quinone (de couleur violette).

La recherche de l'oxydase est un test fondamental pour orienter l'identification du coccobacille. Le chlorhydrate ou le N-diméthylparaphénylène diamine (PDA) est utilisé comme réactif, généralement imprégnés sur des disques (disques oxydases). Un de ces disques est placé sur une lame et une colonie est déposée avec une pipette Pasteur.

S'il n'y a pas apparition d'une couleur violette au bout de 30 secondes, la bactérie est oxydase négative et ne possède pas la cytochrome oxydase. Dans le cas contraire, elle sera positive.

Recherche de la catalase

Ce test permet la recherche d'une enzyme appelée la catalase qui empêche l'accumulation d' H_2O_2 dans la cellule bactérienne, et qui lui serait létale.

Elle se fait en déposant une goutte d' H_2O_2 sur une lame et on y'est associée directement une à deux colonies prélevées d'un milieu solide (prélever à partir de la gélose nutritive).



S'il y'a dégagement immédiat de bulles gazeuses (effervescence) cela signifie que la bactérie est catalase positive. Dans le cas contraire, elle sera négative.

Recherche de la β -galactosidase

Le test ortho-nitro-phényl-galactoside (ONPG) consiste à rechercher la présence de β -galactosidase. On utilise comme substrat, non pas le lactose, mais un autre β -galactoside: l'ortho-nitro-phényl-galactoside qui présente l'avantage d'être hydrolysé en un produit coloré (l'orthonitrophénol: ONP). Ceci est possible car la β -galactosidase n'est pas spécifique du lactose, mais des β -galactosides.

S'il y'a apparition de l'ONP de couleur jaune, issu de la dégradation de l'ONPG, cela met en évidence la présence de la β -galactosidase, qui signifie que la bactérie possède la β -galactosidase. Dans le cas contraire, elle sera négative.

Recherche de l'ADH, LDC, ODC : Test de Moeller

Les décarboxylases bactériennes sont des enzymes qui catalysent les réactions de décarboxylation des acides aminés, elles sont mises en évidence grâce aux produits alcalins formés (amines) détectés à l'aide d'un indicateur de pH.

La lecture de l'alcalinisation nécessite une anaérobiose relative (utilisation d'huile de vaseline).

S'il y'a virage du BCP au jaune signifie : l'acidification due à la fermentation du glucose pour l'activité des décarboxylases et pour visualiser une éventuelle alcalinisation et que la bactérie est de LDC⁺ ou ODC⁺ ou ADH⁺. Dans le cas contraire, elle sera négative.

PS :

Pour réaliser ce test, on doit obligatoirement confirmer la souche testée dégrade le glucose.

Dans le cas contraire, le test est réalisé en ajoutant stérilement dans le milieu un sucre simple que la souche à tester peut dégrader.

Utilisation de citrate

Ce milieu permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate comme seule source de carbone et d'énergie. Ce caractère est intéressant pour discriminer les bactéries entre-elles et ainsi de les identifier.

S'il y'a virage au bleu du Bleu de bromothymol qui traduit par l'alcalinisation liée à l'utilisation du citrate comme seule source d'énergie et de carbone, cela signifie que la bactérie est citrate positif. Dans le cas contraire, elle sera négative.

Recherche d'hydrogène sulfuré (H₂S)

Ce test permet la dégradation des acides aminés soufrés qui se traduit par la libération d'H₂S après incubation à 37°C pendant 24h.

S'il y'a apparition des tâches noires de sulfure ferreux, cela signifie que la bactérie est de H₂S positif. Dans le cas contraire, elle sera négative.

Recherche de l'urée

Ce test consiste en la mise en évidence d'une activité enzymatique en cultivant la souche en présence d'urée, de glucose, et du rouge de phénol qui est jaune au pH 6,8 et rouge à 8,4.

S'il y'a libération d'ammoniac qui fait virer l'indicateur de pH au rouge, cela signifie que la bactérie est urée positif. Dans le cas contraire, elle sera négative.

Recherche du tryptophane désaminase (TDA)

La recherche de la TDA permet la mise en évidence de l'acide indolpyruvique en ajoutant après incubation une goutte de révélateur qui est l'acide chlorhydrique et une goutte de perchlorure de fer.

S'il y'a obtention d'un précipité brun foncé, cela signifie que la bactérie est de TDA positive. Dans le cas contraire, elle sera négative.

Recherche de l'indole

Ce test permet de mettre en évidence la présence de l'indole qui est issu de l'hydrolyse du tryptophane qui est caractérisé par le réactif de Kovacs après incubation à 37°C pendant 24h.

S'il y'a présence de l'indole, il se manifeste par l'apparition d'un anneau rouge en surface, cela signifie que la bactérie est de indole positif. Dans le cas contraire, elle sera négative.

Test de Voges-Proskauer (VP)

Ce test détecte la présence d'acétoïne ou d'acétylméthylcarbinol et de diacétyl qui résulte de la fermentation butanediolique du glucose. Le milieu est un bouillon de culture auquel 0,6 ml d'une solution alcoolique d' -naphthol, puis 0,2 ml d'une solution à 40% d'hydroxyde de potassium sont ajoutés. La coloration est vérifiée après 15 et 30 minutes.

L'acétoïne est oxydée en diacétyl qui réagit avec l' -naphthol pour donner une coloration rouge dans le cas où la bactérie est de VP positif. Dans le cas contraire, elle sera négative.

Hydrolyse de la gélatine

Ce test consiste en la mise en évidence de l'hydrolyse de la protéine qui est la gélatine en polypeptides. L'attaque de la gélatine se traduit par la libération des particules de charbon après incubation à 37°C pendant 24h.

S'il y'a apparition des particules de charbon, cela signifie que la bactérie est de gélatinase positive. Dans le cas contraire, elle sera négative.

Utilisation de glucose

Ce test permet la mise en évidence de la fermentation de l'hydrate de carbone (glucose) en tant que source de carbone et d'énergie. Le milieu est un bouillon de culture auquel 0,5-1,0% de glucose est ajouté. L'indicateur de pH, le rouge de phénol est rouge à pH neutre, mais vire au jaune à pH inférieur à 6,8.

S'il y'a changement de couleur du rouge au jaune, cela signifie que la bactérie fermente le glucose avec production d'acides organiques et le pH du milieu va baisser. Dans le cas contraire, elle sera négative.

Utilisation de mannose

Ce test permet la mise en évidence de la fermentation de l'hydrate de carbone (mannose) en tant que source de carbone et d'énergie. Le milieu est un bouillon de culture auquel 0,5-1,0% de mannose est ajouté. L'indicateur de pH, le rouge de phénol est rouge à pH neutre, mais vire au jaune à pH inférieur à 6,8.

S'il y'a changement de couleur du rouge au jaune, cela signifie que la bactérie fermente le mannose avec production d'acides organiques et le pH du milieu va baisser. Dans le cas contraire, elle sera négative.

Utilisation d'inositole

Ce test permet la mise en évidence de la fermentation de l'hydrate de carbone (inositol) en tant que source de carbone et d'énergie. Le milieu est un bouillon de culture auquel 0,5-1,0% d'inositol est ajouté. L'indicateur de pH, le rouge de phénol est rouge à pH neutre, mais vire au jaune à pH inférieur à 6,8.

S'il y'a changement de couleur du rouge au jaune, cela signifie que la bactérie fermente l'inositol avec production d'acides organiques et le pH du milieu va baisser. Dans le cas contraire, elle sera négative.

Utilisation de sorbitol

Ce test permet la mise en évidence de la fermentation de l'hydrate de carbone (sorbitol) en tant que source de carbone et de l'énergie. Le milieu est un bouillon de culture auquel 0,5-1,0% de sorbitol est ajouté. L'indicateur de pH, le rouge de phénol est rouge à pH neutre, mais vire au jaune à pH inférieur à 6,8.

S'il y'a changement de couleur du rouge au jaune, cela signifie que la bactérie fermente le sorbitol avec production d'acides organiques et le pH du milieu va baisser. Dans le cas contraire, elle sera négative.

Utilisation de rhamnose

Ce test permet la mise en évidence de la fermentation de l'hydrate de carbone (rhamnose) en tant que source de carbone et d'énergie. Le milieu est un bouillon de culture auquel 0,5-1,0% de rhamnose est ajouté. L'indicateur de pH, le rouge de phénol est rouge à pH neutre, mais vire au jaune à pH inférieur à 6,8.

S'il y'a changement de couleur du rouge au jaune, cela signifie que la bactérie fermente le rhamnose avec production d'acides organiques et le pH du milieu va baisser. Dans le cas contraire, elle sera négative.

Utilisation de saccharose

Ce test permet la mise en évidence de la fermentation de l'hydrate de carbone (saccharose) en tant que source de carbone et de l'énergie. Le milieu est un bouillon de culture auquel 0,5-1,0% de saccharose est ajouté. L'indicateur de pH, le rouge de phénol est rouge à pH neutre, mais vire au jaune à pH inférieur à 6,8.

S'il y'a changement de couleur du rouge au jaune, cela signifie que la bactérie fermente le saccharose avec production d'acides organiques et le pH du milieu va baisser. Dans le cas contraire, elle sera négative.

Utilisation de melibiose

Ce test permet la mise en évidence de la fermentation de l'hydrate de carbone (melibiose) en tant que source de carbone et de l'énergie. Le milieu est un bouillon de culture auquel 0,5-1,0% de melibiose est ajouté. L'indicateur de pH, le rouge de phénol est rouge à pH neutre, mais vire au jaune à pH inférieur à 6,8.

S'il y'a changement de couleur du rouge au jaune, cela signifie que la bactérie fermente le melibiose avec production d'acides organiques et le pH du milieu va baisser. Dans le cas contraire, elle sera négative.

Recherche de l'amygdaline

Ce test permet la mise en évidence de la fermentation de l'hydrate de carbone (amygdaline) en tant que source de carbone et de l'énergie. Le milieu est un bouillon de culture auquel 0,5-1,0% de l'amygdaline est ajouté. L'indicateur de pH, le rouge de phénol est rouge à pH neutre, mais vire au jaune à pH inférieur à 6,8.

S'il y'a changement de couleur du rouge au jaune, cela signifie que la bactérie fermente l'amygdaline avec production d'acides organiques et le pH du milieu va baisser. Dans le cas contraire, elle sera négative.

Utilisation de l'arabinose

Ce test permet la mise en évidence de la fermentation de l'hydrate de carbone (arabinose) en tant que source de carbone et de l'énergie. Le milieu est un bouillon de culture auquel 0,5-1,0% de l'arabinose est ajouté. L'indicateur de pH, le rouge de phénol est rouge à pH neutre, mais vire au jaune à pH inférieur à 6,8.

S'il y'a changement de couleur du rouge au jaune, cela signifie que la bactérie fermente le glucose avec production d'acides organiques et le pH du milieu va baisser. Dans le cas contraire, elle sera négative.

2.5. Antibiogramme par diffusion sur milieu solide

L'intérêt clinique d'un antibiogramme est de dresser un relevé des caractères de sensibilité ou de résistance du germe à étudier. Il a pour but de déterminer la CMI d'une souche bactérienne ainsi que de constituer une carte d'identité du germe permettant le choix de l'antibiotique le plus actif.

Milieu pour l'antibiogramme : On utilise le Mueller Hinton qui doit être coulé en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4mm et la gélose doit être séchée avant emploi.

Préparation de l'inoculum : la préparation de l'inoculum se fait comme suit :

A partir d'une culture pure de 18 à 24 heures sur milieu d'isolement approprié, on prélève à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques d'*E. coli*, puis on décharge bien l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9% ; on homogénéise la suspension bactérienne, jusqu'à ce que son opacité soit équivalente à 0,5 MF ou à une DO de 0,08 à 0,10 à 625 nm.

Ensemencement :

On trempe un écouvillon stérile dans l'inoculum puis on essore en le pressant fermement et en le tournant contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum ; on frotte l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées, puis on répète l'opération 3 fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. On finissant l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Remarque : dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, il faut on recharge l'écouvillon à chaque fois.

Application des disques d'antibiotiques :

On presse chaque disque d'antibiotique à l'aide d'une pince bactériologique stérile et on ne déplace pas les disques après application.

Il est préférable qu'on ne mette pas plus de 6 disques d'antibiotiques sur une boîte de Pétri de 90 mm.

La liste des ATB à tester pour *E. coli* sont mentionnés dans le tableau suivant (RAHAL *et al.*, 2011) (voir tableau III) :

Tableau III : liste des antibiotiques à tester pour *E. coli* (RAHAL *et al.*, 2011).

Antibiotiques	Abréviations	Charges (µg)	Familles des antibiotiques
Ampicilline	AMP	30	-lactamines
Amoxicilline + Acide clavulanique	AMC	20+10	
Céfazoline	CZ	30	
Céfotaxime	CTX	30	
Céfoxitine	FOX	30	
Imipénème	IMP	10	
Aztréonam	ATM	30	
Gentamicine	GM	10	Aminosides
Amikacine	AK	30	
Acide nalidixique	NA	30	Quinolones
Ciprofloxacine	CIP	5	
Chloramphénicol	C	30	Phénicoles
Triméthoprime-sulfaméthoxazole	SXT	1.25+23.75	Sulfamides
Colistine	CS	50	Polymyxine

Conditions d'incubation : Incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures.

Lecture

- On mesure avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse ; pour *E. coli* testé sur Mueller Hinton, les mesures seront prises en procédant par transparence à travers le fond de la boîte de Pétri fermée ;

- On compare les résultats obtenus aux valeurs critiques figurants dans la table de lecture correspondantes à *E. coli* (voir annexe N°5), puis on classe cette dernière dans l'une des catégories suivantes : sensible (S), intermédiaire (I), résistante (R).

Parmi les souches de référence de phénotypes d'*E. coli* qui peuvent être obtenu, on a les deux figures 10 et 11 si dessous.

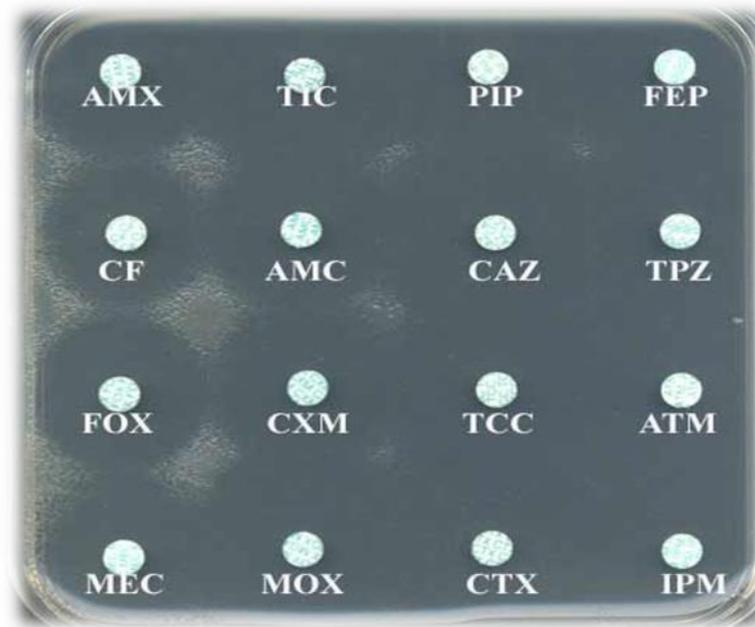


Figure 10: Souche de référence d'un phénotype sauvage d'*Escherichia coli*.



Figure 11 : Souche de référence d'*Escherichia coli* multirésistant.

Durant la période allant de mars à juin 2015, nous avons isolé 14 souches d'*E. coli* provenant d'urines de malades hospitalisés dans différents services du l'E.P.H de Larbaa Nath Irathen.

Les souches répétitives (souches isolées chez le même malade et présentant le même antibiotype) n'ont pas été prises en considération.

1. Résultats de l'étude microscopique

1.1. Etat frais

L'examen au microscope optique, au grossissement 400 a permis d'observer de fins bacilles mobiles pour toutes les 14 souches d'*E. coli* isolées, ainsi que des leucocytes et des polynucléaires.

1.2. Coloration de Gram

L'examen au microscope optique, au grossissement 1000, a permis d'observer des bacilles fins de couleur rose ; qui est identique pour toutes les 14 souches d'*E. coli* isolées, il s'agit de bactéries à Gram négatif qui sont apparues comme suit (Figure 12).

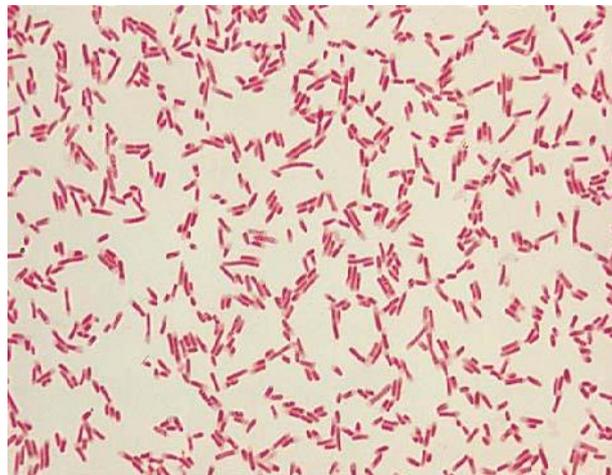


Figure 12 : *E. coli* sous microscope optique après coloration de Gram (G×1000).

2. Résultats du diagnostic bactériologique

2.1. Isolement

Les différents aspects macroscopiques retrouvés chez les 14 souches d'*E. coli* isolées sur les différents milieux solides sont apparus comme suit (Figure 13) :

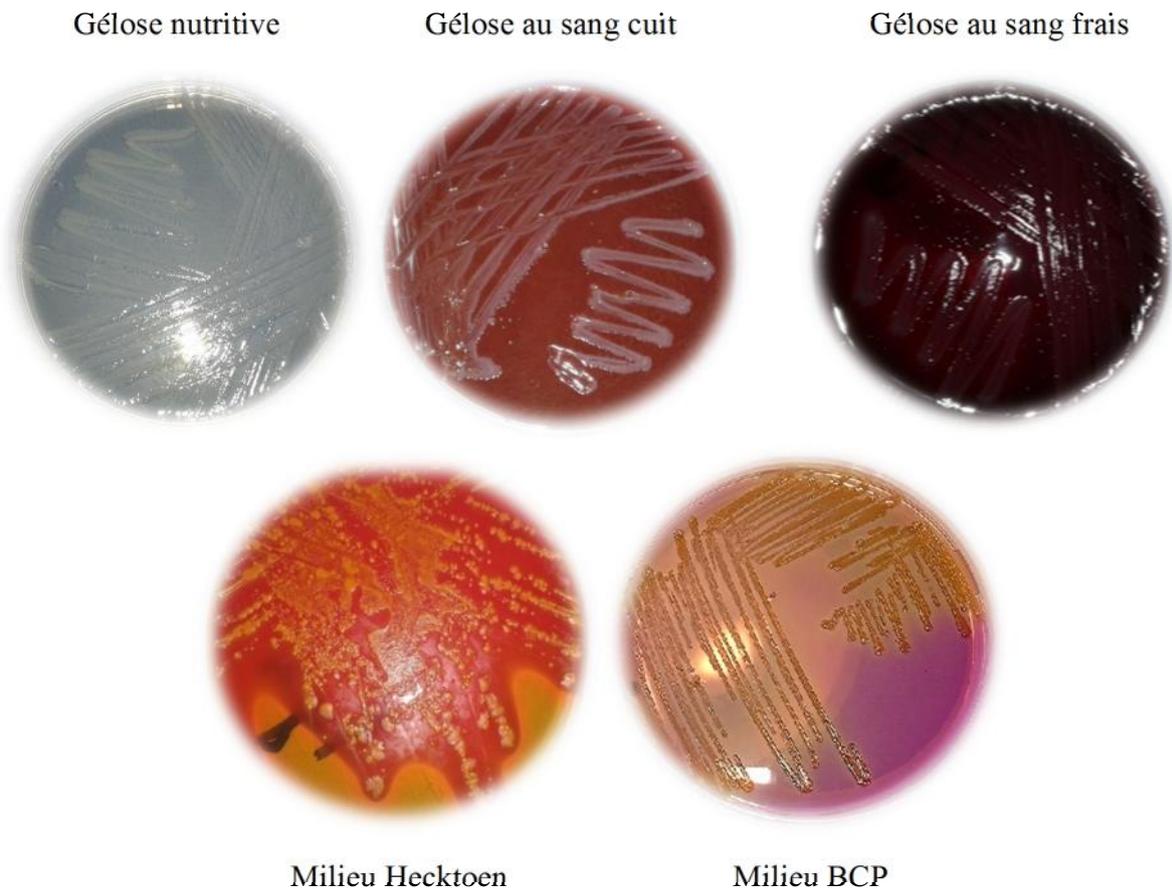


Figure 13: Les différents aspects macroscopiques des colonies d'*E. coli* isolées sur les différents milieux solides.

Pour les souches (1, 4, 5, et 8)

Sur Gélose Nutritive : les colonies sont de 2 à 3 mm de diamètre, rondes, irrégulières, lisses, et plates.

Sur Gélose au Sang Cuit (GSC) : les colonies sont de couleur blanchâtre et sont à bord irréguliers, rondes et non bombées.

Sur Gélose au Sang Frais (GSF) : on trouve des colonies de couleurs blanchâtres et à bord irréguliers, rondes et non bombées.

Sur milieu Hecktoen : les colonies saumon sont de couleur jaunes-orangées sans centre noir, colonies moyennes dont le diamètre est compris entre 3 et 5 mm, cela signifie qu'il s'agit bien d'*E. coli* car il est lactose positif et H₂S négatif.

Sur milieu au pourpre de Bromocrésol (BCP) : de petites colonies dont le diamètre est compris entre 1 et 2 mm ; sont plates de couleur blanchâtre cela correspond à *E. coli* qui fermente le lactose.

Pour les souches (3, 7, 9, 10, et 13)

Sur Gélose Nutritive : les colonies sont de 1 mm de diamètre, rondes, translucides, et plates.

Sur Gélose au Sang Cuit (GSC) : les colonies sont de couleur blanchâtre et sont à bord irréguliers, rondes et non bombées.

Sur Gélose au Sang Frais (GSF) : on trouve des colonies de couleurs blanchâtres et à bord irréguliers, rondes et non bombées.

Sur milieu Hecktoen : les colonies saumon sont de couleur jaunes-orangées sans centre noir, colonies moyennes dont le diamètre est compris entre 3 et 5 mm, cela signifie qu'il s'agit bien d'*E. coli* car il est lactose positif et H₂S négatif.

Sur milieu au pourpre de Bromocrésol (BCP) : de petites colonies dont le diamètre est compris entre 1 et 2 mm ; sont plates de couleur blanchâtre cela correspond à *E. coli* qui fermente le lactose.

Pour les souches (2, 6, 11, 12, et 14)

Sur Gélose Nutritive : les colonies sont de 2 à 3 mm de diamètre, rondes, régulières, et bombées.

Sur Gélose au Sang Cuit (GSC) : les colonies sont de couleur blanchâtre et sont à bord irréguliers, rondes et non bombées.

Sur Gélose au Sang Frais (GSF) : on trouve des colonies de couleurs blanchâtres et à bord irréguliers, rondes et non bombées.

Sur milieu Hecktoen : les colonies saumon sont de couleur jaunes-orangées sans centre noir, colonies moyennes dont le diamètre est compris entre 3 et 5 mm, cela signifie qu'il s'agit bien d'*E. coli* car il est lactose positif et H₂S négatif.

Sur milieu au pourpre de Bromocrésol (BCP) : de petites colonies dont le diamètre est compris entre 1 et 2 mm ; sont plates de couleur blanchâtre cela correspond à *E. coli* qui fermente le lactose.

2.2. Identification

2.2.1. Tests biochimiques

L'étude biochimique des 14 souches d'*E. coli* isolées qui est réalisée sur une galerie API 20E, a permis d'avoir les résultats suivants :

Pour les souches (1, 2, 7, 8, et 12)

Ces souches sont : Glucose -, Inositol -, et Mannose +.

Elles présentent des caractères biochimiques communs dans le cas de : Glucose, Inositol, et de Mannose.

Elles semblent éventuellement du même groupe appartenant à la même souche.

Tableau IV : Les caractéristiques biochimiques des souches communes d'*E. coli*.

ONPG	<u>ADH</u>	<u>LDC</u>	<u>ODC</u>	<u>CIT</u>	<u>H₂S</u>	<u>URE</u>	TDA	IND	<u>VP</u>
+	-	+	+	-	-	-	-	+	-

<u>GEL</u>	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
-	-	+	-	+	+	+	+	-	+

Pour les souches (3, 4, 11, 13, et 14)

Ces souches sont : Glucose +, Saccharose +, et Amygdaline-.

Elles présentent des caractères biochimiques communs dans le cas de : Glucose, Saccharose, et de l'Amygdaline.

Elles semblent éventuellement du même groupe appartenant à la même souche.

Tableau V : Les caractéristiques biochimiques des souches communes d'*E. coli*.

ONPG	<u>ADH</u>	<u>LDC</u>	<u>ODC</u>	<u>CIT</u>	<u>H₂S</u>	<u>URE</u>	TDA	IND	<u>VP</u>
+	+	+	+	-	-	-	-	+	-

<u>GEL</u>	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
-	+	-	-	+	+	+	+	-	+

Pour les souches (5, 6, 9, et 10)

Ces souches sont : Glucose +, Arabinose +, et ADH -.

Elles présentent des caractères biochimiques communs dans le cas de : Glucose, Arabinose, et de l'ADH.

Elles semblent éventuellement du même groupe appartenant à la même souche.

Tableau VI : Les caractéristiques biochimiques des souches communes d'*E. coli*.

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP
+	-	+	+	-	-	-	-	+	-

GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
-	+	+	-	+	+	+	+	-	+

ONPG : Ortho-Nitro-Phényl-Galactopyranoside ; **ADH** : Arginine dihydrolase; **LDC**: Lysine décarboxylase ; **ODC** : ornithine décarboxylase ; **CIT** : trisodium citrate ; **H₂S** : sodium thiosulfate ; **URE** : uréase ; **TDA** : tryptophane désaminase ; **IND** : indole ; **VP** : sodium pyruvate ; **GEL** : gélatinase ; **GLU** : glucose ; **MAN** : mannitol ; **INO** : inositol ; **SOR** : sorbitol ; **RHA** : rhamnose ; **SAC** : saccharose ; **MEL** : melibiose; **AMY** : amygdaline ; **ARA** : arabinose.

2.3.La place d'*E. coli* dans l'EPH de Larbaa Nath Irathen

L'étude de la place d'*E. coli* parmi les autres germes hospitaliers, a permis d'obtenir les résultats suivants (figure 14) :

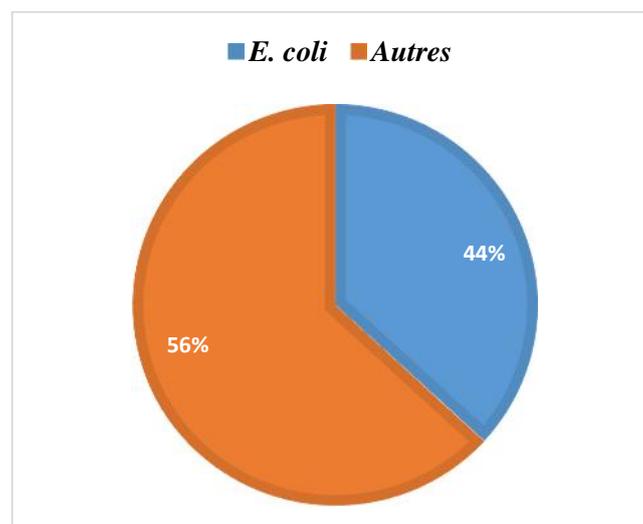


Figure 14 : Pourcentage d'*E. coli* retrouvé durant notre période d'étude.

Sur les 32 bactéries isolées à partir de prélèvement d'urines, 14 étaient d'*E. coli* (soit 44%) et 18 comme autres germes (soit 56%).

2.4. Répartition chronologique des souches d'*E. coli* isolées selon les services

La répartition des 14 souches d'*E. coli* isolées selon les services : médecine interne homme, médecine interne femme, maternité, pédiatrie, durant notre période d'étude a permis d'avoir les résultats présentés ci-dessous (figure 15).

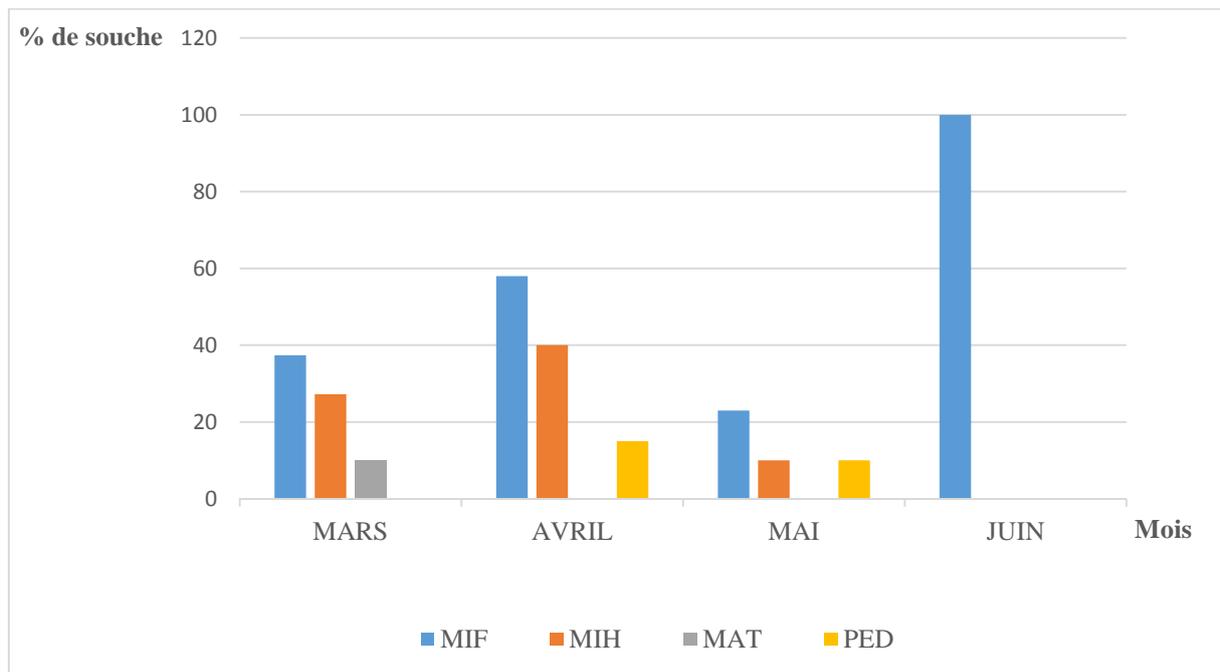


Figure 15 : Répartition des souches d'*E. coli* isolées selon les services (%).

MIF : Médecine Interne Femme

MIH : Médecine Interne Homme

MAT: Maternité

PED : Pédiatrie

La répartition chronologique des 14 souches d'*E. coli* isolées durant la période d'étude, montre une grande variations du nombre d'isolats retrouvés dans les différents services.

Il est à noter que le nombre de services infectés par *E. coli* est important durant les 3 premiers mois. On note également la disparition de ce germe dans les autres services au mois de juin ; ceci pourrait s'explique par la baisse de fréquence des prélèvements effectués.

Cependant, le service de médecine interne femme (MIF) est le service où a été isolé le plus de souches d'*E. coli* : soit 37,4% en mars, 58% en mois d'avril, 23% en mois de mai, avec un pic important de 4 souches (soit 100%) en moi de juin.

2.5. Antibiogramme par diffusion des disques

Les antibiogrammes (sur Mueller Hinton) réalisés sur les 14 souches isolées d'*E. coli*, ont permis d'obtenir les résultats présentés dans les histogrammes ci-dessous (figure 16 et 17).

L'étude du comportement d'*E. coli* vis-à-vis des -lactamines a révélé que le taux de résistance pour l'ensemble des souches, durant notre période d'étude, varie d'un mois à l'autre, avec une résistance importante à tous ces ATB notamment au mois d'avril.

Cependant, on note des taux de résistance très élevé pour l'Ampicilline et l'Augmentin au mois d'avril, cela est relativement lié à l'utilisation abusive de ces deux ATB durant ce mois.

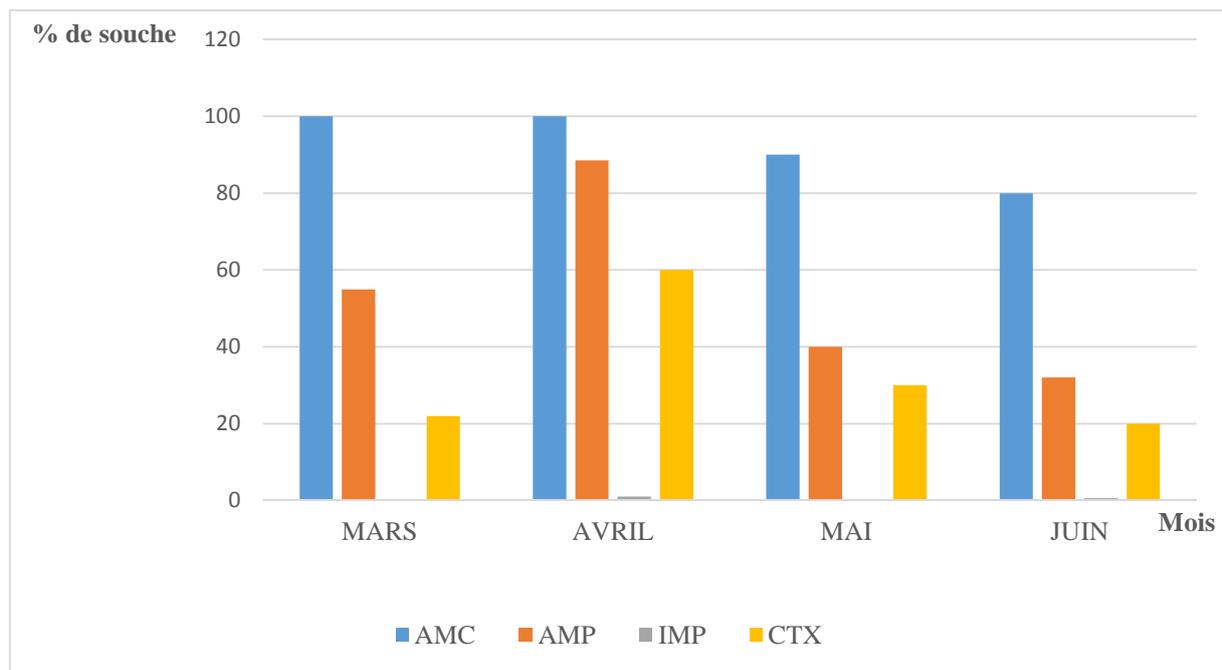


Figure 16 : Répartition des souches d'*E. coli* selon la résistance aux -lactamines (%).

AMC : Amoxicilline +Acide clavulanique (Augmentin)

AMP : Ampicilline

IMP : Imipenème

CTX : Céfotaxime

L'étude du comportement d'*E. coli* vis-à-vis des aminosides, a révélé que le taux de résistance à la Gentamicine varie en fonction du temps avec un pic en mois de juin, soit 20%. Ces résultats sont communs à ceux retrouvés par le réseau national de surveillance en 2011, (RAHAL *et al.*, 2011), où le taux de résistance de la Gentamicine a atteint 18,08%. Par ailleurs, on note une absence de résistance à l'Amikacine durant les deux derniers mois.

L'étude de la résistance des isolats d'*E. coli* aux quinolones, montre une forte résistance à la Ciprofloxacine durant le mois de mars, contrairement au second trimestre où elle a complètement disparue.

Concernant les taux de résistance aux autres ATB (Colistine, Bactrim), notamment à la Bactrim, où le taux de résistance est plus élevé durant les mois de mars, mai et juin (100%). Cette forte proportion de souches résistantes est probablement liée à la pression de sélection par l'antibiothérapie à large spectre ainsi qu'à la prescription inappropriée de ces ATB faite à des doses inadéquates et pour des durées de traitement inadaptées.

On observe enfin que la résistance à la Colistine a marqué un pic juste au mois d'avril.

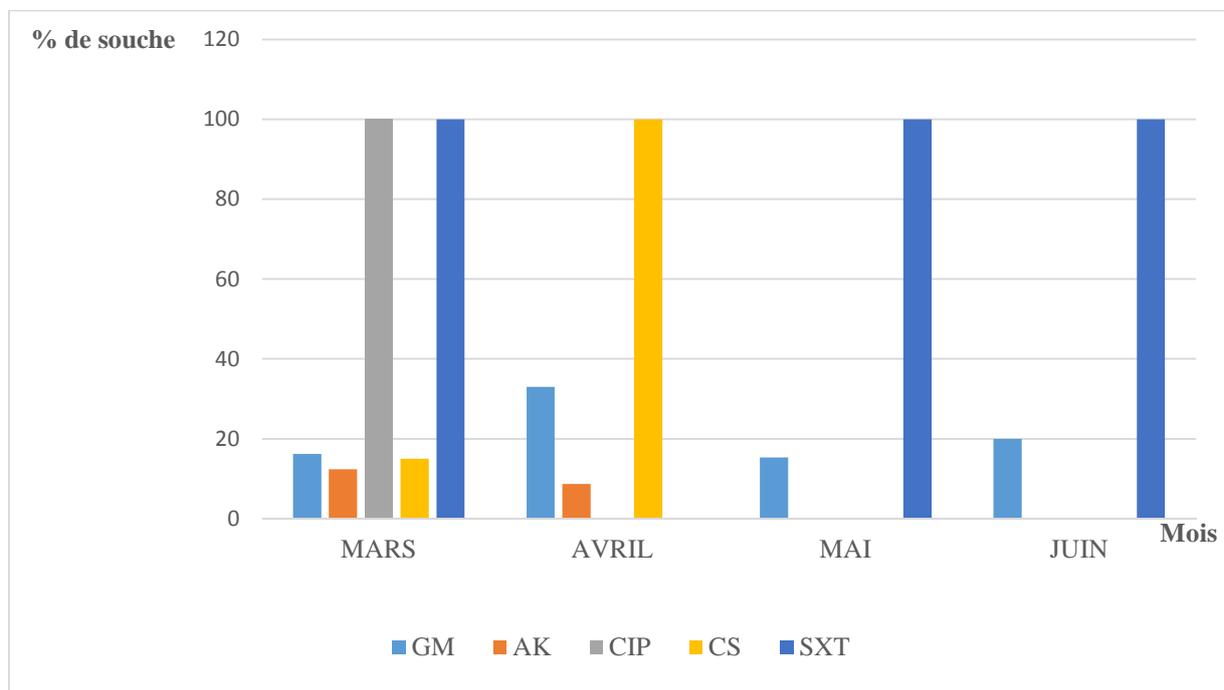


Figure 17 : La répartition des souches d'*E. coli* selon la résistance aux aminosides, aux quinolones et autres ATB (%).

GM: Gentamicine

AK: Amikacine

CIP: Ciprofloxacine

CS: Colistine

SXT: Bactrim

Conclusion

Notre étude réalisée au niveau de l'EPH de Larbaa Nath Irathen durant une période de 4 mois (Mars à Juin 2015) et qui a porté sur l'étude du comportement vis-à-vis des antibiotiques et le recueil de données d'*E. coli*, a permis de constater que cette bactérie occupe une place non négligeable parmi les autres germes hospitaliers, soit 14 souches entre Mars et Juin 2015.

Le service de Médecine Interne Femmes a enregistré 54,60% pour la période citée ci-dessus.

Les antibiogrammes réalisés entre Mars et Juin 2015 ont montré que les souches d'*E. coli* isolées, étaient de plus en plus résistantes à l'AMC avec 80% de résistance. Ont fait ressortir 100% de résistance à cet antibiotique au mois de Mars et Avril, moins de 10% au mois de Mai et moins de 20% en mois en Juin.

En perspective, il est indispensable de maîtriser la dissémination de cette bactérie en milieu hospitalier vu la place qu'elle occupe et ce, en respectant les mesures préconisées par le Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales (CLIN), telles que :

- Le renforcement des mesures d'hygiène hospitalière ;
- L'isolement géographique et technique des patients infectés par l'*E. coli* ainsi que leur signalisation ;
- La mise en place d'une surveillance concertée à partir du laboratoire et mettre en contact le clinicien et le bactériologiste afin d'aboutir à une meilleure prescription des ATB ;
- L'amélioration de l'information et le renforcement des actions d'éducation pour un usage optimal des ATB en prophylaxie et en thérapie ;
- L'association synergique de diverses familles d'ATB afin de cibler les différentes fonctions de la cellule bactérienne ;

Enfin, il apparaît que la connaissance de l'écologie microbienne s'avère essentielle pour mettre en œuvre et adapter une politique de lutte contre les infections nosocomiales ciblant tout particulièrement les principales bactéries en cause dans les établissements de soins.

ABBASSI M.S., ACOUR W., CHERIF A., JABNOUN S., KROUF N. et BEN HASSEN A. (2006). Nosocomial respiratory infection due to imipenem- résistant *Escherichia coli* Strain in a Tunis's neonatal intensive care unit Pathologie Biologie. Epub, Paris.

ABDEL MALEK K., LACOMBE K. et MINO J.C. (1996). Santé public médecine légale, médecine de travail. ESTEM, 2^{ème} Ed., Med-line, Paris.

AHOYO A A.T, BABA-MOUSSAA L, ANAGOB A.E, AVOGBEA P, MISSIHOUNA T.D, LOKO, F, PREVOST G, SANNIA A, DRAMANE K. (2007). Incidence d'infections liées à *Escherichia coli* producteur de bêta-lactamase à spectre élargi au Centre hospitalier départemental du Zou et Collines au Bénin. Médecine et maladies infectieuses; 746-752.

ALAIN R., BERNARD J. (2002).Entérobactéries. Ed lavoisier. 29-38.

ASTAGNEU P. Et BRUCKER G. (1999). Epidémiologie des infections nosocomiales chez l'adulte, 2^{ème} Ed., Masson, Paris.

ATMANI S, AOURAGH R, BOUHARROU A, HIDA M. (2007). L'infection des voies urinaires du nouveau-né : à propos de 23 cas. Journal de pédiatrie et de puériculture ; 20 :70-73.

AVRIL J. M., DABERNAT H. ET MONTEIL D. H. (2000). Bactériologie clinique. 3^{ème} Ed., Ellipses. Paris. 602.

AVRIL J.L., DABERNA H., DENIS F., MONTEIL H. (1992). Bactériologie médicale, 2^{ème} Ed., Ellipses, Paris.

AVRIL J.L., DABERNA H., DENIS F., MONTEIL H. (1992). Bactériologie clinique, 2^{ème} Ed., marketing, Paris.

BAMBA MAMADOU.(2003).Contribution à l'étude de l'infection urinaire au cours de la grossesse: étudeprospective du 1^{er} janvier 2001 au 31 août 2001 au service de gynécologieobstétrique du CHU de Treichville. Thèse Med .Abidjan.

BEJOT J. (2011). Résistance bactérienne. Encyclopédie Universalis de 2011.

BERCHE P., GAILLARD J.L. et SIMONET M. (1991). Bactériologie. Médecine-Sciences, 1^{ère} Ed., Flammarion, Paris.

BERGEY *et al.* (1994) de 9^{ème} Edition; BERGEY'S Manual of determinativebacteriology.

BIDET P. et BINGEN E. *Enterobacteriaceae*. IN : DENIS F., PLOY M.C., MARTIN C., BINGEN E. et QUENTIN R. (2007). Bactériologie médicale: Techniques usuelles. Ed Elsevier Masson. Paris : 295-322.

BILLIARD J.C., GAYRAUD M. et LORTHOLARY O. (2008). Nouveaux cahiers de l'infirmière, 17^{ème} Ed, Elsevier Masson, Paris.

BINGEN E. (2010). Mécanismes de résistance aux -lactamines, Hôpital Robert Debré, Paris.

BLATTNER F.R., PLUNKETT G. III, BLOCH C.A., PERNA N.T., BURLAND V., RILEY M., COLLADO-VIDES J., GLASNER J.D., RODE C.K., MAYHEW G.F., GREGOR J., DAVIS N.W., KIRKPATRICK H.A., GOEDEN M.A., ROSE D.J., MAU B., SHAO Y. (1997). *Science* 277:(1453-1462).

BOILLOT B. (2003). Malformations congénitales des voies urinaires. *Corpus médicale-Faculté de médecine de Grenoble*. p 1-15.

BRAM E.E., WEISS R. ET GUPTA S. (2013). Genetically Programmable Pathogen Sense and Destory. *ACS Synth Biol*.

BRUYERE F, CARIOU G, BOITEUX J-P, HOZNEK A, MIGNARD J-P, ESCARAVAGE L, BERNARD L, SOTTO A, SOUSSY S-J, COLOBY P et le CIAFU.(2008). Recommandation du comité d'infectiologie de l'AFU. Cystites aiguës. *ProgUrol*, 18, suppl 1, p.9-13.

BRUYERE F, CARIOU G, BOITEUX J-P, HOZNEK A, MIGNARD J-P, ESCARAVAGEL, BERNARD L, SOTTO A, SOUSSY S-J, COLOBY P et le CIAFU. (2008). Recommandation du comité d'infectiologie de l'AFU. Prostatites aiguës. *ProgUrol*, 18, suppl 1, p.19-23.

BRUYERE F, CARIOU G, BOITEUX J-P, HOZNEK A, MIGNARD J-P, ESCARAVAGE L, BERNARD L, SOTTO A, SOUSSY S-J, COLOBY P et le CIAFU. (2009). Recommandation du comité d'infectiologie de l'AFU. Pyélonéphrites aiguës. *ProgUrol*, 18, suppl 1, p.14-18.

BRUYERE F. (2010). Prostatite aiguë bactérienne chez l'homme adulte. *ProgUrol*, 20, p.815-817.

BURKINSHAW BJ, DENG W, LAMEIGNÈRE E, WASNEY GA, ZHU H, WORRALL LJ, FINLAY BB, STRYNADKA NC. J. (2015). *BiolChem*.

BUTREAU-LEMAIRE M, BOTTO H. (1997). Infection urinaire nosocomiale. *ProgUrol*, 7, p. 674-682.

CARLE S. (2009). La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important! *Pharmactuel*, vol.2, 6-21.

CARON F. (2003). Physiopathologie des infections urinaires nosocomiales. *Med et Mal Infect*, 33, 9, p. 438-446.

CATTOIR V. (2009). Popes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathologie Biologie*, 10 (52), 607-616.

CHAMPETIER D. (1998). Infections de l'appareil urinaire. *Impact Internat Janvier*, p.139-141.

CHIDIAC C., LEROY O. ET MOUTON Y. (1989). Can nosocomial infections be prevented? *Rev Prat*, 39 (16), 1409-1412.

CHOMARAT M., GERARD A., JEHL F. et WEBER M. (2004). De l'antibiogramme à la prescription, 2^{ème} Ed, Biomérieux, Paris.

CHOPRA I, SCHOFIELD C, EVERETT M, O'NEIL A, MILLER K, WILCOX M, FRÈRE J-M, DAWSON M, CZAPLEWSKI L, URLEB U, and COURVALIN P. (2008). Treatment of health-care-associated infections caused by Gram-negative bacteria a consensus statement. The Lancet infectious diseases; vol 8.

CICCOTI L. (2007). La validation des acquis de l'expérience. 02 : le module de formation incompressible et obligatoire, Heures de France, Paris.

COSTERTON J.W., CHENG K.J., GEESEY G.G., LADD T.I., NICKEL J.C., DASGUPTA M. et MARRIE T.J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. Annu Rev Microbiol, 41, 435-464.

COURVALIN P., LECLERCK IT et BINGEN E. (2006).Antibiogramme. Paris. ESKA: 2^{ème} Ed, 141-162.

COURVALIN P., LECLERCK R., BINGEN E. (2006).Antibiogramme. Paris. ESKA: 2^{ème} édition.

COWAN SW, GARAVITO RM, JANSONIUS JN, JENKINS JA, KARLSSON R, KONIG N, PAI EF, PAUPTIT RA, RIZKALLAH PJ, ROSENBAACH JP. (1995) October. The structure of Omp F porin in a tetragonal crystal form [abstract]. Structure 3(10): 1041-1050.

DJENNANE F., MOHAMMEDI D., TIOUIT D., TOUATI D. ET RAHAL K. (2009). Examen Cytobactériologique des Urines. Techniques Microbiologiques. Institut Pasteur d'Algérie. 76.

DWYER PL, O'REILLY M. (2002).Recurrent urinary tract infection in the female. Curr Opin Obst et Gynecol; 14:537-43.

ELLENBERG E. (2005). Infection nosocomiale : relire l'histoire et penser au présent. Santé publique, 3(17), 471-474.

EUZEBY J.P. (2008). Résistance bactérienne aux antibiotiques, Abrégé de bactériologie générale et médicale. (9), 2615-22.

FOXMAN B, BARLOW R, D'ARCY H, GILLESPIE B, SOBEL J-D. (2001).Urinary tract infection: estimated incidence and associated costs. Ann Epidemiol, 10, 8, p.509-515.

GAUDY C. et BUXERAUD J. (2005). Antibiotiques : pharmacologie et thérapeutique. Elsevier, Paris.

GILGENKRANTZ S. (2005). [Small treatise on art of warfare... from Shigella]. Med Sci Paris, 21 (4), 443-444.

GOUDAUT C. (2008). Utilisation des bandelettes urinaires en médecine générale : enquête de pratique auprès des 229 médecins aubois. Thèse de doctorat en médecine. Reims : université de Reims, p.130.

GRINIONT P.A. (1987). Taxonomie des *Escherichia coli*. Médecine et Maladies Infectieuses, 6-10.

HANES D., NONTYPHOID S. MILIOTIS N., BIER J. (2003). International Handbook of Food borne Pathogens, Marcel Dekker: New York, 137-149.

HANNEDOUCHE T. (2000). Infection Urinaires. Nephrologie online.

HAYASHI K., MOROOKA N., YAMAMOTO Y., FUJITA K., ISONO K., CHOI S., OHTSUBO E., BABA T., WANNER B.L., MORI H., HORIUCHI T. Mol. (2006). Syst. Biol. 2: (E1-E5).

HOLT, JOHN, NOEL KRIEG, PETER SNEATH, JAMES STALEY, ET STANLEY WILLIAMS. (2000). Bergey de Bactériologie Determinative. 9^{ème} Ed, New York.

HORAN T.C., MANGRAM A.J., PEARSON M.L., SILVER L.C. et JARVIS WR. (1999). Guideline for Prevention of Surgical Site Infection. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Hospital Infection Control Practices Advisory Committee, Am J Infect Control. 27(2), 97-132.

HOUSDEN *et al.* (2010). "Directed epitope delivery across the *Escherichia coli* outer membrane through the porin OmpF Proc Natl Acad Sci, USA107, 2412-2417.

HUSSON M.O., IZAD D. ET HANSEN W. (1994). *Escherichia coli* : Manuel de bactériologie clinique, 2^{ème} édition, Elsevier, Paris.

HYGIS N. (1998). Hygiène hospitalière. *Pul.* 2^{ème} Ed., Amazon, Lyon.

ITOH T., AIBA H., BABA T., FUJITA K., HAYASHI K., INADA T., ISONO K., KASAI H., KIMURA S., KITAKAWA M., KITAGAWA M., MAKINO K., MIKI T., MIZOBUCHI K., MORI H., MORI T., MOTOMURA K., NAKADE S. et HORIUCHI T. (1996). *DNA.* (3) ; 379-392).

JARLIER V., FOSSE T. et PHILIPPON A. (1996). Antibiotic susceptibility in aerobic gram-negative bacilli isolated in intensive care units in 39 French teaching hospitals (ICU study). *Intensive Care Med*, 22(10), 1057-1065.

JARRELL K.F. et MCBRIDE M.J. (2008). The surprisingly diverse ways that prokaryotes move, *Nat, Rev Microbial*, 6(6), 466-476.

JEHL F., CHOMARAT M., WEBER M., GERARD A. (2003). De l'antibiogramme à la prescription. 2^{ème} Ed, Biomérieux, 31-64.

JEHL F., CHOMARAT M., WEBER M., GERARD A. (2003). De l'antibiogramme à la prescription Ed. Biomérieux 2^{ème} édition ; 22.

JOLY B. (1989). Données générales sur les antibiotiques, in « Biotechnologie des Antibiotiques ». Chest, 119, 397-404.

- JOLY B. et REYNAUD A. (2002). Entérobactéries: Systématique et méthodes de diagnostic. Ed TEC & DOC et Ed médicales Inter Nationales. Paris. 356.
- KADRI M *et al.*, (2010). Pathogénie d'*Escherichia coli*. BACTERIOLOGIE MEDICALE. Médecine-Science, 2^{ème} Ed., Flammarion, Paris.
- KEZZAL K. (1993). Les antibiotiques, classification, mode d'action, résistance, action in vitro. Office des publications universitaires, Alger.
- LABADENE H., DALLEENNE C., MESSAI Y., GENESTE D., BAKOUR R., ARLET G. (2009). Emergence of extended-spectrum -lactamase PER-1 in *Proteus vulgaris* and *Providencia stuartii* isolates from Algiers, Algeria. Antimicrob Agents Chemother, (53), 4043-4044.
- LABADENE H., MESSAI Y., AMMARI H., ALOUACHE S., VERDET C., BAKOUR R., et ARLET G. (2009). Prevalence of plasmid-mediated Amp C -lactamase among Enterobacteriaceae in Algiers hospitals. Inter J Antimicrob Agents, 34(4), 340-342.
- LAMBERT T. (2007). Aminocyclitolés et bactéries à Gram négatif. AntibioGramme. COURVALIN P. 2^{ème} Ed., 226-246.
- LAMBERT T., (2006). Aminocyclitolés et bactéries à GRAM négatif. In : De BARBEYRAC B., BEBEAR C., BINGEN E, *et al.*, AntibioGramme, Paris, 227-246.
- LAVERAN H. (1998). Hygiène hospitalière. *Pul*, 2^{ème} Ed., Amazon, Lyon.
- LAVIGNE J.P., SOTTO A., MERLE C., JOURDAN J., SOUSSY C.J., SIROT D., (2007).
- LE HEURT M., GOMILA H., GIROT S. et RAFAOUI M.J. (1998). Nouveaux Cahiers de l'infirmière, tome5, Masson, Paris.
- LE MINOR L. et VERON M. (1989). BACTERIOLOGIE MEDICALE. Médecine-Science, 2^{ème} Ed., Flammarion, Paris.
- LOUM N.A. (2005). Les entérobactéries sécrétrices de bêta-lactamases à spectre élargi. Pour l'obtention de grade de docteur en pharmacie. Université Cheikh AntaDiop de Dakar, Sénégal.
- LOZNIEMSKI A. et RABAUD C. (2010). Résistance bactérienne aux antibiotiques. Fiches conseil pour la prévention du risque sanitaire-infections associées aux soins. CLIN.
- LUCET J.C. (2000). Les infections urinaires ; Les infections nosocomiales, Médecine thérapeutique (n° hors-série), 80-84.
- LYNN W.A. ET GOLENBOCK D.T. (1992). Lipopolysaccharide antagonists. Immunol Today, 13(7), 271-276.
- MADIGAN M. et MATINKO J. (2007). Brock biologie des microorganismes. 11^{ème} éd., Pearson éducation, Paris.

MAMMERI H., FRANÇOIS EB., BERKANI A. et NORDMANN P.(2008). Molecular characterization of Amp^C-producing *Escherichia coli* clinical isolates recovered in a French hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 61: 498-503.

MARIANI-KURKDJIAN P. (2004). Physiopathologie des infections urinaires. *Médecine thérapeutique / Pédiatrie*, p.167-72.

MATTICK J.S. (2002). Type P pili and twitching motility, *Annu, Rev Microbiol*; 56, 289-314.

MELZER MARK, PETERSEN IRENE. (2007). Mortality following bacteraemic infection caused by extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *E. coli* compared to non-ESBL producing *E. coli*. *Journal of Infection*. 55: 254-259.

MINOR L. et RICHARD C. (1993). Méthodes de laboratoire pour l'identification des entérobactéries. Institut Pasteur, Paris.

MOUTON Y., BINGEN E., DEBOSKER Y. et DUBREUIL L. (2000). Antibiotiques, antiviraux, anti-infectieux. Jhon Libey Eurotext, Paris.

Nealson, K. H. and J. W. Hastings. (1979). "Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance." *Microbiol Rev*43 (4): 496-518.

PATRICK G.L. (2003). Chimie pharmaceutique. Deboek, Paris.

PEBRET F. (2003). Maladies infectieuses : toutes les pathologies des programmes officiels des études médicales ou paramédicales, Edition 2003, Heures de France, Paris.

PHILLIPPON A. Et GUILLAUME A. (1998). *Escherichia coli* : phénotype de résistance aux antibiotiques. *Médecine, maladies infectieuses ; 28 spéciale*, 120-125.

Pouvoir pathogène et sensibilité aux antibiotiques des *Escherichia coli* isolés au CHU FARHAT HACHED de Sousse. *Rev Tunisienne d'Infectiologie Vol.4- N°1-p*: 26.

Prévention des infections nosocomiales. (2002). Guide pratique .Organisation Mondiale de la Santé ; 2^{ème} édition.

RAHAL K., BENSLIMANI A., TALI-MAAMAR H., MISSOUM M.F.K., KECHIH-BOUNAR S. et AMMARI H. (2011). Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire). 6^{ème} Ed. Alger.

ROBIN F., AGGOUNE-KHINACHE N., DELMAS J., NAIM M., et BONNET R. (2010). Novel VIM Metall-Lactamase Variant from Clinical Isolates of Enterobacteriaceae from Algeria. *Antimicrobial. Agents Chemother*, 54(1), 466-470.

SINGLETON P. (2005). Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies, 6^{ème} éd., Dunod, Paris.

SINGTOHIN S., CHANAWONG A., LULITANOND A., SRIBENJALUX P., AUNCHAROEN A., KAEWKES W., SONGSRI J. et PIENTHAWEECHAI K. (2010). CMY-2, CMY-8b, and DHA-1 plasmid mediated AmpC β -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* from a university hospital, Thailand. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 68: 271-277.

SOUKEHAL A., BENKADDOUR M., BOUKHERIS H., AOUAMEUR R. et BELKACEMI M. (1998). Surveillance des infections nosocomiales au service de réanimation polyvalente du CHU Beni Messous en 1997. *Biologie-infectiologie* : 4(3), 13-18.

SOUSSY C J. (2006). Quinolones et bactéries à GRAM négatif. In: De BARBEYRAC B., BEBEAR C., BINGEN E, *et al.*, *Antibiogramme*, Paris, 263-277.

STAMM WE. (1992). Criteria for the diagnosis of UTI and for the assessment of therapeutic effectiveness; 20(Suppl.3):S151-4.

SZABO C. (2003). Role of flagellin in the pathogenesis of shock and acute respiratory distress syndrome: therapeutic opportunities. *Crit Care Med*, 31(1), 39-45.

TEYSSON R. Et THABAUT A. (1995). Mécanismes de résistance aux antibiotiques. *La lettre de l'infectiologie*, 5(12), 474-476.

VERHAEGEN JAN. (2004). *Les Entérobactéries*. Bactériologie. Elsevier.

VEYSSIER P., DOUMART Y. et LIEBBE A.M. (1998). *Infections nosocomiales*. 2^{ème} Ed., Masson, Paris.

VIDONI M. (2010). Pyélonéphrites et prostatites aiguës prises en charge en ville : épidémiologie bactérienne et sensibilité d'*Escherichia coli* aux antibiotiques. Apport de la bandelette urinaire et de l'imagerie. Thèse de doctorat en médecine. Créteil : université de Créteil, 60.

XIANG-QI MU, et ESTHER BULLITT PNAS. (2006). Type P pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol*, (103): 9861-9866.

YALA D., MERAD A.S., MOHAMEDI D. et OUAR KORICHE M.N. (2001). Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb*, n°91.

YAMASHITA S.K., LOUIE M., SIMOR A.E. et RACHLIS A. (2000). Microbiological surveillance and parenteral antibiotic use in a critical care unit. *Can J Infect Dis*, 2(11), 107-111.

Annexe1 matériel

1.1. Matériel biologique correspond à notre souche bactérienne soit *Escherichia coli*.

1.2. Matériel du laboratoire

1.2.1. Appareillages et verreries

- tubes à vis stériles ;
- boîtes de Pétri stériles ;
- pipettes Pasteur stériles ;
- lames et lamelles ;
- écouvillons stériles jetables ;
- anse de platine ;
- pied à coulisse ;
- pince ;
- poire ;
- seringues stériles ;
- disques d'antibiotiques (annexes) ;
- distributeur de disques d'antibiotiques ;
- disques d'oxydase ;
- api 20E ;
- bec-bunsen ;
- portoir ;
- microscope optique ;
- étuve.

1.2.2. Produits et réactifs

- eau physiologique stérile à 0,9% ;
- eau de robinet ;
- huile d'immersion ; - huile de vaseline ;
- solution de violet de gentiane ;
- solution de bleu de méthylène ;
- H₂O₂ ;
- Lugol ;
- alcool à 90% ;
- fuchsine diluée à 1/10 ;
- réactif de Kovacs.

1.2.3. Milieux de cultures

Milieux de culture solides

- gélose nutritive (GN) ;
- Milieu Hektoen.
- gélose lactosée au pourpre de bromocrésol (BCP) ;

Milieux d'identification

- Pour l'identification biochimique on a utilisé une galerie biochimique miniaturisée api 20E.

Milieux pour l'antibiogramme

- milieu Mueller Hinton (MH).

Milieu de conservation

- milieu d'enrichissement (BHIB) + glycérol 40%.

Annexe 2 Composition des milieux de culture :

➤ BCP (gélose lactosée au bromocrésol pourpre)

Composition

Peptone	5,0 g/L ;
Extrait de viande	3,0g/L ;
Lactose	10,0g/L ;
Bromocrésol pourpre	0,025g/L ;
Agar	11,0 g/L ;
pH	6,8±0,2.

- **Gélose nutritive** : pour la culture des germes qui ne présentent pas d'exigence particulière.

Composition

Extrait de viande de bœuf	1g/L ;
Extrait de levure	2g/L ;
Peptone	5g/L ;
Chlorure de sodium	5g/L ;
Agar	15g/L ;
pH	7,4±0,2.

- **Hecktoen (gélose)** : milieu utilisé pour l'isolement des entérobactéries.

Composition

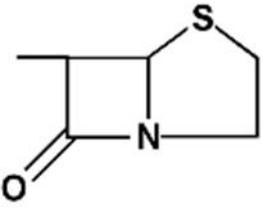
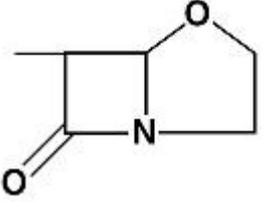
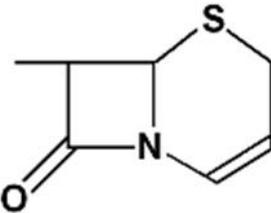
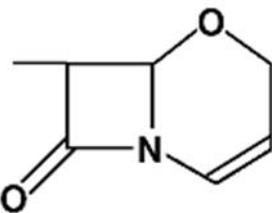
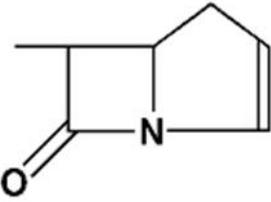
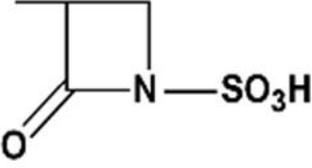
Protéose-peptone	12g/L ;
Extrait de levure	3g/L ;
Lactose	12g/L;
Saccharose	12g/L;
Salicine	2g/L ;
Citrate de fer III et d'ammonium	1,5g/L ;
Sels biliaires	9g/L ;
Fuchsine acide	0,1g/L ;
Bleu de bromothymo	10, 65g/L
Chlorure de sodium	5g/L ;
Thiosulfate de sodium	5g/L
Agar	13g/L.
pH =7, 5	

- **Mueller-Hinton (Gélose)** Gélose riche pour la réalisation de l'antibiogramme standard

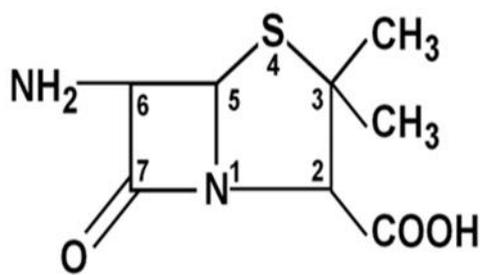
Composition

Infusion de viande de bœuf	300g/L ;
Hydrolysate de caséine	17,5g/L ;
Amidon de maïs	1,5g/L ;
Agar	17g/L ;
pH	7,4±0,2.

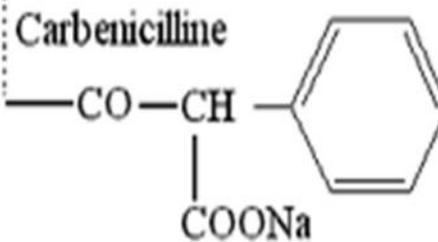
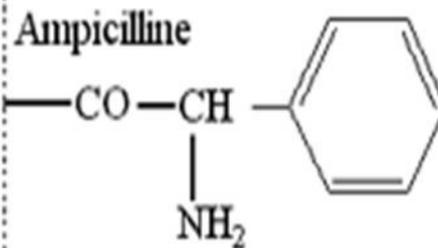
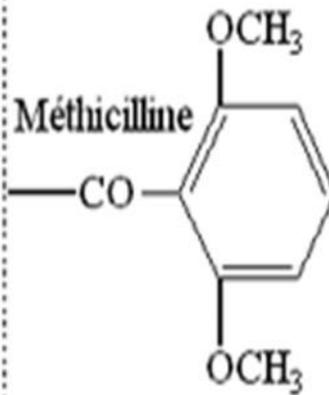
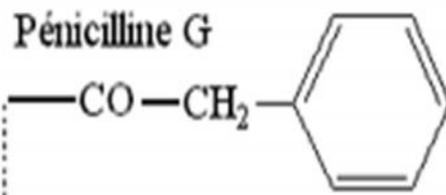
- **Gélose au sang frais** en général de mouton ou de cheval, elle est obtenue en ajoutant à des géloses ordinaires du sang frais dans des proportions de 5 à 10% en volume.
- **Gélose au sang cuit** appelée aussi gélose chocolat, elle permet de libérer par la cuisson des facteurs de croissance supplémentaires.

<p>Noyau pénème (Pénicilline)</p> 	<p>Noyau clavame (Inhibiteur de β-lactamases)</p> 
<p>Noyau céphème (Céphalosporine)</p> 	<p>Oxacéphème</p> 
<p>Carbapénème</p> 	<p>Monobactame</p> 

Annexe 3 : Classification des β -lactamines.



Acide 6-aminopénicillanique



Annexe 4 : Structure chimique des pénicillines.

Antibiotiques	Charges (µg)	sensible	intermédiaire	résistante
Ampicilline	30	>17	14 – 16	< 13
Amoxicilline+Acide clavulanique	20+10	>18	14 – 17	< 13
Céfazoline	30	>18	15 – 17	< 14
Céfotaxime	30	>23	15-22	< 14
Céfoxitine	30	>18	15-17	< 14
Imipénème	10	>16	14-15	< 13
Gentamicine	10	>15	13-14	< 12
Amikacine	30	>17	15-16	< 14
Acide nalidixique	30	>19	14-18	< 13
Ciprofloxacine	5	>21	16-20	< 15
Chloramphénicol	30	>18	13-17	< 12
Triméthoprim-sulfaméthoxazole	1.25+23.75	>16	11-15	< 10
colistine	50	>15	/	< 15
Furane	300	>17	15-16	< 14

Annexe 5 : Valeurs critiques des diamètres (mm) des zones d'inhibition pour *Entérobactéries* (CLSI, 2008).

Tests	Réactions/enzymes	Résultats négatifs	Résultats positifs
ONPG	Bêta-galactosidase	Incolore	Jaune
ADH	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/orange
LDC	Lysine décarboxylase	Jaune	Rouge/orange
ODC	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orange
CIT	Citrate utilisation	Vert pâle/jaune	Bleu-vert/bleu
H ₂ S	H ₂ S production	Incolore/grisâtre	Dépôt noir/fin liseré
URE	Urease	Jaune	Rouge/orange
TDA	Tryptophane desaminase	TDA / IMMEDIAT	
		Jaune	Marron-rougeâtre
IND	Production indole	JAMES / IMMEDIAT	
		Incolore Jaune	Rose
VP	production d'acétoïne	VP1+VP2 / 15 MIN	
		Incolore	Rouge brique
GEL	Gélatinase	Aucune diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	Glucose fermentation / oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune/jaune gris
MAN	Mannitol fermentation / oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
IND	Inositol fermentation / oxydation		
SOR	Sorbitol fermentation / oxydation		
RHA	Rhamnose fermentation / oxydation		
SAC	Saccharose fermentation / oxydation		
MEL	Melibiose fermentation / oxydation		
AMY	Amygdaline fermentation / oxydation		
ARA	Arabinose fermentation / oxydation		

Annexe 6 : tableau de lecture de la galerie api 20E.