



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم : ميكروبيولوجيا

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 Biologie Moléculaire des Microorganismes

Intitulé :

**Etude phénotypique des souches d'*Escherichia coli* multi résistantes
aux antibiotiques responsables des infections urinaires.**

Présenté et soutenu par : *BELGUEDJ NADA*

Le : 25/06/2018

AMOUCHE OUSSAMA

Jury d'évaluation :

Président du jury : *Melle ABDELAZIZ OUIDED* (MAA - UFM Constantine).

Rapporteur : *Melle MEZIANI MERIEM* (MAA - UFM Constantine).

Examineurs : *Mme MERGOUD LILIA* (MAA- UFM Constantine).

*Année universitaire
2017 - 2018*

Remerciements

Nous remercions ALLAH tout puissant qui nous a donné le courage et la volonté et de nous avoir bénie pour la réalisation de ce travail.

Nous voudrions présenter nos remerciements et notre gratitude en premier lieu au chef de service du laboratoire de Microbiologie de l'hôpital du CHU de Constantine Monsieur Benlabed.K pour son acceptation afin de réaliser ce travail.

Nous tenons particulièrement à remercier notre promotrice et directrice de Mémoire Melle « Meziani Meriem» maitre assistante A (MAA) pour avoir accepté la charge d'être rapporteur de ce mémoire, nous la remercions pour sa disponibilité, ses pertinents conseils et pour les efforts qu'elle a consenti durant la réalisation de ce mémoire. Ce travail témoigne de sa confiance et de son soutien dans les moments les plus difficiles. Qu'elle trouve ici l'expression de notre reconnaissance et de notre respect.

Nous remercions également Melle Abdelaziz Ouided maitre assistante A (MAA), pour l'honneur qu'elle nous a fait en présidant le jury. Qu'elle trouve ici l'expression de notre profond respect.

Nous adressons nos sincères remerciements à Mme Mergoud Lilia maitre assistante (MAA) pour avoir accepté d'examiner ce travail et de l'attribuer des remarques et des corrections très intéressantes, et c'est un honneur pour nous qu'elle juge ce travail.

Nous aimerons également exprimer notre gratitude à tous nos professeurs de graduation et de post-graduation de l'université de Constantine I, un grand merci pour vous nos enseignements de Microbiologie que dieu vous bénisse et vous donne la santé.

Nous remercions également tout le personnel de laboratoire de microbiologie du CHU de Constantine pour leur accueil et leur contribution dans ce travail.

Merci

À ceux et celles qui nous ont aidé d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin dans notre travail, nous les remercions du fond du cœur.

Merci à tout...

Dédicaces

A la mémoire de ma chère mère FATIHA

Depuis que dieu vous a choisi pour rejoindre la vie éternelle, il y a dix ans, sachez que je pense toujours à vous, vous n'avez pas de siège aujourd'hui parmi l'assistance mais vous siéger dans mon cœur, vous étiez pour moi un exemple de persévérance, de force, de douceur, en somme un exemple que j'aimerai suivre. Merci d'avoir toujours été la mère dont je rêvais.

Que Dieu tout puissant vous accueille dans son paradis.

A l'homme de ma vie, mon cher père CHERIF

Mon idole, mon exemple..., si je suis debout, fière, aujourd'hui devant, ma famille, mes maitres et mes amis, c'est grâce, après Dieu, a un grand homme qui m'a inculqué le sens de devoir, de responsabilité, de l'honnêteté et de l'humilité, qui m'a épaulé, protégé, consolé et aimé. Ce mémoire n'est que le fruit de votre soutien permanent, votre générosité et vos sacrifices. J'espère que vous y trouviez une humble récompense. Je souhaite également ne jamais vous décevoir et être toujours à la hauteur de ce que vous attendiez de moi.

Que Dieu vous accorde santé, bonheur et longue vie.

A mes adorables sœurs et frère

NABILA, ESMA, IMEN, NEDJOUA ET MOHAMED EL HADI

Par solidarité, je dirais que vous êtes mes soutiens ; de même vous êtes souvent à mes côtés dans les moments difficiles.

Je souhaite simplement que Dieu nous accorde sa bonté, une longue vie et une bonne santé pour que nous puissions s'acheminer ensemble avec honnêteté, sincérité et respect mutuel, comme nous l'ont enseigné nos parents.

A mes neveux et nièces

*RAMI, GHOSNEL BENE, MADJIDA, DJAD, RENAD, MAYACINE,
WADJIH et BELKISSE*

Perles qui viennent embellir ma vie, vous colorez en bonheur mon cœur et en joie mon esprit. Vos éclats de rire sont la meilleure mélodie que j'ai aimé écouter.

Soyez-vous-mêmes, soyez heureux à jamais.

A TAREK, IMED ET MAROUANE que je respecte

A ma chère DOUNIA, amie et plus... !

Je remercie Dieu d'avoir fait ta connaissance, j'apprécie ta personne, j'aime ton franc-parler et ton humour. Que Dieu te garde, te procure santé, bonheur et réussite.

A mon binôme et mon cher ami OUSSAMA

Merci pour ta patience, ta tolérance et les bons moments qu'on a partagé afin de donner naissance à ce mémoire ; vous souhaite un avenir plein de succès et de bonheur.

A mes meilleures collègues

*Merci pour les très bons moments qu'on avait partagés ensemble, je vous aime
toutes.*

NADA.....

Dédicaces

Je dédie cet humble travail

A ma très chère mère Mounira

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.

Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et

T'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon très cher père Ahmed

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.

Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien

Permanent venu de toi.

Dieu tout puissant te garde et te procure santé.

A mes très cher frère et sœurs

... Asma... Soumia... serine ... Islem ... Fouad ..

Sont présent dans tous mes moments d'examens

Par son soutien moral et ses belles surprises sucrées.

Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de

Réussite et de sérénité.

Je t'exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour.

A mes très cher amis Chemse dine et Djaber

*Votre amitié est un honneur et une fierté pour moi, je vous remercie d'avoir
embelli ma vie par de précieux moments de bonheur,*

*Merci d'être toujours à mes côtés, par votre présence, par votre amour, pour
donner du gout et du sens à notre vie que ce travail vous témoigne de ma sincère
affection.*

Merci à vous

...A ma chère binôme et chère amie Nada ...

*Je ne pourrais jamais exprimer le respect que j'ai pour vous, vos encouragements
et votre soutien m'ont toujours été un grand secours.*

Que Dieu le tout puissant vous accorde santé, réussite et bonheur.

...A toutes mes sœurs de master promo 2018...

C'est une grande fierté et honneur pour moi d'être parmi vous.

...A tous mes enseignants et toutes mes enseignantes...

*Il vous revient le mérite de m'avoir prodigué un enseignement profitable et une
formation complète veuillez accepter mes remerciements les plus sincères.*

Oussama 09/03/2018...

Résumé

Notre travail porte sur l'identification et l'étude de la résistance aux antibiotiques de la bactérie *Escherichia coli* impliquée dans les infections urinaires. Cette étude qui a eu lieu au laboratoire de bactériologie du CHU de Constantine durant un mois allant du 1 au 31 Mars, nous a permis d'isoler cinq souches d'*Escherichia coli* à partir des échantillons urinaires des patients qui ont subi une infection urinaire.

La résistance aux antibiotiques a été déterminée par la méthode classique de l'antibiogramme en milieu gélosé Mueller-Hinton. Les cinq souches d'*E.coli* ont présenté une résistance à l'ensemble des β -lactamines à l'exception des Céphamycines (Céfoxitine) et des Carbapénèmes (Imipénème, Ertapénème). Ainsi une résistance aux aminosides et aux quinolones. L'activité de β -lactamase à spectre élargi a été étudiée en utilisant un test de synergie. Nos résultats nous ont permis de déterminer le phénotype de la résistance par la présence des β -lactamases à spectre élargi chez les cinq souches testées.

La diffusion des souches multi-résistantes, d'entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) en particulier *E.coli* dans nos hôpitaux constitue une menace de santé publique, réduisant de manière importante les alternatives thérapeutiques pour le traitement des infections sévères. Pour cela, l'émergence de ces souches permet de rappeler qu'il est évidemment nécessaire d'être attentif aux divers types de souches qui circulent dans nos hôpitaux.

Mots clés : *Escherichia coli*, BLSE, Antibiotiques, multi résistance, Infections urinaires.

الملخص

عملنا هذا يهدف الى تحديد و دراسة مقاومة بكتيريا *Escherichia coli* للمضادات الحيوية ، و التي هي سبب من اسباب التهابات المسالك البولية . هذه الدراسة التي تمت في مخبر علم الجراثيم بالمستشفى الجامعي بقسنطينة على مدار شهر كامل من 01 إلى 31 مارس مكنتنا من عزل 5 سلالات من *Escherichia coli* انطلاقا من عينات بولية من عدة مصابين بالتهاب المسالك البولية.

تقنية Antibiogramme في الوسط Mueller-Hinton تسمح بتحديد المقاومة للمضادات الحيوية . السلالات الخمس لبكتيريا *Escherichia coli* قد اظهرت مقاومة لمجموعة β -lactamines باستثناء Céphamycines (Céfoxitine) و Carbapénèmes (Imepénèm ، Ertapénèm) و كذا مقاومة Aminosides و Quinolones . في دراسة نشاط β -lactamases استعملنا اختبار synergie ، النتيجة المتحصل عليها سمحت لنا بتحديد مظهر المقاومة بوجود β -lactamases a spectre élargi في السلالات المدروسة.

انتشار هذه السلالات المتعددة المقاومة Entérobactérie المنتجة β -lactamases a spectre élargi خاصة *Escherichia coli* في مستشفياتنا تشكل تهديد للصحة العامة و تحد بشكل كبير العلاجات البديلة للالتهابات الحادة. لهذا بروز هذه السلالات يذكرنا بضرورة الانتباه لمختلف انواع السلالات المنتشرة في المستشفيات.

الكلمات المفتاحية: *Escherichia coli* - BLSE - المضادات الحيوية - متعددة المقاومة - التهابات المسالك البولية .

Abstract

Our work focuses on the identification and study of antibiotic resistance of the bacterium *Escherichia coli* involved in urinary tract infections. This study, which took place in the bacteriology laboratory of the University Hospital of Constantine for a month from March 1 to 31, allowed us to isolate five strains of *Escherichia coli* from the urine samples of patients who had a urinary tract infection.

Antibiotic resistance was determined by the conventional method of Mueller-Hinton agar susceptibility testing. All five strains of *E. coli* showed resistance to all β -lactams except Cephamycins (Cefoxitin) and Carbapenems (Imipenem, Ertapenem). Thus resistance to aminosides and quinolones. Broad spectrum β -lactamase activity was studied using a synergy test. Our results allowed us to determine the phenotype of resistance by the presence of broad spectrum β -lactamases in the five strains tested.

The spread of multi-resistant strains, broad-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae (ESBL) especially *E.coli* in our hospitals is a public health threat, significantly reducing therapeutic alternatives for the treatment of severe infections. For this, the emergence of these strains makes it possible to remember that it is obviously necessary to be attentive to the various types of strains circulating in our hospitals.

Key words: *Escherichia coli*, ESBL, Antibiotics, multi-resistance, Urinary tract infections.

Table des matières

Introduction	1
Synthèse bibliographique	
Chapitre 1 : Généralités sur les infections urinaires	
1. Anatomie de l'appareil urinaire	3
2. L'urine.....	5
3. Définition des infections urinaires	5
4. Types d'infections urinaires.....	6
4.1. La cystite	6
4.2. L'urétrite	7
4.3. La pyélonéphrite	7
4.4. La prostatite	7
5. Etiologie	7
6. Physiopathologie et Diagnostique.....	8
7. Traitement	10
7.1. Prévention.....	10
7.2. Antibiothérapie.....	10
7.3. Phagothérapie.....	10
Chapitre 2 : Biologie du germe <i>Escherichia coli</i>	
1. Définition et caractères généraux des entérobactéries.....	12
2. L'espèce <i>Escherichia coli</i>	13
2.1. Présentation d' <i>Escherichia coli</i>	13
2.2. Classification.....	13
2.3. Habitat	14
2.4. Caractères bactériologiques	15
2.4.1. Caractères morphologiques et structuraux	15
2.4.2. Caractères cultureux	15
2.4.3. Caractères biochimiques	15
2.4.4. Caractères antigéniques.....	16
2.5. Pouvoir pathogène.....	18
3. <i>Escherichia coli</i> uropathogène.....	19

Chapitre 3 : La résistance d'*Escherichia coli* aux antibiotiques

1. Définition des antibiotiques.....	20
2. Classification	20
3. Mode d'action	20
4. Principales familles d'antibiotiques.....	21
4.1. Les β -lactamines	21
4.1.1. Structure et classification	21
4.1.2. Mode d'action	24
4.2. Les aminosides.....	24
4.2.1. Mode d'action	24
4.3. Les quinolones	25
4.3.1. Mode d'action	25
5. La résistance aux antibiotiques.....	25
5.1. Définition.....	25
5.2. Mécanismes de résistance.....	26
5.2.1. Mécanismes de résistance aux β -lactamines	26
5.2.2. Mécanismes de résistance aux aminosides.....	30
5.2.3. Mécanismes de résistance aux quinolones.....	31

Matériels et méthodes

1. Lieu et durée d'étude	33
2. Matériels.....	33
2.1. Souches étudiées.....	33
2.2. Matériel utilisé	33
2.3. Milieux de culture.....	34
2.3.1 Milieux solides	34
2.3.2. Milieux d'identification biochimiques et métaboliques.....	34
2.4. Antibiogramme	34
3. Méthodes.....	35
3.1. Prélèvement.....	35
3.2. Ensemencement.....	35
3.3. Isolement et purification	35
3.4. Techniques utilisées pour l'identification des bactéries	35
3.4.1. Tests préliminaires.....	35
3.4.2. Galerie classique	36
3.5. Antibiogramme	40
3.6. Tests de détection des BLSEs (Test de synergie)	41

Résultats et discussion

1. Résultats	43
1.1. Examen macroscopique.....	43
1.2. Examen microscopique.....	44
1.3. Galerie classique	45
1.4. Résistance d' <i>Escherichia coli</i> aux antibiotiques.....	48
1.5. Test de détection des BLSE _s (Test de synergie).....	51
2. Discussion.....	53
2.1. Résultat de l'étude macroscopique et microscopique	53
2.2. Résultats des tests biochimiques.....	53
2.3. Résistance d' <i>Escherichia coli</i> aux antibiotiques	55
2.4. Résultat de test de synergie.....	57
Conclusion	58

La liste des abréviations

° : Degré

µg : microgramme

ADH: Arginine di hydrolase

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMC : Amoxicilline+Acide clavulanique

AML: Amoxicilline

AmpC : β -lactamase de classe C ou céphalosporinase

ARN : Acide ribonucléique

ATB : Antibiotique

ATM: Aztréonam

BLSE : β -lactamases à spectre élargi ou étendu

BU : Bandelette urinaire

C° : Degré Celsius

C1G: Céphalosporine de 1ère génération

C2G: Céphalosporine de 2ème génération

C3G: Céphalosporine de 3ème génération

C4G: Céphalosporine de 4ème génération

CAZ : Céfotazidime

CHUC: Centre hospitalo-universitaire de Constantine

CLSI : Clinical and Laboratory Standard Institut

CS: citrate de Simmons

CT: Colistine

CTX: Céfotaxime

CTX-M: Cefotaximase Munich

E.coli : *Escherichia coli*

ECBU : Examen cytobactériologique des urines

ECUP : *E.coli* uropathogène

ESC : Esculine

ETP: Ertapénème

ExPEC : *E.coli* pathogène extra-intestinaux

FEP : Céfèpime

FOT: Fosfomycine
FOX: Cefoxitine
GEL : Gélatinase
GLU : Glucose
GM: Gentamycine
H : Heure
InPEC : *E.coli* pathogène intra-intestinaux
IPM: Imipénème
ITU : Infection du tractus urinaire
IU : Infection urinaire
KZ: Céfazoline
LAC: Lactose
LDC: Lysine décarboxylase
MAL: malonate
MH: Tetraminocycline
ml : millilitre
mm : millimètre
NA: Acide nalidixique
NET: Nétilmycine
NIT: nitrate réductase
NIT: Nitrofurantoïne
Nmca: Non metallo-carbapenemase-A
ODC: Ornithine décarboxylase
OMS : Organisation mondiale de la santé
OXA: Oxacillinase
PEF: Péfloxacine
pH : Potentiel d'hydrogène
PLP : Protéine liant les pénicillines
PRL: Pipéracilline
Qnr : Quinolone resistance
QRDR: Quinolone Resistance Determining Region
R : Résistant
S : Sensible
SHV: Sulfhydryl reagent Variable

SXT: Sulfamethoxazole-Trimethoprim

TDA : Tryptophane désamine

TEM: D'après Temoniera : nom du malade chez qui la première souche a été isolée

TIC: Ticarcilline

TSI: Triple-Sugar-Iron

URE : Uréase

VP : Réaction de voges Proskauer

La liste des figures

Figure 1 : Système urinaire chez l'homme et la femme.....	4
Figure 2 : Appareil Génito-urinaire de la femme.....	4
Figure 3 : Appareil Génito-urinaire de l'homme.....	5
Figure 4 : Morphologie et structure de la bactérie <i>E. coli</i>	15
Figure 5 : Sites d'infection des différents pathovars d' <i>Escherichia coli</i>	18
Figure 6 : Mécanisme d'action des antibiotiques.....	21
Figure 7 : Cycle β -lactame.....	22
Figure 8 : Structure des différentes classes de β -lactamine.....	24
Figure 9 : Galerie biochimique d' <i>E. coli</i>	36
Figure 10 : Disposition des disques d'antibiotiques pour le test de synergie.....	41
Figure 11 : Aspect d' <i>Escherichia coli</i> sur GN.....	43
Figure 12 : Aspect d' <i>Escherichia coli</i> sur Hektoen.....	44
Figure 13 : Bacilles Gram négatif (coloration de Gram).....	44
Figure 14 : Aspect du milieu TSI (test positif).....	45
Figure 15 : Aspect du milieu mannitol-mobilité (test positif).....	46
Figure 16 : Aspect du milieu citrate de Simmons (test négatif).....	46
Figure 17 : Aspect du milieu urée-indole (uréase négatif).....	47
Figure 18 : Aspect du test indole positif.....	48
Figure 19 : Antibiogramme de la souche EC ₁ et EC ₂	48
Figure 20 : Antibiogramme de la souche EC ₃ et EC ₄	49
Figure 21 : Antibiogramme de la souche EC ₅	49
Figure 22 : Test de synergie positif des souches EC ₁ , EC ₂ , EC ₃ , EC ₄	52
Figure 23 : Test de synergie positif de la souche EC ₅	52

La liste des tableaux

Tableau 1 : La classification d' <i>Escherichia coli</i>	14
Tableau 2 : Caractères biochimiques d' <i>Escherichia coli</i>	16
Tableau 3 : Test TSI.....	37
Tableau 4 : Utilisation de mannitol et test de mobilité.....	37
Tableau 5 : Recherche de l'utilisation de citrate.....	38
Tableau 6 : Recherche de l'uréase et l'indole.....	39
Tableau 7 : Le profil de résistance/sensibilité des souches d' <i>E.coli</i>	50

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 infections urinaires 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.

Les entérobactéries, en particulier *Escherichia coli*, sont des résidents habituels du tractus gastro-intestinal, susceptibles de provoquer de très nombreuses infections, même chez des sujets sans pathologie. *E. coli*, en dépit de son image de bactérie communautaire représente la première cause d'infection urinaire dans plusieurs pays. Naturellement sensible à de très nombreux antibiotiques, l'émergence puis la diffusion de différents mécanismes de résistance acquise au sein de cette espèce, aussi bien en ville qu'à l'hôpital, conduit à l'apparition des souches multi résistantes, confrontant parfois les cliniciens à des quasi-impasses thérapeutiques (**Ayad, 2016**).

La multi résistance des souches d'*Escherichia coli* est principalement liée à la production de β -lactamases à spectre élargi (BLSE), c'est derniers sont des enzymes plasmidiques, appartenant à la classe A de Ambler, qui confèrent une résistance à toutes les pénicillines, aux céphalosporines de 1ère et 2ème génération et à au moins une céphalosporine de 3/4ème génération (C3/4G) ou à l'aztréonam (**Robin et al, 2012**).

Actuellement, la prévalence de BLSE varie selon les pays et les hôpitaux, mais dans tous les cas, les CTX-M (céfotaximase) sont considérées comme le type de BLSE le plus fréquent au monde (Perez et al, 2007). C'est dans ce contexte général que nous avons été amenés à entreprendre ce présent travail qui a pour objectifs:

- L'isolement et l'identification des *Escherichia coli* impliquées dans les infections urinaires.
- L'étude de la résistance d'*Escherichia coli* vis-à-vis différents antibiotiques par réalisation d'un antibiogramme.

- Détermination phénotypique du mécanisme enzymatique responsable de la résistance de ces bactéries par le test de synergie.

Synthèse
bibliographique

***Chapitre I : Généralité
sur les infections
urinaires***

1. Anatomie de l'appareil urinaire

L'appareil urinaire est un ensemble d'organes assurant l'épuration du sang ainsi que la production et l'élimination de l'urine, il est partagé essentiellement en deux parties (**Kouta, 2009 ; Rossant et Rossant-Lumbroso ,2010**).

- Le haut de l'appareil urinaire qui comprend : les deux reins (qui fabriquent l'urine) et les deux uretères.

- Le bas de l'appareil urinaire qui comprend : la vessie (réservoir des urines), l'urètre (canal situé sous la vessie qui permet l'évacuation des urines), et la prostate (glande située autour de l'urètre de l'homme) (**figure1**).

En effet, chez la femme, le méat urinaire est proche de l'anus où sont toujours présentes des bactéries (**figure2**). Ces bactéries peuvent remonter le long de l'urètre vers la vessie et proliférer dans l'urine. Un défaut d'hygiène locale peut donc favoriser les infections urinaires(IU) chez la femme. Cependant l'homme est relativement protégé des IUs par la distance qui sépare l'anus de son méat urinaire (**figure3**), orifice situé à l'extrémité du gland (la longueur de l'urètre masculin est en moyenne de 16 cm, alors que celle de l'urètre féminin est de 2cm). L'IU est donc plus souvent chez l'homme, la traduction d'une anomalie au niveau des voies urinaires, en particulier l'existence d'un adénome de la prostate (qui provoque une stase des urines dans la vessie). La forme des uretères et de la vessie prévient le retour de l'urine vers les reins (**Rossant et Rossant-Lumbroso ,2010**).

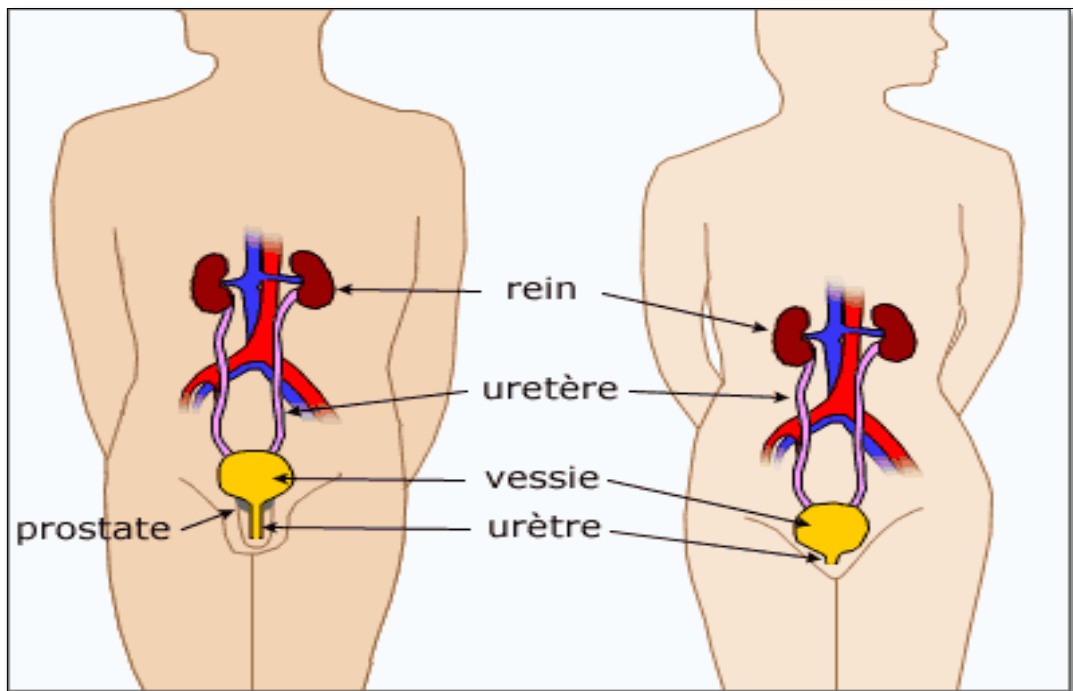


Figure 1 : Système Urinaire chez l’homme et la femme (Rossant et Rossant-Lumbroso ,2010).

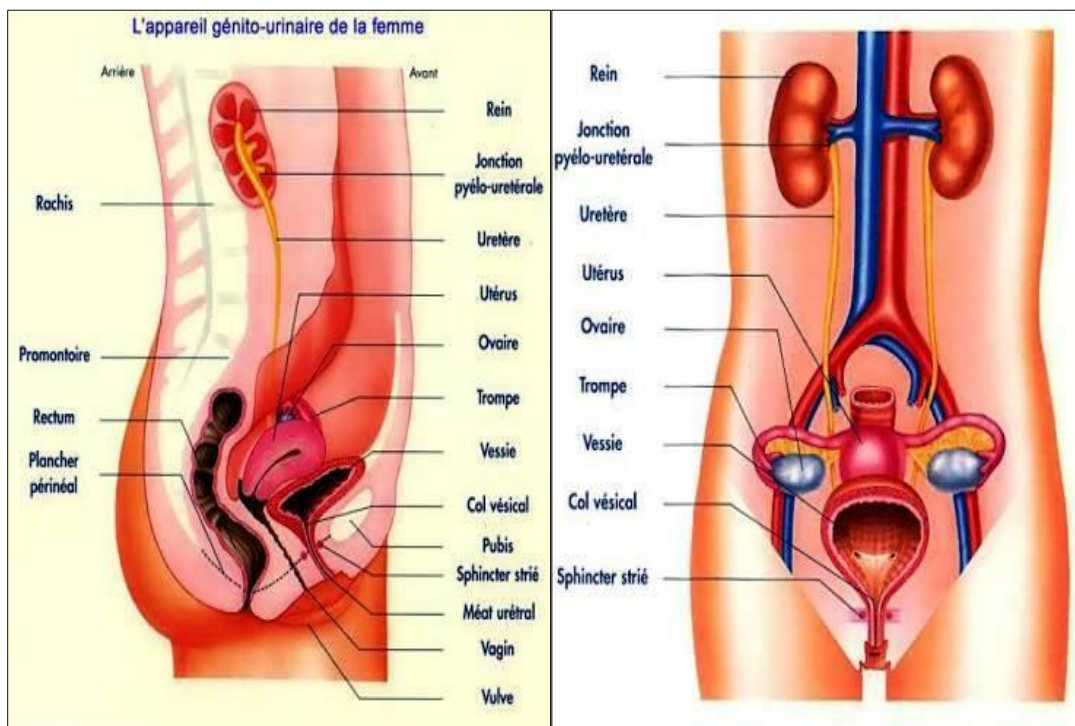


Figure 2 : Appareil Génito-urinaire de la femme (Rossant et Rossant-Lumbroso ,2010).

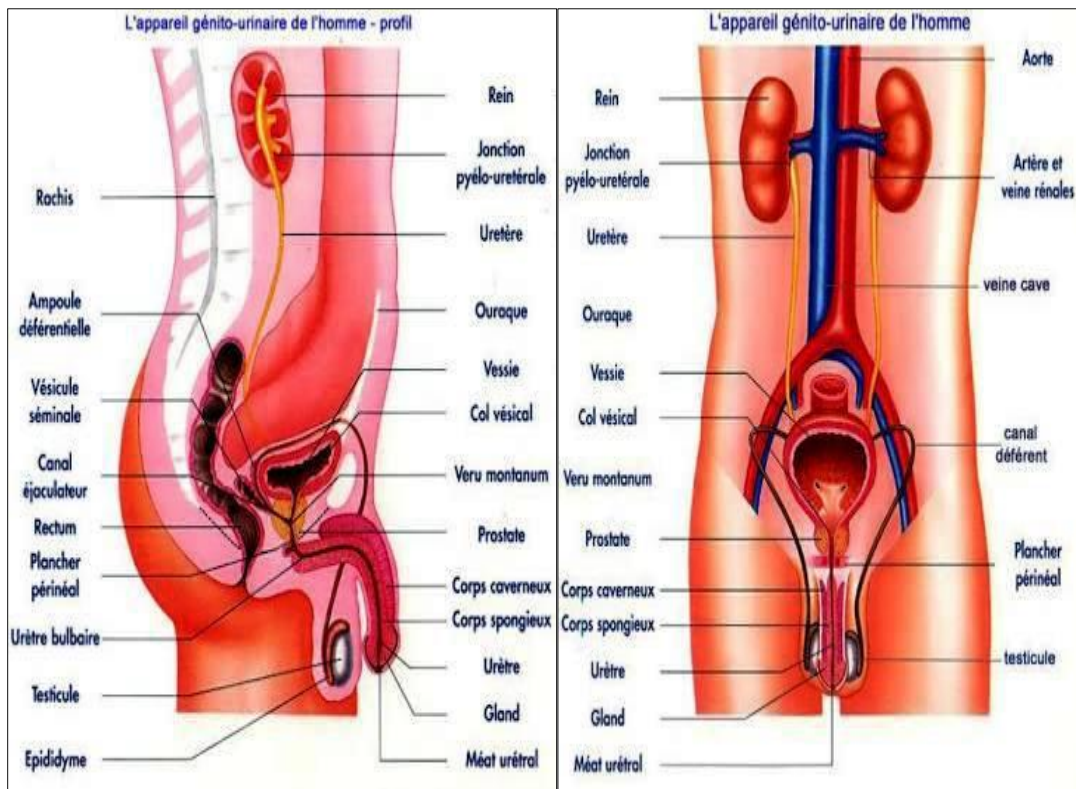


Figure 3 : Appareil Génito-urinaire de l'homme (Rossant et Rossant-Lumbroso ,2010).

2. 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 sécrétée par les reins puis emmagasinée dans la vessie entre les mictions enfin évacuée à travers l'urètre. Elle est composée d'eau, d'urée, d'électrolytes (sodium, potassium, bicarbonates, sulfates), de créatinine, d'acide urique, d'ammoniaque et de toxines. Son pH varie entre 4,5 et 8,0. L'urine est contaminée par les bactéries à sa sortie de l'organisme (Zitti, 2014 ; Alan, 2015).

3. Définition des infections urinaires

C'est une colonisation de l'appareil urinaire par des germes qui envahissent la vessie (infection urinaire basse) ou l'uretère et le rein (infection urinaire haute). Ce sont les infections bactériennes les plus communes chez la femme (Idatie, 1988 ; Mallaret et al., 1996).

L'infection urinaire (IU) correspond à l'agression d'un tissu par un ou plusieurs microorganismes, générant une réponse inflammatoire et des symptômes de nature et

d'intensité variable selon le terrain (**Jury de la conférence de consensus, 2003**). Elle associe au moins un des signes suivants :

- fièvre ($> 38\text{ }^{\circ}\text{C}$), impériosité mictionnelle, pollakiurie, brûlures mictionnelles ou douleur sus-pubienne, en l'absence d'autre cause infectieuse.
- à une uroculture positive. La pertinence des données cliniques et biologiques est à apprécier en fonction des différentes situations.

Biologiquement, elle est définie par la présence significative des bactéries dans l'urine au moins à 10^5 germes par ml d'urine, accompagnée d'une leucocyturie pathologique supérieure ou égale à 10^4 par ml d'urine (**Humbert, 1997**).

- Les définitions actuellement proposées dans la littérature et par la dernière recommandation française séparent deux entités (**AFSSAPS, 2008**) :
 - L'IU simple, avec la cystite (infection de la vessie), ou la pyélonéphrite (infection du rein) simple de la femme de 15 à 65 ans sans antécédent ni complication.
 - L'IU compliquée, survenant chez des patients ayant au moins un facteur de risque pouvant rendre l'infection plus grave et le traitement plus complexe.

4. Types d'infections urinaires

On distingue quatre types d'infections urinaires: la cystite, l'urétrite, la pyélonéphrite et la prostatite. Ils se distinguent selon la localisation de l'infection.

4.1. La cystite

C'est une forme d'infection plus courante du bas de l'appareil urinaire: urètre et vessie. Elle touche presque uniquement les femmes, Il s'agit de l'inflammation de la vessie. La plupart du temps, l'inflammation est provoquée par la prolifération des bactéries intestinales de type *Escherichia coli* (**Guy Albert, 2008**). Mais elle est due à d'autres bactéries (*staphylococcus, Proteus, klebsiella, etc.*). On dit que les femmes font des cystites, car leur urètre est beaucoup plus court que celui de l'homme, donc les microbes peuvent migrer très rapidement dans la vessie surtout s'il y a une irritation au niveau du méat urinaire (**Perino, 2012**).

4.2. L'urétrite

L'urétrite touche uniquement l'urètre (le conduit qui relie la vessie au méat urinaire). Il s'agit d'une Infection Sexuellement Transmissible (IST) courante chez les hommes, mais les femmes peuvent aussi en souffrir. Différents agents infectieux peuvent causer l'urétrite. Les plus communs sont la *chlamydia* et le gonocoque (la bactérie responsable de la gonorrhée) (Guy Albert, 2008).

4.3. La pyélonéphrite

La pyélonéphrite est un état plus grave, elle désigne l'inflammation du bassinet et du rein (le haut de l'appareil urinaire). Celle-ci résulte généralement d'une infection bactérienne. Il peut s'agir d'une complication d'une cystite non traitée ou mal traitée qui permet la prolifération des bactéries de la vessie vers les reins. La pyélonéphrite aiguë est la conséquence d'urines infectées dans le haut de l'appareil urinaire. Ce syndrome associe des frissons avec une hyperthermie supérieure à 38,5°C des douleurs avec parfois des vomissements et des signes d'atteintes du bas de l'appareil urinaire à type de brûlures (Guy Albert, 2008).

4.4. La prostatite

La prostatite est une inflammation de la prostate, affection fréquente chez l'homme âgé (hypertrophie ou hyperplasie bénigne de la prostate) .Si la prostate se développe trop, elle peut resserrer l'urètre et ainsi perturber l'écoulement de l'urine, ce qui rend la miction difficile et douloureuse, voire complètement impossible dans des cas extrêmes (Pilly ,2008).

5. Etiologie

Les bactéries responsables de l'IU sont presque toujours d'origine digestive. Les micro-organismes retrouvés le plus fréquemment chez les patients présentant une infection urinaire sont décrits comme uropathogènes (Achille, 2006) ceci inclut :

- Les bacilles à Gram négatif (BGN)

La plupart des IUs sont dues à la propagation par voie ascendante des bactéries d'origine intestinale (**Colasson, 1981**), d'où la prédominance des Entérobactéries au sein desquels :

- *Escherichia coli* est le plus souvent mis en cause (60 à 80 %) ;
- *Proteus* (*Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus rettgeri*) ;
- *Klebsiella* (*Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*) ;
- *Enterobacter* (*Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, ...) ;
- *Providencia stuartii* ;
- *Morganella morganii*.

Par ailleurs, d'autres BGN, *Pseudomonas aeruginosa* sont responsables des infections urinaires iatrogènes, résultant d'une contamination par des manoeuvres instrumentales endo-urinaires (sonde à demeure, uréthro-cystoscopie...) (**Colasson, 1981**).

➤ Les Cocci à Gram Positif

Les infections urinaires à Cocci à Gram Positif sont rares (**Colasson, 1981**).

Parmi ces bactéries :

- *Staphylocoques* : *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. aureus* ;
- *Staphylocoques* des groupes D sont rares ;
- *Staphylocoques* des groupes B.

6. Physiopathologie et diagnostique

L'arbre urinaire est normalement stérile, à l'exception de la flore des derniers centimètres de l'urètre distal. Cette dernière est variée, et reflète à la fois la flore digestive (Entérobactéries, Streptocoques), la flore cutanée (Staphylocoques à coagulase négative, *Corynebacterium*), et la flore anaérobie (**Daniel et al, 2003**).

Les micro-organismes atteignent l'appareil urinaire par différentes voies : ascendante essentiellement, mais aussi hématogène, ou lymphatique. Le mécanisme principal est la voie ascendante, spécialement pour les bactéries d'origine intestinale (Entérobactéries) (**Finer et al, 2004**).

Le diagnostique des infections urinaires repose sur plusieurs méthodes dont :

a) Bandelette urinaire

La bandelette urinaire (BU) est une méthode d'analyse biologique instantanée des urines qui sont mises en contact avec réactifs spécifique. Elles permettent notamment de détecter de manière qualitative la présence de leucocyte et de nitrite dans les urines (**Ellatif, 2011**).

b) Examen cyto bactériologique des urines (ECBU)

L'objectif de l'ECBU est de mettre en évidence des signes d'inflammation de l'arbre urinaire (traduit par leucocyturie), de quantifier puis d'identifier éventuellement le ou parfois les micro-organismes pathogènes (**Pilly, 2008**).

c) Antibiogramme

Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques supposés ou connus. La souche est déclarée sensible, intermédiaire ou résistante. Un antibiogramme est systématiquement associé à l'ECBU (**Ellatif, 2011**).

7. Traitement

Plusieurs mesures de traitement peuvent être réalisées afin de diminuer le risque d'IU.

7.1. Prévention

Un traitement préventif est envisagé en cas d'IU récidivantes (**Barrier Letertre. 2014**).

- Diurèse abondante (supérieure ou égale à 1,5 l/j) ;
- Mictions régulières ;
- Mictions post coïtales ;
- Traitement d'une infection génitale associée ;
- Hygiène périnéale (toilette d'avant en arrière) ;
- Régularisation du transit intestinal ;
- Oestrogènes ayant une action trophique, à prescrire chez la femme ménopausée (colpotrophine* : 1 ovule / jour, 20 jours, par mois pendant 3 mois) ;
- Acidifiants urinaires ;
- Asepsie rigoureuse lors des manœuvres instrumentales urologiques ;
- Traitement étiologique des infections urinaires récidivantes.

7.2. Antibiothérapie

L'antibiothérapie est le moyen thérapeutique, pour le traitement d'une infection urinaire en utilisant un ou plusieurs médicaments anti-infectieux, appartenant à la classe des antibiotiques. Qui doivent remplir les conditions suivantes :

- Etre un bactéricide et un bactériostatique ;
- Avoir une absorption rapide avec un pic plasmatique précoce ; une élimination urinaire prédominante et de fortes concentrations dans le rein et les urines ;
- Couvrir les spectres de la majorité des germes habituels des infections urinaires.

Après réalisation d'un ECBU, l'antibiothérapie est indispensable. De nombreux antibiotiques ont une excellente diffusion urinaire. Leur pénétration tissulaire est cependant

variable. Lorsque la bactérie est normalement sensible, une monothérapie est recommandée (**Mal, 1991 ; Achille, 2006**).

Il existe deux types d'antibiothérapie: l'antibioprophylaxie et l'antibiothérapie curative. L'antibioprophylaxie ou l'antibiothérapie préventive, n'est qu'une des méthodes à côté de toutes les mesures d'hygiène pour prévenir une infection urinaire. Après confirmation que l'ECBU est positif, un ou plusieurs antibiotiques peuvent être prescrits pour la personne malade. L'antibiothérapie curative est réalisée lorsque l'antibioprophylaxie s'avère insuffisante, dans ce cas l'acte chirurgical est nécessaire (**Lobel et Soussy, 2007**).

7.3. Phagothérapie

La phagothérapie est une technique très efficace, qui consiste en l'utilisation de bactériophages préalablement sélectionnés pour traiter divers infection bactériennes. Elle est relativement méconnue dans la médecine occidentale mais très utilisée en Europe (**Geoffry, 2005**).

En 2011, face à l'augmentation des infections nosocomiales et de la résistance des microorganismes aux antibiotiques habituels, et la carence en nouvelles molécules thérapeutiques, des recherches encouragées par l'OMS ont été entreprise. Les premiers résultats ont montré que les bactériophages avaient des effets sur les infections urinaires, cette méthode améliore notamment l'action des antibiotiques (**Dublanchet et Patey, 2011**). Cette ancienne thérapie, dite phagothérapie, suscite de nouveaux espoirs en tant que traitement complémentaire aux antibiotiques dans certaines infections à bactéries multi résistantes.

***Chapitre II : Biologie
du germe Escherichia
coli***

1. Définition et caractères généraux des entérobactéries

Les entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif, retrouvés partout dans le sol, dans l'eau et surtout dans le tube digestif de l'homme et des animaux, elles comprennent un nombre très élevé de genre et d'espèces.

Leur abondance dans l'intestin, leur mobilité, la rapidité de leur multiplication, l'acquisition fréquente de mécanismes de résistance aux antibiotiques, expliquent qu'elles soient les bactéries les plus souvent impliquées en pathologie infectieuse humaine surtout en milieu hospitalier (Verhaegen, 2002).

La famille des Entérobactéries se définit par les caractères suivants : (Freney et Croze, 2007).

- bacilles souvent mobiles par une mobilité péritriche ou immobiles ;
- non exigeants, leur culture est facile sur milieux ordinaires ;
- dépourvues de cytochrome oxydase ;
- possèdent un nitrate réductase, enzyme qui réduit les nitrates en nitrites ;
- aéro-anaérobies facultatifs (capables de pousser en présence de dioxygène) ;
- dégradent le glucose par une voie fermentaire avec ou sans production de gaz.

On peut schématiquement subdiviser l'ensemble des Entérobactéries en deux groupes : (Verhaegen, 2002).

- ✚ D'une part les entérobactéries qui font partie des flores fécales commensales habituelles de l'homme et des animaux, ce groupe comprend principalement : *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Entérobacter*, *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*, *Serratia*, *Citrobacter*. Ces espèces ne provoquent pas de pathologies intestinales mais sont très fréquentes dans beaucoup d'infections extra-intestinales, en premier lieu dans les infections urinaires.
- ✚ D'autre part les espèces pathogènes pour l'intestin dont l'ingestion provoque une infection intestinale (*Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella* et certaines souches d'*Escherichia coli*) ou un syndrome septicémique (*Salmonella typhi*).

2. L'espèce *Escherichia coli*

2.1. Présentation d'*Escherichia coli*

C'est en 1885 que Theodore Escherich, un pédiatre allemand, a identifié pour la première fois la bactérie *Escherichia coli* (*E.coli*) dans des selles de nourrissons, qu'il appela *Bacterium coli commune* (Kaper et al, 2004). Son nom actuel lui est donné en 1919 par Castellani et Chaombers (Grimont, 1987). Depuis ce temps, *E. coli* est devenue la bactérie la mieux connue et la plus étudiée, sa découverte précoce et sa culture aisée (division cellulaire toutes les 20 minutes à 37C°) en font un outil d'étude pratique. En effet, nous devons beaucoup de nos connaissances du métabolisme intermédiaire, recombinaison génétique, réplication de l'ADN, Transcription de l'ARN et la synthèse des protéines à des études menées sur *E.coli* (Donnenberg, 2002).

Escherichia coli est un type de coliforme fécal faisant partie des bactéries trouvées dans les intestins d'humains et d'animaux à sang chaud. La plupart des *E. coli* sont inoffensifs et ont une fonction utile dans le corps en arrêtant la croissance des espèces bactériennes nuisibles et en synthétisant des vitamines nécessaires (vitamines K), qui aident à la coagulation sanguine. Cependant, elles peuvent être des pathogènes opportunistes, tandis que d'autres peuvent causer la maladie gastro-intestinale chez des individus sains quand elles sont ingérées. *E. coli* est présente dans le gros intestin, donc elle est aussi présente dans la matière fécale des humains et des animaux. Si la contamination récente de sources d'eau avec des vidanges ou des déchets animaux a lieu, *E.coli* sera présente (Aril et al, 1988 ; Chalmers, 2000).

2.2. Classification

Escherichia coli fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. (Tableau1).

Tableau 1 : La classification d'*Escherichia coli* selon le Bergey's manual 2012.

Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gamma Proteobacteria</i>
Ordre	<i>Enterobacteriales</i>
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genre	<i>Escherichia</i>
Espèce	<i>Escherichia coli (E.coli)</i>

2.3. Habitat

E. coli est une bactérie commune de la microflore commensale intestinale de l'homme et de la plupart des animaux à sang chaud (mammifères et oiseaux). Elle colonise de manière asymptomatique le tractus digestif de l'homme dans les premières heures qui suivent la naissance et constitue dès lors l'espèce bactérienne dominante de la flore anaérobie facultative du colon humain. Sa niche écologique se trouve dans la couche de mucus sécrétée par l'épithélium du colon où elle assure, avec les autres composants de la microflore, une barrière de protection de la muqueuse. La concentration en *E. coli* par grammes de selles varie d'un individu à un autre de 10^7 à 10^9 unités formant des colonies (UFC). Elle est plus faible chez les autres mammifères. *E. coli* peut transiter dans l'eau et les sédiments. Il est utilisé comme un indicateur de la contamination fécale de l'eau. On estime que la moitié de la population totale des *E. coli* réside au niveau de ces habitats secondaires environnementaux, au sein desquels certaines souches peuvent être sélectionnées et disséminer naturellement. *E. coli*, et plus largement les coliformes thermo-tolérants, sont également recherchés dans les aliments comme indicateurs de contamination fécale (Pantel, 2015).

2.4. Caractères bactériologiques

2.4.1. Caractères morphologiques et structuraux

E. coli est un bacille, donc de forme cylindrique (bâtonnets) ou coccobacillaire, gram négatif uniformément coloré, non sporulé, de 2µm à 3µm de long sur 0.7µm de large. Il se présente soit seul ou groupé le plus souvent par deux (diplobacilles), très rarement ils sont rencontrés en amas. Ils sont mobiles grâce à une ciliature péritriche (**Figure4**) (**Soumaila, 2012**).

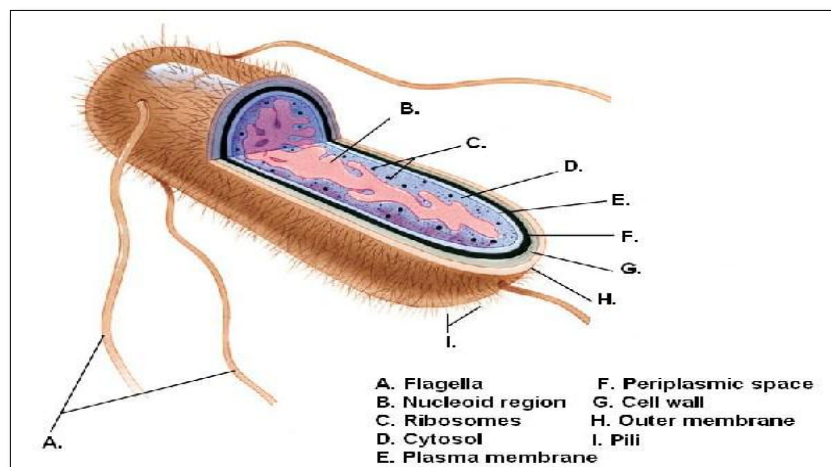


Figure 4 : Morphologie et structure de la bactérie *E.coli* (**Soumaila, 2012**).

2.4.2. Caractères culturaux

Elle se développe en 24 heures à 37C° sur les milieux gélosés en donnant des colonies rondes, lisses, à bords réguliers, de 2 à 3 mm de diamètre, non pigmentées. Sur les milieux lactosés, les colonies sont généralement lactose positif. Sur gélose au sang, elles peuvent être hémolytiques (**Avril et al, 2000**).

2.4.3. Caractères biochimiques

E. coli appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Elle possède les caractères classiques de cette famille : c'est un bacille à Gram négatif, non sporulé, généralement mobile grâce à une ciliature péritriche, aéro-anaérobie facultatif, à métabolisme respiratoire et fermentaire, oxydase négative, catalase positive et nitrate réductase positive (**Bidet et Bingen,**

2011). Cette bactérie possède également des caractères biochimiques particuliers permettant de la différencier des espèces voisines. Il s'agit de la production d'indole à partir de tryptophane, l'absence d'utilisation du citrate comme source de carbone et l'absence de production d'acétoïne (Joly et Reynaud, 2007).

Les caractères biochimiques d'*Escherichia coli* sont présentés dans le **tableau2**.

Tableau 2 : Caractères biochimiques d'*Escherichia coli* (Flaudrois, 2004).

Test	GLU	LAC	H ₂ S	GAZ	CS	GEL	MAL	LDC	NIT	ODC	ADH	URE	TDA	VP	ESC
Résultat	+	+	+	+	-	-	-	+/-	-	+/-	+/-	-	-	-	-

Légende :

+ : caractère positif

- : caractère négatif

+/- : caractère inconstant

2.4.4. Caractères antigéniques

Les principaux antigènes d'*Escherichia coli* sont :

- Antigènes somatique O

Les antigènes somatiques sont composés plus de 150 de lipopolysaccharides complexes. Actuellement certains laboratoires d'analyses médicales utilisent l'agglutination avec des sérums pour déterminer le sérotype, mais cette technique est limitée par le nombre de plus en plus élevé de sérums à fabriquer, par la présence d'agglutination croisée entre les antigènes O d'*E.coli*, *Shigella* et ceux de *Salmonella*, et par le passage de la consistance

crémeuse de la colonie à une consistance rugueuse ayant pour conséquence l'absence de synthèse de l'antigène O sont regroupés dans le groupe de gènes *rfb* peut être amplifié spécifiquement grâce à un système d'amorces puis, après restriction par l'endonucléase *MbII*, un profil noté « R » peut être obtenu par électrophorèse, correspondant à un sérotype d'*E.coli* (Surveillane, 1997).

- Antigène flagellaire H

Chez *E. coli*, les flagelles sont constitués de trois parties : un corpuscule basal, un crochet et un filament hélicoïdal formé d'un assemblage de flagelline. Plus de 40 gènes répartis principalement dans 4 clusters sont impliqués dans la formation et le fonctionnement du flagelle. La flagelline, immunogène et constituant l'antigène H est généralement codée par le gène *fliC*. Chez *E. coli*, les parties N-terminale et C-terminale de la flagelline sont conservées, tandis que la partie centrale, exposée à l'environnement, est hautement variable. Cette diversité proviendrait des transferts horizontaux et des recombinaisons d'ADN étranger qui généreraient de nouveaux allèles de *fliC* et ainsi de la diversité antigénique. Les souches d'*E. coli* dans l'incapacité de synthétiser un flagelle fonctionnel sont classées comme non-motiles (NM ou H-) (Miszczucha, 2013).

- Antigènes de surface ou d'enveloppe K

Il existe 3 types d'antigène K désignés par les lettres L, A ou B (Posl et al, 1998).

- ✓ L'antigène L : est le plus fréquent mais est thermolabile (il est détruit en une demi-heure à 100°C), donc le chauffage provoque une perte du pouvoir antigénique, du pouvoir de fixer les anticorps et du pouvoir de masquer l'antigène O.
- ✓ L'antigène A : est rare, c'est un antigène capsulaire (les *Escherichia coli* encapsulés sont relativement fréquents dans les infections urinaires). L'Ag A est très thermostable (il faut un autoclavage pour le détruire).
- ✓ L'antigène B : est toujours présent chez les *Escherichia coli* entéropathogènes de gastro-entérite infantile. Il a une thermolabilité intermédiaire : après une demi-heure à 100°C il reste toujours de l'antigène O peut entrer en contact

avec le sérum par « trouage » de l'enveloppe, la fixation de l'anticorps est toujours positive mais le pouvoir antigénique se perd progressivement (en fonction de la durée de chauffage).

2.5. Pouvoir pathogène

E. coli est une espèce commensale qui interagit avec son hôte dans une relation mutualiste. Cependant, *E. coli* peut également être un pathogène opportuniste ou un pathogène obligatoire du fait de l'expression de facteurs de virulence spécifiques. Les souches pathogènes opportunistes ou obligatoires ont développé différents modes d'interaction avec leur hôte se traduisant par des signes cliniques variés. Elles sont classiquement séparées en deux groupes : les *E. coli* pathogènes intestinaux (InPEC) responsables de gastro-entérites et les *E. coli* pathogènes extra-intestinaux (ExPEC) responsables d'infections urinaires, de péritonites, de pneumonies nosocomiales, de méningites ou encore de sepsis. Sur la base des modes d'interaction hôte/bactérie et des signes cliniques de l'infection, les souches sont classées en « pathovars » ou « pathotypes » qui regroupent des souches de sérotypes spécifiques (**Figure 5**) (Croxen et Finlay, 2010).

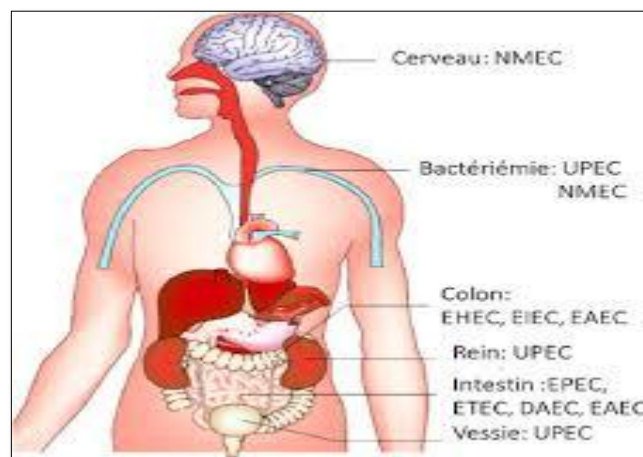


Figure 5 : Sites d'infection des différents pathovars d'*Escherichia coli* (Croxen et al, 2010).

Les InPEC sont à l'origine des syndromes diarrhéiques sévères, notamment chez l'enfant, dans les pays en développement. Ils sont responsables de deux millions de morts par an dans le monde (Clarke et al, 2003).

Actuellement, les InPEC sont classés en six pathotypes :

- les EPEC pour « Enteropathogenic *E. coli* », premier pathotype décrit historiquement et responsable de diarrhées aqueuses ;
- les EHEC pour « Enterohaemorrhagic *E. coli* », agents de colites hémorragiques parfois compliquées de syndrome hémolytique et urémique (SHU) ;
- les ETEC pour « Enterotoxigenic *E. coli* », responsables de diarrhées aqueuses (« turista ») ;
- les EIEC pour « Enteroinvasive *E. coli* », entraînant un syndrome dysentérique proche de celui des *Shigella* spp ;
- les EAEC pour « Enteroaggregative *E. coli* », responsables de diarrhées persistantes ;
- les DAEC pour « Diffusely adherent *E. coli* », entraînant également des diarrhées aqueuses persistantes.

Le site de l'adhésion dans le tractus intestinal diffère en fonction des souches (Figure 5). Chaque pathotype possède un mécanisme de pathogénicité (adhésion, invasion, production d'enterotoxines) qui lui est propre et engendre un syndrome spécifique (**Croxen et Finlay, 2010**).

Le terme de ExPEC (pour « Extra-intestinal pathogenic *E. coli* ») regroupe les pathovars responsables d'infections extra-intestinales (**Russo et Johnson, 2000**) :

- les UPEC (pour « Uropathogenic *E. coli* ») ;
- les MNEC (pour « Meningitis-associated *E. coli* ») (**Figure 5**).

3. *Escherichia coli* uropathogène

Les *E. coli* uropathogènes (UPEC) sont responsables de 80 % des infections des voies urinaires (UTI) soit environ 150 millions de personnes par an dans le monde. Les UPECs touchent particulièrement les femmes de tout âge. Environ 60 % des femmes souffrent d'une UTI au moins une fois dans leur vie, et 25 % d'entre elles auront une récurrence. Les UTIs se produisent lorsqu'il y a contamination de la région urogénitale par la flore fécale. Les bactéries peuvent atteindre la vessie et provoquer une cystite aiguë ou infecter les reins et provoquer une pyélonéphrite aiguë (**Kaper, Nataro et al, 2004**). Leur pouvoir pathogène est caractérisé par une adhésion aux cellules uro-épithéliales grâce à plusieurs types d'adhésines, et à d'autres facteurs comme l'hémolysine alpha et les sidérophores (**Soderstrom et al, 2008**).

***Chapitre III : Résistance
d'Escherichia coli aux
antibiotiques***

1. Définition des antibiotiques

Un antibiotique est défini comme toute substance chimique produite par des micro-organismes ayant le pouvoir d'inhiber et même de détruire les bactéries et autres micro-organismes. L'étendue de l'activité antibactérienne d'un antibiotique définit son spectre. Plus un antibiotique détruit des types de bactéries différentes, plus son spectre est large (**Mehdi, 2008**).

Les antibiotiques sont caractérisés par :

- Activité antibactérienne (spectre d'activité) ;
- Toxicité sélective (mode d'action) ;
- Activité en milieu organique (pharmacocinétique) ;
- Bonne absorption et diffusion dans l'organisme.

2. Classification

Pour pouvoir mieux connaître les antibiotiques afin qu'ils soient utilisés à bon escient, on a procédé à leur classification selon certains critères (**Talbert et al, 2009**) :

- Les antibiotiques ayant une même structure chimiques, à l'origine de leur mécanisme d'action, se classent dans une même famille ;
- Au sein d'une même famille, les antibiotiques peuvent se différencier par leur spectre d'activité et sont réunis alors dans des groupes ;
- Au sein d'un même groupe, l'activité antimicrobienne est identique mais les antibiotiques peuvent se différencier par leur propriété pharmacologique ou leur tolérance.

3. Mode d'action

Les antibiotiques agissent à l'échelon moléculaire au niveau d'une ou de plusieurs étapes métaboliques indispensables à la vie de la bactérie (**Yala et al, 2001**) (**Figure6**).

- Action sur la structure de la membrane cytoplasmique bactérienne ;
- Action sur la synthèse protéique bactérienne ;
- Action sur la synthèse de l'ADN de la bactérie ;

- Action sur la synthèse des folates.

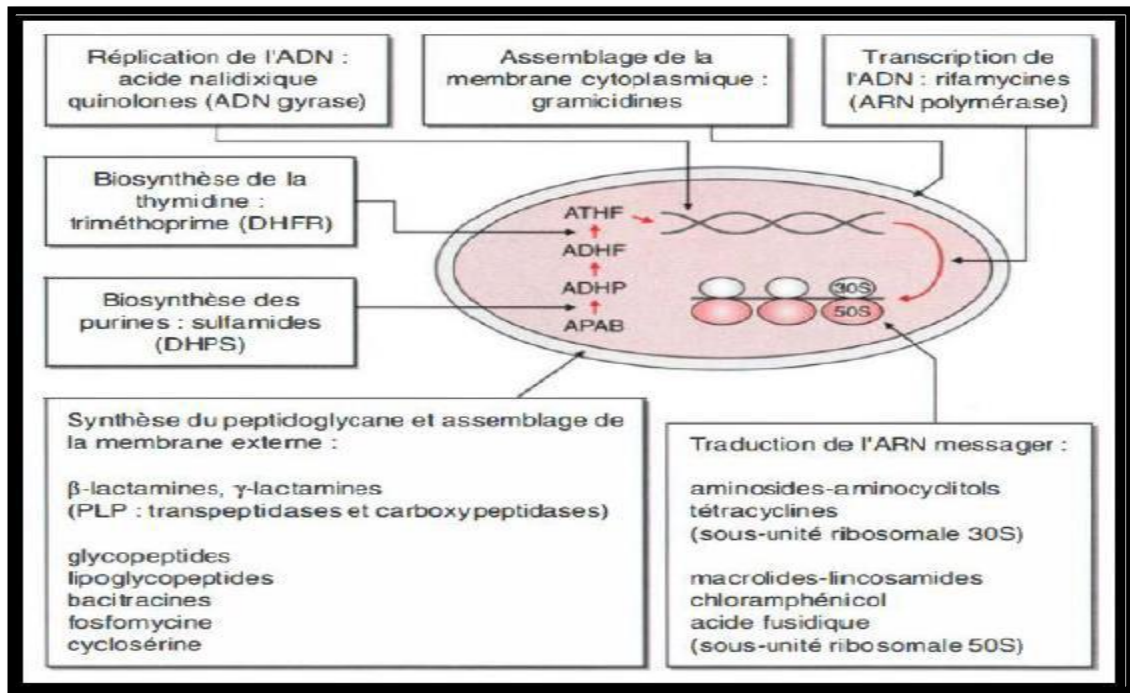


Figure 6 : Mécanisme d'action des antibiotiques (Paul, 1997).

4. Principales familles d'antibiotiques

Les principales familles d'antibiotiques présentant un intérêt thérapeutique contre les entérobactéries, y compris *E. coli*, sont les β -lactamines, les aminosides et les quinolones (Bert et Lambert-Zechovsky, 2000).

4.1. Les β -lactamines

Les β -lactamines sont les antibiotiques de première ligne dans le traitement des infections causées par les entérobactéries. Cependant, dès le début de leur utilisation de masse dans les années 1940, leur efficacité a été confrontée à la production d'enzymes les inactivant : les β -lactamases (Ruppé, 2010).

4.1.1. Structure et classification

La base commune à toutes les β -lactamines est le noyau azétidinone, qui contient la structure carbonyle lactame indispensable pour l'activité de ces molécules (Bryskier, 1999) (Figure7).

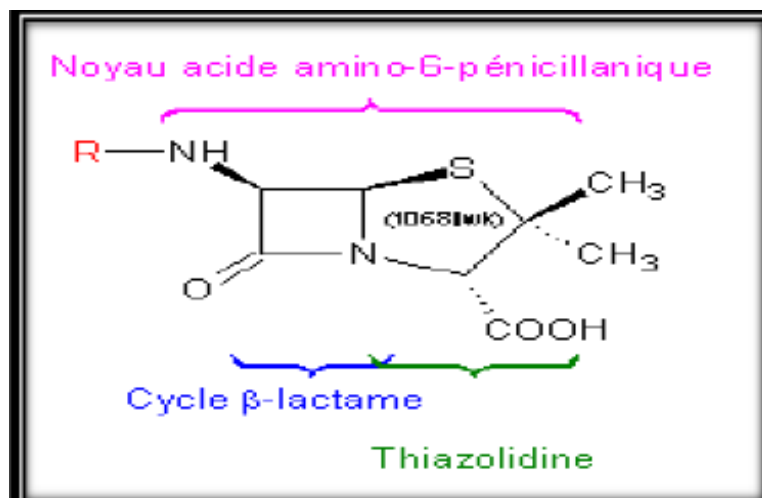


Figure7 : Cycle β -lactame (Bessard, 2004).

À partir de cette structure, cinq groupes ont été développés par adjonction d'un cycle latéral: les pénames, les céphèmes, les pénèmes, les monobactames et les inhibiteurs de β -lactamases (Figure8) (Cavallo et al, 2004).

❖ Pénames (Pénicillines)

Il s'agit d'un groupe de molécules, ayant en commun le noyau péname, qui est caractérisé par un pentacycle saturé (cycle thiazolidine) associé au noyau β -lactame. Selon la nature de la chaîne latérale, on a défini plusieurs sous-classes, dont les plus utilisées sont les aminopénicillines (ampicilline, amoxicilline), les carboxypénicillines (ticarcilline) les uréidopénicillines (pipéracilline) et les amidinopénicillines (pivmecillinam) (Ruppé, 2010).

❖ Céphèmes (Céphalosporines)

Leur noyau de base associe un cycle β -lactame à un cycle dihydrothiazine pour former le noyau céphème. La particularité du noyau céphème et les nombreux radicaux de substitution proposés expliquent les propriétés antibactériennes différentes des céphalosporines, justifiant leur distinction fonctionnelle en plusieurs générations, de spectre et d'intérêt clinique variables (Cavallo et al, 2004). On distingue ainsi:

- Les céphalosporines de première génération (C1G) : elles sont plutôt actives sur les bactéries à Gram positif. Exemples : céfalotine, céfazoline et céfalexine.
- Les céphalosporines de deuxième génération (C2G) : elles ont un spectre étendu vers les bactéries à Gram négatif. Exemples : céfamandole, céfuroxime, céfoxitine et céfotétan.

- Les céphalosporines de troisième génération (C3G) : elles ont un spectre étendu à la plupart des entérobactéries. Exemples : céfotaxime, ceftazidime, ceftriaxone et céfopérazone.
- Les céphalosporines de quatrième génération (C4G) : elles sont relativement stables à l'hydrolyse des céphalosporinases. Elles restent actives sur les entérobactéries ayant acquis une résistance aux C3G par hyperproduction d'une céphalosporinase. Exemples : céfépime et ceftiprome (**Ruppé, 2010**).

❖ Pénèmes (Carbapénèmes)

Les pénèmes se caractérisent par la présence d'un cycle penta-atomique insaturé collé au cycle β -lactame. En fonction de l'hétéroatome fixé en position 1, on distingue trois groupes: les sulfopénèmes, les carbapénèmes et oxapénèmes (**Bryskier, 1999**). Les carbapénèmes possèdent un très large spectre antibactérien associé à une grande stabilité envers la quasi-totalité des β -lactamases. Elles sont considérées comme traitement de choix des infections sévères à bactéries à Gram négatif (Kattan et al, 2008). Quatre molécules sont commercialisées : l'imipénème, le méropénème, l'ertapénème et le doripénème (**Nordmann et Carrer, 2010**).

❖ Monobactames

Se caractérisent par la présence du noyau monocyclique, azétidine, limité au cycle β -lactame. L'aztréonam est le seul monobactame commercialisé (**Ruppé, 2010**). Il montre une très bonne activité contre les bactéries à Gram négatif aérobies et plus particulièrement contre les entérobactéries, pour lesquelles il possède une activité comparable à celle des céphalosporines de troisième génération en raison de sa bonne stabilité vis-à-vis des β -lactamases (**Cavallo et al, 2004**).

❖ Inhibiteurs de β -lactamases

Il s'agit de l'acide clavulanique (clavame ou oxapénème), sulbactam et tazobactam (pénicillines sulfones). Ce sont des β -lactamines à faible activité antibactérienne intrinsèque. Associés à une β -lactamine, ils en restaurent l'activité antibactérienne qu'elle n'avait plus du fait de son hydrolyse par les β -lactamases (**Cavallo et al, 2004**). En effet, l'acide clavulanique est utilisé avec l'amoxicilline dans l'Augmentin et la ticarcilline dans le Claventin, alors que le tazobactam est utilisé avec la pipéracilline dans la Tazocilline. Le spectre d'inhibition de ces molécules est limité aux pénicillinases (**Ruppé, 2010**).

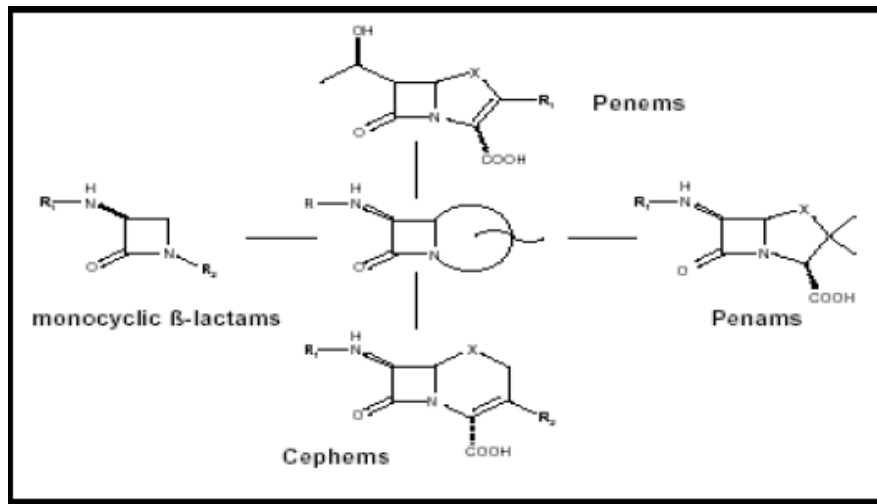


Figure8 : Structure des différentes classes de β-lactamine (**Bryskier, 1999**).

4.1.2. Mode d'action

Les β-lactamines inhibent la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane (polymère majeur spécifique de la paroi des bactéries à Gram négatif et positif). Les cibles des β-lactamines sont des enzymes situées dans la partie externe de la membrane cytoplasmique bactérienne et appelées PLP. Ces enzymes correspondent aux transpeptidases impliquées dans la synthèse du peptidoglycane. La fixation des β-lactamines sur ces PLP est responsable de l'arrêt de la synthèse du peptidoglycane (**Cavallo et al, 2004**). Les carbapénèmes se fixent principalement aux PLP 1 et PLP 2 contrairement aux céphalosporines et aux aminopénicillines qui se fixent à la PLP 3 (**Wolff et al, 2008**).

4.2. Les aminosides

Sont des antibiotiques bactéricides de la famille des aminoglycosides, ils comprennent la kanamycine, l'amikacine, la gentamycine, la nétilmycine, la tobramycine (**Bryskier, 1999**). Ce sont des hétérosides naturels formés par un ou plusieurs glycosides liés à un aminocyclitol (**Yala, 2001**).

4.2.1. Mode d'action

Le spectre d'action des aminosides est large, agissant sur les bacilles Gram négatifs aérobies notamment les entérobactéries et sur les bacilles à Gram positif (*Listeria*). Ils sont actifs sur les *staphylococcus aureus* sécréteurs de pénicilline, sur les cocci à Gram négatif. Ces antibiotiques sont inactifs sur les streptocoques, pneumocoques, les entérocoques et les

anaérobies. Les aminosides perturbent la synthèse des protéines au niveau de la sous-unité 30S des ribosomes des bactéries entraînant la destruction bactérienne (Yala, 2001).

4.3. Les quinolones

Les quinolones sont des antibiotiques synthétiques, découvertes en 1962 par Leshner qui a isolé l'acide nalidixique à partir d'une préparation de chloroquine destinée au traitement du paludisme, la fluoration de ces molécules en position 6 a permis d'étendre leur spectre d'activité selon la génération de la molécule à *Pseudomonas aeruginosa*, aux coques à Gram positif, aux bactéries intracellulaires et aux anaérobies (Meradi et al, 2009), ces fluoroquinolones, qui sont des quinolones de deuxième génération (norfloxacine, péfloxacine, ciprofloxacine) (Yala, 2001), sont largement utilisés en médecine humaine et vétérinaire, notamment dans le cas d'infections urinaires et respiratoires (Meradi et al, 2009).

4.3.1. Mode d'action

Les fluoroquinolones ne sont pas actives sur les entérocoques, malgré leur efficacité sur les bactéries à gram négatif, leur utilisation doit être raisonnée afin de contrôler l'émergence de résistance (Botto, 2003). Les fluoroquinolones ont un spectre d'activité élargi, qui recouvre les bactéries à Gram négatif, les cocci à Gram positif dont l'activité est 100 à 1000 fois plus élevée que celles des quinolones de 1ère génération (sauf streptocoques et pneumocoques). L'ofloxacine et la Ciprofloxacine ont une activité sur *Mycobacterium tuberculosis* (Yala, 2001). Les Quinolones inhibent spécifiquement la synthèse d'ADN bactérien en agissant sur les topoisomérases de type II ainsi que la topoisomérase IV. Elles se fixent sur la sous-unité A de la gyrase (cible préférentielle des bactéries à Gram négatif) (Meradi et al, 2009).

5. La résistance aux antibiotiques

5.1. Définition

Une souche résistante est une souche qui supporte une concentration d'antibiotique notamment plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des souches de la même espèce, La résistance aux antibiotiques des bactéries peut être naturelle ou acquise (OMS, 2012).

✓ **Résistance naturelle**

La résistance naturelle ou intrinsèque est un caractère d'espèce qui touche toutes les souches. Elle est stable, transmise à la descendance mais pas ou peu transmissible sur un mode horizontal. Elle est programmée sur le génome bactérien. Les bactéries naturellement sensibles définissent le « spectre d'activité » de l'antibiotique (Messai, 2006).

Escherichia coli est une entérobactérie, qui comme toutes les entérobactéries présente une résistance naturelle aux glycopeptides et à la pénicilline G. Elle appartient au groupe 1 des Entérobactéries qui sont naturellement sensibles à l'ensemble des bêta-lactamines (Saidani, 2012).

✓ **Résistance acquise**

La résistance acquise est un caractère qui ne concerne que quelques souches d'une espèce donnée. Elle est moins stable, mais elle se propage souvent de façon importante dans le monde bactérien, par l'acquisition des nouveaux gènes capables de rendre la bactérie insensible à un antibiotique ou à un groupe d'antibiotique. Ce nouveau gène peut être obtenu soit par mutation au niveau du chromosome, soit par transfert d'ADN de plasmide conjugatif ou de transposons (Yala, 2001). Certaines souches ont acquis de nouveaux mécanismes de résistance leur permettant d'échapper aux antibiotiques. La résistance d'*E.coli* aux bêta-lactamines est due à une inactivation de l'antibiotique par l'acquisition d'enzymes (Saidani, 2012).

5.2. Mécanismes de résistance

5.2.1. Mécanismes de résistance aux β -lactamines

De manière générale, les entérobactéries y compris *E.coli* utilisent différents mécanismes pour développer une résistance aux β -lactamines : il peut s'agir de troubles de perméabilité pour les antibiotiques, ce qui empêche la pénétration de l'antibiotique dans la bactérie, de systèmes d'efflux qui permettent d'évacuer les antibiotiques qui auraient pénétré dans la bactérie, ou de modification de la cible bactérienne de l'antibiotique (exemples : les sites de liaison des pénicillines, les penicillin binding proteins (PBP), ce qui empêche la fabrication de la paroi de la bactérie). Mais le plus fréquemment, il s'agit d'enzymes détruisant les β -lactamines, les β -lactamases (Vora et Auckenthaler, 2009).

- Diminution de la perméabilité

La pénétration des β -lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe s'effectue à travers les porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau. Ainsi, la sensibilité aux β -lactamines dépend du nombre de porines fonctionnelles. L'altération des porines par mutation est à l'origine de résistances acquises aux β -lactamines, soit par une modification structurale d'une porine essentielle, ce qui a été décrit chez *E. coli*, soit par une diminution quantitative des porines, qui est la situation la plus fréquente (**Kumar et Schweizer, 2005**). Différents isolats cliniques d'*E. coli* caractérisés par une altération ou expression réduite de porines de type OmpC et/ou OmpF ont démontré une susceptibilité réduite aux β -lactamines (**Harder et al, 1981**).

- Hyperproduction de système d'efflux

Les systèmes d'efflux sont constitués de protéines particulières, jouant le rôle de pompes utilisant une force protons motrice pour expulser l'antibiotique dès qu'il apparaît dans la bactérie. Des mutations dans les régions régulatrices des opérons des systèmes d'efflux multi-drogues peuvent conduire à une surexpression des systèmes d'efflux constitutifs associée ou non à une perte des porines, et conférer une multi résistance aux antibiotiques. Ainsi, la mutation des gènes *marRAB* d'*Escherichia coli* entraîne une résistance aux quinolones, au chloramphénicol et aux tétracyclines (**Pool, 2004**).

- Modification de la cible

Plusieurs facteurs peuvent concourir à la résistance par modification de la cible : perte d'affinité des PLP pour les β -lactamines par mutation, acquisition de gènes ou fragments de gènes codant pour des PLP d'affinité diminuée ou hyperproduction de PLP normales. Ce type de mécanisme de résistance reste très rare chez *E.coli* (**Nikaido, 1994**).

- Production de β -lactamases

Les β -lactamases ont été identifiées en 1940 par Abraham et Chain, qui ont mis en évidence une enzyme capable d'empêcher l'action de la pénicilline chez *E. coli* ; ils la nommèrent pénicillinase (**Abraham et Chain, 1940**). Les β -lactamases sont des enzymes capables d'ouvrir le cycle β -lactame en créant un intermédiaire acylenzyme instable, menant au final à la perte d'un groupement carboxyle (**Ruppé, 2010**).

Selon La classification structurale d'Ambler on distingue quatre classes :

- La classe A correspond aux « pénicillines » inhibées par l'acide clavulanique ;
- La classe B correspond aux carbapénèmes inhibées par l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) ;
- La classe C regroupe les « céphalosporines » non inhibées par l'acide clavulanique ;
- La classe D correspond aux oxacillines de sensibilité variable à l'acide clavulanique.

Les enzymes des classes A, C et D sont des serine-enzymes. En revanche, les enzymes de la classe B sont des métallo- β -lactamases comportant deux atomes de zinc dans leur site actif (**Ambler, 1980**).

- Hyperproduction de céphalosporinase chromosomique de classe C :

E.coli produit à très bas niveau une céphalosporinase chromosomique naturelle non inductible de type AmpC, qui peut entraîner chez certaines souches une réduction de la sensibilité aux aminopénicillines, à leur association au clavulanate et/ou aux céphalosporines de première génération. La régulation de l'expression de β -lactamase AmpC chez cette espèce, diffère considérablement de celle chez les autres entérobactéries productrices naturellement d'une AmpC inductible. Cette différence est due à l'absence du gène régulateur *ampR* et à la présence d'un atténuateur transcriptionnel diminuant ainsi la force du promoteur. Les souches sauvages restent donc le plus souvent sensibles à l'ensemble des β -lactamines. Cependant, l'hyperproduction d'enzyme AmpC provoque une résistance à diverses β -lactamines dont la ticarcilline, la pipéracilline, les céphamycines, les céphalosporines de troisième génération, l'aztréonam et aux combinaisons des pénicillines avec les inhibiteurs de β -lactamases. Le mércilline, les céphalosporines de quatrième génération (céfépime, cefpirome) et les carbapénèmes gardent leur activité sur les souches produisant ces enzymes (**Ayad, 2016**).

- β -lactamase à spectre élargi

Dans les dernières décennies, de nombreuses études ont montré l'augmentation, de par le monde, des infections à *E. coli* productrices de β -lactamases à spectre élargi (BLSE). Ces

enzymes sont définies comme des β -lactamases appartenant à la classe A ou D de la classification d'Ambler, capables d'hydrolyser les pénicillines, les céphalosporines de 1ère, 2ème, 3ème et 4ème génération et les monobactames. Par contre, les céphamycines (céfoxitine, céfotétan et latamoxef) et les carbapénèmes restent actifs. Les BLSE sont inhibées par les inhibiteurs de β -lactamases. En effet, Pour les souches productrices de BLSE, il en résulte une synergie remarquée entre les C3G inactivées et l'acide clavulanique, ce qui est à la base du test de synergie utilisé pour leur détection (Ayad, 2016).

Plusieurs variantes de BLSE existent, les plus fréquentes étant le type TEM (isole à partir d'une souche d'*E.coli* chez un patient nommé Temoneira), SHV(pour Sulfhydryl variable) et CTX-M (pour cefotaxime--Munich).Les souches productrices de BLSE sont souvent multi résistantes à d'autres familles d'antibiotiques (Rodriguez et al,2008 ;Tumbarello et al,2010). Contrairement aux enzymes de types SHV et TEM qui résultent de mutations dans le site actif, les enzymes de type CTX-M sont un exemple de résistance obtenue par l'acquisition d'un gène normalement retrouvé dans le chromosome du genre *Kluyvera*, un micro-organisme issue de la flore normale. À ce jour, plus de 130 enzymes de type CTX-M ont été décrites depuis la première description en 1989 (Cantón et al, 2012). Le gène *bla*CTX-M a été retrouvé chez de nombreuses entérobactéries et tout particulièrement chez *Escherichia coli* (Rogers et al, 2011).

- Carbapénémases

La première description d'une carbapénémase produite par des entérobactéries (NmcA) a été rapportée en 1993. Depuis, plusieurs carbapénémases ont été identifiées appartenant à trois classes moléculaires d'Ambler : les classes A, B et D.

Les carbapénémases de classe A confèrent une résistance à toutes les β -lactamines. Elles sont peu inhibées par l'acide clavulanique. Chez *E. coli* les carbapénémases de classe A restent rares. Ils n'ont pas encore été rapportés dans les pays d'Afrique du Nord et sont rarement détectés dans les pays de la Méditerranée (Ayad, 2016).

Les carbapénémases de classe B : les enzymes de type VIM (Verona Integron encoded Metallo- β -lactamase) et IMP(Imipénémase) qui représentent la majorité des carbapénémases de classe B ont été rejointes en 2008 par une nouvelle enzyme appelée NDM-1 (New Delhi metallo- β -lactamase 1) (Dubois et al, 2012). Pour *E. coli*, quelques études ont rapporté la présence des enzymes de type VIM chez des souches cliniques isolées dans les pays de la méditerranée et une seule étude effectuée au Maroc a signalé la présence de variant IMP-1 chez une souche d'*E. coli* uropathogène (Ayad, 2016).

NDM-1 (*New Delhi metallo- β -lactamase 1*), identifiée en 2008, est une nouvelle zinc-métallo- β -lactamase identifiée dans une souche de *K. pneumoniae* et dans une souche d'*E. coli* provenant respectivement d'un prélèvement urinaire et rectal chez un patient suédois rapatrié après un séjour dans un hôpital de New Delhi (**Yong et al, 2009**). Depuis cette découverte, plus de 268 publications ont signalé la diffusion de cette enzyme chez *E. coli* dans plusieurs pays à travers le monde (**Berrazeg et al, 2014**).

Les β -lactamases de Classe D, nommées également OXA pour oxacillinase, ont été signalées chez *P. aeruginosa*. Par la suite, ces carbapénémases ont été détectées chez de nombreuses autres bactéries à Gram négatif, y compris les entérobactéries. Parmi ces enzymes, OXA-48 représente la carbapénémase la plus répandue chez *E. coli* dans la méditerranée. Elle a été détectée en France, en Italie, en Turquie, au Maroc, en Egypte et plus récemment en Algérie (**Ayad, 2016**).

5.2.2. Mécanismes de résistance aux aminosides

Les mécanismes généraux de résistance aux aminosides sont :

- Altération de la cible

Le mode d'action des aminosides laisse présager la mutation de l'ARN 16S comme moyen de résistance. Trois activités de méthylation de l'ARN 16S modifient le site A aux positions G1405 (N7), A1408 et C1407 (N5) (**Beauclerk, 1981**).

- Modification enzymatique de l'antibiotique

Lorsqu'un aminoside est modifié par des enzymes bactériennes sa fixation sur l'ARN 16S peut être affectée et se traduire par la perte de son activité. Les enzymes modificatrices des aminosides sont le mécanisme de résistance le plus courant chez les bactéries Gram négatif et positif. Elles ont été regroupées en fonction de la réaction qu'elles catalysent (**Ramirez, 2010**):

- Acétylation d'un groupement aminé [N- acétyltransférase (AAC)].
- Phosphorylation d'un groupement hydroxyle [O- phosphotransférase (APH)].
- Nucléotidylation d'un groupement hydroxyle [O-nucléotidyltransférase (ANT)].

- Piégeage de l'antibiotique

Une enzyme modificatrice peut parfois neutraliser l'action d'un aminoside par une liaison affine sans pour autant modifier sa structure. Le piégeage de l'antibiotique a été proposé comme mécanisme responsable du phénotype de résistance à la kanamycine et à la Tobramycine alors que la gentamicine et la Nétilmycine restent actives. Lorsque la bactérie produit une grande quantité de la phosphotransférase qui reconnaît la Tobramycine sans la modifier celle-ci peut être piégée dans un complexe enzyme-substrat fonctionnellement inactif (**Menard et al, 1993**).

- Imperméabilité ou exportation de l'antibiotique

L'accès de l'aminoside à sa cible met enjeu différentes étapes. Compte tenu de leur caractère hydrophile les aminosides pénètrent la membrane externe des bactéries à Gram négatif par les porines (**Hancock, 1991**). Le passage par la voie lipophile est associé à leur caractéristique polycationique par substitution avec le calcium ou le magnésium de la membrane externe. La deuxième étape consiste en la traversée de la membrane cytoplasmique hydrophobe et requiert l'énergie de la force proton motrice produite par la chaîne respiratoire (**David, 1987**).

5.2.3. Mécanismes de résistance aux quinolones

Deux principaux mécanismes de résistance aux quinolones chez *E.coli* s'exercent séparément ou en combinaison et confèrent des niveaux de résistance variables.

- la résistance par mutation chromosomique qui est due, soit à la diminution d'affinité des cibles intracellulaires qui sont les complexes ADN-ADN gyrase et ADN-ADN topoisomérase IV, soit à la diminution d'accumulation intracellulaire de l'antibiotique, par défaut de pénétration passive et/ou excrétion active (**Lewin et al, 1991**). La perte d'affinité pour la cible provient de modification structurale dans une région appelée la QRDR (*Quinolone Resistance Determining Region*), où sont trouvées la majorité des mutations responsables de la résistance aux fluoroquinolones.
- la résistance plasmidique est due à la protection de l'ADN gyrase de la fixation des quinolones. Cette résistance est décrite pour la première fois en 1998 aux USA chez une souche de *K. pneumoniae* hébergeant un plasmide portant le gène *qnrA* qui code pour une protéine Qnr A (**Jacoby et al, 2003**).

Depuis la résistance plasmidique aux quinolones a été rapportée, les gènes *qnr* ont été identifiés chez différentes espèces d'entérobactéries dans le monde entier et sont souvent associés à la production de β -lactamases à spectre élargi. Six déterminants *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC*, *qnrD* et *qnrVC* ainsi que différents variants des protéines QnrA, QnrB, QnrS, QnrD et QnrVC ont été identifiés. Chez *E. coli*, les variants QnrA, QnrB, QnrS et QnrD ont été décrits à travers le monde (Ayad, 2016).

Un autre mécanisme de résistance plasmidique aux quinolones a été décrit chez des souches d'*E. coli* isolées en Chine. Il s'agit de l'inactivation des quinolones par l'acétyltransférase aac (6')-Ib-cr (Robicsek et al, 2006), ce variant confère la résistance simultanée aux fluoroquinolones et aux aminosides.

***Matériels et
méthodes***

1. Lieu et durée de l'étude

Cette étude a été réalisée au laboratoire de bactériologie du Centre Hospitalo-Universitaire Ben Badis de Constantine. Ce travail a duré un mois (du 01 au 31 Mars).

2. Matériel

2.1. Souches étudiées

Dans notre travail nous avons étudié cinq souches d'*Escherichia coli* isolées à partir des échantillons urinaires des patients qui ont subi une infection urinaire au niveau des services du CHU de Constantine.

- **Souches des références**

ATCC 25922: *Escherichia coli*.

2.2. Matériel utilisé

- Microscope optique.
- Bec bunsen.
- Pipettes pasteur.
- Anse de platine.
- Boîtes de pétri.
- Lames et lamelles.
- Etuve.
- Distributeurs d'antibiotiques.
- Ecouvillon.

2.3. Milieux de cultures

2.3.1. Milieux solides

- Gélose nutritive.
- Hektoen.
- Mueller Hinton.

2.3.2. Milieux d'identification biochimiques et métaboliques

- Milieu TSI.
- Milieu Mannitol mobilité.
- Milieu Citrate de Simmons.
- Milieu Liquide Urée-Indole.

2.4. Antibiogramme

2.4.1. Disques d'antibiotiques

• β -lactamines

Amoxicilline (AML), Ticarcilline (TIC), Pipéracilline (PRL), Céfazoline (KZ), Céfoxitine (FOX), Céfotaxime (CTX), Ertapénème (ETP), Aztréonam (ATM), Imipénème (IPM).

• Aminosides

Gentamycine (GM), Nétilmycine (NET).

• Quinolones

Acide nalidixique (NA), Péfloxacine (PEF).

• Autres

Colistine (CT), Sulfamethoxazole-Trimetoprim (SXT), Nitrofurantoïne (NIT), Fosfomycine (FOT), Tetraminocycline (MH).

3. Méthodes

3.1. Prélèvement

Le prélèvement correspondait aux urines ; isolées essentiellement dans le laboratoire de bactériologie du CHU de Constantine.

3.2. Ensemencement

On procède directement à une recherche de germes et cela en déchargeant en stries condensées l'écouvillon de prélèvement sur toute la surface de la boîte gélosée par la gélose Hektoen pour l'isolement des entérobactéries.

3.3. Isolement et purification

Après une lecture morphologique, les différentes colonies obtenues sont ré-isolées sur le même milieu afin d'obtenir des souches pures.

3.4. Techniques utilisées pour l'identification des bactéries

L'identification des souches a porté sur une série de tests préliminaires (examen macroscopique et examen microscopique), tests biochimiques et un antibiogramme.

3.4.1. Tests préliminaires

- Examen macroscopique

Cet examen sert à orienter le diagnostic, il consiste en une observation des colonies en mentionnant l'aspect des colonies, la couleur, la forme, la consistance, l'odeur et diamètre de ces dernières.

- Examen microscopique : Coloration de Gram

C'est la coloration de base en bactériologie et permet de rechercher l'affinité tinctoriale des bactéries leurs morphologies et leurs modes de regroupement. Elle permet une classification des bactéries selon leur structure. Les étapes de coloration de Gram sont détaillées dans l'**Annexe 2**. 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.

3.4.2. Galerie classique

L'identification des souches est réalisée par l'étude de plusieurs tests biochimiques et métaboliques, les différents tests utilisés sont représentés dans les **tableaux 3, 4, 5, 6**.

- Préparation de l'inoculum

Une colonie bactérienne est prélevée, à partir d'une culture jeune de 18-24 h, et est transférées dans l'eau physiologique stérile. Bien homogénéiser la suspension bactérienne.

- Inoculation de la galerie

A l'aide d'une pipette pasteur, les tubes sont inoculés par la suspension bactérienne déjà préparés en évitant d'introduire les bulles d'air.



Figure 9 : Galerie biochimique d'*E.coli* (Témoin).

Tableau 3 : Test TSI (Abed et Essayd, 2015).

Principe	Mode d'ensemencement	Résultat
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 H ₂ S.	-Ensemencement de culot par piqure centrale et la pente par des stries serrées à l'aide de la pipette pasteur. -Mettre à l'étuve à 37C° pendant 24h.	- 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 H ₂ S se traduit par noircissement du milieu.

Tableau 4: Utilisation de mannitol et test de mobilité (Abed et Essayd, 2015).

Principe	Mode d'ensemencement	Résultat
Le mannitol-mobilité est un milieu semi solide qui permet l'étude de la dégradation du mannitol, et la mobilité. Ce milieu est utilisé seulement pour les bactéries fermentatives.	Ensemencement par piqure centrale à l'aide d'une pipette pasteur, incubation à 37C° pendant 24 h.	-Le virage du milieu rouge au jaune signifie la fermentation du mannitol. -L'observation d'une culture dans tout le tube signifie que les bactéries ont diffusé dans tout le milieu (mobilité +). -Lorsqu'il y a culture uniquement au niveau de la piqure centrale (mobilité-).

Tableau 5 : Recherche de l'utilisation de citrate (Abed et Essayd, 2015).

Principe	Mode d'ensemencement	Résultat
<p>Le milieu citrate de sodium (simmons) est un milieu solide qui permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate comme seule source de carbone et d'énergie, ce caractère est intéressant pour discriminer les bactéries entre-elles ainsi de les identifier.</p>	<p>-Ensemencement par des stries le long de la pente à l'aide de la pipette pasteur. -Mettre à l'étuve 24h à 37C°.</p>	<p>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 un citrate perméase (citrate+).</p>

Tableau 6 : Recherche de l'uréase et l'indole(Abed et Essayd, 2015).

Principe	Mode d'ensemencement	Résultat
<p>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 :</p> <p>- 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.</p> <p>- L'indole Après addition du réactif de Kovaks, le diméthyl-amino4benzaldehyde contenu dans le réactif de Kovaks réagit avec l'indole, produit l'activité du tryptophanase et forme un composé coloré en rouge.</p>	<p>Ce milieu est inoculé avec quelques gouttes de la suspension bactérienne, incubation à 37C° pendant 24 h. après incubation nous l'avons ajouté 2à 3 gouttes de réactifs de kovaks.la lecture est immédiate.</p>	<p>- 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.</p> <p>- L'indole Formation d'un anneau rouge : indole (+). Absence de coloration rouge : indole (-).</p>

3.5. Antibiogramme

Nous avons testé la sensibilité des souches d'*E.coli* (EC₁, EC₂, EC₃, EC₄, EC₅) identifiées vis-à-vis de différents antibiotiques par la méthode de diffusion en milieu gélosé Mueller-Hinton (MH) qui consiste à tester les antibiotiques selon les recommandations de CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institut, 2014) (voir annexe 3).

- **Milieu**

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

- **Inoculum**

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 les transférer dans un écouvillon contenant 2.5 ml d'eau physiologique stérile. Bien homogénéiser la suspension bactérienne.

- **Ensemencement**

L'écouvillon est trempé dans l'inoculum, le sortir du tube en l'essorant doucement sur les parois internes 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 répétée 3 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.

- **Application des antibiotiques**

Les disques d'antibiotiques à tester (AML, TIC, PRL, KZ, FOX, CTX, ETP, ATM, IPM, GM, NET, NA, PEF, CIP, CT, SXT, NIT, FOT, MH) sont déposés à l'aide du distributeur d'antibiotiques, 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 37C° pendant 18 à 24 heures ; en position renversée.

• Lecture et interprétation

La lecture se fait par mesure du diamètre de la zone d'inhibition obtenu autour des disques d'antibiotiques à l'aide d'une règle. L'interprétation en sensible (S) ou résistante (R) est effectuée selon les critères définis par les recommandations du CLSI.

3.6. Test de détection des BLSEs (Test de synergie)

Le test de synergie permet la détection de BLSE chez une souche donnée. Ces enzymes peuvent être mises en évidence par la méthode des disques, qui consiste à rechercher une image de synergie entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de β -lactamase et les disques de céphalosporines de troisième génération (CTX, CAZ et FEP) et ATM. Cette image dite en "bouchon de champagne".

• Technique

La recherche de β -lactamase à spectre élargi est fait dans les conditions standard de l'antibiogramme, puis en disposant les disques d'ATB: un disque d'Amoxicilline + acide clavulanique (AMC 30 μ g) et les disques de C3G (CTX 30 μ g, FEP 30 μ g, CAZ 30 μ g) et l'aztréonam (ATM 30 μ g) à une distance de 20 à 30 mm sur les boîtes de Pétri (**figure10**). Incubation pendant 18-24 heures à 37C° \pm 1C°.

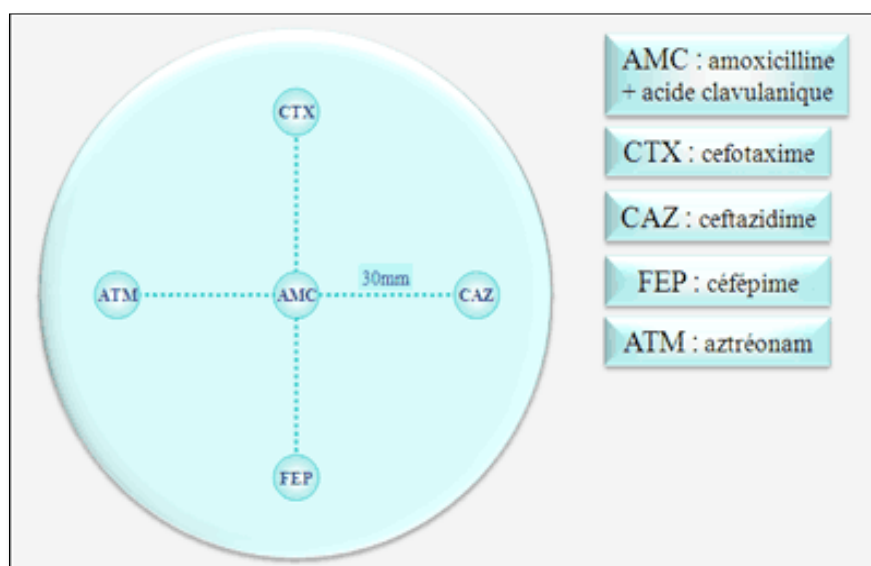


Figure10 : Disposition des disques d'antibiotiques pour le test de synergie [1].

- **Lecture**

La production des enzymes BLSE se traduit par l'apparition d'une image de synergie ou bouchon de champagne entre les disques d'AMC et les C3G.

*Résultats et
Discussion*

1. Résultats

1.1. Examen macroscopique

Le résultat de l'examen macroscopique montre que :

- Sur milieu GN

Escherichia coli apparaît en colonies de 2-3 mm de diamètre non pigmentées, brillantes, opaques, blanchâtres et bien rondes à surface lisses plus un point ombiliqué central.



Figure11 : Aspect d'*Escherichia coli* 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 *Escherichia coli* est lactose positif.



Figure12 : Aspect d'*Escherichia coli* sur Hektoen.

1.2. Examen microscopique

- Coloration de Gram

Les résultats obtenus par observation microscopique après coloration de Gram, montre que *Escherichia coli* se présente sous forme de bacilles ou diplobacilles et parfois en amas colorés en rose.

Donc *Escherichia coli* est un bacille à Gram négatif.

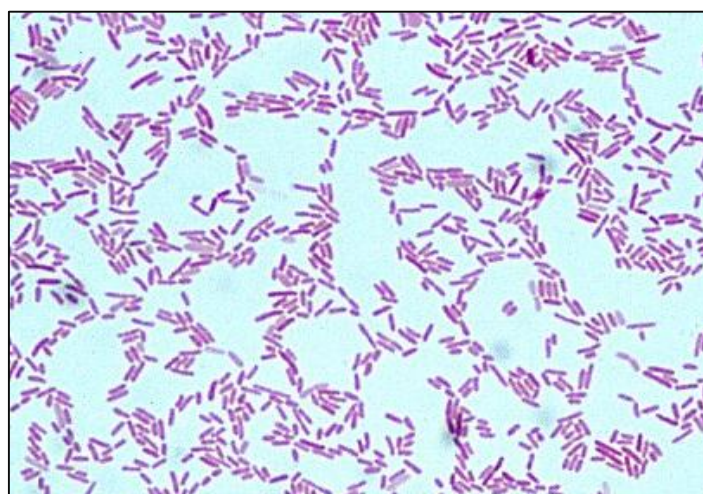


Figure13 : Bacilles Gram négatif (coloration de Gram) [2].

1.3. Galerie classique

- **Milieu TSI**

Après l'incubation, on a remarqué que pour les cinq souches d'*Escherichia coli* étudiées 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, parfois décollement de la gélose et absence de noircissement.

Donc les cinq souches sont: lactose et saccharose(+), glucose (+), gaz(+), H₂S(-).

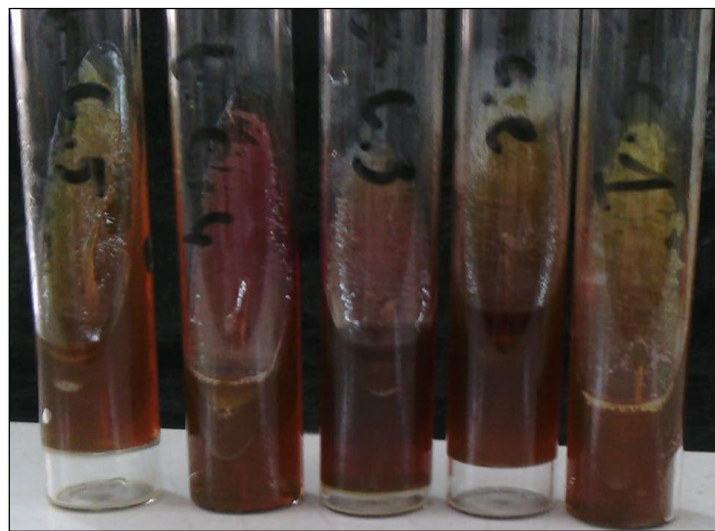


Figure14 : Aspect du milieu TSI (test positif).

- **Utilisation de mannitol et test de mobilité**

Les résultats qu'on a obtenus montrent que pour les cinq souches d'*Escherichia coli* il y a eu une acidification du milieu, d'où le virage du rouge de phénol au jaune.

Donc les cinq souches sont mannitol(+).

En ce qui concerne la mobilité, les bactéries ont diffusé à partir de la ligne verticale d'ensemencement en créant un trouble, ce qui montre qu'*Escherichia coli* est mobile.

Donc on note mobilité (+).

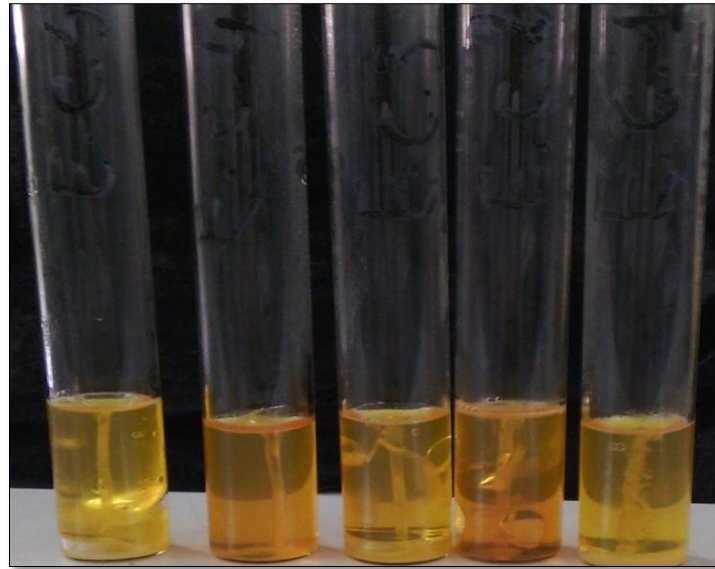


Figure15 : Aspect du milieu mannitol-mobilité (test positif).

- **Recherche de l'utilisation de citrate**

Après 24h d'incubation on n'a pas observé un virage de couleur du vert au bleu, ce qui signifie qu'y a pas eu une alcalinisation du milieu et que les bactéries n'ont pas utilisé le citrate comme seule source de carbone et d'énergie.

Donc *Escherichia coli* ne possède pas une citrate perméase et est dite citrate (-).

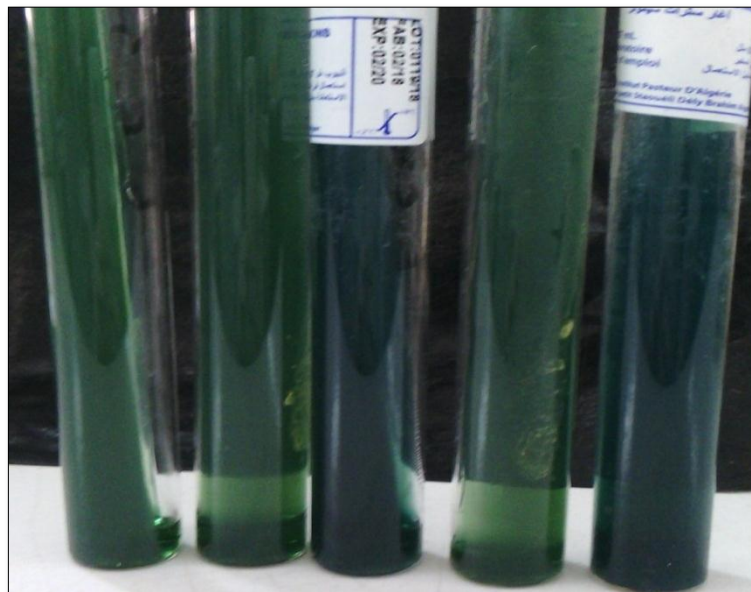


Figure16 : Aspect du milieu citrate de Simmons (test négatif).

- Recherche de l'uréase et l'indole

- L'hydrolyse de l'urée

Pour les cinq souches d'*Escherichia coli* on n'a pas remarqué un virage de la couleur orange vers le rose violet, ce que signifie qu'il n'a pas eu une alcalinisation du milieu et que les bactéries ne possèdent pas une uréase.

Donc *Escherichia coli* est uréase (-).

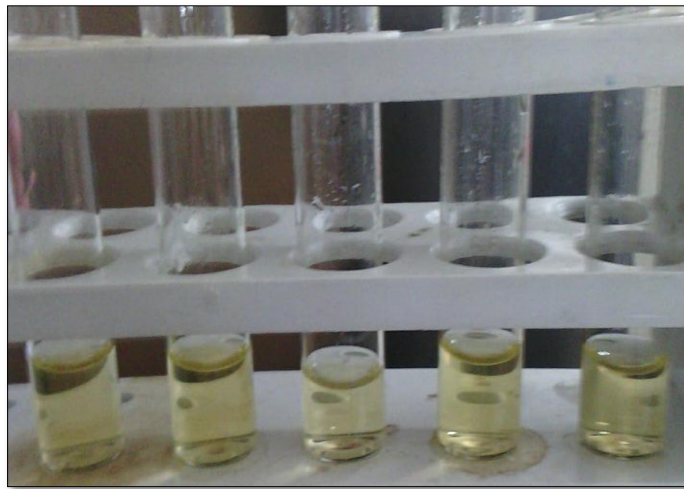


Figure17 : Aspect du milieu urée-indole (uréase négative).

- L'indole

Après addition du réactif de covaks (après incubation), on a remarqué l'apparition d'un anneau rouge dans les cinq tubes.

Donc *Escherichia coli* est indole (+).



Figure18 : Aspect du test indole positif

1.4. Résistance d'*Escherichia coli* aux antibiotiques

Les résultats des souches EC₁, EC₂, EC₃, EC₄ et EC₅. Après incubation, il a été réalisé, pour chaque antibiotique, la mesure de diamètre de la zone d'inhibition de croissance bactérienne autour des disques à l'aide d'une règle appliquée le plus près possible de la surface de gélose.

Le diamètre mesuré est comparé à des diamètres critiques selon les recommandations du CLSI :

-Si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur au diamètre critique : la souche est dite **sensible** « **S** ».

-Si le diamètre de la zone d'inhibition est inférieur au diamètre critique : la souche est dite **résistante** « **R** ».

➤ Profil de la résistance des cinq souches d'*Escherichia coli* aux antibiotiques

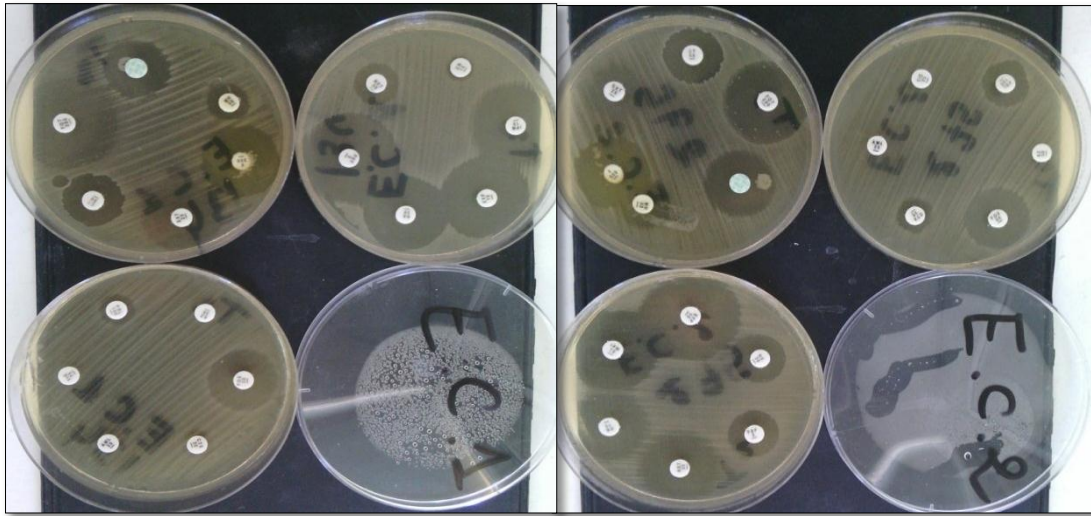


Figure19 : Antibiogramme de la souche EC₁ et EC₂.

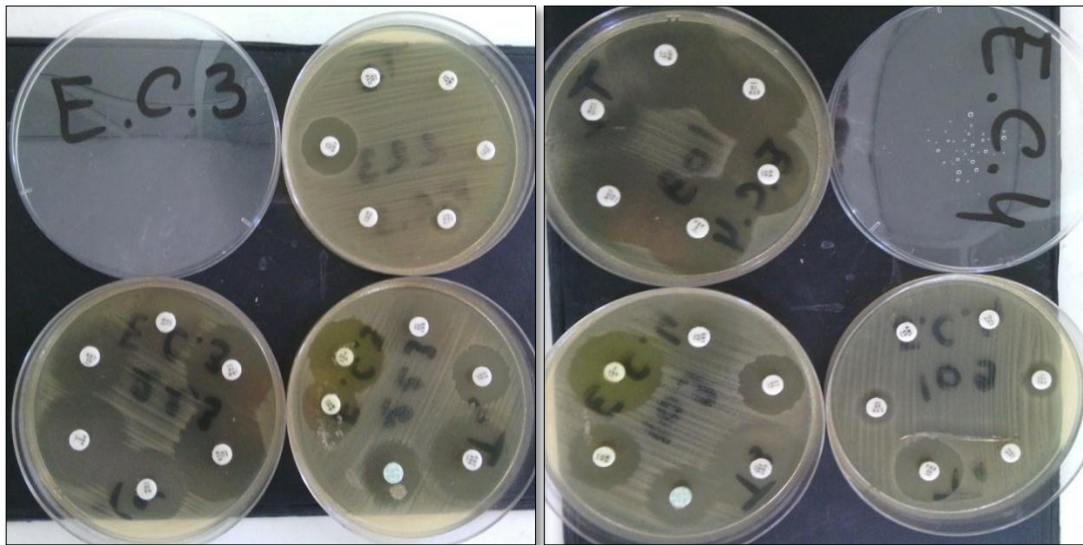


Figure20 : Antibiogramme de la souche EC₃ et EC₄.

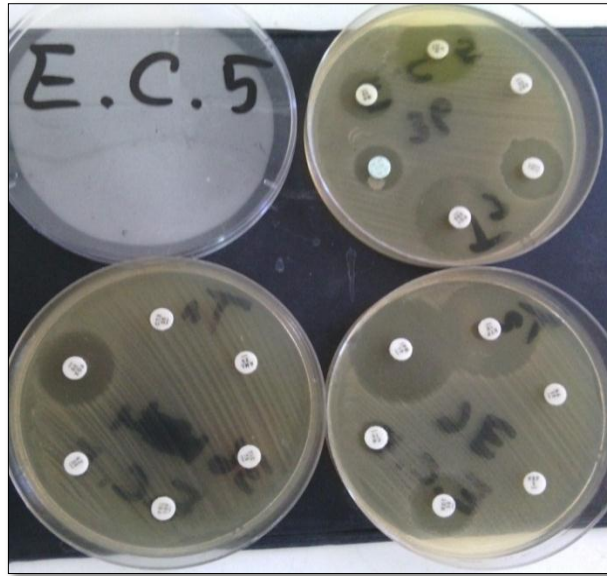


Figure21 : Antibiogramme de la souche EC₅.

Tableau 7 : Le profil de résistance/sensibilité des souches d'*E.coli*.

Antibiotiques	Phénotypes				
	EC ₁	EC ₂	EC ₃	EC ₄	EC ₅
β-lactamines					
Amoxicilline	R	R	R	R	R
Ticarcilline	R	R	R	R	R
Pipéracilline	R	R	R	R	R
Céfazoline	R	R	R	R	R
Céfoxitine	S	S	S	S	S
Céfotaxime	R	R	R	R	R
Ertapénème	S	S	S	S	S
Aztréonam	R	R	R	R	R
Imipénème	S	S	S	S	S
Aminosides					
Gentamycine	R	S	S	S	R
Nétilmycine	R	S	S	S	R
Quinolones					
Acide nalidixique	S	R	S	S	R
Péfloxacine	S	R	S	S	R
Autres					
Colistine	S	S	S	S	S
Sulfamethoxazole-Trimetoprim	S	S	S	S	R
Nitrofurantoïne	S	S	S	S	S
Fosfomycine	S	S	S	S	S
Tetraminocycline	R	R	S	S	R

Dans cette étude cinq souches d'*E.coli* sont testées. D'après les résultats trouvés nous remarquons une résistance à l'Amoxicilline, la Ticarcilline, la Pipéracilline, la Céfazoline, la Céfotaxime, et l'Aztréonam. Cependant on note une sensibilité à la Céfoxitine, l'Imipénème, et l'Erapénème.

Concernant la résistance aux aminosides, EC₁ et EC₅ présentent le phénotype résistant aux aminosides. Par contre EC₂, EC₃, EC₄ présentent le phénotype sensible.

La résistance aux quinolones est identifiée avec EC₂, EC₅ souches résistantes à l'acide nalidixique et la pefloxacine et EC₁, EC₃, EC₄ souches sensibles à toutes les quinolones.

Dans le cas des autres antibiotiques, nous avons noté une sensibilité à la Colistine, la Fosfomycine, la Tetraminocycline, la Nitrofurantoïne, et la Sulfaméthoxazole-Triméthoprim.

1.5. Test de détection de BLSE (Test de synergie)

La recherche du phénotype BLSE est réalisée sur l'antibiogramme selon la technique décrite précédemment. Ceci permet de mettre en évidence (après incubation de 24h à 37C°) une augmentation très nette du diamètre d'inhibition des disques contenant les C3G en regard du disque contenant l'acide clavulanique/Amoxicilline, prenant ainsi la forme d'un « bouchon de champagne » pour les souches productrices de BLSE.

D'après notre étude, nous avons remarqué dans les cinq boîtes de pétri une augmentation de la zone d'inhibition des disques contenant les céphalosporines (Céfotaxime, Céfépime, Céfotaxidime), en direction du disque porteur d'acide clavulanique. En d'autres termes, une augmentation de la zone d'inhibition obtenue pour les céphalosporines en présence d'acide clavulanique, par rapport à la zone d'inhibition d'une céphalosporine seule, ce qui indique la présence d'une BLSE. Donc les cinq souches testées d'*E.coli* sont productrices de β -lactamase à spectre élargi.



Figure 22 : Test de synergie positif des souches EC₁, EC₂, EC₃, EC₄.

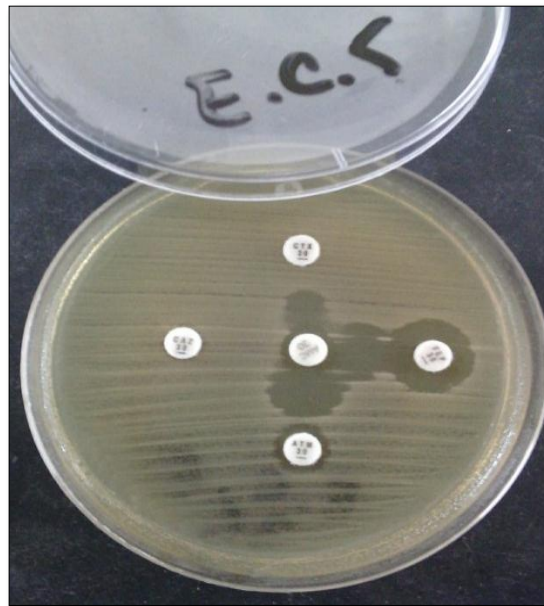


Figure 23 : Test de synergie positif de la souche EC₅.

2. Discussion

Les cinq souches d'*E.coli* isolées à partir des urines ont été identifiées sur la base de leurs caractères morphologiques, biochimiques, et leur résistance aux antibiotiques.

Enfin, un test de synergie a été réalisé pour la révélation de la présence de β -lactamase à spectre élargi, et la détection des souches multi résistantes d'*E.coli* productrices de BLSE.

2.1. Résultat de l'étude macroscopique et microscopique

Les cinq souches d'*E.coli* 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, très rarement rencontrées en amas colorées en rose mobiles.

On a constaté aussi que *E.coli* se présente sous forme de colonies lactose positif sur milieu lactosé. Ces résultats sont compatibles avec ceux mentionnés par Avril et al, 2000 ; Mendaci et Mihoubi, 2015.

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).

➤ Test TSI

Le milieu TSI (Triple Sugar Iron) permet l'identification des entérobactéries par la mise en évidence rapide de fermentation du lactose, du glucose (avec ou sans production de gaz), du saccharose et de la production de sulfure d'hydrogène (H₂S).

Au cours de notre étude, nous avons trouvé que les souches d'*E.coli* : EC₁, EC₂, EC₃, EC₄, EC₅ fermentent le lactose, le saccharose, le glucose avec production de gaz, et sans production de l'H₂S. Ces résultats sont en accord avec ceux de Delarras, 2007 ; Meziani, 2012 ; Mendaci et Mihoubi, 2015.

➤ **Utilisation de mannitol et test de mobilité**

La fermentation du mannitol se traduit par une acidification du milieu qui sera mise en évidence par le virage de l'indicateur coloré de pH (le rouge de phénol).

D'après notre étude, les résultats obtenus montrent que les cinq souches d'*E.coli* 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 cinq souches d'*E.coli*. Ces résultats sont en parfait d'accord avec ceux décrits par Meziani, 2012 ; Mendaci et Mihoubi, 2015.

➤ **Utilisation du citrate**

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 n'a pas été constaté pour les cinq souches d'*Escherichia coli* donc elles sont dépourvues de citrate perméase et par conséquent elles sont incapables 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.

➤ **Production de l'uréase et de l'indole**

▪ **L'uréase**

En présence de l'enzyme de l'uréase, l'urée est transformé en carbonate d'ammonium et il en résulte une alcalinisation du milieu.

Les souches EC₁, EC₂, EC₃, EC₄, EC₅ étudiées ont donné une réaction négative avec le test de l'uréase. Cela s'explique par l'absence de l'enzyme de l'uréase chez *Escherichia coli*.

Les résultats obtenu du test uréase avec les cinq souches sont vérifiés par ceux noté par Meziani, 2012; Mendaci et Mihoubi, 2015.

▪ **L'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 contenu dans le réactif de Kovaks et forme un anneau rouge.

D'après notre étude, les cinq souches d'*E.coli* ont donné une réaction positive avec le test indole. Ces résultats sont en conformité avec ceux de Meziani, 2012.

2.3. Résistance d'*Escherichia coli* aux antibiotiques

Comme nous l'avons mentionné précédemment, chaque souche identifiée a été soumise à un antibiogramme afin de déterminer la sensibilité et la résistance aux différents antibiotiques. L'étude de la sensibilité des antibiotiques a montré des résistances importantes des cinq souches d'*E.coli* à l'ensemble des antibiotiques testés.

L'Amoxicilline et l'augmentin sont les molécules les plus utilisées dans les infections causées par *E.coli*. La sensibilité de cette bactérie à ces antibiotiques a beaucoup diminué. Notre étude confirme cette observation car les cinq souches testées sont résistantes à l'amoxicilline. Ce résultat est comparable avec celui rapporté par Rakotovao et al, 2017. Cette résistance à l'amoxicilline justifie que les aminopénicillines ne soient plus actuellement recommandées en traitement probabiliste des infections urinaires (El Bouamri et al, 2014).

Concernant le phénotype de résistance aux β -lactamines, le mécanisme essentiel est de nature enzymatique par production de β -lactamase. Selon Ayad, 2016 ; les β -lactamases à spectre élargi sont des enzymes capable d'hydrolyser les pénicillines, les céphalosporines de 1ère, 2ème, 3ème, 4ème génération et les monobactames. Par contre, les céphamycines (Céfoxitine) et les carbapénèmes restent actifs.

D'après notre étude, les résultats obtenus montrent que les cinq souches testées d'*E.coli* sont résistantes à l'ensemble des pénicillines (Amoxicilline, Ticarcilline, Pipéracilline), les céphalosporines de 1ère génération (Céfazoline), 3ème génération (Céfotaxime), et les monobactames (Aztréonam). Par contre sont sensibles aux céphamycines (Céfoxitine), et les carbapénèmes (Imipénème, Ertapénème). Donc les cinq souches testées sont productrices de β -lactamases à spectre élargi qui inactivent les β -

lactamines par hydrolyse du noyau β -lactame. Djerfi et al, 2013 et Rakotovao et al, 2017 ont montré également cette résistance aux β -lactamines ce qui est en adéquation avec nos résultats.

Concernant les phénotypes de résistance aux aminosides, le mécanisme relève essentiellement de l'acquisition d'enzymes modificatrices. Ces enzymes appartiennent à 3 classes correspondant à des activités de phosphorylation, acétylation et nucléotidylation. En effet, l'émergence actuelle des méthyltransférases de l'ARN 16S conférant un haut niveau de résistance à tous les aminosides utilisés en pratique est un phénomène préoccupant qui nécessite un suivi épidémiologique (Rakotovao et al, 2017).

D'après notre étude les souches EC₁, EC₅ présentent le phénotype résistant aux aminosides (Gentamycine, Nétilmycine). Par contre ces derniers gardent une excellente activité et restent actifs sur les souches EC₂, EC₃, EC₄. Les résultats obtenus par les souches EC₁ et EC₅ sont conformes à ceux rapportés par Rakotovao et al, 2017. Tandis que les résultats obtenus par EC₂, EC₃, EC₄ présentent une discordance avec ceux décrits par Rakotovao et al, 2017. Dans la présente étude, les phénotypes résistants aux aminosides doivent être pris en compte.

Concernant le phénotype de résistance aux quinolones (Acide nalidixique, Péfloxacin), les souches EC₁, EC₃, EC₄ sont sensibles à l'ensemble des quinolones. Par contre EC₂ et EC₅ présentent le phénotype résistant, cela peut s'expliquer par l'émergence de mutations de premier niveau de l'ADN gyrase (GyrA) qui confèrent une résistance à l'acide nalidixique chez *E.coli*. La multiplication de telle souche est susceptible de faire le lit de mutations additionnelles à la suite d'une exposition à l'antibiotique et ainsi d'une émergence des résistances aux fluoroquinolones. L'évolution des résistances à l'acide nalidixique et aux fluoroquinolones doit donc être particulièrement surveillée (Ben Haj Kalifa, 2010).

Dans le cas des autres antibiotiques, nous avons noté une bonne sensibilité à la Fosfomycine, la Tetraminocycline, la Nitrofurantoïne. Ces résultats sont parfaitement en accord avec ceux présentés par Zahar et al, 2009.

En ce qui concerne la Colistine et la Sulfaméthoxazole-Triméthoprim les cinq souches testées sont sensibles. Ces résultats sont très proches de ceux présentés par Zahlane et al, 2010.

2.4. Résultat de test de synergie

Généralement la production de BLSE est mise en évidence sur l'antibiogramme par :

- Une sensibilité à l'un ou plusieurs des antibiotiques suivants : Céfotaxime, Céfotazidime, Céfépime, ou aztréonam. Il faut, cependant, noter que le degré de résistance vis-à-vis des C3G peut être très variable d'une BLSE à une autre ; c'est-à-dire pendant que certaines souches BLSE montrent une franche résistance, d'autres se montrent intermédiaires ou même sensibles. Ceci peut être dû en par la qualité de l'inoculum, d'après certains investigateurs
- L'aspect en « bouchon de champagne » dû à un effet synergique entre les disques contenant l'acide clavulanique et les disques de C3G et celui d'aztréonam.

Les souches EC₁, EC₂, EC₃, EC₄, EC₅ étudiées ont donné un résultat positif avec le test de synergie. Cela s'explique par la présence de l'enzyme de β -lactamases à spectre élargi. Ce résultat est conforme avec celui de El Bouamri et al, 2014.

Actuellement, la prévalence de BLSE varie selon les pays et les hôpitaux, mais dans tous les cas, les CTX-M (céfotaximase) sont considérées comme le type de BLSE le plus fréquent au monde (Perez et al. 2007). Donc Nous avons pensé qu'il s'agit de l'enzyme CTX-M cette supposition doit être confirmée par des méthodes moléculaires (PCR, Séquençage).

*Conclusion et
perspectives*

Conclusion et perspectives

La découverte des antibiotiques a constitué un grand pas dans la lutte contre les maladies infectieuses, notamment dans les infections urinaires. C'est ainsi qu'on assiste à l'émergence de bactéries résistantes à un ou plusieurs antibiotiques.

Le présent travail réalisé au laboratoire de bactériologie du CHU de Constantine avait pour objectif d'étudier in vitro le niveau de résistance de la bactérie *Escherichia coli* isolée à partir des échantillons urinaires des patients qui ont subi une infection urinaire, pour cela nous avons réalisé un antibiogramme comme nous avons détecté le phénotype de résistance par un test de synergie.

Notre résultat révèle une résistance des cinq souches testées d'*Escherichia coli* à l'ensemble des β -lactamines à l'exception des céphamycines (Céfoxitine) et des carbapénèmes (Imipénème, Ertapénème), cette résistance est due à une activité enzymatique des β -lactamases à spectre élargi qui rend ces antibiotiques inactifs par l'hydrolyse de leur noyau β -lactame cela se traduit par un résultat positif de test de synergie.

Conscient de leur entrée en milieu hospitalier, les BLSE représentent une nouvelle menace majeure pour la santé publique. Réduisant de manière importante les alternatives thérapeutiques pour le traitement des infections sévères. Pour cela, l'émergence de ces souches permet de rappeler qu'il est évidemment nécessaire d'être attentif aux divers types de souches qui circulent dans nos hôpitaux. La gestion du risque infectieux que représente la diffusion de souches multi-résistantes exige une collaboration étroite entre les différents acteurs de santé concernés (Médecins cliniciens, Infectiologues, Bactériologistes, Hygiénistes, Personnels soignants...).

Enfin, des mesures d'hygiène strictes restent indispensables au sein des services hospitaliers pour limiter la diffusion de ces souches multi-résistantes, on note : L'hygiène des mains, tenue de protection, port de gants, gestion du matériel et des surfaces souillées, circuit du linge, des déchets et des prélèvements biologiques, la détection précoce des porteurs lors de leur admission à l'hôpital et le renforcement des mesures d'hygiène autour des patients porteurs (application des précautions contact).

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

A

Abed, N., Essayd.M (2015). Profil de résistance des bactéries à Gram positif et à Gram négatif isolées au niveau du CHU de Constantine. Mémoire de master. Université des frères Mentouri Constantine. 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22p.

Abraham, E.P and Chain, E. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*, 146, 837.

Achille, R. (2006). Profil antibiotypique des bactéries responsables d'infections urinaires communautaire. Thèse de doctorat. Université de Bamako. 131p.

AFSSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé. (février 2007). Diagnostic et antibiothérapie des infections urinaires bactériennes communautaires du nourrisson et de l'enfant.

Ambler, R.P. (1980). The structure of bêta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 289, 321-31.

Alan, E. (2015). Les infections urinaires communautaires bactériennes : évolution des connaissances de l'équipe officinale et des conseils apportés aux patients. Thèse de doctorat. Université de Lorraine, 151p.

Aril, JL ; Dabernat, H ; Denis, F et Monteil, H. (1988). *La Bactériologie clinique*. 2ème édition section IV. 149 p.

Avril, J.L ; Denis, F ; Dabernat, H et Monteil, H. (2000). *Bactériologie clinique*. 2ème édition Marketing. Paris. 148-280p.

Ayad, A. (2016). Etude de résistance aux antibiotiques chez *Escherichia coli* au niveau des hôpitaux de l'ouest algérien. Thèse de doctorat. Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen. Algérie. 174p.

B

Beauclerk, A and Cundliffe, E. (1987). Sites of action of two ribosomal RNA methylases responsible for resistance to aminoglycosides. *J.Mol.Biol*, 193, 661-671 p.

Ben Haj Khalifa et al. (Avril 2010). Fréquence et résistance aux antibiotiques des bactéries uropathogènes à l'hôpital universitaire Tahar Sfar De Mehdia. *Revue Tunisienne d'Infectiologie*, 4(2), 60p.

Bert, F et Lambert-Zechovsky, N. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* : actualités sur la résistance aux β -lactamines et implications thérapeutiques. *Antibiotiques*, 2, 195-201 p.

Bessard, G. (2004). *Pharmacologie des antibiotiques*. Faculté de médecine de Grenoble.

Université Joseph Fourier[en ligne]. (Page consultée le 1 mars 2018) www-sante.ujfgrenoble.fr/SANTE/pharma/site.fac/diaporama/antibio2.ppt.

Bidet, P et Bingen, E. (2011). Bactériologie Médicale. Elsevier Masson SAS : 2ème édition 331-427 p.

Botto, H. (2003). Infections urinaires nosocomiales de l'adulte. Conférence de consensus 2002. Médecine et maladies infectieuses, 33, 370–375p.

Boutet-Dubois, A ; Pantel, A ; Sotto, A ; Philippe Lavigne, J. (2012). Les entérobactéries productrices de carbapénémases. Lettre d'information du CClin Sud-Est destinée aux Acteurs de la Lutte contre les Infections Nosocomiales & Associées aux Soins.

Bryskier, A. (1999). Antibiotiques Agents Antibactériens et Antifongiques. Paris: Ellipses. 55p.

C

Cantón, R; González-Alba, J.M and Galán, J.G. (2012). CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. Front Microbiol, 3, 110-129.

Cavallo, J ; Fabre, R ; Jehl, F ; Rapp, C ; Garrab, E. (2004). Bêtalactamines. EMC Maladies Infectieuses, 1, 129-202 p.

Chalmers, R; Aird, H et Bolton, FJ. (2000). Waterborne *Escherichia coli* O157. Journal of applied Microbiology, 88, 124-132.

Clarke, S; Haigh, R; Freestone, P et Williams, P. (2003). Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. Clin Microbiol Rev, 16, 365–378.

Colasson, F ; Darracq Paries, Jc et al. (1981). Les risques fœtaux et maternels dans l'infection urinaire gravidique. Rev Fr, 76, 78- 269p.

Croxen, M et Finlay B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Nat Rev Microbiol, 8, 26–38.

D

Daniel, J ; Thirion, G et William, D. (2003). Les infections urinaires. Une approche clinique pharmactuel. 36(5), 246-255p.

Davis, B. D. (1987). Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. Microbiol Rev, 51, 341-350.

Denis, F; Ploy, M.C; Martin, C; et al. (2007). Bactériologie médicale. Paris : Ellipses. 573p.

Dellarras, C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle Sanitaire : Technique et documentation. France : Lavoisier. 462 p.

Djerfi et al. (2013). Isolement et identification d'*Escherichia coli* au niveau des eaux

usées d'Oued Boumerzoug Chaabat Erssas, étude de la résistance aux antibiotiques.

Donnenberg, M. (2002). *Escherichia coli* Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen. Elsevier. 21-26p.

Dublanchet, A et Patey, O. (2011). Phagothérapie, expérience personnelle alternative ou complément à l'antibiothérapie, centre hospitalier intercommunal de Villeneuve St Georges.

E

El Bouamri MC, Arsalane L, Kamouni Y, Yahyaoui H, Bennouar N, Berraha M, et al. (2014). Profil actuel de résistance aux antibiotiques des souches d'*Escherichia coli* uropathogènes et conséquences thérapeutiques. Prog Urol, 24(16), 58–62p.

Ellatif, O. (2011). Place des fluoroquinolones dans le traitement des infections urinaires dans les établissements de santé lorrains. Université Henri Poincaré-Nancy 1.

F

Finer, G et Landau, D. (2004). Pathogenesis of urinary tract infections with normal female anatomy. The Lancet Infectious Diseases, (4), 631-35.

Flaudrois, JP. (2004). Bactério Géné /croissance bactérienne. Cours de Bactériologie Médicale DCEM1UFR Médecine Lyon Sud-Laboratoire de biométrie .1-10 p.

Freney, J et Croze, M. (2007). Précis de bactériologie clinique. Entérobactériaceae-généralités. Edition ESKA. 798-979p.

G

Geoffroy, W. (2010). Phagothérapie : principes et perspective. Paris. 94p.

Grimont, P. (1987). Taxonomie des *Escherichia*. Méd Mal Infect, 17, 6-10p.

Guy Albert, K. (2008). Etude bactériologique des infections urinaires au centre Pasteur du Cameroun. Mémoire de fin d'étude.50p.

H

Hancock, R. E; Farmer, S; Li, Z and Poole, K. (1991). Interaction of aminoglycosides with the outer membranes and purified lipopolysaccharide and OmpF porin of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother, 35, 1309-1314.

Harder, K.J; Nikaido, H and Matsubashi, M. (1981). Mutants of *Escherichia coli* that are resistant to certain β -lactams compounds lack the OmpF porin. Antimicrob Agents Chemother, 20(4), 549-552.

Humbert, G. (1997). Ecologie bactérienne des infections urinaires. L'Euro biologiste, 31(5).

I

Idatie, Jm. (1988). Infections urinaires chez l'adulte : Néphrologie. Paris: Ellipses. 38-207p.

J

Jacoby, G. A; Chow, N; and Waites, K.B. (2003). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 47, 559-562.

Joly, B et Reynaud, A. (2007). *Entérobactéries : systématique et méthodes de diagnostic*. Paris : Tec. 3-182p.

Jury de la conférence de consensus. (2003). Infections urinaires nosocomiales de l'adulte. *Médecine et maladies infectieuses*, 33, 223–244.

K

Kattan, J.N; Villegas, M. V and Quinn, J.P. (2008). New developments in carbapenems. *Clin Microbiol Infect*, 14, 11.

Kaper, J; Nataro, J.P and Mobley, H. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*, 2(2), 123-140.

Kouta, K. (2009). Infection urinaire chez les diabétiques adultes. Mémoire de fin d'étude. Université Kasdi-merbah Ouargla, 76p.

Kumar, A and Schweizer, H.P. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Delivery Rev*, 57, 1486-1513.

L

Lewin, C. S; Howard, B; and Smith, J.T. (1991). Protein- and RNA-synthesis independent bactericidal activity of ciprofloxacin that involves the A subunit of DNA gyrase. *J.Med.Microbiol*, 34, 19-22.

Lobel, B et Soussy, C. (2007). *Les infections urinaires*. Paris.82p.

M

Mal, M. (1991). 2^{ème} conférence de consensus en thérapeutique, anti-infectieuse. *Antibiothérapie des voies urinaires*, 12, 4- 51.

Mallaret, M ; Bosseray, A et Micoud, M. (1996). *Encyclopédie médicale : Infection nosocomiales*.

Mehdi, S. (2008). La fréquence des bactéries multi résistante à l'hôpital Hassan ii de Settat. Thèse de doctorat. Université Mohammed faculté de medecine et de pharmacie. Rabat. 48-51p.

Menard, R; Molinas, C; Arthur, C.M; Duval, J; Courvalin, P; and Leclercq, R. (1993). Overproduction of 3'-aminoglycoside phosphotransferase type I confers resistance to tobramycin in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 37, 78-83.

Mendaci,A et Mihoubi,S. (2015). Profil de sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries uropathogènes (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*).mémoire en master. Université des frères Mentouri. Constantine. 88p.

Meradi, L ; Djahoudi, A ; Abdi, A ; Bouchakour, M ; Perrier Gros Claude, J-D et Timinouni, M. (2009). Résistance aux quinolones de types qnr, aac (60)-Ib-cr chez les entérobactéries isolées à Annaba en Algérie. Pathologie Biologie, 59, 73-78 p.

Messai, A. (2006). Analyse critique des pratiques de l'antibiothérapie en élevages avicoles.21p.

N

Nordmann, P; Naas, T and Poirel, L. (2011). Global spread of carbapenemase-producing enterobacteriaceae. Emerging Infect Dis, 17, 8.

Nikaido, H. (1994). Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. Science, 264, 382-388.

P

Pantel, A. (2015). Multi résistance des entérobactéries aux antibiotiques, Modulation de l'influx et de l'efflux membranaires chez *Escherichia coli* ST131.Thèse de doctorat. Université de Montpellier .244 p.

Paul, H. Roy. (1997). Dissémination de la résistance aux antibiotiques : le génie génétique à l'œuvre chez les bactéries. Médecine/ sciences, 13(8).

Perez, F ; Endimiani, A; Hujer, K; et Bonomo, R. (2007). The continuing challenge of ESBLs. Curr Opin Pharmacol, 7, 459-469.

Pilly, E. (2008). Maladies infectieuses et tropicales. Paris. 124-131p.

Poirel, L. (2006). Nouveaux mécanismes de résistance chez *Pseudomonas aeruginosa* : quelles perspectives XVII Congrès nationale de la SFHH-Nantes .25 p.

Posl, P ; Linermas, P ; Mainil, J ; et Deprez, P. (1998). Production des vérocytotoxine par *Escherichia coli* du porc : Annales de médecine vétérinaire. 38- 133 p.

R

Ramirez, M and Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resist Updat, 13, 151-171.

Rakotovao-Ravahatra, Z. D ; Randriatsarafara, F. M ; Rasoanandrasana, S ; Raverohanta, L ; et Rakotovao, A. L. (2017). Phénotypes de résistance des souches d'*Escherichia coli* responsables d'infection urinaire au laboratoire du Centre Hospitalo-Universitaire de Befelatanana Antananarivo. The Pan African Medical Journal, 26.

Robicsek, A; Strahilevitz, J; Jacoby, G.A; Macielag, M; Abbanat, D; Park, C; Bush, K; and Hooper, D. (2006). Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat.Med*, 12, 83-88.

Robin, F; Gibold, L; et Bonnet, R. (2012). Résistances naturelles et acquises aux β -lactamines chez les entérobactéries : comment les identifier en pratique quotidienne. *Revue Francophone des laboratoires*, 445, 47-58 p.

Rodríguez-Baño, J et Pascual, A. (2008). Clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 6, 671–683 p.

Rogers, B.A; Sidjabat, H.E; Paterson, D.L. (2011). *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *Antimicrob Chemother*, 66(1), 1-14.

Ruppé, E. (2010). Épidémiologie des β -lactamases à spectre élargi : l'avènement des CTX-M. *Doi*, 12(1), 3-16p.

Rossant, L et Rossant-Lumbroso, J. (2010). Encyclopédie médicale : Les infections urinaires.

Russo, T et Johnson, JR. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis*, 181, 1753–1754.

S

Saidani, M. (2012-2013). Epidémiologie des pyélonéphrites et prostatites communautaires : Les traitements probabilistes recommandés sont-ils toujours adaptés ? . Thèse de doctorat. Université Paris Diderot. France.

Soderstrom, A; Osterberg, P; Lindqvist, A; Jonsson, B, Lindberg, A; Blide ulander, S et al. (2008). Large *Escherichia coli* O157 outbreak in Sweden associated with locally produced lettuce .*Foodborne Pathog Dis*, 5, 339-349.

Soumaila, G. (2012).Caractérisation phénotypique et génétique des *Escherichia coli* isolés des cas de colibacilloses aviaires au Sénégal. Thèse de doctorat. Université cheikh anta diop de Dakar. 79 p.

Surveillane, E. (1997). Surveillance des infections à *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) et du syndrome hémolytique et urémique (SHU) en Europe. DGV de la commission des communautés européennes .12p.

T

Talbert, M ; Willoquet, G et Gervais, R. (2009). *Pharmaco Clinique*. Wolters Kluwer. France. 641-655 p.

Tumbarello, M ; Spanu, T ; Di Bidino, R ; Marchetti, M ; Ruggeri, M ; Trecarichi, EM et al. (2010). Costs of bloodstream infections caused by *Escherichia coli* and influence of

extended-spectrum beta-lactamase production and inadequate initial antibiotic therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, 54, 4085–4091.

V

Verhaegen, J. (2002). Cours de bactériologie : les entérobactéries[en ligne]. (Consulté le 15 Mars 2018). www.kuleuven.be/vesaliusonline/UNIKEN%20KONGO.doc.

W

Wolff, M ; Joly-Guillou, M-L et Pajot, O. (2008). Le point sur les carbapénèmes. *Réanimation*, 17, 242-250 p.

Y

Yala, D ; Merad, A ; Mohamedi, D et Ouar Korich, M. (2001). Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb*, 91.

Yong, D; Toleman, M; Giske, C; Cho,H; Sundman, K; Lee,K and Walsh, T. (2009). Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla (NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *AntimicrobAgents Chemother*, 54, 5046-5054.

Z

Zahar, J. R ; Bille, E ; Schnell, D ; Lanternier, F ; Mechai, F ; Masse, V ; et Lortholary, O. (2009). Diffusion communautaire des entérobactéries sécrétrices de β -lactamase à spectre élargi (EBLSE). *médecine/sciences*, 25(11), 939-944.

Zahlane, K ; Labial, A ; Bouzekraoui, T ; Soraa, N ; Chabaa, L. (2009-2010). La résistance des souches *d'Escherichia coli* uropathogènes isolées chez l'adulte, CHU Marrakech. Laboratoire des analyses biologiques, hôpital Ibn Tofail.

Zitti, T. (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.

[1] <http://www.memobio.fr/images/bact/synergie.gif>.

[2] <http://spiralconnect.univ-lyon1.fr/spiral-files/download?mode=inline&data=4930878>.

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 boeuf.....	300ml.
Peptone de caséine.....	17,5g.
Amidon de maïs.....	1,5g.
Agar.....	17g.

pH = 7,4

- **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

- **Mannitol-Mobilité-Nitrate**

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

pH = 7,6

- **Milieu urée-indole**

L-tryptophane03g.
Urée20g.
Monophosphogénophosphate de potassium01g.
Dihydrogénophosphate de potassium01g.
Chlorure de sodium05g.
Éthanol à 95 °	10ml.
Rouge de phénol en solution à 1%.....	2,5ml.

pH = 6,8

- **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

Annexe 2 : Coloration de gram

- Réaliser un frottis ou un étalement
- Fixer la préparation à la flamme sans dépasser 50-60° (brièvement supportable à la main), ce qui la sécher puis laisser refroidir la lame.
- Immerger (ou inonder) la lame dans une solution de Cristal violet pendant 1min.
- Laver à l'eau en traversant la lame ou sous le robinet.
- Immerger la lame dans le lugol pendant 1min.
- Laver à nouveau à l'eau.
- Décolorer jusqu'à disparition de la couleur violette dans l'alcool en faisant couler goutte à goutte sur la lame inclinée ou en immergeant la lame pendant une dizaine secondes dans le décolorant.
- Laver à l'eau.
- Contre colorer avec la solution de safranine diluée ou de fuchsine diluée pendant 20 à 30 secondes.
- Laver à l'eau et sécher à l'air ou en chauffant vers 50°. La lame doit être parfaitement sécher.
- Observer à l'objectif ×100, en immersion avec de l'huile à immersion.

Annexe 3 : Tableau des Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour les entérobactéries (CLSI, 2014).

Antibiotiques	Diamètres critiques (mm)	
	R	S
Amoxicilline	≤13	≥17
Ticarcilline	≤13	≥18
Piperacilline	≤13	≥17
Cefazoline	≤19	≥23
Cefotaxime	≤22	≥26
Cefoxitine	≤14	≥18
Ertapenem	≤18	≥22
Imipenem	≤19	≥23
Aztreonam	≤17	≥21
Gentamycine	≤12	≥15
Netilmycine	≤14	≥17
Acide nalidixique	≤13	≥19
Pefloxacine	≤15	≥21
Fosfomycine	≤12	≥16
Colistine	≤13	≥17
Tetraminocycline	≤10	≥17
Sulfamethoxazole- Trimethoprim	≤10	≥16
Nitrofurantoine	≤14	≥17

Etude phénotypique des souches d'*Escherichia coli* multi résistantes aux antibiotiques responsable des infections urinaires.

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en :
Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes

Résumé

Notre travail porte sur l'identification et l'étude de la résistance aux antibiotiques de la bactérie *Escherichia coli* impliquée dans les infections urinaires. Cette étude qui a eu lieu au laboratoire de bactériologie du CHU de Constantine durant un mois allant du 1 au 31 Mars, nous a permis d'isoler cinq souches d'*Escherichia coli* à partir des échantillons urinaires des patients qui ont subi une infection urinaire.

La résistance aux antibiotiques a été déterminée par la méthode classique de l'antibiogramme en milieu gélosé Moeller-Hinton. Les cinq souches d'*E.coli* ont présenté une résistance à l'ensemble des β -lactamines à l'exception des Céphamycines (Céfoxitine) et des Carbapénèmes (Imepenem, Ertapenem). Ainsi une résistance aux aminosides et aux quinolones. L'activité de β -lactamase à spectre élargi a été étudiée en utilisant un test de synergie. Nos résultats nous ont permis de déterminer le phénotype de la résistance par la présence des β -lactamases à spectre élargi chez les cinq souches testées.

La diffusion de souches multi-résistantes, d'entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) en particulier *E.coli* dans nos hôpitaux constitue une menace de santé publique, réduisant de manière importante les alternatives thérapeutiques pour le traitement des infections sévères. Pour cela, l'émergence de ces souches permet de rappeler qu'il est évidemment nécessaire d'être attentif aux divers types de souches qui circulent dans nos hôpitaux.

Mots clés : *Escherichia coli*, BLSE, Antibiotiques, Multi résistance, Infections urinaires.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de bactériologie du Centre Hospitalo-Universitaire Ben Badis de Constantine.

Jury d'évaluation :

Président du jury : Melle ABDELAZIZ OUIDED (MAA - UFM Constantine),
Rapporteur : Melle MEZIANI MERIEM (MAA - UFM Constantine),
Examineur : Mme MERGOUD LILIA (MAA - UFM Constantine).

Date de soutenance : 25/06/2018