



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الميكروبيولوجيا

Département de Microbiologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Générale et biologies Moléculaire des microorganismes

Intitulé:

**Profil de sensibilité aux antibiotiques des Entérobactéries uropathogènes
(*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*)**

Présenté et soutenu par: MENDACI AMEL

Le : 23/06/2015

MIHOUBI SIHEM

Devant le jury:

Président: M^{me} MERGOUD L. Maître assistante classe A. Université des Frères Mentouri Constantine

Rapporteur: M^{elle} MEZIANI M. Maître assistante classe B. Université des Frères Mentouri Constantine

Examinateur: M^{me} ZERMENE F. Maître assistante classe A. Université des Frères Mentouri Constantine

Année Universitaire : 2014-2015

REMERCIEMENTS

Nous remercions en premier lieu Allah le tout puissant de nous avoir guidés et donné le courage d'arriver à ce stade.

Nous sommes très honorés et tenons à remercier les membres du jury:

M^{me} MERGOUD L. Maître assistante classe A à l'Université des Frères Mentouri de Constantine pour avoir accepté de présider le jury.

M^{me} ZERMENE F. Maître assistante classe A à l'Université des Frères Mentouri de Constantine Pour avoir accepté de lire et de faire l'analyse critique de ce mémoire en tant que examinatrice.

Nous tenons à remercier tout particulièrement **M^{elle} MEZIANI M.** Maître assistante classe B à l'Université des Frères Mentouri de Constantine, de nous avoir encadrés et suivies durant la réalisation de notre étude.

Nous remercions également: **Mr KHMISSE S.** médecin biologiste à l'hôpital militaire régional universitaire de Constantine "Allaoua Benbaatouche" et **Mr BELBEKOUICHE T.** technicien à l'hôpital militaire régional universitaire de Constantine "Allaoua Benbaatouche", pour leur conseils et pour nous avoir facilitée l'accès au laboratoire et la réalisation de ce travail.

Merci à toutes les personnes ayant contribué de loin ou de près a la réalisation de cette étude.

DEDICACES

C'est avec une profonde et sincères gratitude que je dédie ce modeste travail:

À celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse de courage de responsabilité et d'amour, votre prière, votre bénédiction, et votre patience qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite. Que dieux te garde, te comble de santé, et te donne longue vie ma douce maman

A mon défunt père qui est plus de ce monde mais son âme reste toujours prêt de moi pour me soutenir, que dieu t'accueille dans son vaste paradis.

A mes chères sœurs Aziza, Warda, Radia, qui m'ont soutenues avec leur amour et bonté et gentillesse. Je souhaite simplement que Dieu nous accorde une longue vie et une bonne santé pour que nous puissions cheminer ensemble sur la route du destin avec amour, honnêteté, sincérité, respect mutuel, solidarité, dignité comme nous l'ont enseigné nos parents.

A mes chers frères Boubakeur, Massoud, Bachir, Didine, Khaled, Azzedine, Billel, j'ai beaucoup apprécié l'estime et la tendresse que vous me portez. Que Dieu vous protège.

A ma chère tante Djida, que Allah te bénisse et te protège te donne longue vie.

A mes belles sœurs, Soumaia, Wafa, Salima, Julie, que dieu vous protège et vous accorde une longue vie pour que vous assistiez les réussites de vos enfants.

A mon neveu Houssam et mes nièces Tawes, Julia, Rose, Batoul, votre innocence et gaieté m'ont donné une bouffée d'énergie. Que Dieu fasse que vous suiviez mes traces et que vous fassiez plus que moi. Je vous aime.

A ma chère Siham, tu as été pour moi durant ces années passées ensemble plus qu'une amie, une sœur. Qu'Allah te protège, je t'aime.

À mes amies: Abir, Ahlam, Aziza, Imane, Amina, avec laquelle j'ai partagé de très bons moments à l'université et l'hôpital.

MENDACI AMEL

DEDICACES

Que ce travail témoigne de mes respects:

À mes parents:

Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.

Grâce à leurs tendres encouragements et leurs grands sacrifices, ils ont pu créer le climat affectueux et propice à la poursuite de mes études.

Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération et mes profonds sentiments envers eux.

Je prie le bon Dieu de les bénir, de veiller sur eux, en espérant qu'ils seront toujours fiers de moi.

À ma sœur Kawthar et à mon frère Akram.

À la famille MIHOUBI.

Ils vont trouver ici l'expression de mes sentiments de respect et de reconnaissance pour le soutien qu'ils n'ont cessé de me porter.

À tous mes professeurs: Leur générosité et leur soutien m'oblige de leurs témoigner mon profond respect et ma loyale considération.

À ma chère amie Amel avec laquelle j'ai partagé de très bons moments.

À tous mes amis et mes collègues : Ils vont trouver ici le témoignage d'une fidélité et d'une amitié infinie.

MIHOUBI SIHAM

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	2
CHAPITRE1 : GENERALITES.....	2
1. APPAREIL URINAIRE	2
2. DEFINITION DE L'URINE	2
3. DEFINITION DES INFECTIONS URINAIRES	2
4. ETIOLOGIE	3
5. TRAITEMENT MEDICALE	4
CHAPITRE2 : RESISTANCE BACTERIENNE AUX ANTIBIOTIQUES	5
1. DEFINITION DES ANTIBIOTIQUES.....	5
2. NOTIONS DE RESISTANCE ET SENSIBILITE.....	6
2.1. Résistance naturelle et résistance acquise.....	6
2.1.1. Résistance naturelle.....	6
2.1.2. Résistance acquise	6
3. MODE D'ACTION	7
3.1. Antibiotiques agissant sur la synthèse du peptidoglycane	8
3.2. Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines	8
3.3. Antibiotiques agissant sur les acides nucléiques	8
3.4. Antibiotiques agissant sur les membranes.....	9
4. CLASSIFICATION DES ANTIBIOTIQUES.....	9
4.1. Critères de classification.....	9
4.1.1. Classification selon l'origine.....	9
4.1.2. Classification des antibiotiques en fonction de leur spectre d'activité.....	10
4.1.3. Classification en familles d'antibiotiques.....	10
CHAPITRE 3 : BIOLOGIE DES ENTEROBACTERIES UROPATHOGENES.....	12
1. BIOLOGIE DES ENTEROBACTERIES	12
1.1. Définition	12
1.2. Historique	12
1.3. Classification	13
1.4. Habitat	15
1.5. Caractères bactériologiques	15
1.5.1 Les caractères morphologiques.....	15
1.5.2. Les caractères cultureux.....	15
1.5.3. Les caractères biochimiques.....	15
1.5.4. Les caractères antigéniques.....	16
2. LES ENTEROBACTERIES UROPATHOGENES	17
2.1. Escherichia coli.....	17
2.1.1. Définition.....	17
2.1.2. Habitat.....	17

2.1.3. Caractères morphologiques et cultureux	17
2.1.4. Caractères biochimique	18
2.1.5. Pouvoir pathogène.....	18
2.1.6. Résistance aux antibiotiques	18
2.2. Proteus mirabilis	19
2.2.1. Définition.....	19
2.2.2. Habitat.....	19
2.2.3. Caractères morphologique et cultureux	19
2.2.4. Caractères biochimiques.....	20
2.2.5. Pouvoir pathogène.....	20
2.2.6. Résistance aux antibiotiques	20
2.3. Klebsiella pneumoniae.....	21
2.3.1. Définition.....	21
2.3.2. Habitat.....	21
2.3.3. Caractères morphologiques et cultureux.....	22
2.3.4. Caractères biochimiques.....	22
2.3.5. Pouvoir pathogène.....	22
2.3.6. Résistance aux antibiotiques	22
MATERIELS ET METHODES	24
1. DUREE DE L'ETUDE	24
2. LIEU DE L'ETUDE	24
3. ECHANTILLONNAGE (POPULATION DE L'ETUDE)	24
4. METHODES.....	24
4.1. Etude macroscopique.....	24
4.2. Etudes microscopique.....	25
4.2.1. Etat frais.....	25
4.2.2. Coloration de Gram	25
4.3. Etude biochimique	26
4.3.1. Identification par galeries classique	26
4.3.2. Identification des entérobactéries par la galerie API 20 E.....	34
4.4. Etude de la sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries	35
4.4.1. Milieu pour l'antibiogramme.....	35
4.4.2. Réalisation de l'inoculum bactérienne	36
4.4.3. Ensemencement par écouvillonnage.....	36
4.4.4. Choix des antibiotiques.....	36
4.4.5. Application des disques.....	36
4.4.6. Lecture et interprétation	36
RESULTATS ET DISCUSSION	37
1. RESULTATS	37
1.1. Etude macroscopique.....	37
1.2. Etude microscopique	38
1.2.1. Etat frais.....	38

1.2.2. Coloration de gram	38
1.3. Etude biochimique	39
1.3.1. Identification par La galerie classique	39
1.3.2. Identification par la galerie API 20 E.....	46
1.4. Résistance des entérobactéries aux antibiotiques	47
2. DISCUSSION	50
2.1. Résultat de l'étude macroscopique et microscopique.....	50
2.2. Résultats des tests biochimiques	50
2.3. Résistance des entérobactéries aux antibiotiques	55
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	57
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE	58
ANNEXES.....	63

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADH : Arginine di hydrolase

AK : Amikacine

AMP : Ampicilline

AMC : Amoxicilline-Acide clavulanique

BLSE : Bêta-lactamases à spectre étendu

CA-SFM : Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie

CFM : Céfixime

CIP : Ciprofloxacine

CN : Gentamycine

CT : Colistine

CTX : Céfotaxime

FT : Furanes

H₂S : Sulfure d'hydrogène

IP : Imipénème

IU : Infection urinaire

KZ : Céfazoline

LDC : Lysine décarboxylase

MEVAG : Milieu d'étude de la voie d'attaque des glucides

ODC : Ornithine décarboxylase

OFX : Ofloxacine

ONPG : Orthonitrophényl-β-D-galactopyrannoside

PRL: Piperacilline

RM : Rouge de Méthyle

R : Resistance

S : Sensibilité

TDA : Tryptophane désaminase

TSI : Triple Sugar Iron

VP : Vosges-Proskauer

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Principales familles d'antibiotiques.....	11
Tableau 2: Subdivisions hiérarchiques de classification des entérobactéries.....	13
Tableau 3: Classification des espèces d'Entérobactéries les plus fréquentes en clinique humaine.....	14
Tableau 4: Le profil de résistance/sensibilité pour les souches testées.....	49

LISTE DES FIGURES

Figure01 : Aspect des trois souches sur GN	37
Figure02 : Aspect des trois souches sur Hektoen.....	38
Figure03 : Bacilles Gram négatif (coloration de Gram)	38
Figure04 : Aspect du milieu TSI.....	39
Figure05 : Aspect du milieu mannitol-mobilité.....	40
Figure06 : Aspect du milieu citrate de Simmons	40
Figure07 : Aspect de l'eau peptoné exempté d'indole.....	41
Figure08 : Aspect du milieu urée-indole.....	41
Figure09 : Aspect du milieu MEVAG	42
Figure10 : Test ONPG	43
Figure11 : Test VP-RM.....	43
Figure12 : Test de Nitrate réductase	44
Figure13 : Test de catalase.....	44
Figure14 : Test d'oxydase.....	45
Figure15 : Milieu moeller	46
Figure16 : <i>E.coli</i> par galerie API20E.....	46
Figure17 : <i>P.mirabilis</i> par galerie API20E	46
Figure18 : <i>K.pneumoniae</i> par galerie API20E	47
Figure19 : Antibiogramme de <i>P. mirabilis</i>	47
Figure20 : Antibiogramme de <i>E. coli</i>	48
Figure21 : Antibiogramme de <i>K. pneumoniae</i>	48

Résumé

Les entérobactéries représentent une des principales familles de bacilles à Gram négatif responsables des infections urinaires graves.

Notre étude menée au laboratoire de bactériologie de l'hôpital militaire régional universitaire de Constantine "Allaoua Benbaatouche" et au niveau du laboratoire de microbiologie à l'université des Frères Mentouri de Constantine ; sur une période de deux mois (Mars, Mai 2015). Un totale de 740 prélèvements des urines de patients hospitalisés sont effectués, trois souches d'entérobactéries ont été identifiées.

Le but de cette étude est de mettre en place un algorithme d'identification de ces 3 souches isolées à partir de l'urine, cette démarche a été réalisée d'une part selon les caractères morphologiques et biochimiques qui ont été effectuée par la galerie classique et la galerie API20E ; et d'autre part la détermination du profil de résistance vis-à-vis des antibiotiques testés afin d'évaluer et mettre en évidence l'état de la résistance de ce groupe de germes.

Une sensibilité totale à tous les β -lactamines chez *E. coli* a été révélé ; et le même profil chez *K. pneumoniae* sauf à l'ampicilline auquel possède une résistance naturelle, ainsi que chez *P. mirabilis* qui est une résistance acquise qui peut être due à une mutagénèse. En ce qui concerne les autre familles d'antibiotiques les trois souches ont montré une sensibilité entière envers ces antibiotiques ; à l'exception de *p. mirabilis* qui est résistant à la colistine et le furane (caractère naturelle et spécifique). En terme globale ; aucune résistance acquise a été observé chez *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*, ce qui indique que ces deux souches isolées demeure sauvages.

Le changement permanant des résistances d'entérobactéries aux différents antibiotiques doit conduire à renforcer la surveillance et organiser des contrôles périodiques dans notre pays, afin de maitriser toutes sortes d'anomalies.

Mots clés: Entérobactéries, profil de Résistance, infections urinaires, identification.

ملخص

السلالات المعوية *Enterobacteriaceae* تمثل واحدة من أهم العائلات الرئيسية السلبية الغرام المسؤولة عن الالتهابات البولية الخطيرة.

تمت دراستنا في مخبر علم الجراثيم في المستشفى العسكري الجامعي الإقليمي لقسنطينة علاوة بن بعطوش وعلى مستوى مخبر الميكروبيولوجيا في جامعة الإخوة منتوري قسنطينة. لمدة شهرين (29 مارس, 7 ماي 2015), من بين 740 عينة من البول لمرضى بالمستشفى تم انتقاء 3 سلالات و دراستها.

إن الغرض من هذه الدراسة هو وضع منهجية لتعريف السلالات الثلاث التي تم عزلها من عينات البول, و تم تشخيصها على أساس الخصائص المورفولوجية و البيوكيميائية من جهة وذلك بواسطة الطريقة الكلاسيكية البيوكيميائية و , الطريقة المعتمدة API20E, و من جهة أخرى دواصة رد فعل هذه السلالات اتجاه المضادات الحيوية لتحديد حالة الحساسية أو المقاومة لهذه المجموعة.

تم ملاحظة حساسية تامة لمجموعة البيبتالكتام عند *E. coli*, و حساسية لهذه المجموعة ماعدا ampicilline التي هي عبارة عن مقاومة مكتسبة عند *P. mirabilis* التي يمكن أن تكون ناتجة عن طفرة و صفة طبيعية عند *K. pneumoniae*

أما بالنسبة للمضادات الحيوية الأخرى تم ملاحظة حساسية تامة للسلالات الثلاث ماعدا *P. mirabilis* الذي أظهر مقاومة اتجاه colistine و furane (صفة طبيعية و مميزة). بصفة شاملة لم يتم ملاحظة أي نوع من المقاومة المكتسبة عند *E. coli* و *K. pneumoniae* مما يفسر أنها سلالات نقية.

إن التغيير المستمر لمقاومة المضادات الحيوية للسلالة البكتيرية *Enterobacteriaceae* يفرض تدعيم الرقابة في بلدنا و تبني ممارسات جيدة في مجال المضادات الحيوية من أجل السيطرة على جميع أنواع الشذوذ.

الكلمات المفتاحية: السلالات المعوية, نمط المقاومة تجاه المضادات الحيوية, الالتهابات البولية, التشخيص.

Abstract

Enterobacteriaceae represent one of the main families of Gram negative bacilli responsible for serious urinary tract infections.

Our study was conducted at bacteriological laboratory of regional military university hospital in Constantine "Allawa Benbaatouche" and at microbiology laboratory of University Mentouri Brothers Constantine 1; during two months (March, Mai 2015). A total of 740 urine samples from hospitalized patients are performed, three *Enterobacteriaceae* strains were identified.

The purpose of this study is to establish an identification algorithm of the 3 strains isolated from urine, this has been achieved firstly by morphological and biochemical features that have been performed by classical and API20E galleries; and secondly determining the resistance profile with respect to antibiotics tested in order to evaluate and highlight the resistance state of this group of germs.

A total sensitivity to the whole β -lactam in *E. coli* has been revealed; and the same profile in *K. pneumoniae* except ampicillin to which it has a natural resistance, also an acquired resistance in *P.mirabilis* which may be due to mutagenesis. As regards to other families of antibiotics the three strains showed a full sensitivity to these antibiotics; except the *p. mirabilis* which is resistant to colistin and furan (natural and specific character). Globally; no acquired resistance was observed in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, indicating that these two strains remain wild.

The permanent change of *Enterobacteriaceae* resistance to different antibiotics should lead to strengthen monitoring and organize periodic controls in our country, in order to control all kinds of anomalies.

Key words: *Enterobacteriaceae*, resistance profile, urinary tract infections, identification

Introduction

Introduction

L'intérêt porté ces dernières années aux infections urinaires et leur prise en charge en thérapeutique anti-infectieuse restent encore d'actualité. En effet ces infections constituent un véritable problème de santé Publique et elles viennent en deuxième position après les infections respiratoires (**Achille, 2006**).

Les IU sont habituellement causées par les bactéries qui proviennent de la flore intestinale ou périnéale. Les bacilles à Gram négatif sont les germes le plus souvent isolés et sont représentés essentiellement par les entérobactéries. *Escherichia coli* est le germe le plus incriminé il est responsable dans 85% des cas, *Klebsiella pneumoniae* vient en deuxième position avec 10 % des cas, *Proteus mirabilis* vient en troisième position avec 4% des cas, d'autres bacilles à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*) ou cocci à Gram positif (*Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus sp*) peuvent être moins souvent en cause (**Bruyère et al.,2008; Ben Abdallah et al., 2005**).

L'épidémiologie bactérienne des infections urinaires a beaucoup changé ces 20 dernières années, les bactéries en cause étant de plus en plus variées et surtout présentant une résistance accrue aux antibiotiques ce qui aboutit dans certains des cas à un échec thérapeutique. Cette évolution imprévisible de la résistance, doit inciter à une surveillance régulière de la sensibilité des espèces bactériennes prédominantes aux différents antibiotiques utilisés (**Souna, 2011**).

C'est dans cet ordre d'idée que nous sommes proposés de réaliser une étude macroscopique et microscopique de quelques entérobactéries uropathogènes (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*) ainsi que leur identifications biochimiques, et leur profil de sensibilités aux antibiotiques durant une période de deux mois au niveau de l'hôpital militaire régional universitaire (HMRU) de Constantine "Allaoua Benbaatouche" et au niveau du laboratoire de microbiologie à l'université des Frères Mentouri Constantine .

Synthèse bibliographique

Synthèse bibliographique

Chapitre1: Généralités

1. Appareil urinaire

L'appareil urinaire correspond à l'ensemble des organes dont le rôle consiste en l'expulsion après filtrage des déchets humains liquides sous forme d'urine. L'appareil urinaire est composé des reins, des uretères, de la vessie, de l'urètre et du méat urinaire et de nombreux vaisseaux sanguins permettant d'éliminer les déchets azotés produit par le métabolisme cellulaire. Lors de l'utilisation de molécules, comme les protéines, par les cellules, ces dernières rejettent de l'azote, une substance toxique pour le corps si elle est très concentrée. On se doit donc de l'éliminer, sous forme d'urée. L'urée voyage dans le système circulatoire jusqu'au rein, où le sang est filtré. L'urée ainsi qu'un peu d'eau se retrouve dans le rein lui-même, puis descend l'uretère jusqu'à la vessie, où l'urine est stockée. Lorsqu'il est accumulé en grande quantité, l'urine descend l'urètre vers l'extérieur du corps¹.

2. Définition de l'urine

Issue du latin *urina* et du grec *ouron*, l'urine est un liquide organique de couleur jaune ambrée, d'odeur safranée souvent acide. Elle est secrétée par les reins puis emmagasinée dans la vessie entre les mictions enfin évacuée à travers l'urètre (Zitti, 2014).

3. Définition des infections urinaires

Une infection urinaire (IU) correspond à l'agression d'un tissu par un (ou plusieurs) micro-organisme, en terme global elle est définie par la présence anormal de germe dans l'urine. Elle regroupe à la fois la colonisation ou bactériurie asymptomatique et l'infection du tractus urinaire symptomatique qui génère une réponse inflammatoire et des signes de nature et d'intensité variables selon le terrain. La "bactériurie" est comme étant la présence de germes dans les urines vésicales et sous-vésicales. L'infection du "tractus urinaire" est comme étant l'infection de l'appareil urinaire, des muqueuses et parenchyme du rein et des voies excrétrices sous-jacentes (uretère exclu). Elle associe au moins un des signes

¹ <http://www.corps.dufouraubin.com/pipi/pipi.htm>

ou symptômes suivants: fièvre ($> 38\text{ }^{\circ}\text{C}$), impériosité mictionnelle, pollakiurie, brûlures mictionnelles ou douleur sous-pubienne, douleur lombaire (**Bruyère et al., 2008; Vorkauffer, 2011**).

Les critères de l'infection urinaire sont l'existence d'une bactériurie significative (supérieure à 10^5 UFC/ml) et la présence de polynucléaires en grand nombre (supérieur à 10^4 leucocytes/ml) dans les urines du matin quel que soit la symptomatologie clinique et parfois en son absence (**Zitti, 2014**).

4. Etiologie

Les micro-organismes retrouvés le plus fréquemment chez les patients présentant une infection urinaire sont décrits comme uropathogènes (**Achille, 2006; Schmiemann et al., 2010; Foxman, 2002**). Ceci inclut :

➤ Les bacilles à Gram négatif

La plupart des infections du tractus urinaire sont dues à la propagation par voie ascendante des bactéries d'origine intestinale d'où la prédominance des entérobactéries au sein desquels: *Escherichia coli* est le plus souvent mis en cause (60-85%) *Proteus* (*Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus rettgeri*) et *Klebsiella* (*Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*) qui comptent pour environ 4% chacune. Par ailleurs, d'autres bacilles à Gram négatif sont responsables des infections urinaires nosocomiales, résultant d'une contamination par manœuvres instrumentales, *Pseudomonas aeruginosa* et le plus fréquemment retrouvé pour environ (5-10%).

➤ Les cocci à Gram Positif

Les infections urinaires à cocci à Gram Positif sont rares. Ce sont: les *Staphylocoques* à coagulase négative (*S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*) sont retrouvés dans moins de 4% des IU simples. Les *Streptocoque* des groupes D (*Entérocoque*), G et B sont surtout rencontrés lors d'infection urinaire nosocomiales pour environ (5-10%).

➤ Rarement, des virus sont responsables de cystites hémorragiques et *Chlamydia trachomatis* ou *Neisseria gonorrhoeae* sont responsables d'urétrite.

5. Traitement médicale

Comme pour toute maladie infectieuse, la prescription d'antibiotiques est le traitement le plus indiqué pour les infections urinaires, il faut choisir un antibiotique qui s'éliminant en quantité suffisante et sous forme active dans l'urine, de préférence qui atteigne des concentrations sanguines et lymphatiques élevées pour stériliser l'ensemble de l'appareil urinaire. L'antibiothérapie doit être adaptée aux résultats de l'antibiogramme, sa durée varie d'une prise unique à des prises pluriquotidiennes sur plusieurs jours et dépendra de certaines caractéristiques du patient toute en tenant compte du terrain: allergique ; précaution chez la femme enceinte ; et précaution chez l'insuffisant rénal.

Les produits les plus prescrits et qui sont le plus régulièrement actifs sont: les sulfamides l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole, les nitrofurantoin, l'ampicilline et les produit apparentés, une céphalosporine, l'acide nalidixique de préférence associé à un autre agent, les aminosides et colimycine. Il faut toujours associer à l'antibiothérapie des mesures générales tels que: boissons abondantes, une miction fréquentes, hygiène périnéale, traitement de toute constipation ou diarrhée concomitance. Un Examen cytobactériologique des urines (ECBU) de contrôle pratiqué 2 jours après l'arrêt des antibiotiques vérifie l'efficacité du traitement (**Pechère et al., 1991; Kernbaum, 1985**).

Chapitre2: Résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance des bactéries aux antibiotiques pose aujourd'hui un problème majeur de santé publique, comme l'attestent de nombreux rapports publiés (**Pechère et al., 1995 ; Wis et al., 1998**). Les entérobactéries sont souvent les bactéries responsables d'infections dues à des souches multirésistantes.

Aucune espèce bactérienne, parmi celles croisées en pathologie humaine, et aucun antibiotique, même parmi les plus récents, n'échappe aujourd'hui au phénomène de résistance, notamment en pathologie infectieuse urinaire (**Goettsch et al., 2003 ; Goldstein, 2000 ; Gupta et al., 1999**).

Les infections urinaires sont très fréquentes aussi bien en milieu communautaire qu'hospitalier (**Larabi et al., 2003**). Elles occupent la deuxième position après les infections respiratoires (**Alvarez et al., 1992**). Les bactéries les plus fréquemment isolées appartiennent à la famille des entérobactéries avec *E. coli* en tête de liste.

1. Définition des antibiotiques

Du grec *anti*: «contre» et *bios*: «la vie». Au sens strict, les antibiotiques sont des agents antibactériens naturels d'origine biologique ; qui, à basse concentration, peuvent inhiber la croissance des micro-organismes. Ils sont élaborés par des microorganismes, champignons et diverses bactéries. Les produits employés actuellement sont des dérivés semi-synthétiques préparés par modification de produits de base naturels (**Ndiaye, 2005**).

Le premier antibiotique a été découvert par Flemming en 1929, c'était la pénicilline mais Il a fini par abandonner cette recherche après avoir publié ses résultats. En 1939, Howard Florey (professeur de pathologie à Oxford) testait l'activité de substances bactéricides. Son collaborateur, Ernest Chain a entrepris de reprendre les travaux de Flemming et de purifier la pénicilline avec l'aide de Heatley, un biochimiste. Ils réussirent et confirmèrent les résultats de Flemming, ce qui leur valut le prix Nobel (**Favet, 2014**).

2. Notions de résistance et sensibilité

La résistance bactérienne à un antibiotique 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). La résistance peut être soit naturelle, soit acquise. En fait, une souche est dite « résistante » lorsque la concentration d'antibiotique qu'elle est capable de supporter est plus élevée que la concentration que l'on peut atteindre in vivo à la suite d'un traitement (Sylvie, 2009).

2.1.Résistance naturelle et résistance acquise

2.1.1. Résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque correspond à la capacité de résister à la présence d'un antibiotique pour toutes les souches d'une espèce ou d'un genre bactérien. La Société Française de Microbiologie (SFM) définit la résistance naturelle comme la caractéristique d'une espèce bactérienne qui se traduit par des concentrations minimales inhibitrices (CMI) supérieures à la concentration critique supérieure des tests de sensibilité pour l'antibiotique concerné. Habituellement, le support de cette résistance est chromosomique (Peyrou, 2001).

2.1.2. Résistance acquise

On oppose à la résistance naturelle, propriété d'espèce ou de genre, la résistance acquise qui est une propriété de souche. Cette dernière correspond à la capacité de supporter une concentration d'antibiotique beaucoup plus élevée que celle supportée par les autres souches de la même espèce. Elle peut s'acquérir soit par mutation chromosomique, soit par acquisition de matériel génétique exogène (Peyrou, 2001).

2.1.2.1. Résistance par mutation chromosomique

Le mécanisme chromosomique des résistances bactériennes peut être dû à une mutation spontanée au niveau du génome ou à une recombinaison. La mutation est un changement fortuit dans la séquence des acides nucléiques qui peut transformer la molécule cible d'un antibiotique et rendre l'interaction avec l'antibiotique impossible. Quant à la recombinaison, elle consiste en un transfert de fragments de gènes d'un endroit du chromosome bactérien à un autre. Si ces

fragments sont incorporés à des endroits bien précis, ils sont appelés intégrons, alors que s'ils se déplacent librement, il s'agit de transposons (Zogheib et al., 2005).

2.1.2.2. Résistance par acquisition de matériel génétique exogène (extra-chromosomique)

Ce type de résistance procède de l'acquisition de gènes de résistance par l'intermédiaire d'un plasmide ou de transposons à la faveur de 3 mécanismes d'échange possibles: conjugaison, transformation ou transduction.

a- Conjugaison

Dans le phénomène de conjugaison, une bactérie donneuse transmet à une bactérie receveuse une copie de son plasmide porteur de gène de résistance (appelé plasmide R ou facteur R). Ce mécanisme peut s'effectuer entre bactéries de la même espèce, au sein d'un même genre ou parfois entre bactéries de genres différents d'où son efficacité. Par exemple, *Staphylococcus aureus* peut échanger du matériel génétique avec *E. coli* (Peyrou, 2001).

b- Transformation

La transformation est le résultat d'un réarrangement de séquences d'ADN échangées entre deux bactéries. On peut alors obtenir de nouveaux gènes de résistance. Ce processus se fait généralement entre bactéries de genre proche car il doit y avoir une forte analogie entre les séquences nucléotidiques pour permettre la recombinaison (Peyrou, 2001).

c- Transduction

Dans la transduction, un virus bactériophage incorpore une séquence d'ADN d'une bactérie et la transmet à une autre bactérie. Du fait de la spécificité des bactériophages, ce phénomène n'a lieu que pour les bactéries de la même espèce (Peyrou, 2001).

3. Mode d'action

Les antibiotiques bloquent de manière spécifique les processus métaboliques vitaux des bactéries sensibles et arrêtent ainsi leur développement, le plus souvent seulement temporairement (effet bactériostatique) mais parfois définitivement (effet bactéricide).

Il existe différents types d'antibiotiques capables d'agir sur les bactéries selon différents mécanismes (Gaudy, 2005).

3.1. Antibiotiques agissant sur la synthèse du peptidoglycane

Le peptidoglycane est un polymère réticulé fait de chaînes de glycanes relié par des peptides. Cette molécule n'existe que chez les bactéries et assure la rigidité de la paroi. Les précurseurs du peptidoglycane sont synthétisés dans le cytoplasme et assemblés à l'extérieur de la membrane cytoplasmique. Lorsque les bactéries sont en phase de croissance, il existe simultanément des phénomènes de synthèse et de destruction du peptidoglycane. L'équilibre entre ces deux phénomènes est rompu par les antibiotiques inhibant la synthèse du peptidoglycane. Il en résulte une altération de la paroi ayant un effet létal pour la bactérie (Perronne, 1999).

3.2. Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines

Plusieurs familles d'antibiotiques peuvent inhiber par différents mécanismes, l'élongation de la chaîne polypeptidique chez les bactéries (Perronne, 1999).

- Antibiotiques se fixant sur la sous-unité 30S du ribosome: Les cyclines se fixent de manière réversible et les aminoacides de manière irréversible sur la sous-unité 30S.
- Antibiotiques se fixant sur la sous-unité 50S du ribosome: Le chloramphénicol, les macrolides, les lincosamides et les synergistines se fixent de manière réversible sur la sous-unité 50S.
- Antibiotique inhibant le facteur d'élongation G: C'est le mode d'action de l'acide fusidique.

3.3. Antibiotiques agissant sur les acides nucléiques

On distinguera les antibiotiques actifs d'une part sur la synthèse des ARN et d'autre part, sur la synthèse des ADN ou de leurs précurseurs.

- Les inhibiteurs de l'ARN polymérase sont représentés par la classe des ansamycines, tandis que les inhibiteurs des topoisomérases regroupent les quinolones. Ces 2 familles d'antibiotiques doivent leur spécificité d'action aux différences qui existent entre les enzymes procaryotes et eucaryotes et qui permettent la reconnaissance spécifique d'un type de cible exclusivement.
- Les sulfamides agissent sur la synthèse de l'acide folique, un cofacteur de la synthèse des bases puriques et pyrimidiques à incorporer dans les acides nucléiques. Leur spécificité d'action provient du fait que les eucaryotes ne synthétisent pas d'acide folique.

- Les diaminopyridines inhibent la réduction de l'acide folique en tirant parti de la différence de sensibilité de la dihydrofolate réductase bactérienne par comparaison avec l'enzyme des cellules eucaryotes (**Agregé et al., 2015**).

3.4. Antibiotiques agissant sur les membranes

Les polymyxines se fixent sur les membranes bactériennes (en particulier la membrane externe des bactéries à Gram négatif) et les désorganisent (**Perronne, 1999**).

4. Classification des antibiotiques

Actuellement, il existe un nombre très important d'antibiotiques. Il est plus facile pour le praticien, en vue d'une prescription, d'avoir un classement rigoureux des molécules existantes. Une famille d'antibiotiques regroupe des composés dont les structures chimiques sont proches. Les modes d'action, ainsi que les spectres d'action, sont aussi semblables. Cette famille pourra ensuite être subdivisée en groupes et en sous-groupes. Cependant, il faut noter qu'il existe des antibiotiques « orphelins », n'appartenant à aucune famille tels que l'acide fusidique, la fosfomycine (**Agregé et al., 2015**).

4.1. Critères de classification

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères:

- Leur origine (bio-synthétisés par des champignons, des bacilles ou des Streptomyces, artificiels)
- Le type de leur activité antibactérienne.
- Leur structure chimique (dérivés d'acides aminés, hétérosidiques ou polycycliques).

4.1.1. Classification selon l'origine

On distingue trois grands groupes d'antibiotiques:

- Les antibiotiques naturels, élaborés par les micro-organismes:
 - Des champignons inférieurs: Penicillium, Cephalosporium
 - Des bactéries: Bacillus et surtout Streptomyces (90% des antibiotiques sont produits par des Streptomyces)
- Les antibiotiques hémisynthétiques ou de ½ synthèse: ils résultent de la transformation chimique des composés naturels.

- Les antibiotiques artificiels: obtenus par synthèse chimique (**Agregé et al., 2015**).

4.1.2. Classification des antibiotiques en fonction de leur spectre d'activité

Le spectre d'activité d'un anti-infectieux correspond à l'ensemble des espèces bactériennes qui lui sont sensibles. Lorsque le spectre d'activité est limité à un certain nombre d'espèces bactériennes, il est dit « étroit », tandis qu'un antibiotique actif sur de nombreuses bactéries est dit à spectre « large ».

Enfin, une bactérie insensible à un antibiotique est définie comme étant résistante. Un antibiotique à spectre large agit sur un grand nombre de bactéries (sur les bacilles et coques Gram + et Gram -). Un antibiotique à spectre étroit agit seulement sur les bacilles et coques Gram + ou Gram - (**Agregé et al., 2015**).

4.1.3. Classification en familles d'antibiotiques

Cette classification est la plus utilisée car, fondée sur la structure chimique de base d'un chef de file, premier d'une série, elle regroupe « en familles » ou « classes » des produits ayant des caractéristiques communes: de structure, de spectre d'activité, de cible moléculaire bactérienne, de sensibilité à des mécanismes de résistance (résistances croisées) et d'indications cliniques (**Agregé et al., 2015**).

Tableau1: Principales familles d'antibiotiques.

Famille	Sous-famille	Origine	Molécule(s)	
BêtaLactamines	Pénicillines	Naturelle	Pénicilline G	
		Semi-synthétique	Oxacilline et Cloxacilline (groupe M)	
			Ampicilline et amoxicilline (groupe A)	
	Céphalosporines	Naturelle ou Semi-synthétique	Céfaloine, Cefalexine (1 ère génération)	
			Céfalonium (2 ème génération)	
			Céfopérazone, Ceftiofur (3 ème génération)	
			Cefquinome (4ème génération)	
Polypeptides		Naturelle	Colistine	
			Bacitracine	
Aminoside		Naturelle ou semi-synthétique	Streptomycine, kanamycine, apramycine, gentamicine, néomycine...	
			Spectinomycine	
Macrolides		Naturelle ou semi-synthétique	Erythromycine, spiramycine, tylosine, Tilmicosine	
Apparentés aux macrolides		Lincosamides	Naturelle ou semi-synthétique	Lincomycine, clindamycine
Tétracyclines			Naturelle ou semi-synthétique	chlortétracycline, Oxytétracycline, Doxycycline.
Phénicols	Naturelle ou semi-synthétique		Florfénicol, chloramphénicol et thiamphénicol	
Sulfamides		Synthétique	Sulfaguanidine, sulfadimidine, sulfadiméthoxine...	
Quinolones		Synthétique	Acides nalidixique et oxolinique (1ère génération)	
			Fluméquine (2ème génération)	
			Enro-, dano-, marbo-, difloxacin (3ème génération)	

Chapitre 3: Biologie des Entérobactéries uropathogènes

1. Biologie des Entérobactéries

1.1. Définition

Famille de bactéries usuellement rencontrées en bactériologie médicale. La plupart des espèces sont des hôtes commensaux ou pathogènes du tube digestif de l'homme et des autres mammifères. Mais des genres plus récemment décrits sont plutôt des bactéries de l'environnement. En fait, les *Enterobacteriaceae* ont une définition bactériologique, ce sont des bactéries (**Bousseboua, 2005; Trystram, 2003**).

- Bacilles ou coccobacilles à Gram négatif (2 à 4 μ de long sur 0,4 à 0,6 μ de large);
- Mobiles avec ciliature péritriche ou immobiles;
- Non exigeants poussant sur milieux de culture ordinaires ;
- Aérobie - anaérobie facultatif ;
- Fermentant le glucose avec ou sans production de gaz ;
- Nitrate réductase positive (réduisant les nitrates en nitrites) ;
- Oxydase négatif;
- Catalase positif;
- Non sporulés.

1.2. Historique

La période de naissance de la famille des *Enterobacteriaceae* se situe entre 1937 lorsque Otoo Rahn proposa le genre *Enterobacter* pour regrouper les microorganismes présentant des propriétés biochimiques et morphologiques communes et parmi lesquels on trouve déjà des noms tels que *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia* ou *Shigella*. Deux années après cette description qui concerne 112 espèces, ce nombre fut ramené à 67. Avec les travaux de Don Brenner et de Patrick Grimont, cette famille a connu un essor et beaucoup de nouveaux genres et espèces furent découvertes (**Niang, 2003**).

En 1972, Edward et Ewing intégraient 11 genres et 26 espèces dans la famille des *Enterobacteriaceae* (Edwards et al., 1977). Une année après, 31 genres et 139 espèces étaient caractérisés. En 1985, Farmer et Coll décrivaient 22 genres comprenant 69 espèces et 29 groupes entériques (Farmer et al., 1985).

1.3. Classification

Tableau2: Subdivisions hiérarchiques de classification des entérobactéries (Boone et al., 2001).

Rangs taxonomiques	Classification
Domaine	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Enterobacteriales</i>
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>

La famille des *Enterobacteriaceae* comprend actuellement 100 espèces répertoriées. Les espèces les plus communément isolées en bactériologie clinique appartiennent à 12 genres : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia*. On peut les classer dans le tableau suivant (Pilet et al., 1979):

Tableau3: Classification des espèces d'Entérobactéries les plus fréquentes en clinique humaine.

		Genre	Espèces
GROUPE I	<i>Edwardsiellae</i>	<i>Edwardsiella</i>	
	<i>Salmonelleae</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella typhi</i> <i>Salmonella paratyphi</i> <i>Salmonella enteritidis</i>
GROUPE II	<i>Escherichieae</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>
		<i>Shigella</i>	<i>Shigella dysenteriae</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Shigella boydii</i> <i>Shigella sonnei</i>
	<i>Levineae</i>	<i>Levinea</i>	
GROUPE III	<i>Klebsielleae</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>
		<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter cloacae</i>
		<i>Serratia</i>	<i>Serratia marcescens</i>
		<i>Erwinia</i>	
GROUPE IV	<i>Proteae</i>	<i>Proteus</i>	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Proteus rettgerii</i>
		<i>Providencia</i>	
GROUPE V	<i>Yersinieae</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>

1.4. Habitat

Les entérobactéries sont des hôtes du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux où ils sont retrouvés soit à l'état de pathogène, soit à l'état de commensaux. Mais cette localisation digestive n'est pas exclusive. On les retrouve également dans l'environnement (sols, eau) où ils participent à la dégradation des matières organiques, à l'altération des plantes suite à des nécroses, à une dégénérescence ou à un ramollissement (Carbonnelle et *al.*, 1987 ; Drame, 2001).

1.5. Caractères bactériologiques

1.5.1 Les caractères morphologiques

Toutes les entérobactéries ont une morphologie habituellement typique de type bacilles à Gram négatif de 2-3 μ de long sur 0,6 μ de large, généralement polymorphes. De nombreuses espèces sont mobiles grâce à une ciliature péritriche, et d'autres sont immobiles (*Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia pestis*). La présence d'une capsule visible au microscope est habituelle chez les *Klebsielles*. La plupart des espèces pathogènes pour l'homme possèdent des fimbriae ou pili qui sont des facteurs d'adhésion (Bakhoun, 2004 ; Bossert et *al.*, 1986 ; LE Minor et *al.*, 1989).

1.5.2. Les caractères cultureux

Les entérobactéries poussent facilement sur les milieux ordinaires en 24 heures à 37°C en aérobiose et en anaérobiose. Sur milieux gélosés, les colonies d'entérobactéries sont habituellement lisses, brillantes, de structure homogène «type S: smooth ». Cet aspect peut évoluer après cultures successives pour donner des colonies à surface sèche rugueuse « type R: rough ». Les *Klebsielles* forment des colonies souvent très muqueuses « type M », larges et luisantes. Les *Proteus* ont tendance à envahir la gélose et à y former un tapis uniforme (Bakhoun, 2004 ; Pilet et *al.*, 1979).

1.5.3. Les caractères biochimiques

- Aéro-anaérobie et de type fermentatif du glucose (respiration aérobie le plus souvent et fermentation en anaérobiose).
- Réduisant en général les nitrates en nitrites (des souches réduisent les nitrates en diazote *Klebsiella* et d'autre ne réduisent pas *Yersinia*, *Shigella*).
- Habituellement catalase (+), dépourvus d'oxydase (Kassama et *al.*, 2013).

1.5.4. Les caractères antigéniques

L'étude des caractères antigéniques permet d'individualiser les espèces au sein de chaque genre. Les entérobactéries possèdent toutes des antigènes de paroi « somatiques » ou antigènes O, certains possèdent des antigènes de surface tel que les adhésines et les antigènes d'enveloppe ou antigènes K, alors les entérobactéries mobiles possèdent en plus des antigènes de flagelle «flagellaires» ou antigènes H. On peut identifier ces antigènes par plusieurs techniques dont la plus courante est l'agglutination sur lame avec des sérums spécifiques: la présence d'une agglutination indique qu'il y a correspondance entre le sérum utilisé et un antigène de la souche étudiée.

a- Antigène ECA

Antigène ECA (Enterobacterial Common Antigen) ou antigène de Kunin, il n'existe que chez les entérobactéries et de ce fait a un intérêt taxonomique. Sa présence chez les *Yersinia* a permis d'inclure ce genre dans la famille des entérobactéries.

b- Antigène O

L'antigène O est l'endotoxine des bactéries à Gram négatif. Il est composé de lipopolysaccharides (LPS) complexes qui sont thermostables et résistent à l'alcool, très toxiques, Il est constitué d'une mosaïque d'antigènes dont certains sont des constituants communs à toutes les entérobactéries et germes apparentés, et d'autres, des constituants spécifiques de chaque espèce.

c- Antigène H

L'antigène H n'est pas toxique, de nature protéique (flagelline), il est thermolabile et inactivé par l'alcool, il est constitué comme l'antigène O d'une mosaïque d'antigènes avec des constituants communs à toutes les entérobactéries mobiles et des constituants spécifiques à chaque espèce.

d- Antigène de surface

L'antigène K capsulaire, de nature polysaccharidique, qui entoure la paroi de certaines entérobactéries et peut masquer l'antigène O, on le trouve chez les *Escherichia coli*, les *Shigelles* ou chez certaines *Salmonelles* et *Citrobacter* (ex: antigène Vi, pour virulence, de *Salmonella typhi*). Les antigènes d'adhérence ou adhésines de nature protéique, portés par des pilis communs encore appelés fimbriae (Sougakoff et al., 2003 ; Kassama et al., 2013).

2. Les Entérobactéries uropathogènes

Les entérobactéries sont les germes le plus souvent isolées dans les IU d'où on les a nommées uropathogène. Cela s'explique par la physiopathologie ascendante de l'IU à partir de la flore urétrale (colonisation du périnée par les entérobactéries d'origine digestive) et par la présence de facteurs spécifiques d'uropathogénicité (adhésines, uréase...) parmi les germes les plus incriminées arrive en première position *Escherichia coli* avec des fréquences d'isolement allant de 65 à 85% , *Klebsiella pneumoniae* , vient en deuxième position avec des fréquences d'isolement allant de 10,5 % , *Proteus mirabilis* vient en troisième position avec des fréquences d'isolement allant de 4% (**Ben Abdallah et al., 2005**).

2.1. *Escherichia coli*

2.1.1. Définition

E. coli est l'espèce type du genre *Escherichia* qui a été dénommé d'après le médecin allemand Theodor Escherich (1857-1911), qui en 1885, publia ses travaux sur un court bâtonnet à Gram négatif aux extrémités arrondies, présent dans les matières fécales et l'intestin d'enfants. Cette espèce bactérienne fut baptisée *Bacillus* ou *Bacterium coli* commune, puis renommée, en 1919 sur proposition, et en 1958 officiellement, *Escherichia coli* (**Mainil, 2003**).

2.1.2. Habitat

E. coli est une espèce commensale du tubes digestif de l'homme et des animaux. Elle représente à elle seul la plus grande partie de la flore bactérienne aérobie de l'intestin (espèce aérobie dominante) à raison de 10^8 par gramme de fèces (flore totale: 10^{11} à 10^{12} bactéries par gramme). La recherche d'*E. coli* dans l'eau d'alimentation (colimétrie) et faite pour apprécier sa potabilité, sa présence dans l'eau est un indice de contamination fécale ce qui le rend impropre à la consommation (**Avril et al., 2000**).

2.1.3. Caractères morphologiques et culturels

Escherichia coli ou colibacille fait partie des Entérobactéries, c'est une bactérie fine et allongée à extrémités arrondies, bacille à Gram négatif, aéro-anaérobie facultatif, asporulée, mesurant 2 à 4 μ de long sur 0,4 à 0,6 μ de large, mobile grâce à une ciliature péritriche. Ce germe non exigeant, Culture facile sur milieux ordinaires. Sur milieux solides après 18-24 h les colonies sont arrondies, lisses, brillantes et homogènes, à bords réguliers, de 2 à 3 mm de

diamètre. Pousse sur milieux sélectifs pour entérobactéries type Mac Conkey, Drigalski (Clave, 2012 ; Oulymata, 2007).

2.1.4. Caractères biochimiques

E. coli possède les caractères biochimiques suivants (Clave, 2012 ; Oulymata, 2007) :

- Oxydase(-), catalase(+), uréase (+/-), nitrate réductase (+), gélatinase (-), TDA (+) ;
- Glucose(+), lactose(+), mannitol(+), sorbitol(+), Gaz en glucose(+)
- ONPG (+), H₂S(-), indole (+), citrate de Simmons(-), VP (-), RM(+)
- LDC variable (90% +), ODC (+/-), ADH (+/-).

2.1.5. Pouvoir pathogène

E. coli est souvent responsable de gastro-entérites graves pouvant être mortelles dans certains cas à l'absence de traitement. Elle est classée dans le groupe des entérobactéries pathogènes spécifiques avec les *Shigelles*, les *Salmonelles* qui sont responsables de dysenteries et fièvres typhoïdes graves. Elle est également incriminée dans les infections urinaires (80 % des infections urinaires), génitales, dans les méningites et dans diverses suppurations (Perrière, 1992).

2.1.6. Résistance aux antibiotiques

➤ Résistance naturelle

Les souches d'*E. coli* sont sensibles à toutes les bêta-lactamines, malgré la présence d'une céphalosporinase chromosomique d'espèce de classe C qui est exprimée à très bas niveau.

➤ Résistance acquise

- Bêta-lactamase de classe A haut niveau (pénicillinase): Les souches d'*E. coli* présentent une résistance de haut niveau à l'amoxicilline et la ticarcilline, qui est due à l'élaboration d'une pénicillinase. L'inhibition de cette activité enzymatique est réalisée par l'acide clavulanique, L'activité de cette pénicillinase est réduite pour les uréidopénicillines (piperacilline) et les céphalosporines de 1^{ère} et 2^{ème} génération.

- Bêta-lactamase de classe A (pénicillinase TRI): Ces souches ont le même phénotype qu'*E. coli* pénicillinase haut niveau, mais elles ont une résistance haut niveau aux associations amoxicilline-acide clavulanique (AMC) et ticarcilline-acide clavulanique (TCC) (pas d'activité d'inhibition de l'acide clavulanique).

- Bêta-lactamase de classe A à spectre étendu: Résistance à l'ensemble des pénicillines et céphalosporines, en particulier aux céphalosporines de 3^{ème} génération, et aux monobactames(ATM). L'activité des céphamycines et de l'imipénème n'est pas modifiée. Une image de synergie (inhibition de l'activité enzymatique par l'acide clavulanique) est souvent détectée entre les C3G et AMC ou TCC. Lorsque le niveau d'expression de l'enzyme est trop élevé, l'image de synergie est plus difficile à mettre en évidence (**Sougakoff et al., 2003**).

2.2. *Proteus mirabilis*

2.2.1. Définition

Le genre *Proteus* est classiquement placé dans la tribu des *Proteae*. Actuellement, ce genre rassemble cinq espèces. Ce sont des bacilles à Gram négatif, mobiles, sont largement répandus dans la nature et elles sont isolées du sol, de l'eau, de l'intestin de l'homme et de nombreuses espèces animales. *Proteus mirabilis* est l'espèce la plus fréquemment isolée de prélèvements cliniques. C'est la bactérie la plus souvent isolée des urines et elle est à l'origine d'infections graves et parfois mortelles (**Sougakoff et al., 2003**).

2.2.2. Habitat

Les *Proteus* sont très répandus dans la nature, on les rencontre dans les eaux de surface, les eaux usées, le sol, sur les légumes, dans la flore de putréfaction des matières organiques animales. Ils végètent en saprophytes sur la peau et les muqueuses, ils sont les hôtes habituels du tube digestif de l'homme et des animaux (**LE Minor, 1989**).

2.2.3. Caractères morphologiques et culturels

Les *Proteus sp.* Sont des bacilles à Gram négatif, très généralement mobiles, polymorphes, mesurant de 0,4 à 0,8 µm de diamètre sur 10 µm à 80 µm de longueur. En milieu gélosé. *P. mirabilis* et *P. vulgaris* peuvent envahir la surface de milieu en formant des ondes concentriques. Cet essaimage ou swarming, est dû à la grande mobilité de la bactérie. L'envahissement des cultures par les *Proteus* peut être réduit par la présence dans le milieu des sels biliaires ou de détergents, par accroissement de teneur en gélose ou par une diminution de la teneur en NaCl (milieu CLED) (**Avril et al., 2000**).

2.2.4. Caractères biochimiques

Les *Proteus* sont caractérisés par leur uréase très active, la production d'H₂S, d'une gélatinase et leur pouvoir glucidolytique faible (Sougakoff et al., 2003 ; Avril et al., 2000).

- Fermentation des sucres: glucose (+) ;
- Réduction des nitrates en nitrites: NO₃⁺ ;
- Métabolisme du tryptophane en indole: indole (-) ;
- ONPG (-) ;
- Ornithine décarboxylase: ODC (+) ;
- TDA (+).

2.2.5. Pouvoir pathogène

- Infections urinaires communautaires ou nosocomiales. *P. mirabilis* grâce à son uréase puissante peut alcaliniser les urines et être responsable de lithiases. Ces lithiases se comportent comme du matériel étranger qui permet à l'infection de devenir chronique, entraînant ainsi une destruction progressive du parenchyme rénal.

- *P. mirabilis* peut être responsable des infections localisées surtout cutanées, infections des voies respiratoires, des septicémies et bactériémies (Sougakoff et al., 2003; Archambaud et al., 2004).

2.2.6. Résistance aux antibiotiques

➤ Résistance naturelle

P. mirabilis est naturellement résistant à la colistine, cyclines (spécificité de l'espèce *mirabilis*) et furanes. Souches sensibles à toutes les bêta-lactamines (pas de céphalosporinase chromosomique de classe C). Les autres antibiotiques testés sur les bacilles à Gram négatif type Entérobactéries sont habituellement actifs (aminosides, quinolones, cotrimoxazole, chloramphénicol).

➤ Résistance acquise

Mécanismes identiques à ceux décrits pour *E. coli*.

- Bêta-lactamase de classe A haut niveau (pénicillinase): des carbénicillinases (type PSE-4) ont été décrites.
- Résistance aux inhibiteurs des bêta-lactamases: un mutant de type TEM, IRT-2 (Arg244Ser), a été décrit en association avec TEM-1 dans une souche insensible aux inhibiteurs des bêta-lactamases de classe A.
- Bêta-lactamases de classe A à spectre étendu (BLSE): une souche produisant TEM-10 a été décrite.
- Résistance à l'imipénème: chez *P. mirabilis*, elle n'est pas d'origine enzymatique. La résistance à l'imipénème semble associée à une altération des PLP1A et 2 (protéines liant la pénicilline) (Sougakoff et al., 2003; Archambaud et al., 2004).

2.3. *Klebsiella pneumoniae*

2.3.1. Définition

Les *Klebsielles* sont des *Enterobacteriaceae* toujours immobiles, bacilles gram négatif, possèdent généralement une capsule, ONPG positive et VP positif caractère clé; car elles font partie du groupe "KESH". Le genre *Klebsiella* comporte cinq espèces dont l'espèce type est *Klebsiella pneumoniae*. Cette espèce possède toutes les caractéristiques des *Enterobacteriaceae*. Sa taille est de 2 à 6 µ de longueur sur 1 µ de largeur, c'est une bactérie commensale de l'homme et des animaux, elle est responsable d'infections communautaires (urinaires et respiratoire) et d'infections opportunistes chez les malades hospitalisés (Avril et al., 2000; Iliaquer, 2010).

2.3.2. Habitat

Klebsiella pneumoniae est répandue dans la nature on peut l'isoler de l'eau, de végétaux, sol et d'aliments divers. Cette espèce est rencontrée dans la flore fécale de 30 à 40% des animaux et de l'homme (bactérie ubiquitaire présente dans le tube digestif et dans l'appareil respiratoire des hommes et des animaux en tant que bactérie commensale), elle végète sur la peau, les muqueuses et les voies respiratoires supérieures. Fréquente dans les selles et peut être un indicateur d'une contamination fécale (Avril et al., 2000).

2.3.3. Caractères morphologiques et cultureux

Les *Klebsiellas* sont des bacilles à gram négatif, immobiles, de dimensions comparables à celles d'*E. coli*. En général ils ont une culture très facile sur tous les milieux usuels. Sur les milieux classiques d'isolement pour entérobactéries (Drigalski, AMB, DCL, Hektoen, Mac Conkey), les colonies de *Klebsiella pneumoniae* sont lactose positives, bombées, muqueuses, parfois filantes à l'anse de platine, d'un diamètre de 3 à 4 mm (Sougakoff et al., 2003).

2.3.4. Caractères biochimiques

- Fermentation des sucres: glucose(+);
- Réduction des nitrates en nitrites: NO₃⁺;
- Métabolisme du tryptophane en indole: indole (-);
- ONPG (+);
- LDC (+);
- H₂S (-);
- Urease (+);
- TDA (-);
- VP (+) (Sekhri, 2011).

2.3.5. Pouvoir pathogène

Klebsiella pneumoniae est le chef de file du groupe des entérobactéries pathogènes opportunistes très incriminé dans les infections nosocomiales, Elle est responsable d'infections diverses: infections suppuratives, urinaires, respiratoires, biliaires, hépatiques intra-abdominales, bactériémies, septicémies, Infections de sites opératoires (Sekhri, 2011).

2.3.6. Résistance aux antibiotiques

➤ Résistance naturelle

K. pneumoniae est naturellement résistant aux pénicillines (amoxicilline, ticarcilline) par production d'une bêta-lactamase de classe A d'espèce (chromosomique) appelée K2, inhibée par l'acide clavulanique.

➤ Résistance acquise

-Résistance aux inhibiteurs des bêta-lactamases: des bêta-lactamases de classe A de type IRT insensibles à l'acide clavulanique (mutants d'enzymes TEM) ont été décrites.

-Bêta-lactamases de classe A à spectre étendu (BLSE): de nombreuses souches de *K. pneumoniae* sont productrices de BLSE. Pour la plupart d'entre elles, la production de BLSE se traduit par des images de synergie très caractéristiques entre les céphalosporines de 3^{ème} génération et l'acide clavulanique (disque d'augmentin ou de claventin).

-Bêta-lactamases plasmidiques de classe C: chez *Klebsiella pneumoniae*, on connaît un grand nombre de bêta-lactamases plasmidiques de classe C qui dérivent des céphalosporinases chromosomiques.

-Résistance au céfépime et au cefpirome: elle a été récemment décrite chez *K. pneumoniae* et semble liée à la combinaison de deux mécanismes: la production à haut niveau d'une BLSE SHV-5 et une diminution de la perméabilité de la membrane externe.

-Résistance à l'imipénème: elle peut être due à l'association d'une imperméabilité de la membrane externe, à une production à haut niveau d'une bêta-lactamase plasmidique de classe C (Sougakoff et al., 2003).

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

1. Durée de l'étude

Notre étude s'est étalée sur une période de deux mois (du 29 mars au 7 mai 2015).

2. Lieu de l'étude

Notre étude a été réalisée au sein du laboratoire de bactériologie de l'hôpital militaire régional universitaire (HMRU) de Constantine "Allaoua Benbaatouche" précisément au niveau de la paillasse des infections urinaires, et au niveau du laboratoire de microbiologie à l'université des Frères Mentouri de Constantine.

3. Echantillonnage (population de l'étude)

Durant la période de notre stage, 740 prélèvements des urines de patients hospitalisés et externes ont été effectués, parmi ces prélèvements un total de 63 souches d'*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* sont isolées. Parmi ces 63 souches, on a choisies une souche pour chacune.

4. Méthodes

4.1. Etude macroscopique

L'étude macroscopique permet d'apprécier l'aspect des colonies leur couleur, leur taille, leur forme, leur consistance, ainsi que leur capacités à fermenter le lactose.

- **Sur gélose nutritive GN (Annexe 1)** : la GN est un milieu qui convient à la culture des germes ne présentent pas d'exigences particulières.
- **Sur milieu Hektoen (Annexe 1)** : le milieu Hektoen est un milieu sélectif pour les trois germes.
- **Ensemencement**

Nous avons appliqué la méthode des trois cadrans. Cette méthode est la plus classique. Elle consiste à diviser une boîte de pétri en deux parties égales (50 % et 50 %), puis de diviser de nouveau par deux une moitié afin d'obtenir 3 cadrans de 50 %, 25 % et 25 %.

Sur le plus grand cadran. Deux gouttes de l'urine sont déposées puis étalées à l'aide d'une pipette pasteur. Ensuite on retourne la boîte afin d'étaler les bactéries sur un cadran plus petit,

puis on retourne afin d'ensemencer le dernier petit cadran. Les stries doivent être serrées et la pipette doit être flambée entre chaque cadran pour de meilleurs résultats. L'incubation se fait pendant 24 h à 37 C°.

4.2. Etudes microscopique

4.2.1. Etat frais

- **Principe et technique**

C'est un examen de mise en œuvre très simple et qui a lieu au microscope optique à l'objectif x 40. IL permet d'apprécier la morphologie des bactéries, leur mode de regroupement, leur abondance et leur mobilité.

Sur une lame porte objet stérile, déposer une goutte d'eau physiologique et une colonie. Homogénéiser et recouvrir d'une lamelle en évitant d'emprisonner les bulles d'air, lire au microscope.

4.2.2. Coloration de Gram

- **Principe et technique**

La coloration de Gram est la coloration de base de la bactériologie. C'est une coloration double qui permet de différencier les bactéries non seulement d'après leur forme, mais surtout d'après leur affinité pour les colorants liées à la structure générale de la paroi.

Le principe de cette méthode, mise au point de façon empirique par le médecin danois Gram en 1884, est le suivant : on étale les bactéries sur une lame de verre, on les fixe par la chaleur ou l'alcool, puis on les colore successivement avec une solution de violet de gentiane et un mordant, la liqueur de Gram, ou solution de Lugol (mélange d'iode et d'iodure de potassium) ; la préparation est ensuite traitée avec un solvant organique, tel que l'alcool. Après le solvant, on procède à une contre-coloration avec un colorant rouge, comme la fuchsine de Ziehl diluée.

Lecture

La lecture se fait au grossissement x 100 avec une goutte d'huile à immersion. Les bactéries à Gram positif apparaissent colorées en violet, alors que les bactéries Gram négatif sont roses.

4.3. Etude biochimique

4.3.1. Identification par galeries classique

➤ Préparation de la suspension bactérienne

La préparation de la suspension bactérienne consiste en transfert en condition aseptique d'une colonie bien isolée sur GN vers un tube qui contient 1 à 2 ml d'eau physiologique stérile. Cette suspension a servi à ensemercer différents milieux de culture en tubes permettant ainsi de mettre en évidence différents caractères biochimiques.

➤ Milieu TSI

• Principe

Le milieu Triple-Sugar-Iron est un milieu d'identification rapide pour les entérobactéries, permet de mettre en évidence la fermentation du glucose (avec ou sans dégagement gazeux), du lactose, du saccharose et la production de H₂S.

• Technique

Elle consiste à ensemercer à l'aide d'une pipette pasteur en stries serrées la pente de la gélose puis par piqûre centrale le culot, la lecture se fait après 24 h d'incubation à 37°C.

• Lecture

- la fermentation du glucose se traduit par le virage au jaune du culot , et la production de gaz se traduit par la formation de bulles de gaz dans la gélose ou le décollement de celle-ci.

- la fermentation du lactose et/ou du saccharose se traduit par le virage au jaune de la pente.

- Production de H₂S se traduit par noircissement du milieu.

➤ Milieu mannitol-mobilité

• Principe

Le milieu mannitol-mobilité est utilisé pour la différenciation rapide des Entérobactéries. Il permet de déceler la dégradation du mannitol et la mobilité de la bactérie.

- **Technique**

L'ensemencement se fait au moyen d'une pipette pasteur par une simple piqure centrale jusqu'au fond du tube, la lecture se fait après 24 h d'incubation à 37°C.

- **Lecture**

- La fermentation du mannitol se traduit par un virage de couleur du rouge au jaune.
- La présence des bactéries au-delà de l'axe central signifie qu'elles sont mobiles; cependant leur présence uniquement au niveau de la piqure centrale signifie qu'elles sont immobiles.

- **Milieu citrate de Simmons**

- **Principe**

Le milieu citrate de sodium (Simmons) est utilisé pour l'identification des bacilles Gram négatif. Il permet de rechercher l'utilisation de citrate de sodium comme seule source de carbone.

- **Technique**

L'ensemencement se fait au moyen d'une pipette pasteur par des stries longitudinales de la pente, la lecture se fait après 24 h d'incubation à 37°C.

- **Lecture**

L'utilisation du citrate de sodium se traduit par un virage de couleur du vert au bleu qui signifie qu'il y a eu une alcalinisation du milieu et que la bactérie possède une citrate perméase.

- **Eau peptonée exempte d'indole**

- **principe**

L'eau peptonée exempte d'indole permet la culture des germes ne présentant pas d'exigence particulière, et la recherche de la production d'indole par l'intermédiaire d'une tryptophanase qui dégrade le tryptophane en acide indole-acétique ou en acide carboxylique, seules les bactéries indologènes poursuivent cette dégradation jusqu'à la formation d'indole.

Remarque : L'indole peut être mis en évidence en utilisant l'eau peptonée exempte d'indole ou le milieu urée-indole.

- **Technique**

L'ensemencement se fait au moyen d'une pipette pasteur par l'ajout de quelques gouttes de la suspension bactérienne dans un tube d'eau peptonée exempte d'indole, la lecture se fait après 24 h d'incubation à 37°C.

- **Lecture**

Après l'incubation on ajoutant deux gouttes du réactif de Kovacs, le diméthyl-amino-4-benzaldéhyde qui est un composant du réactif de Kovacs réagit avec l'indole, produit de l'activité de la tryptophanase, et forme un anneau coloré en rouge, ce qui signifie que la bactérie et indole positif.

- **Milieu urée-indole**

- **Principe**

Le milieu urée-tryptophane appelé improprement milieu urée-indole c'est un milieu complexe qui fournit un ensemble de résultats utiles pour la différenciation des entérobactéries. Il permet de rechercher :

- **L'uréase**

Les entérobactéries peuvent dégrader l'urée qui est un composé organique et qui peut servir de source d'azote unique aux bactéries possédant une uréase très active. En présence de cette enzyme, les bactéries uréolytiques peuvent transformer l'urée en ammoniac et en carbonate d'ammonium qui alcalinise le milieu, et qui fait virer l'indicateur coloré de pH (le rouge de phénol) du jaune au rouge en milieu basique.

- **La tryptophane-désaminase(TDA)**

La désaminase agit sur le L-tryptophane en donnant l'acide pyruvique. Ce dernier donne avec le perchlorure de fer (FeCl_3) une coloration brune.

- **Technique**

L'ensemencement se fait au moyen d'une pipette pasteur par l'ajout de quelques gouttes du milieu urée-indole dans un tube contenant la suspension bactérienne. La lecture se fait après 24 h d'incubation à 37°C.

- **Lecture**

- **L'hydrolyse de l'urée**

Le virage de la couleur de l'orange vers le rouge ou le rose violet signifie qu'il y a eu une alcalinisation du milieu et que la bactérie possède une uréase.

- **La TDA**

Après adition du réactif TDA, l'apparition d'une coloration brun foncé montre que la bactérie est TDA positive.

- **Milieu MEVAG**

- **Principe**

Le milieu MEVAG permet de déterminer la voie d'attaque des glucides, qui peut être catalysées par voie respiratoire ou par voie fermentaire. La dégradation d'un glucide s'accompagne généralement d'une acidification du milieu.

- **Techniques**

Elle consiste à ensemencer 2 tubes contenant le milieu MEVAG au moyen d'une pipette pasteur par une simple piqure centrale, l'un des tubes sera recouvert d'une couche d'environ 1-1.5 cm d'épaisseur d'huile de vaseline et sera bien fermé ; et l'autre tube sera moins fermer on relâchant le couvercle, la lecture se fait après 24 h d'incubation à 37°C.

- **Lecture**

- Type fermentatif**

- Coloration jaune dans les deux tubes: respiration ou fermentation aérobie du glucide et fermentation anaérobie, cela signifie que la souche est aéro-anaérobie facultatif.

- Coloration jaune dans le tube fermé. Il est neutre en surface et acide en profondeur dans le tube ouvert: fermentation anaérobie du glucide, cela signifie que la souche est anaérobie stricte.

- Type oxydatif**

- Coloration jaune seulement en surface du tube ouvert : respiration aérobie du glucide, cela signifie que la souche est aérobie stricte.

-Type inerte

- Coloration jaune en surface du tube ouvert: pas d'utilisation du glucide mais des peptones. La souche peut être aérobie stricte ou non (vérifier le long de la pique).

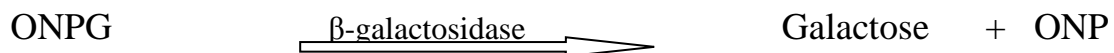
➤ **Test ONPG**

• **Principe**

Le test **ONPG** (Ortho-Nitro-Phényl-Galactopyranoside) ou test de l'ONPG-hydrolase est complémentaire, voir indispensable, à l'étude de la dégradation du lactose chez les entérobactéries. Pour que des entérobactéries dégradent le lactose, il faut qu'elle possède deux enzymes :

- Une **perméase** membranaire, nécessaire à la pénétration du lactose dans la cellule ;
- Une **β-galactosidase** permettant de dégrader la molécule de lactose en galactose et glucose.

Le test 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 (ONPG) qui possède une structure analogue au lactose ; et qui présente l'avantage d'être hydrolysé en l'orthonitrophénol: ONP qui est responsable de la coloration jaunâtre de milieu selon la réaction suivante:



• **Technique**

Préparer une suspension dense d'une culture bactérienne à étudier dans un tube à essai stérile contenant 0.5ml d'eau physiologique, puis y ajouter un disque ONPG. Incuber au bain-marie à 37°C pendant un temps variant entre 15 à 30 minutes et jusqu'à 24h au maximum.

• **Lecture**

La lecture se fait à des intervalles de temps différents: après 15mn, 30mn, 1 heure, 6 heures et 24 heures. Le test ONPG est positif lorsque la suspension bactérienne se colore en jaune.

➤ **Milieu Clark et Lubs: test RM et VP**

• **Principe**

Le milieu de Clark et Lubs permet l'étude des produits de fermentation du glucose: différenciation entre les fermentations « acides mixtes » et « butylène glycolique ».

- **Test RM (rouge de méthyle)**

Ce test permet la mise en évidence, grâce au rouge de méthyle, de la fermentation acide mixte par acidification d'un milieu glucosé après fermentation du glucose.

- **Test VP (Voges-Proskauer)**

Ce test permet la mise en évidence de la production d'acétoïne (ou 3-hydroxy-butanone) au cours de la fermentation butylène glycolique: en présence d'une base forte (soude ou potasse) et d'a-naphtol, l'acétoïne donne une coloration rouge en milieu très oxygéné.

• **Technique**

Une colonie de la souche à étudier est ensemencée sur le milieu Clark et Lubs puis incubé à 30°C pendant 24 à 48 heures. Après l'incubation, diviser le milieu dans deux tubes stériles, verser quelques gouttes de VP I et quelques gouttes de VP II dans l'un des tubes, et dans l'autre, ajouter quelques gouttes de réactif RM.

• **Lecture**

- **Test RM:** Coloration rouge: RM (+)

Coloration jaunâtre : RM (-)

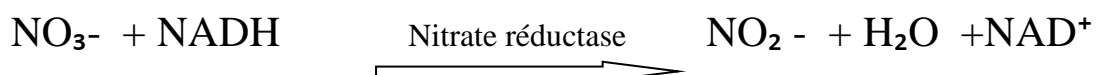
- **Test VP:** Coloration rouge: VP (+)

Coloration jaunâtre: VP (-)

➤ **Recherche de nitrate réductase**

• **Principe**

L'étude de la réduction des nitrates se fait par la mise en évidence des nitrites formés. Ces derniers en milieu acétique ou sulfurique, donnent une coloration rose. L'enzyme nitrate réductase catalyse la réaction des nitrates en nitrites.



Les nitrates peuvent aller également jusqu'au stade azote (N₂) ; Dans ce cas, on doit compléter par l'épreuve de Zoo Bell, épreuve qui consiste à ajouter de la poudre de zinc au milieu:

- Si le zinc réduit les nitrates encore présents en nitrites, la coloration rose apparaît et la réaction est négative (bactéries sans nitrate réductase).
- Si au contraire, la teinte du milieu reste inchangée, le stade nitrite a été dépassé donc les bactéries possédant un nitrate réductase très active.

- **Technique**

À une culture en bouillon nitraté de 24 h d'incubation à 37°C, on ajoute deux gouttes de réactif de Griess (Nit 1 et Nit2). Après agitation, la lecture est immédiate.

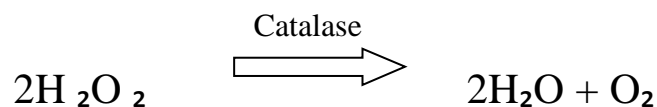
- **Lecture**

- Coloration rose ou rouge: nitrates réduits en nitrites (nitrate réductase positive NR+).
- Milieu restant incolore: ajouter un peu de poudre de zinc (réducteurs des nitrates) ; agitation, inclinaison du tube de culture en position presque à l'horizontale et attendre cinq minute savant la lecture:
 - Si le milieu devient alors rose ou rouge, il reste des nitrates, donc ces derniers n'ont pas été réduits par la bactérie: nitrate réductase négative NR(-).
 - Si le milieu reste incolore, il ne reste plus de nitrates, les bactéries les ont réduit au-delà du stade nitrites: nitrate réductase positive NR(+).

➤ **Recherche de la catalase**

- **Principe**

La catalase est un enzyme ayant la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) avec dégagement d'oxygène selon la réaction suivante:



- **Technique**

Sur une lame et à l'aide d'une pipette Pasteur, on dépose une colonie bactérienne à laquelle on ajoute de l'eau oxygénée (à 10 volumes).

- **Lecture**

- Catalase(+): effervescence.
- Catalase (-): pas d'effervescence.

- **Recherche de l'oxydase**

- **Principe**

Le test de l'oxydase est fondé sur la production bactérienne d'une enzyme oxydase intracellulaire. En présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C, cette enzyme oxyde le réactif pour former un composé coloré en violet « l'indophénol ».

- **Technique**

Sur un papier filtre stérile, déposer un disque d'oxydase imprégné de diméthyl-paraphénylènediamine. Humidifier le disque avec quelques gouttes d'eau distillée stérile. Un excès d'eau peut nuire à la lecture. À l'aide d'une anse de platine prendre une colonie de la bactérie à identifier et la déposer sur le disque.

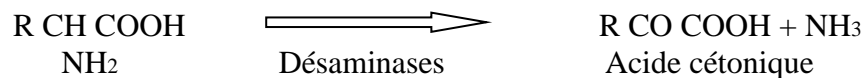
- **Lecture**

Apparition d'une coloration violette immédiatement : la souche est dite oxydase positive.

- **Recherche des décarboxylases: Lysine décarboxylase (LDC), Ornithine décarboxylase (ODC) et Arginine dihydrolase (ADH)**

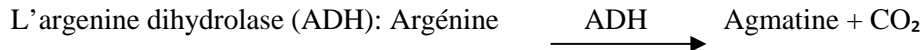
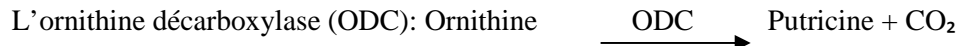
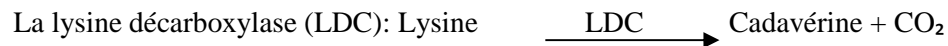
- **principe**

Les décarboxylases ou carboxylases, scindent les acides aminés entraînant la formation de l'amine correspondant avec la libération de CO₂. Suivant la réaction:



Il s'agit d'enzymes induites dont la synthèse est favorisée par un pH acide (pH =3.5 - 5.5) et des conditions d'anaérobiose.

Les décarboxylases sont:



- **Technique**

Le test est réalisé avec le milieu Moeller réparti dans 4 tubes à hémolyse différents:

- Le premier tube constitue le témoin. Il contient essentiellement du glucose en petite quantité et du pourpre de bromocrésol comme indicateur de pH.
- Les trois autres tubes contiennent en plus du milieu témoins, un des trois acides aminés suivants: Arginine, Lysine ou Ornithine.
- Après ensemencement, 1ml de vaseline stérile est ajouté dans chaque tube et le tout sera incubé à 30°C pendant 24 à 48 h.

- **Lecture**

- une bactérie non décarboxylante utilisera les peptones du milieu, et produira des acides organiques ainsi que des bases faibles comme l'ammoniac. Le milieu deviendra jaune.
- une bactérie décarboxylante après avoir utilisé le glucose va produire du dioxyde de carbone et des amines. L'alcalinité des amines est importante, et le virage de l'indicateur de pH sera obtenu : le milieu restera violet.

4.3.2. Identification des entérobactéries par la galerie API 20 E

La galerie API 20E est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif. C'est une technique de routine très utilisée en milieu professionnel pour le diagnostic in vitro et le contrôle microbiologique. Une galerie se compose de 20 micro-tubes contenant un substrat déshydraté pour réaliser 20 tests biochimiques miniaturisés. On inocule chaque tube avec la suspension bactérienne à identifier, Certains des puits auront des changements de couleur résultants des différences de pH qui se traduisent par des virages colorés ; d'autres produisent des sous-produits qui doivent être identifiés avec des réactifs. Un numéro de profil est déterminé d'après la série de tests (+ et -), qui permet d'identifier l'espèce (Derafa, 2012).

- **Technique**

Après le développement de la bactérie en colonies isolées sur milieu gélosé, préparer la suspension bactérienne :

- Introduire quelques ml d'eau distillée stérile (avec une pipette Pasteur) dans un tube à vis stérile, avec la pipette Pasteur, prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé.
- Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu.
- l'inoculation de la galerie API20 E: Il faut remplir à l'aide d'une pipette Pasteur les tubes et les cupules des tests CIT, VP et GEL avec la suspension bactérienne, et pour les autres tests; on va remplir uniquement les tubes (et non les cupules) avec la création d'une anaérobiose dans les tests: ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leur cupule par l'huile de vaseline stérile. Enfin, on incube à 37 C° pendant 18-24 heures.

- **Lecture**

Les réactifs appropriés sont ajoutés aux compartiments :

- 1 goutte de réactif de Kovac à l'IND (faire la lecture dans les minutes qui suivent).
- 1 goutte de réactif de VP1 et VP2 (une réaction positive peut prendre jusqu'à 10minutes).
- 1 goutte de réactif TDA.

Noter les résultats et comparer les réactions avec le tableau de différenciation (Annexe 2).

4.4. Etude de la sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries

Pour déterminer la sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques, l'antibiogramme est réalisé par la méthode de diffusion de disques imprégnés d'antibiotiques et la mesure des diamètres selon les recommandations du comité d'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM).

4.4.1. Milieu pour l'antibiogramme

On utilise un milieu non sélectif Mueller-Hinton (Annexe1), il doit être coulé en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4mm, les boîtes doivent être séchées avant leur emploi.

4.4.2. Réalisation de l'inoculum bactérienne

A partir d'une culture pure de 18 h à 24 h sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'une pipette pasteur quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques, et la transférer dans un écouvillon contenant 2.5 ml d'eau physiologique stérile. Bien homogénéiser la suspension bactérienne.

4.4.3. Ensemencement par écouvillonnage

- l'écouvillon est trempé dans l'inoculum, L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum, puis Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas, en stries serrées, l'opération est répéter 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

4.4.4. Choix des antibiotiques

Dans notre étude, les antibiotiques utilisés sont :

- L'ampicilline, Amoxicilline-acide clavulanique, Pipéracilline, Céfazoline, Céfotaxime, Céfixime pour les β -lactamines.
- Imipénèmes pour les carbapénèmes.
- Amikacine, Gentamicine pour les aminosides.
- Ofloxacine, Ciproflaxacine pour les quinolones.
- Colistine, Furanes.

4.4.5. Application des disques

Les disques choisis sont posés à l'aide d'une pince flambée qui sont parfaitement appliqués à plat sans glissement en appuyant légèrement sur la surface de la gélose. Une distance minimale de 15 mm doit séparer un disque périphérique du bord de la boîte et deux disques doivent être éloignés au minimum de 30mm de sorte que les zones d'inhibitions ne se chevauchent pas. Les boîtes sont ensuite portées à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures ; en position renversée.

4.4.6. Lecture et interprétation

Elle consiste à déduire à partir de la mesure des diamètres d'inhibition, le caractère sensible, ou résistant de la bactérie en compare les résultats aux valeurs critiques (Annexe 3).

Résultats et discussion

Résultats et discussion

1. Résultats

1.1. Etude macroscopique

Les résultats de notre étude montrent que:

- Sur milieu GN
 - *Escherichia coli* apparaît en colonies de 1-3 mm de diamètre généralement bombés, brillante, opaques, blanchâtres et bien rondes à surface lisses plus un point ombiliqué central.
 - *Klebsiella pneumoniae* apparaît en colonies de 3-4 mm de diamètre bombés, grasses, large, luisantes, très muqueuses et ayant tendance à la confluence.
 - *Proteus mirabilis* apparaît sous forme d'un envahissement de la gélose en voile montrant des vagues successives, avec une odeur désagréable.



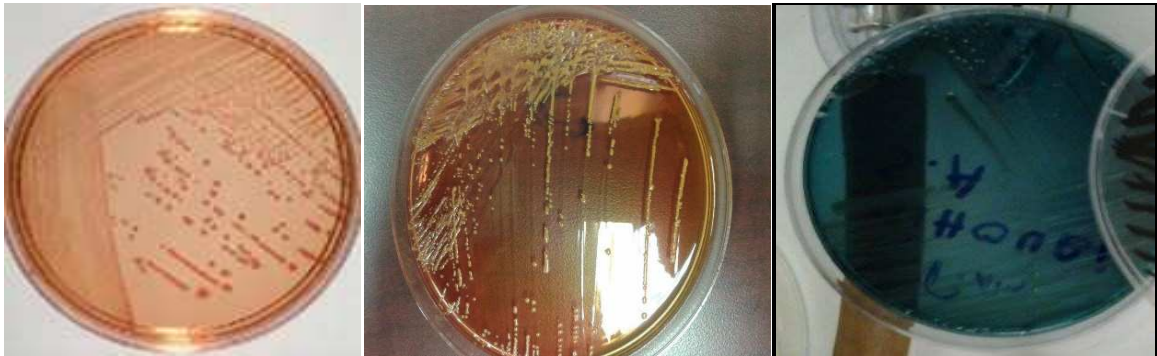
(a):*Escherichia coli*

(b):*Klebsiella pneumoniae*

(c): *Proteus mirabilis*

Figure01: Aspect des trois souches sur GN.

- Sur milieu Hektoen
 - L'aspect des colonies sur milieu Hektoen est en relation de la capacité des microorganismes à fermenter le lactose mis dans le milieu. Cela conduit à une production d'acide qui abaisse le pH et modifie l'indicateur de pH placé dans le milieu qui vire du vert au jaune-orangé, donc nos souches sont lactose positif pour *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et lactose négatif pour *Proteus mirabilis*.



(a): *Escherichia coli* (b): *Klebsiella pneumoniae* (c): *Proteus mirabilis*

Figure02: Aspect des trois souches sur milieu Hektoen.

1.2. Etude microscopique

1.2.1. Etat frais

L'observation microscopique montre que:

- *Escherichia coli* se présente sous forme de bacilles polymorphes, avec une mobilité.
- *Klebsiella pneumoniae* donne des bacilles immobiles courts.
- *Proteus mirabilis* donne des bacilles sous forme bâtonnées, très polymorphes et mobiles.

1.2.2. Coloration de gram

Les résultats obtenus par observation microscopique après coloration de Gram, montre que les trois souches se présentent sous forme de bacilles ou diplobacilles colorées en rose. Donc ce sont des bacilles à Gram négatif.



Figure03: Bacilles Gram négatif (coloration de Gram)

1.3. Etude biochimique

1.3.1. Identification par La galerie classique

➤ Milieu TSI

Après l'incubation, on a remarqué que pour *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* il y a eu une acidification dans la pente et le culot, d'où le virage du rouge de phénol au jaune avec présence des bulles d'air et absence de noircissement donc les deux souches sont: lactose et saccharose(+), glucose (+), gaz(+), H₂S(-).

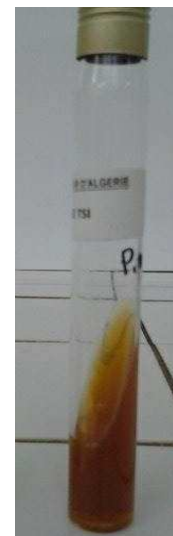
Alors que pour *Proteus mirabilis* il y a eu une acidification que dans le culot, avec présence des bulles d'air et absence de noircissement donc la bactérie est : lactose et saccharose (-), glucose (+), gaz (+), H₂S (-).



(a): *Escherichia coli*



(b): *Klebsiella pneumoniae*



(c): *Proteus mirabilis*

Figure04: Aspect du milieu TSI.

➤ Milieu mannitol-mobilité

Les résultats qu'on a obtenus montrent que pour les trois souches il y a eu une acidification du milieu, d'où le virage du rouge de phénol au jaune, donc les trois souches sont mannitol(+).

En ce qui concerne la mobilité, les bactéries mobiles sont diffusées à partir de la ligne verticale d'ensemencement en créant un trouble, ce qui a été observé pour

Escherichia coli et *Proteus mirabilis*. Alors que *Klebsiella pneumoniae* a uniquement poussé le long de la strie d'ensemencement donc elle est immobile.



(a): aspect du test positif



(b): aspect du test négatif

Figure05: Aspect du milieu mannitol-mobilite

➤ Milieu citrate de Simmons

Après 24 h d'incubation on a remarquees qu'il y a eu une alcalinisation du milieu, d'où le virage du bleu de bromothymol du vert au bleu ,c'est ce qui a été observé pour *Klebsiella pneumoniae* et *Proteus mirabilis* qui sont citrate(+), mais c'est pas le cas pour *Escherichia coli* qui est citrate(-).



(a): aspect du test négatif



(b): aspect du test positif

Figure06: Aspect du milieu citrate de Simmons.

➤ Eau peptonée exempte d'indole

Après l'addition du reactif de Kovacs on a remarqué l'apparition d'un anneau rouge que pour *Escherichia coli*, donc elle est indole (+). Mais pas pour *Klebsiella pneumoniae* et *Proteus mirabilis* donc elles sont indole(-).



(a): *Escherichia coli*

(b): *Klebsiella pneumoniae*

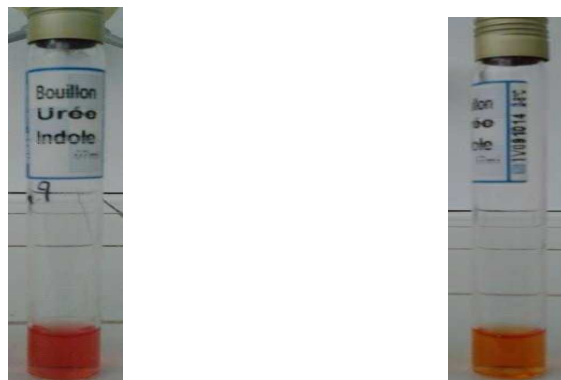
(c): *Proteus mirabilis*

Figure07: Aspect de l'eau peptonée exempte d'indole.

➤ Milieu urée-indole

- L'uréase

Concernant l'hydrolyse de l'urée, les deux souches *Klebsiella pneumoniae* et *Proteus mirabilis* étaient urée (+) car il y a eu une alcalinisation du milieu d'où le virage de couleur de l'orange vers le rouge, alors que *Escherichia coli* était urée (-) car il n'y a pas eu un virage de couleur.



(a): aspect du test positif

(b): Aspect du test négatif

Figure08: Aspect du milieu urée-indole.

- La TDA

Après l'addition du réactif TDA, on a remarqué l'apparition d'une coloration brun foncé que pour *Proteus mirabilis*, qui montre que la bactérie est TDA (+). Alors que les autres souches étaient TDA (-).

➤ Milieu MEVAG

Les résultats obtenus montrent que pour les trois souches il y a eu une acidification dans les deux tubes (le tube fermé et le tube ouvert) d'où le virage de couleur du rouge de phénol au jaune qui signifie que les résultats sont positifs (+).



(a): tube à l'anaérobiose

(b): tube à l'aérobiose

Figure09: Aspect du milieu MEVAG.

➤ Production de la B-Galactosidase (test ONPG)

Les souches d'*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, sont Pourvues de la β -Galactosidase, elles ont donné un résultat positif c'est-à-dire ONPG(+) où le milieu utilisé devient jaune. Alors que la souche de *Proteus mirabilis* a donné un résultat négatif avec le test ONPG c'est-à-dire le milieu restait incolore.



(a): aspect du test négatif

(b): aspect du test positif

Figure10: Test ONPG

➤ **Tests RM-VP**

Les souches d'*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* sont VP négatif car après ajouts des réactifs VP1 et VP2 il n'y a pas eu de réaction. Par contre la souche de *Klebsiella pneumoniae* a donné un résultat positif VP(+) (Coloration rose à rouge).

Concernant le test RM, les souches d'*Escherichia coli*, et *Proteus mirabilis* sont RM positif car le milieu est devenu rouge après l'addition du réactif de rouge de méthyle. Alors que *Klebsiella pneumoniae*, est RM négatif car le milieu n'est pas devenu rouge donc aucune réaction ne s'est produite.



(a): test VP positif



(b): test RM positif

Figure11: test VP-RM

➤ Recherche de nitrate réductase

Après incubation 2 gouttes de solution d'acide sulfanilique (Nit1) et 2 gouttes de d'une solution de naphtylamine (Nit2) sont ajoutées au bouillon.une coloration rose est apparait chez les trois souches: *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*.



(a): bouillon nitrate négatif



(b): bouillon nitrate positif

Figure12: Test de nitrate réductase

➤ Recherche de la catalase

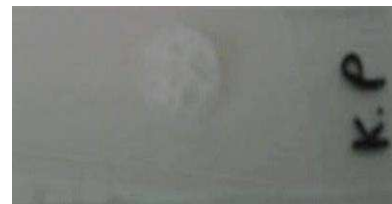
Des colonies sont met en contact avec de l'eau oxygéné (à 10 volumes). Une effervescence dû à un dégagement de dioxygène est apparait, signe la présence d'une catalase.



(a): *Proteus mirabilis*



(b): *Escherichia coli*



(c): *Klebsiella pneumoniae*

Figure13: test de catalase positif

➤ Recherche de l'oxydase

La réaction positive s'est traduite par l'apparition d'une coloration violette à l'endroit où la colonie a été déposée soit immédiatement, soit quelques secondes après. Les résultats obtenus étaient les suivants:

Nos souches *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* étaient dépourvues d'oxydase et il n'y a pas eu de coloration, donc elles sont oxydase négative.



(a): Oxydase négatif



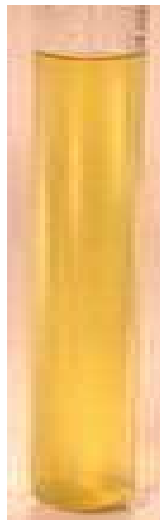
(b): Oxydase positif

Figure14: test d'oxydase

➤ Recherche des décarboxylases : Lysine décarboxylase (LDC), Ornithine décarboxylase (ODC) et Arginine dihydrolase (ADH)

Les milieux de Moëller (LDC: lysine décarboxylase, ODC: ornithine décarboxylase, ADH: arginine dihydrolase) permettent de montrer la présence de ces enzymes par la mise en évidence de l'acidification du milieu et sa réalcalinisation éventuelle. Après avoir effectué les tests nous avons obtenu les résultats suivants :

- ***Escherichia coli***: les deux milieux de moëller LDC et ODC n'ont pas changé de couleurs et sont resté violet donc LDC et ODC positifs.
Par contre le milieu ADH est devenu jaune car le milieu est devenu acide donc négatif car il aurait fallu avoir une ré-alcalinisation.
- ***Proteus mirabilis***: les deux milieux de moëller LDC et ADH ont changé de couleurs et sont devenu jaunes donc sont négatifs .alors que le milieu ODC est resté violet qui signifie un résultat positif.
- ***Klebsiella pneumoniae***: est LDC positif et ADH positif, ODC négatifs.



(a): Milieu moëller négatif



(b): Milieu moëller positif

Figure15: milieu moëller

1.3.2. Identification par la galerie API 20 E

➤ *Escherichia coli*

ONPG(+); LDC, ODC(+); CIT(-); H₂S(-); URE(-); TDA(-); IND(+); VP(-)
GLU(+)



Figure16: *E. coli* par galerie API20E

➤ *Proteus mirabilis*

ONPG(-); LDC(-); ODC(+); CIT(+); H₂S(-); URE(+); TDA(+); IND(-); VP (-)
GLU(+)



Figure17: *P. mirabilis* par galerie API20E

➤ *Klebsiella pneumoniae*

ONPG(+); LDC(+); ODC(+); CIT(+); H₂S(-); URE(+); TDA(-); IND(-); VP(+)
GLU(+)



Figure18: *K. pneumoniae* par galerie API20E

1.4. Résistance des entérobactéries aux antibiotiques

Les diamètres d'inhibition autour des disques sont mesurés à l'aide d'une règle, puis ils sont comparés aux diamètres critiques rassemblés dans l'annexe 3.

Il convient de noter toutefois, qu'une souche dont la sensibilité aux antibiotiques est ainsi évaluée peut être déclarée " sensible (S), résistante (R) " après consultation des abaques de lecture (Annexes 3).

➤ Profil de la sensibilité aux antibiotiques de *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*



Figure19: antibiogramme de *P. mirabilis*

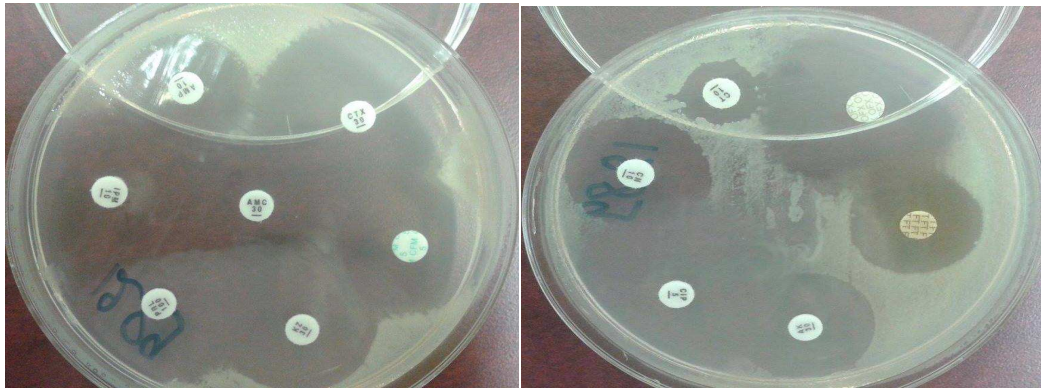


Figure20: antibiogramme d'*E. coli*



Figure21: antibiogramme de *K. pneumoniae*

Tableau4: Le profil de résistance/sensibilité pour les souches testées.

Antibiotiques	<i>E. coli</i>		<i>P. mirabilis</i>		<i>K. pneumoniae</i>	
	Diamètre (mm)	Phénotype	Diamètre (mm)	phénotype	Diamètre (mm)	phénotype
β-lactamines						
AMP	20	S	≤6	R	≤6	R
AMC	30	S	18	S	22	S
PRL	36	S	21	S	25	S
KZ	27	S	20	S	20	S
CTX	40	S	40	S	25	S
CFM	28	S	40	S	30	S
IPM	34	S	25	S	28	S
Aminosides						
AK	28	S	30	S	24	S
CN	25	S	27	S	23	S
Quinolones						
OFX	37	S	40	S	40	S
CIP	40	S	46	S	40	S
Divers						
CT	16	S	≤6	R	16	S
FT	23	S	≤6	R	30	S

2. Discussion

Les trois souches à Gram négatif isolées à partir de l'urine ont été identifiées sur la base de leurs caractères morphologiques, biochimiques, et leur sensibilité aux antibiotiques. L'identification de ces bactéries bénéficie depuis de nombreuses années déjà de l'existence de plusieurs méthodes:

- galerie classique avec un nombre limité de caractères ;
- galeries API qui sont très performantes.

2.1. Résultat de l'étude macroscopique et microscopique

Les souches identifiées ont une morphologie habituellement typique de type bacilles à Gram négatif de 2-3 μ de long sur 0,6 μ de large, généralement polymorphes. Et que ce présentent sous forme de bacilles ou diplobacilles colorées en rose mobiles, ce qui est observé pour *Proteus mirabilis* et *Escherichia coli*, et Certaines sont immobiles tel que *Klebsiella pneumoniae*.

On a constaté aussi que *Klebsiella pneumoniae* forme des colonies souvent très muqueuses, larges et luisantes. Et *Proteus mirabilis* a tendance à envahir la gélose et à y former un tapis uniforme. Ces résultats sont compatibles avec ceux mentionnés par **LE Minor, 1989 ; Illiaquer, 2010 ; Oulymata, 2007 ; Kouta, 2009.**

2.2. Résultats des tests biochimiques

L'identification présomptive des bactéries a été effectuée en comparant nos résultats avec ceux relevés sur des références de systématiques bactériennes (**Delarras, 2007 ; Denis, 2007**).

➤ Milieu TSI

Les résultats obtenus montre que Les deux souches: *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* ont fermenté les trois sucres : le lactose, le saccharose ainsi que le glucose avec production du gaz mais pas du sulfure d'hydrogène H₂S, donc elles sont incapables de réduire les sulfates en sulfure. Alors que l'espèce *Proteus mirabilis* a fermenté le glucose avec production de gaz alors que H₂S n'a pas été détecté, mais elle n'a pas fermenté ni le lactose ni le saccharose. Nous avons donc trouvé le même profil biochimique concernant la gélose TSI, comme signalé par **Delarras, 2007 ; Hajna, 1945.**

➤ Milieu mannitol-mobilité

D'après notre étude, les résultats obtenus montrent que les trois bactéries sont capables de fermenter le mannitol et de l'utiliser comme source de carbone et d'énergie. Concernant le test de mobilité nous avons obtenu des résultats positifs avec les deux souches: *Escherichia coli* et *Proteus mirabilis* et un résultat négatif avec la souche de *Klebsiella pneumoniae*. Ces résultats sont en parfait accord avec ceux décrits par **Meziani, 2012**.

➤ Milieu citrate de Simmons

Seules les bactéries autotrophes sont capables d'utiliser le citrate comme seule source de carbone, notant que ce dernier est le premier composé du cycle de Krebs ; s'il est utilisé, il y a croissance et le milieu s'alcalinise et cela se traduit par le virage de couleur du vert en bleu, ceci a été constaté que pour *Klebsiella pneumoniae* et *Proteus mirabilis*, mais pas pour *Escherichia coli* donc elle est dépourvue de citrate perméase et par conséquent elle est incapable d'utiliser le citrate comme seule source de carbone ainsi que le cycle de Krebs. Ces résultats sont compatibles avec ceux obtenus par les travaux de **Meziani, 2012**.

➤ Eau peptonée exempte d'indole

L'indole est obtenu de la dégradation du tryptophane, grâce à une enzyme bactérienne « la tryptophanase ». L'indole est apolaire, donc soluble dans les solvants organiques et réagit fortement en milieu acide avec le diméthyl-amino-4-benzaldéhyde contenus dans le réactif de Kovacs et forme un anneau rouge, ce qui est le cas pour *Escherichia coli* et non pas pour *Klebsiella pneumoniae* et *Proteus mirabilis* qui ont dépourvus de la tryptophanase. Les résultats obtenus sont en conformité avec ceux de **Souna, 2011; Meziani, 2012**.

➤ Milieu urée-indole

L'uréase

En présence de l'enzyme de l'uréase, l'urée est transformée en carbonate d'ammonium et il en résulte une alcalinisation du milieu. Avec les deux souches *Proteus mirabilis* et *Klebsiella pneumoniae* étudiées, nous avons constaté une réponse à l'urée fortement positive. Ce phénomène s'explique par le fait que ces espèces possédant une uréase très active qui entraîne la formation d'ions ammonium. Ces ions ammonium vont alcaliniser le milieu et entraîner le virage de l'indicateur du pH (le rouge de phénol) de l'orange au rouge en milieu basique.

Par contre la souche *Escherichia coli* a donné une réaction négative avec le test de l'uréase. Cela s'explique par l'absence de l'enzyme de l'uréase chez cette bactérie.

Les résultats obtenu du test uréase avec les trois souches sont vérifiés par ceux noté par **Meziani, 2012; Souna, 2011.**

La TDA

La tryptophane-désaminase agit sur le L-tryptophane en donnant l'acide pyruvique. Ce dernier donne avec le perchlorure de fer (FeCl_3) une coloration brune. Cette réaction a été constaté pour la souche *Proteus mirabilis* ce qui prouve que cette dernière possède une tryptophane-désaminase. Les deux souches *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* ont données une réaction négative avec le test de TDA. Cela s'explique par l'absence de l'enzyme tryptophane-désaminase chez ces deux germes.

Les résultats obtenus du test TDA avec les trois bactéries sont compatibles avec ceux de **Souna, 2011.**

➤ **Milieu MEVAG**

Le milieu MEVAG permet de déterminer la voie d'attaque des glucides, qui peut être catalysées par voie respiratoire ou par voie fermentaire. La dégradation d'un glucide s'accompagne généralement d'une acidification du milieu cela a été constaté pour les trois espèces.

Les résultats obtenus montrent qu'il a eu une respiration ou fermentation aérobie et fermentation anaérobie du glucide, donc les trois souches sont aéro-anaérobies facultatifs. Ces résultats sont en tout accord avec ceux mentionnés par **Denis et al., 2007.**

➤ **Production de la β -Galactosidase (test ONPG)**

Un test ONPG positif montre que l'organisme qui est testé contient les enzymes nécessaires à la fermentation du lactose et peut donc être classé comme un lactose fermenteur.

Dans notre étude, nous avons observé le caractère lactose (+) chez les souches d'*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*. Ce sont des espèces lactose positif, donc capables de scinder le lactose en glucose et galactose, grâce à l'enzyme intracellulaire la β -galactosidase, cette réaction ne peut être possible qu'en présence d'une autre enzyme, également intracellulaire, la β -galactoside perméase qui assure la pénétration du lactose dans la cellule bactérienne et par conséquent sa fermentation. Dans le test ONPG, c'est donc la β -

galactosidase qui est recherchée, cette enzyme permet de scinder le composé synthétique, incolore, ONPG (orthonitrophényl- β -Dgalactopiranoside) et libérer l'orthonitrophénol soluble qui donne la coloration jaune.

Selon **Delarras, 2007**, les bactéries Lactose (+) possèdent la β -galactosidase, et donc elles sont toujours ONPG (+). En comparant nos résultats avec ces données, nous pouvons déduire que nos résultats obtenus avec le test ONPG chez *Escherichia coli*, et *Klebsiella pneumoniae* sont corrects.

Dans notre travail, la souche de *Proteus mirabilis* est ONPG (-), ces résultats sont vérifiés par ceux notés par **Denis et al., 2007**.

➤ Tests RM-VP

Selon **Denis et al., 2007**; les espèces de *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* fermentent le glucose en produisant de nombreux acides organiques plus ou moins forts par la voie des fermentations acides mixtes. Par contre la souche de *Klebsiella pneumoniae* fermente le glucose par la fermentation butanediolique en produisant l'acétoïne qui est mis en évidence par le test VP. Cette distinction des deux voies peut justifier une règle parfois contestable mais fréquemment vérifiée: les bactéries VP (+) sont toujours RM (-), les bactéries RM (+) sont VP (-).

D'après notre étude, nos résultats sont en parfait accord avec ceux décrits par les auteurs **Denis et al., 2007**.

➤ Recherche de nitrate réductase

Le réactif de Griess prend une teinte rouge en présence d'ions nitrites. L'apparition de cette teinte dans le milieu signe la présence d'ions nitrites. Cela signifie que la bactérie possède une nitrate réductase et que cette dernière est capable de réduire les nitrates jusqu'au stade nitrites: c'est le cas pour les Entérobactéries.

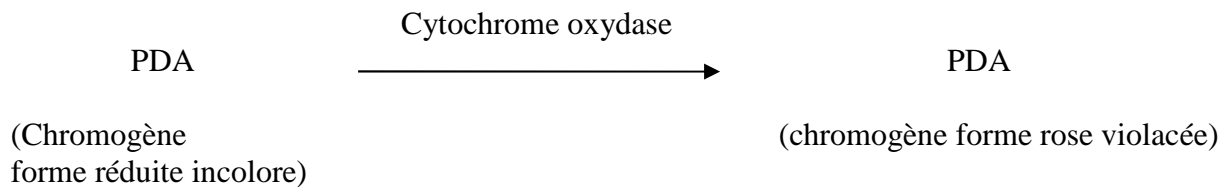
Donc nos souches: *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* possèdent une nitrate réductase (Nit+) qui a transformé les nitrates (NO_3^-) en nitrite (NO_2^-). Ces résultats sont corroborés par les études de **Denis et al. 2007 ; Delarras, 2007**.

➤ Recherche de la catalase

Après avoir effectué le test catalase, toutes les souches d'entérobactéries que nous avons étudiées ont présenté un caractère catalase (+), ces résultats sont confirmés par la Littérature **Khan et al., 2011**.

➤ Recherche de l'oxydase

Le réactif utilisé est le chlorhydrate ou l'oxalate de N-diméthyl paraphénylène diamine (PDA) qui est de couleur violette. Si une bactérie possède l'enzyme respiratoire, appelée le cytochrome oxydase (dernière enzyme de la chaîne), alors elle peut faire la réaction suivante :



Ce test est essentiel pour orienter l'identification des bacilles Gram négatif, est un bon contrôle pour les bactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, car elles sont toutes oxydases négatives. En réalisant ce test, nous avons obtenu des résultats conformes à ceux rapportés par **Delarras, 2007** ; qui prouvent que nos souches *proteus mirabilis*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* sont tous oxydase négatives.

➤ Recherche des décarboxylases : Lysine décarboxylase (LDC), Ornithine décarboxylase (ODC) et Arginine dihydrolase (ADH)

Les enzymes décarboxylases (LDC, ODC) et décarboxylase et dihydrolase (ADH) utilisées dans les galeries biochimiques réalisées pour l'identification des souches bactériennes isolées, présentent toutes un intérêt taxonomique.

Pour la recherche de ces enzymes, nous avons utilisé les milieux de Moeller, contenant l'acide aminé étudié (soit la lysine soit l'ornithine, soit l'arginine), du glucose et un indicateur coloré le bromocrésol pourpre. la réaction s'effectue en deux temps lorsque le glucose est fermenté, il y a virage au jaune du bromocrésol pourpre, lorsque l'acide aminé est décarboxylé, il y a une réalcalinisation du milieu qui vire au violet.

En comparant nos résultats avec ceux rapportés par **Denis, 2007 ; Dannessa, 2014** qui indiquent que *Escherichia coli* est caractérisé par une lysine décarboxylase(LDC), alors que *Proteus mirabilis* est identifié par une ornithine décarboxylase(ODC), par contre *Klebsiella pneumoniae* possède une lysine décarboxylase(LDC) et arginine dihydrolase (ADH).

Nous pouvons alors dire que notre identification par rapport à ce caractère biochimique a été conforme, nous avons trouvé presque les mêmes résultats.

➤ Identification des entérobactéries par la galerie API 20 E

La détermination de la positivité et la négativité de chaque test consiste sur une lecture ; soit directe (sans ajouter aucun réactif) soit indirecte(en ajoutant des réactifs spécifiques).la lecture est faite en se basant sur le tableau de lecture de la galerie API20E (Annexe 2).

D'après les résultats qu'on a obtenu par la galerie API20E et ceux de la galerie classique qui sont totalement identiques. Ces résultats sont compatibles avec ceux observé par **Souna, 2011**. On a conclu que nos souches sont des souches pures, donc la galerie API 20E vient de confirmer les résultats qu'on a obtenus.

2.3. Résistance des entérobactéries aux antibiotiques

Les entérobactéries ont une résistance naturelle à certaines familles d'antibiotiques. De nombreuses classes d'antibiotiques restent cependant actives comme la plupart des bêta-lactamines, les aminoglycosides, les tétracyclines, les quinolones et les sulfamides. Classiquement, on classe les entérobactéries en 4 groupes en fonction de leur sensibilité naturelle aux β -lactamines.

Profil de résistance de *Proteus mirabilis*

P. mirabilis par son phénotype sauvage est naturellement sensible à toutes les β -lactamines.

Notre souche isolée, possède une sensibilité à toutes les β -lactamines sauf l'Ampicilline qui donne un phénotype résistant(R), donc c'est une résistance acquise qui peut être due à une mutagenèse ou à un transfert de gènes, résultats relativement éloignés de ceux mentionnés par **Kassama et al., 2013**.

Concernant les aminosides, une sensibilité totale est enregistrée vis-à-vis de l'amikacine avec un diamètre de (30mm), et Gnetamicine (27mm). résultats non conforme aux travaux de **Kassama et al., 2013** indiquant 100% de résistance.

Une sensibilité totale est observée vis-à-vis des Quinolones .par contre une résistance totale par rapport à la colistine et furane qui est un caractère naturelle et spécifique de *P. mirabilis*.

Profil de résistance de *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae présente une résistance naturelle (chromosomique) à l'ampicilline correspond à une résistance naturelle de cette espèce par sécrétion d'une pénicillinase naturelle inhibée par l'acide clavulanique.

Notre souche de *K. pneumoniae* demeure sensible à toutes les β -lactamines sauf à l'ampicilline, observation similaire à celle rapportée par **Kassama et al., 2013** et celle de **Sakhri-Arafa en 2011**.

Concernant les aminosides, quinolones ainsi que la colistine et furane, notre souche présente une sensibilité entière envers ces antibiotiques. Ce qui indique que notre souche isolée de *K. pneumoniae* demeure sauvage et n'a aucune résistance acquise.

Profile de résistance d'*Escherichia coli*

E. coli fait partie du premier groupe (G1) des entérobactéries, qui présente une sensibilité totale à toutes les β -lactamines, les aminosides, les quinolones et aux polypeptides (colistine et furane) donc *E. coli* sont naturellement sensibles aux antibiotiques actifs sur les bacilles Gram négatif.

Notre souche d'*E. coli* montre une sensibilité totale vis-à-vis toutes les familles d'antibiotiques. Résultats non convenable à celle observé par **Meziani, 2012**.

Conclusion et Perspectives

Conclusion et Perspectives

Les entérobactéries sont les bactéries les plus retrouvées en pathologie humaine. Elles sont associées à de nombreuses infections incluant (des abcès, des pneumonies, des méningites, des septicémies, infections urinaires, des cystites...), elles représentent la deuxième cause d'infections graves après les cocci Gram positif.

Ces germes ont acquis des capacités à produire des mécanismes de résistances divers. Une antibiothérapie inadaptée initialement entraîne une augmentation du risque de résistances bactériennes. Une meilleure connaissance des mécanismes de résistances des entérobactéries et de leur traitement pourrait améliorer le pronostic des patients et diminuer la pression de sélection des antibiotiques.

Notre travail qui a fait appel à des techniques biochimiques a permis d'une part d'identifier des différentes espèces bactériennes incriminées dans les infections urinaires, et d'autre part d'établir leur profil de résistance vis à vis des antibiotiques couramment utilisés .

De l'ensemble des résultats obtenus de ce travail, il ressort que :

- Le phénotype biochimique qui est révélé à l'aide de la galerie classique présente certaines limites dans l'identification bactérienne.
- la galerie API20E qui est très performante qui permet une démarche simple, rapide et cohérente pour une bonne identification des espèces d'entérobactéries.
- l'analyse de profil de résistance des entérobactéries vis-à-vis antibiotiques est un outil important dans l'identification bactériennes.

Enfin, au point de vue perspective, nous insistons sur l'élaboration d'une approche plus fiable pour permettre aux laboratoires de santé de renforcer la surveillance qui doit être continue et systématique, et à mettre en place des bonnes pratiques en matière d'antibiothérapie

Les études épidémiologiques menées dans les différents hôpitaux du pays sont ainsi susceptibles de contribuer à l'adaptation des stratégies thérapeutiques pour le traitement des infections urinaires.

Références bibliographiques

- Achille R. (2006). Profil antibiotypique des bactéries responsables d'infections urinaires communautaire. Thèse de doctorat. Université de Bamako. 131p.
- Agregé S., Belguith J., Hadiji R. (2015) .Generalités sur les Anti-infectieux, en médecine vétérinaire.Ecole Nationale de médecine vétérinaire Sidi thabet. p13-14.
- Alvarez C., Pangnon B., Allouch P.Y., Ghnassia J.C. (1992). Infections urinaires: principaux aspects épidémiologiques, bactériologiques et cliniques. *Feuill Biol.* 23 (189) : 15-24.
- Archambaud M., Clave D. (2004). Fiche technique : *Proteus mirabilis* BLSE. Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique. 51 : 8-543.
- Avril J-L., Dabernat H., Denis F. et al. (2000). Bactériologie Clinique. Ellipses. 3^{ème} Edition. 511 p.
- Bakhoum I. (2004). Contrôle de qualité et validation de différentes microméthodes d'identification bactérienne. Thèse doctorat. Université Cheikh Anta Diop de Dakar. 113p.
- Ben Abdallah H., Sahnoun O., Ben Romdhane F., Loussaief S., Noomen M., Bouzouaia N., et al. (2005). Profile de sensibilité aux antibiotiques des *Entérobactéries* uropathogènes isolées dans la région de Monastir. *Rev Tun Infetiol.* 2 (2) : 5-8.
- Boone D.R., Garrity G., et al. (2001). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The *Archaea* and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. 2nd Edition. 721p.
- Bossert I. D., Young L.Y. (1986). Anaerobic oxidation of paracresol by a denitrifying bacterium. *Applied and environmental Microbiology.* 52 (5) : 1117-1122.
- Bousseboua H. (2005). Element de microbiologie. Edition Campus-Club. 2^{ème} Edition. 304p.
- Bruyère F., Cariou G., Boiteux J.P.,Hoznek A., Mignard J.P., Bernard L., Sotto A., et al. (2008). Progrès en Urologie. *Elsevier Masson.* 18 (1): 5-6.
- Carbonnelle B., Denis F., Marmonier A., et al. (1987). Bactériologie Médicale : Techniques usuelles. SIMEP SA. Paris. P.121-137 ; 146-155.

- CA-SFM. 2010. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. [En ligne]. <http://www.sfm.asso.fr>. Consulté le (16/05/2015).
- Clave D. (2012). Fiche technique : *Escherichia coli*. Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique. 123 : 8-543.
- Dannessa M. (2014). Introduction to diagnostic microbiology for the laboratory sciences. Jones and Bartlett publishers. 552p.
- Dellarras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Technique et documentation. France. Lavoisier. 462 p.
- Denis F., Ploy M-C., Martin C., et al. (2007). Bactériologie médicale. Ellipses. . 2^{ème} Edition. 573p.
- Derafa C. (2012). Travaux pratiques de systématique bactérienne. Université Farhat abbas sétif. 35p.
- Drame B. (2001). Microméthode d'identification et d'étude de la sensibilité des *Entérobactéries* : Intérêts thérapeutiques. Thèse doctorat. Université de Dakar. 126p.
- Edwards P.R., Ewing W.H. (1977). Identification of the *Enterobacteriaceae*. Edition Burgess. Minneapolis. 3rd Edition. 536p.
- Favet J. (2014). Antibiotiques et résistance bactérienne offensives et contre offensives. séminaire de bactériologie. 1-2.
- Farmer J.J., Davis B.R., Hickman-Bernner F.W., McWhorter A., Huntley-Carter G.P. Asbury M.A. et al. (1985). Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *Journal of clinical microbiology*. 21 (1): 46-76.
- Foxman B. (2002). Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity and economic costs. *American Journal of Medicine* .113: 5-13.
- Gaudy C. (2005). Antibiotiques : pharmacologie et thérapeutiques. Elsevier. Amesterdam. 269 p.

- Goettsch W., Van Pelt W., Nagelkerke N., et al. (2003). Increasing resistance to fluoroquinolones in *E. coli* from urinary tract infections in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother.* 46: 223.
- Goldstein F.W. (2000). The Multicentre Study Group Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community-acquired urinary tract infections in France. *Eur J Clin Microbiol Infect Diseases.* 19: 7-112.
- Gonthier R. (2000). Infection urinaire du sujet âgé. La revue de gériatrie, Tome25. 2 : 98-99.
- Gupta K., Scholes D., Stamm W. (1999). Increasing prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in women. *J Am Med Association.* 281: 736.
- Hajna A.A. (1945). Triple Sugar Iron Medium for the Identification of the Intestinal groups of Bacteria. *J. Bact.* 49: 516-517.
- Ilijaquer M. (2010). Epidémiologie et caractérisation moléculaire de souches cliniques de *Klebsiella pneumoniae* résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} generation hors BLSE, isolées entre 2007 et 2009, au C.H.U de Nantes. Université de Nantes. 123p.
- Kassama M., Hamadi S.(2013). Evaluation de la résistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries isolées à l'établissement hospitalier spécialisé de Constantine. Université constantine1. 62p.
- Kernbaum S. (1985). Elément de pathologie infectieuse. 3^{ème} Edition. 585p.
- Khan F., Rizvi M., Shukla I., Malik A. (2011). A novel approach for identification of members of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical samples. *Biology and Medicine.* 3 (2): 313-319.
- Kouta K. (2009). Infections urinaires chez les diabétiques adultes. Université Kasdi Merbah Ouargla. 76p.
- Larabi K., Masmoudi A., Fendri C. (2003). Etude bactériologique et phénotypique de résistance des germes responsables d'infections urinaires dans un CHU de Tunis. *Méd Mal Infect.* 33 : 52-348.

- LE Minor L., Veron M. (1989). Bactériologie Médicale. Médecine –Science FLAMMARION. 2^{ème} Edition. 1107p.
- Mainil J. (2003). Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli*: les adhésines et facteurs de colonisation. *Annales De Médecine Vétérinaire*. 147 : 105-126.
- Neiss K. (2002). La résistance bactérienne : la nouvelle guerre froide. Le médecin du Québec. 37 :41.
- Ndiaye A. (2005). Les entérobactéries secretrices de béta-lactamases à spectre elargie. Université Cheikh Anta diop de Dakar. 65p.
- Niang O. (2003). Validation d'une microméthode d'identification des bacilles à Gram négatif non fermentaires. Thèse doctorat. Université de Dakar. 96p.
- Oulymata G. (2007). Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles a gram négatif. Thèse doctorat. Université Cheikh Anta Diop de Dakar. 120p.
- Pechère J.C., Acar M., Armengane J., Grenier D., Noennring R. J. R., Sande M., et al. (1991). Les infections. 3^{ème} Edition. 798p.
- Pechère J.C., Frottier J. (1995). Une menace croissante : la résistance aux antibiotiques. *Médecine Hygiène*. 2090: 107.
- Perrière G. (1992). Application d'une présentation par objet des connaissances de modélisation de certains aspects de l'expression des gènes chez *E. coli* UCBL. Thèse de doctorat. Université de Claude Bernard –Lyon 1. 96p.
- Perronne C. (1999). Maladies infectieuses. Wolters kluwer France. 406p..
- Peyrou M. (2001). Antibiorésistance des souches bactériennes d'origine equine. Université Toulouse. 87p.
- Pilet C., Bourdon J.L., Toma B., et al. (1979). Les *Entérobactéries* : Bactériologie médicale et vétérinaire : systématique bactérienne. Doins. Paris. p.109-187.

- Schmiemann G., Kniehl E., Gebhardt K., Matejczyk M., Pradier E. (2010). The diagnosis of urinary tract infection: a systematic review. *Deutsches Ärzteblatt International*. 107 (21): 361-7.
- Sekhri-Arafa N. (2011). Fréquence et marqueurs épidémiologiques de *Klebsiella pneumoniae* dans les services à haut risque infectieux au niveau du CHU Benbadis de Constantine.université constantine1. 160p.
- Sougakoff W., Trystram D. (2003). Résistances aux β -lactamines. Université Pierre et Marie Curie. Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière. p. 31-46.
- Souna D. (2011). Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques des Entérobactéries au niveau du C.H.U de Sidi Bel Abbas. Mémoire de Magister. Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen.127p.
- Sylvie C. (2009). La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important. Le parrain âge des antimicrobiennes. 42 :7.
- Trystram D. (2003). Bactériologie. Université PARIS-VI Pierre et Marie Curie. Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière. p. 61-72.
- Vorkauer S. (2011). Les infections urinaires communautaires bactériennes de l'adulte : Prise en charge diagnostique et thérapeutique. Thèse de doctorat. Université Henri Poincaré de Nancy. 94p.
- Wise R., Hart T., Cars O., et al. (1998). Antimicrobial resistance is a major threat to public health. *British Med J*. 317: 10.
- Zitti T.J.Z. (2014). Mise en place de la surveillance des résistances aux antibiotiques des germes responsables d'infections urinaires dans le laboratoire Rodolphe Merieux de Bamako. Thèse de doctorat. Université des sciences et des technologies de Bamako. 88p.
- Zogheib E., Dupot H. (2005). Entérobactéries multirésistance. Conférence d'actualisation. Elsevier SAS. p153-165.

Annexes**Annexe 1: Milieu de culture (Composition en g / l d'eau distillée)****- Gélose nutritive**

Extrait de viande.....	01g.
Extrait de levure.....	02g.
Peptone.....	05g.
Chlorure de sodium.....	05g.
Agar.....	15g.

pH = 7,4**- Gélose Hektoen**

Protéose-peptone.....	12g.
Extrait de levure.....	03g.
Lactose.....	12g.
Saccharose.....	12g.
Salicine.....	02g.
Citrate de fer III et d'ammonium.....	1,5g.
Sels biliaires.....	09g.
Fuchsine acide.....	0,1g.
Bleu de bromothymol.....	0,065g.
Chlorure de sodium.....	05g.
Thiosulfate de sodium.....	05g.
Agar.....	14g.

pH = 7,5

- Gélose Mueller-Hinton

Infusion de la viande de bœuf.....	300ml.
Peptone de caséine.....	17,5g.
Amidon de maïs.....	1,5g.
Agar.....	17g.

pH = 7,4**- Mannitol-Mobilité-Nitrate**

Hydrolysats tryptique de caséine.....	10g.
Mannitol.....	7,5g.
Rouge de phénol.....	0,04g.
Nitrate de potassium.....	01g.
Agar.....	3,5g.

pH = 7,6**- Milieu TSI**

Peptones de caséine.....	15g.
Peptones de viande.....	05g.
Extraits de viande.....	03g.
Extrait de levure.....	03g.
Chlorure de sodium.....	05g.
Lactose.....	10g.
Saccharose.....	10g.
Glucose.....	01g.
Citrate de fer III et d'ammonium.....	0,5g.
Thiosulfate de sodium.....	0,5g.
Rouge de phénol.....	0,024g.

Agar.....12g.

pH = 7,4

- **Milieu citrate de Simmons**

Citrate de sodium.....02g.

Bleu de bromothymol.....0,08g.

Chlorure de sodium.....05g.

Sulfate de magnésium.....0,2g.

Hydrogénophosphate de potassium.....01g.

Dihydrogénophosphate d'ammonium.....01g.

Agar.....15g.

pH = 6,9

- **Bouillon Clark et Lubs**

Peptone tryptique ou poly peptone.....05 à 07g.

Glucose.....05g.

Hydrogénophosphate de potassium.....05g.

pH = 7,5

- **Bouillon nitraté**

Infusion cœur-cerveau.....25g.

Nitrate de sodium.....10g.

pH = 7,2

- **L'eau peptonée exempte d'indole**

Peptone de caséine.....10g.

Chlorure de Sodium.....05g.

pH = 7,2**- Milieu urée-indole**

L-tryptophane	03g.
Urée	20g.
Monophydrogénophosphate de potassium	01g.
Dihydrogénophosphate de potassium	01g.
Chlorure de sodium	05g.
Éthanol à 95 °	10ml.
Rouge de phénol en solution à 1%	2,5ml.

pH = 6,8**- Milieu MEVAG**

Macération de viande	50ml.
Chlorure de potassium	05g.
Rouge de phénol	10ml.
Agar	03g.

pH = 7-7,2**- LDC**

Extrait de levure	03g.
L-lysine (monochlorhydrate)	05g.
Glucose	01g.
Bromocrésol pourpre	0,16mg.
Éthanol	01ml.
Chlorure de sodium	05g.

pH = 6,8

- **ODC**

Extrait de levure.....	03g.
L-ornithine (monochlorhydrate).....	05g.
Glucose.....	01g.
Bromocrésol pourpre.....	0,16mg.
Éthanol.....	01ml.
Chlorure de sodium.....	05g.

pH = 6,8

- **ADH**

Extrait de levure.....	03g.
L-arginine (monochlorhydrate).....	05g.
Glucose.....	01g.
Bromocrésol pourpre.....	0,16mg.
Éthanol.....	01ml.
Chlorure de sodium.....	05g.

pH = 6,8

Annexe 2: Tableau de lecture des résultats de la galerie api 20 E

Tests et réactifs	Réactions/enzymes	Résultats négatifs	Résultats positifs
ONPG	β -galactosidase	Incolore	Jaune
ADH	Arginine-dihydrolase	Jaune	Rouge/orange
LDC	Lysine-décarboxylase	Jaune	Rouge/orange
ODC	Ornithine-decarboxylase	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	Uréase	Jaune	Rouge/orange
TDA TDA/immédiat	Tryptophane-désaminase	Jaune	Marron-rougeâtre
IND Kovacs/immédiat	Indole production	Incolore Vert-pâle/jaune	Rose
VP VP 1+ VP 2 / 10 min	Acetoin production	Incolore	Rose/rouge
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
INO	Inositol fermentation/oxydation		
SOR	Sorbitol fermentation/oxydation		
RHA	Rhamnose fermentation/oxydation		
SAC	Saccharose fermentation/oxydation		
MEL	Melibiose fermentation/oxydation		
AMY	Amygdalin fermentation/oxydation		
ARA	Arabinose fermentation/oxydation		

**Annexe 3: Tableau des Valeurs critiques des diamètres des zones
d'inhibition pour les entérobactéries (CA - SFM, 2010).**

Familles d'antibiotiques	Antibiotiques testés	Charge des Disques	Diamètres critiques (mm)	
			S	R
β-Lactamines	Ampicilline	10µg	≥19	<16
	Amoxicilline +Ac.clavulanique	20/10µg	≥21	<16
	Pipéracilline	75µg	≥20	<16
	Céfazoline	30µg	≥23	≤19
	Céfotaxime	30µg	≥26	<23
	Céfixime	10µg	≥25	<22
	Imipénème/Meropénème	10µg	≥24	<17
Aminosides	Amikacine	30µg	≥17	<15
	Gentamicine	15µg (10UI)	≥18	<16
Quinolones	Ofloxacine	5 µg	≥25	<22
	Ciprofloxacine	5 µg	≥25	<22
Divers	Colistine	50 µg	≥15	<15
	Furanes	300µg	≥17	≤14

MENDACI AMEL MIHOUBI SIHEM	Date de soutenance : 23 / 06 / 2015
Profil de sensibilité aux antibiotiques des Entérobactéries uropathogènes (<i>Escherichia coli</i>, <i>Proteus mirabilis</i>, <i>Klebsiella pneumoniae</i>)	
Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master Spécialité : Microbiologie Générale et biologies Moléculaire des microorganismes	
<p>Résumé</p> <p>Les entérobactéries représentent une des principales familles de bacilles à Gram négatif responsables des infections urinaires graves.</p> <p>Notre étude menée au laboratoire de bactériologie de l'hôpital militaire régional universitaire de Constantine "Allaoua Benbaatouche" et au niveau du laboratoire de microbiologie à l'université des Frères Mentouri de Constantine ; sur une période de deux mois (Mars, Mai 2015). Un totale de 740 prélèvements des urines de patients hospitalisés sont effectués, trois souches d'entérobactéries ont été identifiées.</p> <p>Le but de cette étude est de mettre en place un algorithme d'identification de ces 3 souches isolées à partir de l'urine, cette démarche a été réalisée d'une part selon les caractères morphologiques et biochimiques qui ont été effectuée par la galerie classique et la galerie API20E ;et d'autre part la détermination du profil de résistance vis-à-vis des antibiotiques testés afin d'évaluer et mettre en évidence l'état de la résistance de ce groupe de germes.</p> <p>Une sensibilité totale à tous les β-lactamines chez <i>E. coli</i> a été révélé ; et le même profil chez <i>K. pneumoniae</i> sauf à l'ampicilline auquel possède une résistance naturelle, ainsi que chez <i>P. mirabilis</i> qui est une résistance acquise qui peut être due à une mutagénèse. En ce qui concerne les autre familles d'antibiotiques les trois souches ont montré une sensibilité entière envers ces antibiotiques ; à l'exception de <i>p. mirabilis</i> qui est résistant à la colistine et le furane (caractère naturelle et spécifique). En terme globale ; aucune résistance acquise a été observé chez <i>Klebsiella pneumoniae</i> et <i>Escherichia coli</i>, ce qui indique que ces deux souches isolées demeure sauvages.</p> <p>Le changement permanent des résistances d'entérobactéries aux différents antibiotiques doit conduire à renforcer la surveillance et organiser des contrôles périodiques dans notre pays, afin de maîtriser toutes sortes d'anomalies.</p>	
Mots clés : Entérobactéries, profil de Résistance, infections urinaires, identification	
Laboratoire de recherche : Laboratoire de bactériologie de l'hôpital militaire régional universitaire (HMRU) de Constantine "Allaoua Benbaatouche", et laboratoire de microbiologie à l'université des Frères Mentouri de Constantine.	
<p>Président : M^{me} MERGOUD L. Maître assistante classe A. Université des Frères Mentouri Constantine</p> <p>Examinateur : M^{me} ZERMENE F. Maître assistante classe A. Université des Frères Mentouri Constantine</p> <p>Encadreur : M^{elle} MEZIANI M. Maître assistante classe B. Université des Frères Mentouri Constantine</p>	