



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 : الميكروبيولوجيا

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 de quelques souches d'*Escherichia coli* productrices des carbapénèmases

Présenté et soutenu par : *Benabdallah-Khodja Akram*

Le : 19/06/2016

Hamlaoui Yahia

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : Mme Mergoud L.

MAA-UFM Constantine

Rapporteur : Melle Méziani M.

MAA-UFM Constantine

Examinatrice : Melle Belmassikh A.

MAA-UFM Constantine

*Année universitaire
2015 - 2016*

Remerciements

Nous adressons nos remerciements à Allah le tout puissant qui nous a aidés à faire ce travail.

Nous adressons nos remerciement à toutes les personnes ayant participés de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

Nous tenons à adresser tout particulièrement et en premier lieu nos plus sincères remerciement à notre rapporteur Meziani Meriem pour avoir accepté de nous encadrer. Vue les difficultés d'encadrement que nous avons rencontrées et pour tous les conseils techniques, les encouragements, les orientations qu'elle nous a prodigués durant la préparation de notre mémoire. Qu'elle trouve ici notre profonde gratitude.

Comme nous avons aussi l'obligation impérative d'adresser nos remerciements les plus forts aux membres du jury :

- Présidente : Mme Mergoud Lilia - Maitre Assistante classe A*
- Examinatrice : Melle Belmassikh Aicha - Maitre Assistante classe A*
- Encadreur : Melle Méziani Meriem - Maitre Assistante classe A*

Qui ont eu l'amabilité d'accepter la constitution-composition du jury et la présidence de notre soutenance, membres respectables pour leur dévouement à bien vouloir lire, étudier et analyser notre modeste ouvrage. Nous écouterons attentivement et recevrons toutes leurs remarques éventuelles toujours enrichissantes.

Nous n'oublions pas de dire merci à tous nos amis et amies du cycle et hors cycle avec qui nous avons lié amitié et entraide à l'université et à la cité universitaire, valeurs que nous ferons perdurer dans le temps et dans l'espace.

Table des matières

Introduction.....	1
-------------------	---

Chapitre I : Généralités sur les *Entérobactéries*

1- Définition et caractéristiques générales.....	3
2- Les caractères bactériologiques.....	3
2-1- Les caractères morphologiques.....	3
2-2- Les caractères cultureux.....	4
2-3- Les caractères biochimiques.....	5

Chapitre II : *Escherichia coli*

1- Historique	6
2- Définition	6
3- Classification	7
4- Habitat et réservoir	7
5- Caractères bactériologiques	7
5-1- Caractères morphologiques et cultureux	7
5-2 - Caractères biochimiques	8
5-3- Le pouvoir pathogène	9
6- Caractères antigéniques	9
6-1- Antigènes somatique « O »	9
6-2- Antigènes flagellaires « H »	10
6-3- Antigènes de surface ou l'enveloppe « K »	10
7- Résistance aux antibiotiques	11
7-1- Définitions	11
7-2- Mode d'action des antibiotiques	11
7-3- Types de résistance aux antibiotiques	12
7-3-2- Résistance naturelle	12
7-3-1- Résistance acquise.....	12
7-4- Mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	12
8- Les β -lactamines	13

8-1- Les pénames	14
8-2- Les cepèmes (céphalosporines)	14
8-3- Les monobactames	15
8-4- Les pénèmes	15

Chapitre III : Les carbapénèmes et les carbapénèmases

1- Les carbapénèmes	17
1-1- Généralités et historique	17
1-2- Classification des carbapénèmes	18
1-3- Mécanisme d'action	18
1-4- Spectre d'action	18
1-5- Utilisation des carbapénèmes	19
2- Les carbapénèmases	19
2-1- Généralités et définition	19
2-2- Origine des carbapénèmases	20
2-3- Classification	21
2-3-1- Classification fonctionnelle	21
2-3-2- Classification moléculaire	22
2-4- Support moléculaire des gènes	22

Chapitre IV : Matériels et méthodes

1-Objectif	23
2-L'identification	23
2-1-Examen microscopique (coloration de Gram)	23
3-Les tests biochimiques	24
3-1-Préparation de la suspension bactérienne	24
3-2-Le test TSI (milieu triple sucres)	24
3-3-Milieu Mannitol-Mobilité	25
3-4-Milieu Clark et Lubs (test RM et VP)	25
3-5-Citrate de Simmons	26
3-6-Urée –indole	26

3-6-1-Recherche de l'uréase	26
3-6-2-Recherche de la TDA	27
3-6-3-Recherche de l'indole	27
4-Antibiogramme	27
4-1-Milieu de culture	27
4-2-Les antibiotiques utilisés	27
4-3-L'Ensemencement	28

Chapitre V : Résultats et Discussion

1-Les tests biochimiques	29
1-1- Coloration de Gram	29
1-2- Mannitol-mobilité	29
1-3- Clark et Lubs (tests RM-VP)	29
1-4- Milieu Urée-indole	30
1-4-1- Recherche d'uréase	30
1-4-2- Recherche d'indole	31
1-4-3- Recherche de TDA	31
1-5-Milieu TSI	31
1-6-Utilisation du citrate	32
2-L'antibiogramme	32
3- Discussion	33
Conclusion	35
Références bibliographiques	36

Annexes

Résumé

Notre travail avait pour objectif l'étude du profil de résistance aux antibiotiques de plusieurs souches d'*Escherichia coli* productrices de carbapénèmases. Un total de 200 souches provenant de différents prélèvements biologiques ont été isolées et identifiées et ceci sur des milieux spécifiques à l'isolement d'*E.coli* et des milieux d'identification biochimiques. La sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par la méthode classique de l'antibiogramme en milieu gélosé Moëller-Hinton.

Sur les 200 souches testées, seules 5 ont présenté une résistance aux carbapénèmes. Ces 5 souches sont résistantes aux bêta-lactamines, à la Céfoxitine et à l'ertapénème et sensibles à l'imipénème. Ces résistances sont confirmées par les travaux de Djerfi et al. (2013) et Filali et al. (2000). Par contre les résultats de la résistance à l'ertapénème ont montrés une différence avec celles trouvés par Boutersa et al. (2015).

Les entérobactéries productrices de carbapénèmases en particulier *E. coli* représentent une nouvelle menace pour la santé publique. La situation à la suite de notre étude n'est pas tout à fait alarmante. Mais de nouveaux moyens plus efficaces doivent être mise en œuvre dans la détection des EPC.

Abstract

Our work intrested in the study of resistance profile to antibiotics of several producing strains of *E.coli* of carbapenems. A total of 200 strains coming from different biological environements were isolated, identified on specific and biochemical media. The sensitivity to antibiotics was carried out by the classical method of the antibiogram in Moëller-Hinton agar medium.

On the 200 strainstested, only 5 hadshown a resistance to the carbapenemases. Those 5 strains are resistant to the B-lactamines, cefoxitine and the ertapenem and olso resistant to imipenem. These resistances are confirmed by work of Djerfi and al.,(2013) and Filali and al.,(2000). On other hand the result found for the resistance of ertapénème were different from those found by Boutersa and al.,(2015).

The producing enterobacteries of carbapenemases in particular *E.coli* pose a new threat for the public health. The situation following our study is not completely alarming. But new effective means must be put in work for the detection of the EPC.

ملخص

عملنا يهدف الى دراسة جانبية المقاومة لعدة سلالات من *E. coli* المنتجة للكريبينيماز من 200 سلالة *E. coli* تم اخذ عينات بيولوجية مختلفة، حيث تم عزلها و تحديدها باستعمال اوساط خاصة لعزلها و اوساط لتحديدها بيوكيمياويا. تم اتباع المنهج الكلاسيكي لاختبار الحساسية في وسط اجار Moëller-Hinton.

من 200 عينة مستعملة تم الحصول على خمس سلالات مقاومة للكربابينيم، وهذه الخمس سلالات مقاومة لكل من *bêta-lactamine* ، *céfoxitine* ، *ertapénème* و *imipénème*، وهذه المقاومة تم التأكد منها من نتائج جرفي و زميلاتها (2013)، و ايضا نتائج فيلالي و زميلاتها (2000). بينما نتائج المقاومة ل *ertapénème* اظهرت اختلاف مع نتائج بو ترسة و زميلاتها (2015). الأمعانيات المنتجة للكربابينيماز خاصة *E. coli* تمثل خطر جديد على الصحة الإجتماعية.

الوضعية المتحصل عليها إنطلاقا من هذه النتائج ليست بالحرجة و لكن اصبحت هناك وسائل جديدة جد فعالة يجب وضعها حيز الإستعمال في تحديد الأمعانيات المنتجة للكربابينيماز.

Liste des abréviations

BCP : Pourpre de Bromocrésol

Les formes R: Rough forms = colonies rugueuses

Les formes S: Smooth forms

Ag: Antigène

Un antigène ECA : Enterobacterial Common Antigen /antigène de Kunin

Ag O : Antigène osomatique

Ag H : Antigène flagellaires

Ag K : Antigène capsulaire

LPS : Lipopolysaccharides

h : heure.

min : minute

µm : micromètre

mm : millimètre

°C : Degrés Celsius

+ : Caractère positif

- : Caractère négatif

+/- : Caractère inconstant

CS : Citrate de Simmons

BCP : Bromo crésol pourpre

ESC : Esculine

PDA : Phénylalanine désaminase

LDC : Lysine décarboxylase

ODC : Ornithine décarboxylase

URE : Uréase

VP : Voges Proskauer

RM : Rouge de Méthyle

TDA : Tryptophane désaminase

GLU : Glucose

LAC : Lactose

ADN : Acide Desoxy-ribonucleique

pH : potentiel Hydrogène

ADH : Arginine dehydrolase

BLSE : Bêta -lactamase à spectre étendu

DHP-1 : Dehydropeptidase rénale humaine

PBP : Penicillin binding proteins

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

ONPG : Orthonitrophényl- β -galactoside

EPC : Entérobactéries Productrices de Carbapénèmases

KPC : *Klebsiella pneumoniae* carbapénémase

NDM : New Delhi métallob- β -lactamases

IMI : Imipénème hydrolyse β -lactamase

IMP : Imipénèmes

GES : Guyane à spectre étendu.

MBL : Métallob- β -lactamases

NMC : Carbapénémase non métallob-enzymatique

OXA : Oxacillinases

C3G : Céphalosporine de 3ème génération

Liste des figures

Figure 01: Observation microscopique de la morphologie des *Entérobactéries* G X 1000

Figure 02: *Escherichia coli* sous microscope électronique a G X 1000

Figure 03: Squelette de base des carbapénèmes

Figure 04: Structure des carbapénèmes

Figure 05: Aspect négatif du test VP

Figure 06: Aspect positif du test RM

Figure 07: Aspect négatif du test uréase

Figure 08: Aspect du milieu TSI avec *Escherichia coli*

Figure 09: Aspect du citrate de Simmons avec *Escherichia coli* (-)

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les caractères d'identification des genres le plus fréquemment rencontrés des Entérobactéries

Tableau 2 : la classification d'*Escherichia coli* selon le Bergey's manual 2012

Tableau 3 : les Caractères biochimiques d'*Escherichia coli*

Tableau 4 : Différents cas où l'antibiothérapie nécessite l'utilisation des carbapénèmes selon sanford guide to antimicrobial therapy

Tableau 5 : Classification fonctionnelle des carbapénèmases



INTRODUCTION

Introduction

Introduction

Les entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif constituant l'une des plus importantes familles de bactéries. Certaines sont pathogènes strictes et d'autres sont pathogènes opportunistes, elles sont responsables d'infections nosocomiales et communautaires.

E.coli est un bacille à gram négatif appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. C'est une espèce au sein de laquelle on retrouve à la fois des souches commensales du tube digestif colonisant les individus sains et des souches virulentes responsables de plusieurs infections avec différents signes cliniques.

Les entérobactéries dont *E.coli* sont de plus en plus résistantes aux antibiotiques et l'augmentation de l'incidence des infections liées à des bactéries «BLSE» a conduit à l'utilisation massive parfois non justifiée des carbapénèmes. [61][62][63] Les carbapénèmes demeurent les bêta-lactamines au spectre d'activité le plus large. Leur excellente activité antibactérienne est liée en particulier à la rapidité de leur pénétration transmembranaire à travers la paroi externe des bacilles Gram négatif et à leur stabilité vis-à-vis de la plupart des bêta-lactamases naturelles ou acquises, y compris les céphalosporinases qu'elles soient chromosomiques ou plasmidiques et les bêta-lactamases à spectre étendu «BLSE». [64]

Les progrès de l'antibiothérapie semblaient avoir résolu la quasi-totalité des problèmes courants en pathologie infectieuse. Par la suite, l'émergence de résistances chez ces bactéries devient un problème préoccupant, en développant plusieurs stratégies pour résister à l'action des antibiotiques et parmi ces mécanismes, l'expression de bêta-lactamases à forte activité hydrolytique vis-à-vis des carbapénèmes «les carbapénèmases ».

Dès lors, il est devenu nécessaire de connaître la bactérie, de bien maîtriser ses mécanismes de résistance, ainsi que de tester son comportement vis-à-vis des autres antibiotiques afin d'apporter une solution thérapeutique et une fin à ce fléau.

Introduction

Dans le cadre de la surveillance et de la lutte contre l'émergence et la dissémination des souches d'entérobactéries productrices de carbapénèmases, le laboratoire de bactériologie du Centre Hospitalo-Universitaire Ibn Badis de Constantine (CHUC) réalisé une étude prospective des différents prélèvements biologiques provenant de différents services pendant une période de treize mois dont l'objectif est :

- D'évaluer la prévalence de résistance aux bêta-lactamines par la production de carbapénèmases chez les différentes souches des *E.coli* isolées au laboratoire de bactériologie du CHUC des différents prélèvements biologiques.
- Présenter les différentes carbapénèmases et leur classification.
- Exposer une synthèse de recommandations et mesures de prévention et contrôle à appliquer pour prévenir la propagation des souches productrices de carbapénèmases dans les milieux de soins.



***Généralités sur les
entérobactéries***

Généralités

Les entérobactéries constituent une famille bactérienne hétérogène, composée d'une vingtaine de genres et de plusieurs dizaines d'espèces. Celles-ci sont souvent opportunistes et responsables d'infections nosocomiales.

Leur abondance dans l'intestin, leur mobilité, leur rapidité de multiplication et leur fréquente résistance aux antibiotiques expliquent le fait qu'elles soient les bactéries les plus impliquées en pathologie infectieuse humaine surtout en milieu hospitalier. Leur distribution dans la nature est néanmoins plus large, puisqu'on les retrouve notamment chez les végétaux et dans l'environnement (sol et eau). [1][2][3][4] [5]

1- Définition et caractéristiques générales

Les entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif, immobiles ou mobiles grâce à une ciliature péritriche. Ils sont aéro- anaérobies facultatifs et se développent sur milieu ordinaire. Ils sont dépourvus d'oxydase et ont la faculté de fermenter le glucose, mais aussi de réduire les nitrates en nitrites. La famille des entérobactéries comprend plusieurs genres bactériens et les différences entre les nombreux genres et espèces viennent de critères plus précis, comme la fermentation des différents sucres, la production ou non de sulfure, la présence ou l'absence d'enzymes du métabolisme (désaminases, décarboxylases). [6][7][8][9][10][11]

2- Les caractères bactériologiques

2-1- Les caractères morphologiques

Toutes les entérobactéries ont une morphologie habituellement typique, sous forme de bacilles à gram négatif de 2 à 3µm de long sur 0,6µm de large généralement polymorphes. Certaines espèces sont mobiles grâce à une ciliature péritriche et d'autres sont immobiles (*Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia pestis*). La présence d'une capsule visible au microscope est habituelle chez *Klebsiella*. La plupart des espèces pathogènes chez l'homme possèdent des pilis (ou fimbriae) qui constituent des facteurs d'adhésion. [12]

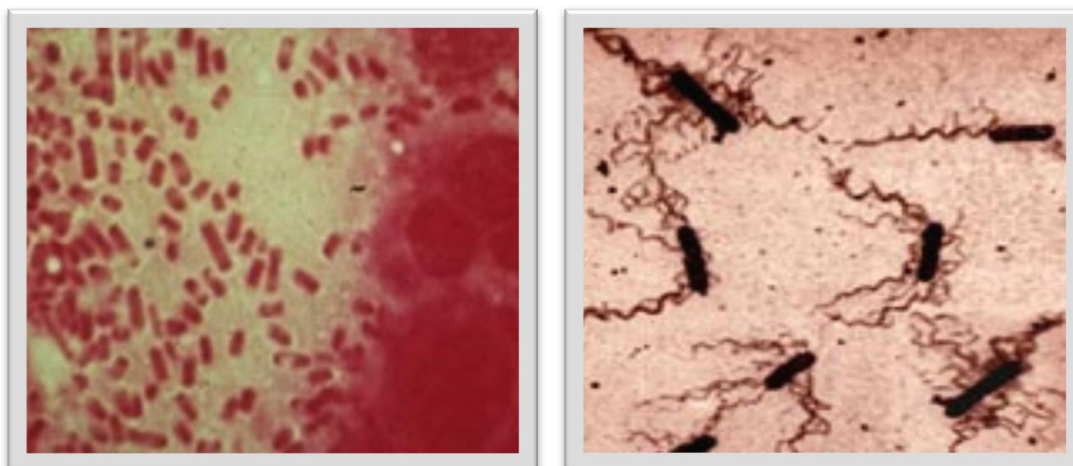


Figure 01: Observation microscopique de la morphologie des *Entérobactéries* G X 1000 [12]

2-2- Caractères cultureux

Les Entérobactéries se développent rapidement in vitro sur des milieux ordinaires, en particulier le milieu de Mac Conkey ou le BCP. La température optimale de croissance est 37 °C mais la culture est possible entre 20 et 40 °C. Ce sont des germes mésophiles et neutrophiles (pH optimum voisin de 5.5-8) et ils sont assez tolérants à la variation de la pression osmotique.

Les Entérobactéries se développent bien dans un bouillon ou sur une gélose ordinaire incubée 18 heures à 37°C. Sur gélose, on peut obtenir différentes formes :

- ❖ Les formes S (smooth) sont l'aspect habituel. Les colonies sont lisses, bombées, brillantes et humides, elles sont entre 2 à 4mm de diamètre.
- ❖ Les formes R (rough) s'observent surtout avec les souches ayant subi plusieurs repiquages. Les colonies sont rugueuses, sèches, à contours irréguliers et de teinte mate.
- ❖ En bouillon, les formes R donnent un aspect grumeleux.
- ❖ Les colonies rugueuses sont habituelles avec les *Klebsiella*. Leur diamètre peut dépasser 10mm, elles ont une tendance à la confluence. On peut les rencontrer aussi avec d'autres espèces, notamment *Salmonella paratyphi B*.

Les colonies naines s'observent avec des souches déficientes dans certaines de leurs chaînes métaboliques. Elles ne sont pas exceptionnelles chez *Escherichia coli* isolée d'infections urinaires. [13][14]

2-3- Les caractères biochimiques

Le diagnostic de genre et d'espèce repose sur l'étude des caractères biochimiques, après que le diagnostic de famille ait été établi avec certitude. Les caractères d'identification sont essentiellement "biochimiques" et utilisent des tests qui étudient le métabolisme protéique (présence d'uréase, production d'indole, dégradation du tryptophane) ou la fermentation des sucres (glucose, lactose, saccharose etc.), la capacité d'utiliser le citrate, la présence d'enzymes (décarboxylases, désaminases), la production d'hydrogène sulfuré ou la formation de gaz. [15][16]

Tableau 01 : Les caractères d'identification des genres les plus fréquemment rencontrés des Entérobactéries [17]

	<i>Escherichia</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Serratia</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Providencia</i>	<i>Yersinia</i>
Lactose	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	+	-	+/-	-	-	+
Indole	+	-	-	+/-	-	-	+/-	+/-	+	+/-
VP (Acétoïne)	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+*
Citrate	-	+	+	+	+	+/-	-	+/-	+	-
Mobilité	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+*
Urée	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
PDA	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
H₂S	-	+/-	-	-	-	+	-	+/-	-	-

(*) : à 20°C seulement

(+) : Résultat positif

(-) : Résultat négatif



Escherichia coli

1- Historique

En 1885, Theodor Escherich (1857-1911) découvre un bacille qu'il dénomma *Bacterium coli* commun dans les selles de nourrissons. [19]

Médecin allemand, il fit une partie de ses études de médecine à Strasbourg et élaborait sa thèse de doctorat en pédiatrie en 1881 à Munich à propos des bactéries intestinales des nourrissons et de leur rapport avec la physiologie de la digestion.

En 1904 : isolement de cette même bactérie dans un cas d'infection urinaire.

En 1919 : Castellani et Chalmers donne le nom d'*Escherichia coli* à cette bactérie. [20]

2- Définition

Le genre *Escherichia* comprend plusieurs espèces, dont seul *E.coli* (colibacille) est potentiellement pathogène pour l'homme. *Escherichia coli* est l'espèce bactérienne qui a été la plus étudiée par les fundamentalistes pour des travaux de physiologie et de génétique. [25]

Il représente l'espèce dominante de la flore intestinale aérobie, où il participe à la barrière intestinale en arrêtant la croissance d'espèces bactériennes nuisibles. La colonisation du tube digestif commence dès les premières heures après la naissance et le rythme de division d'*E.coli* lui permet de garder pendant toute la vie de l'individu sa place dominante dans la flore (une division toute les 20 min à 37°C et en conditions favorables). La présence de cette bactérie dans le sol, l'eau et /ou les aliments témoigne d'une contamination fécale et suggère la possibilité que d'autres bactéries ou virus d'origine digestive s'y trouvent. On considère que sa présence rend l'eau ou les aliments impropres à l'utilisation ou à la consommation. [21][22]

3- Classification

Tableau 02 : La classification d'*Escherichia coli* selon le Bergey's manual 2012[23]

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 (E.coli)</i>

4- Habitat – Réservoir

Bactérie commensale du tube digestif, *E.coli* est l'espèce la plus importante des anaérobies facultatifs de l'intestin : 10^8 par gramme de fèces (flore totale : 10^{11} à 10^{12} bactérie par gramme), < 1 % de la flore totale du colon, 99% représentés par les anaérobies strictes. La présence d'*E.coli* dans l'eau est témoin d'une contamination fécale qui la rend impropre à la consommation (recherche des coliformes), pathogène indiscutable pour l'homme et l'animal. [24]

5- Caractères bactériologiques

5-1- Caractères morphologiques et culturels

E.coli ou colibacille est une bactérie asporulée mesurant 2 à 4 μm de long sur 0.4 à 0.6 μm de large. C'est une bactérie fine et allongée à extrémités arrondies, mobile grâce à une ciliature péritriche. Elle se développe en 24 heures à 37°C 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. [25]

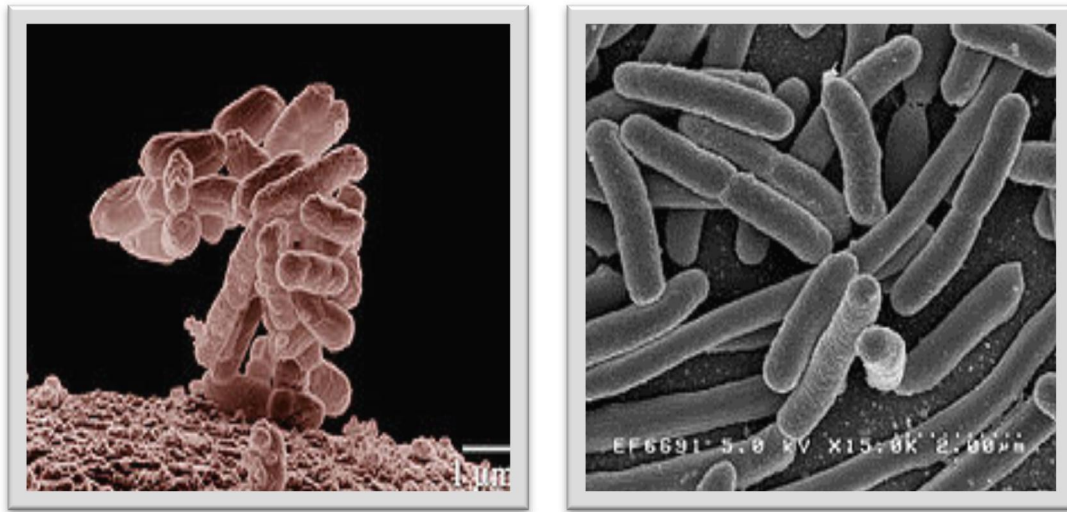


Figure 02: *Escherichia coli* sous microscope électronique a G X 1000 [25]

5-2- Caractères biochimiques

E.coli possède une catalase mais elle est dépourvue d'oxydase. L'étude d'activités enzymatiques et de la fermentation des sucres est réalisée à l'aide de micro-méthodes validées disponibles dans le commerce sous forme de galeries. Ces dernières permettent l'identification de cette bactérie ainsi que le diagnostic différentiel avec les autres bactéries de la même famille.[26][27][28][29]

Ces caractères sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 03 : Les caractères biochimiques d'*Escherichia coli*

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

Légende :

+ : caractère positif

- : caractère négatif

+/- : caractère inconstant

5-3- Le pouvoir pathogène

L'*E.coli* est responsables d'infections extra-intestinales :

- Infections urinaires
- Infections abdominales
- Infections méningées néonatales (*E.coli* k1)
- Septicémies avec choc septique due à l'endotoxine O

L'infection intestinale : L'existence des diarrhées à *E.coli* est connue depuis 1940. Ces diarrhées sont dues à des souches de sérotypes particuliers qui provoquent soit des cas sporadiques, soit des petites épidémies. [25]

6- Caractères antigéniques

L'antigène somatique O, définissant le sérotype, est contenu dans les lipopolysaccharides présents sur la paroi bactérienne des souches à Gram négatif. L'antigène flagellaire H est de nature protéique entrant dans la structure du flagelle (ciliature péritriche) permettant la mobilité de la bactérie. L'antigène K de surface n'est pas toujours présent mais s'il l'est, il bloque l'agglutinabilité de l'antigène O. [30]

6-1- Antigènes somatiques O

Il existe plus de 150 antigènes somatiques. Ils sont composés 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'agglutinations croisées d'antigènes O d'*E.coli*, *Shigella* et ceux de *Salmonella*, et par le message de la consistance crémeuse de la colonie à une consistance rigoureuse ayant pour conséquence l'absence de synthèse de l'antigène O. Les gènes codants pour les enzymes impliquées dans la synthèse de l'antigène O sont regroupés dans le groupe de gènes *rfb*. Ce groupe *rfb* peut être amplifié spécifiquement grâce à un système d'amorces puis, après restriction par l'endonucléase *Mbol*III, un profil noté « R » peut être obtenu par électrophorèse, correspondant à un sérotype d'*E.coli*. [30]

6-2- Antigènes flagellaires H

Les antigènes H ne servent pas à l'identification des *E. coli* pathogènes mais présentent un grand intérêt du point de vue épidémiologique : l'identité de l'antigène H constitue un élément pour assurer qu'il s'agit d'une même souche.

L'antigène H est codé par le gène *fliC*. Les parties N et C terminales de la flagelline sont très conservés et c'est la partie médiane, qui est plus variable, qui donne la spécificité de l'antigène H.

Les *E.coli* immobiles possèdent également le gène *fliC* mais sont incapables de synthétiser un flagelle, après restriction et amplification du gène *fliC* il est possible de typer l'antigène H en comparant le profil obtenu à une base de données de profil-type. Par exemple, le profil *fliC* (noté F) aura un numéro F8, correspondant au type H8 obtenu avec le sérum. [30]

6-3- Antigènes de surface ou d'enveloppe K

Il existe 3 types de l'antigène K désignés par les lettres L, A ou B.

- **L'antigène L** est le plus fréquent mais thermolabile (il est détruit en une demi-heure, à 100°C). Donc le chauffage provoque une perte de 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 *E.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 *E.coli* enteropathogènes de gastro-entérite infantile. Il a une thermolabilité intermédiaire : après une demi-heure à 100°C, il reste toujours de l'antigène B mais 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). [30]

7- Résistance aux antibiotiques

7-1- Définition

D'un point de vue strictement bactériologique, une souche bactérienne devient résistante lorsqu'elle peut croître en présence d'une concentration d'antibiotique plus élevée que la concentration qui inhibe normalement les souches sensibles de l'espèce.

Les résistances bactériennes aux antibiotiques peuvent être naturelles ou acquises.

On appelle « Antibiotique » toute substance naturelle d'origine biologique élaborée par un organisme vivant, substance chimique produite par synthèse ou substance semi synthétique obtenue par modification chimique d'une molécule de base naturelle ayant les propriétés suivantes :

- Activité antibactérienne
- Activité en milieu organique
- Une bonne absorption et bonne diffusion dans l'organisme

Les antibiotiques ont la propriété d'interférer directement avec la prolifération des micro-organismes à des concentrations tolérées par l'hôte.

7-2- Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques agissent à l'échelon moléculaire au niveau d'une ou de plusieurs étapes métaboliques indispensables à la vie de la bactérie. Ils agissent par :

- Toxicité sélective au niveau de la :
 - Synthèse de la paroi bactérienne
 - Membrane cytoplasmique
 - Synthèse des protéines
 - Acides nucléiques
- Inhibition compétitive : dans ce cas l'antibiotique est un analogue structural, il interfère avec une fonction essentielle à la bactérie. [31]

7-3- Types de résistance aux antibiotiques

7-3-1- Résistance naturelle

Leur mécanisme sur le génome bactérien est constant dans un taxon et est généralement chromosomique. Elle correspond à la résistance de toutes les souches d'une même espèce bactérienne à un antibiotique. Elle est due soit à une absence de cible pour l'antibiotique soit à une imperméabilité de la paroi à cet antibiotique.

A ce titre, elle constitue un critère d'identification. La résistance naturelle détermine les phénotypes «sauvages » des espèces bactériennes vis-à-vis des antibiotiques.[32]

7-3-2- Résistance acquise

Le terme de résistance acquise est utilisé pour désigner des processus permettant à des bactéries appartenant à une espèce originellement sensible de devenir résistante à un ou plusieurs antibiotiques.

La résistance acquise résulte de l'emploi thérapeutique des antibiotiques et elle est déterminée par des modifications génétiques consistant à des mutations sur des gènes déjà présents chez la bactérie (résistance par mutation chromosomique), ou en l'acquisition de nouveaux gènes de résistance par transfert horizontal (résistance extra-chromosomique). [33]

7-4- Mécanismes de résistance aux antibiotiques

Bien que plusieurs mécanismes soient impliqués dans les résistances acquises de certaines espèces bactériennes à certains antibiotiques, les suivants sont communément décrits : [34]

- Diminution de la perméabilité

L'absence de perméabilité de la paroi est un phénomène de résistance naturelle chez certaines espèces mais peut survenir chez des espèces sensibles à la suite d'une mutation chromosomique. L'altération des purines suite à une mutation chromosomique diminue le passage des molécules et réduit la sensibilité des bactéries à certains antibiotiques.[34]

- Modification du site d'action

Si la cible d'action d'antibiotique a subi une altération par une mutation, l'antibiotique est incapable de se fixer ou se fixe mal à cette molécule modifiée. Par conséquent son action inhibitrice ou destructrice est limitée ou annulée. Exemple : modification des PLP est l'un des mécanismes de résistance aux bêta-lactamines. [34]

- Inactivation de l'antibiotique par les enzymes bactériennes

Elle consiste en la production d'une enzyme spécifique qui détruit ou modifie l'antibiotique en donnant des dérivés inactifs sur la bactérie. Le pouvoir antibiotique des bêta-lactamines, des aminosides et des chloramphénicol peut-être inactivé par une enzyme comme β -lactamase, estérase. [34]

- Substitution de la cible d'action des antibiotiques

Ce système consiste en un développement d'une voie métabolique visant à remplacer la voie bloquée par l'antibiotique. Un des mécanismes de résistance avec le sulfamide et triméthoprimine suppose qu'entre autre ce mode de résistance est lié à la synthèse d'une enzyme plasmidique insensible à l'action de l'antibiotique. [34]

8- Les β -lactamines

Ce sont des antibiotiques ayant en commun un cycle bêta-lactame qui est le support de l'activité antibactérienne. L'ouverture de ce cycle par les bêta-lactamases, enzymes secrétées par certains germes bactériens, rend la molécule inactive par formation de dérivés inactifs. Sur le plan chimique, on peut distinguer schématiquement quatre groupes :

- Les pénames dont font partie des pénicillines, possédant un cycle pentagonal saturé.
- Les céphèmes correspondant aux céphalosporines, à cycle hexagonal saturé.
- Les monobactames (ou monolactames) dont la structure se limite au seul cycle β -lactame.
- Les pénèmes : ayant un cycle pentagonal insaturé.[35]

8-1- Pénames

Pénicilline G, pénicillines M, pénicilline A, pénicilline V, carboxy-pénicilline et uréido-pénicillines.[36]

8-2- Céphèmes

En général les céphèmes, céphamycines et oxalcéphèmes, en dépit de leurs différences de structure sont souvent désignés en céphalosporines et classés selon leur activité antibactérienne en générations. Ce sont tous des produits à large spectre.

- **Céphalosporines:** Les céphalosporines ont pour noyau commun l'acide 7 amino-céphalosporinique. Leur classification repose sur leur spectre d'activité de plus en plus large que sur leur structure chimique commune [40]

- **Céphalosporines de première génération**

Il existait plus d'une dizaine de céphalosporines dites de première génération mais certaines ne sont plus commercialisées. Exemple : Céfaclor, Céfadroxil, Céfalexine, Céfalotine, Céfatrizine, Céfazoline, Céfradine.

- **Céphalosporines de deuxième génération**

Les céphalosporines de deuxième génération comprennent la céfuroxime, le céfamandole et la céfoxitine. Elles sont caractérisées par une meilleure résistance aux β -lactamases, un spectre d'action plus large, une activité à faible concentration et une bonne diffusion tissulaire. [41]

- **Céphalosporines de troisième génération**

Exemple : céfotaxime - ceftazidime – ceftriaxone – céfopérazone. [40]

- **Céphalosporines de quatrième génération**

Elles restent actives chez les entérobactéries ayant acquis une résistance aux C3G par hyperproduction d'une céphalosporinase, inactives en cas de bêta-lactamases à spectre étendu. Exemple : Cefepime, Cefpirome. [42]

8-3- Monobactames

Leur noyau se caractérise par la présence du noyau monocyclique, azétidine, limité au cycle β -lactame. Exemple : Aztreonam

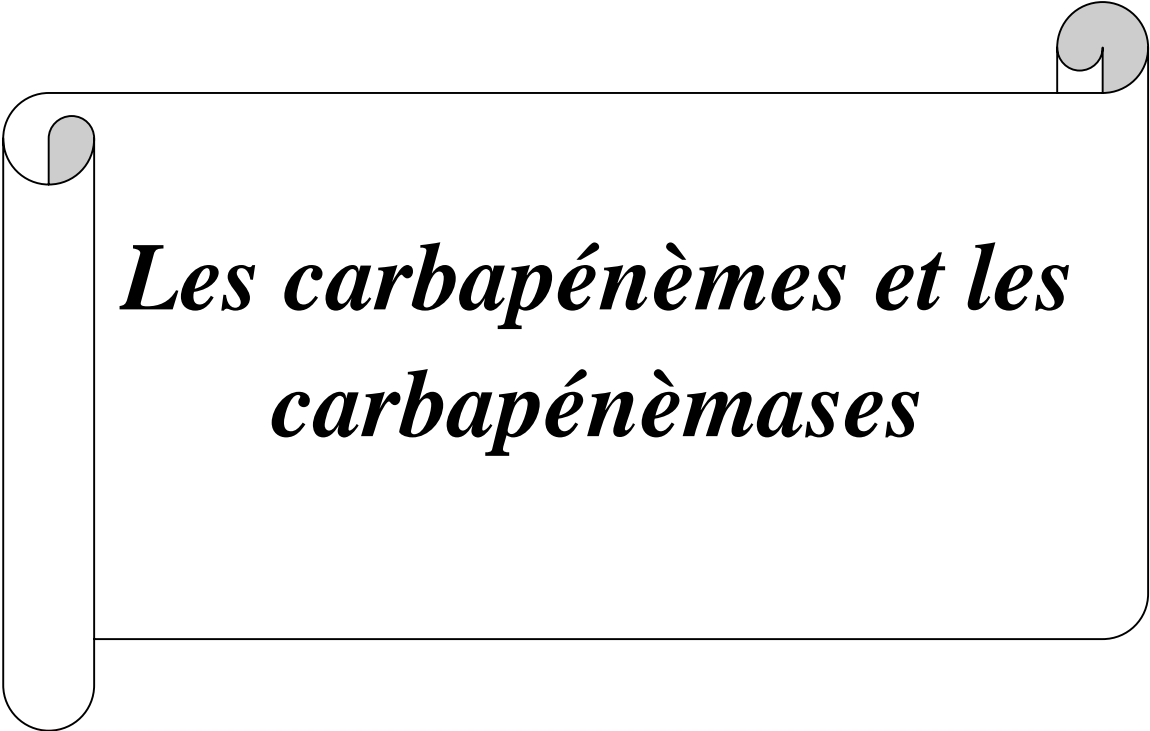
Actif sur : toutes les bactéries à Gram négatif, y compris ceux qui sécrètent des pénicillinases ou des céphalosporinases à bas niveau.

Espèces inconstamment sensibles : *Acinetobacter*, *Bordetella*, *Branhamella*

Espèces résistantes : Gram positif, anaérobies [43]

8-4- Pénèmes :

Ils ont un cycle pentagonal insaturé. Les carbapénèmes feront l'objet du chapitre suivant.



***Les carbapénèmes et les
carbapénémases***

Généralités

Les carbapénémases sont des β -lactamases ayant une activité hydrolytique vis-à-vis des carbapénèmes associés ou non à l'inactivation d'antibiotiques appartenant à la famille des β -lactames. L'émergence de ces enzymes est décrite de façon croissante dans le monde entier et constitue un réel problème pour la santé publique, car ils sont fréquemment impliqués dans les infections tant communautaires, qu'acquises dans les milieux de soins ainsi le fait que les carbapénèmes représentant très souvent les dernières molécules actives de l'arsenal thérapeutique pour combattre les bactéries multi-résistantes. De plus, l'identification des gènes de résistance de ces bactéries sur des plasmides est également une source d'inquiétude puisque cette caractéristique facilite la transmission de cette résistance à d'autres espèces bactériennes.

Les carbapénémases se développent rarement, mais les bactéries qui les portent se propagent facilement. Les classes spécifiques de carbapénémases se retrouvent habituellement le plus couramment dans la zone géographique où elles sont apparues, mais se propagent dans le monde entier, généralement lorsque des patients reçoivent des soins dans un autre pays, mais depuis le signalement des premiers cas de colonisation ou d'infection par des souches de carbapénémases en 2008 (VIM-1 : Vérone intégrons code métallo- β -lactamase) et en 2010 (NDM-1: New Delhi métallo- β -lactamase), un nombre croissant de bactéries productrices de carbapénémases ont été répertoriées. La majorité des patients affectés n'avaient pas séjourné dans des pays décrits comme étant à risque élevé pour l'acquisition de carbapénémases, ce qui montre que ces germes ultras résistants circulent maintenant de façon endémique dans les hôpitaux.

Seule l'étude de l'épidémiologie et du mode de transmission et de détection précoce des souches productrices de carbapénémases permet la mise en place rapide de mesures adéquates de prévention et de contrôle afin de limiter leurs introductions et transmission dans les milieux de soins.[44] [45]

1- Les carbapénèmes

1-1- Généralités et historique

Les carbapénèmes (Figure 0) sont des bêta-lactamines obtenus à partir de *Streptomyces cattleya* possédant un très large spectre antibactérien associé à une grande stabilité envers la quasi-totalité des bêta-lactamases. Elles sont historiquement considérées comme les médicaments de choix pour le traitement des infections graves causées par des bactéries produisant des bêta-lactamases à spectres étendus (BLSE) ou utilisées en dernier recours, lorsque d'autres antibiotiques n'ont pas fonctionnés. Toutes les carbapénèmes sont administrées par injection, à l'exception du tébipénème qui existe sous forme de comprimés.

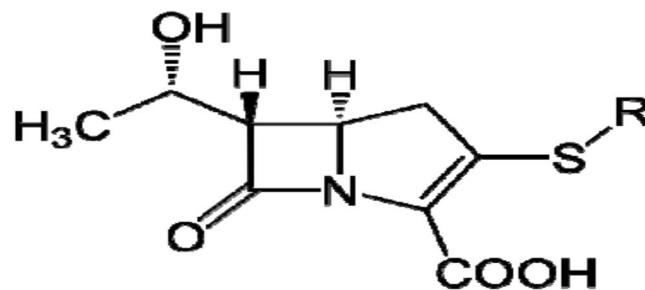


Figure 03 : Squelette de base des carbapénèmes

Quatre molécules sont commercialisées : l'imipénème, le méropénème, l'ertapénème et le doripénème (Figure 04).

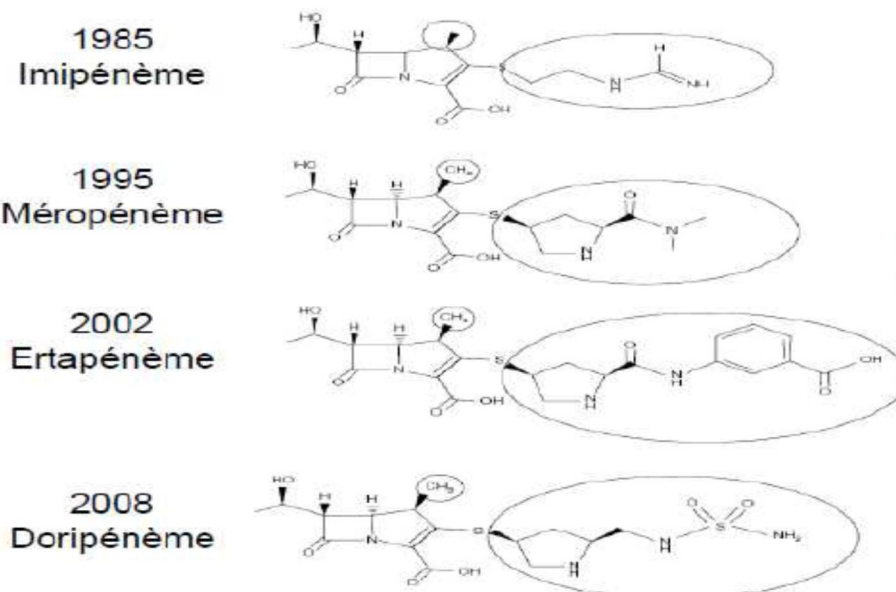


Figure 04 : Structure des carbapénèmes [45]

C'est en 1976 que fut découverte la thiénamycine, produite par *Streptomyces cattleya*. La molécule était instable, ce qui conduisit au développement dans les années 1980 d'un dérivé N-formimidoyl semi-synthétique, l'imipénème. En raison d'une dégradation rapide in vivo par l'adéhydropeptidase rénale humaine (DHP-1), l'imipénème doit être co-administré avec un inhibiteur de cette enzyme, la cilastatine.

L'imipénème possède un quasi-monopole au sein de cette famille en France, alors que le méropénème, apparu environ dix ans plus tard, est largement utilisé dans d'autres pays d'Europe et en Amérique du Nord. Le début des années 2000 a vu l'apparition de nouvelles carbapénèmes : l'ertapénème et le doripénème. [44] [45]

1-2- Classification des carbapénèmes

Certains auteurs ont proposé une classification des différentes carbapénèmes :

Le groupe 1 comprend des molécules à large spectre avec une efficacité limitée sur les bacilles à Gram-négatif non fermentant (ertapénème essentiellement).

Le groupe 2 comprend les molécules ayant une bonne efficacité sur les bacilles à Gram-négatif non fermentant (imipénème, méropénème, doripénème).

Le groupe 3 comprend notamment le composé PZ-601, une carbapénème en cours de développement avec une activité anti-Gram positif, notamment le staphylocoque résistant à la méthicilline. [46] [47]

1-3- Mécanisme d'action

Les carbapénèmes agissent en liant les peptidases bactériennes, les pénicillin binding proteins (PBP) et plus spécifiquement la PBP-2 et la PBP-3, des bacilles Gram négatifs. Ces PBP sont des peptidoglycanes responsables du maintien de la paroi cellulaire. En court-circuitant ce mécanisme, on entraîne un défaut de la paroi cellulaire, qui s'ensuit par une lyse bactérienne. [46] [47]

1-4- Spectre d'action

Les carbapénèmes sont actives sur les bactéries à Gram positif, sauf les staphylocoques résistants à la méthicilline et *Enterococcus faecium* résistant à l'ampicilline.

Les entérobactéries sont très sensibles aux carbapénèmes, y compris les souches productrices de BLSE et les souches productrices de céphalosporinase à haut niveau. L'imipénème, le doripénème et le méropénème ont une activité comparable sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*.

Stenotrophomona maltophilia et, certains isolats de *Clostridium difficile* sont résistants aux carbapénèmes. Initialement, seuls les bacilles à Gram négatif producteur de métallobêta-lactamases, de carbapénèmases de la classe A d'Ambler ou présentant une imperméabilité à l'imipénème pouvant être résistants aux carbapénèmes. Actuellement, l'émergence de bêta-lactamases de classe D possédant un spectre étendu aux carbapénèmes remet en question l'efficacité de ces molécules en clinique. Les carbapénèmases de classe D ont surtout été décrites chez *Acinetobacter baumannii*. [46] [47]

1-5- Utilisation des carbapénèmes

En général, la prescription des carbapénèmes doit être envisagée au dernier recours pour le traitement des infections bactériennes, le tableau 04 ci-dessous énumère les différents cas où l'antibiothérapie nécessite l'utilisation des carbapénèmes. [46] [47]

Tableau 04 : Différents cas où l'antibiothérapie nécessite l'utilisation des carbapénèmes selon *Sanford guide to antimicrobial therapy*. [46] [47]

Syndromes cliniques	Selon le germe (infection sévères)
<ul style="list-style-type: none"> - Infection nosocomiale sévères (pneumonie, sinusite sur une intubation nasotrachéale). - Sepsis d'origine inconnue. - Infection intra abdominales sévères. - Méningites bactériennes. 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Acinetobacter spp.</i> - <i>Pseudomonas aeruginosa.</i> - <i>Alcaligenes spp.</i> <i>Enterobacteries</i> : - <i>Enterobacter spp.</i> - <i>Serratia spp.</i> - <i>Citrobacter spp.</i> - <i>Proteus spp.</i> - <i>Escherichia coli ou klebsiella spp.</i> avec ESBL ou AmpC.

2- Les carbapénèmases

2-1- Généralités et définition

L'usage des antibiotiques de la famille des carbapénèmes s'est répandu au cours des dernières années, notamment pour le traitement d'infections causées par des bactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération.

Tout comme d'autres bactéries, une résistance aux antibiotiques utilisés a été développée. Dans le cas présent, elles ont développé une résistance aux carbapénèmes conférée par la production d'une carbapénèmase. Certains chercheurs ont préféré la nomenclature "enzymes hydrolysant les carbapénèmes" à l'expression "carbapénèmases", suggérant que les carbapénèmes ne sont qu'un segment de leur spectre substrat. Cependant, le terme carbapénèmase s'est retranché dans la littérature β -lactamase et est utilisé tout au long de cette étude.

Actuellement, ces enzymes à capacités hydrolytiques polyvalentes constituent un groupe hétérogène d'enzymes, définies sur la base d'un spectre enzymatique (hydrolyse d'au moins un carbapénème disponible) et non sur une base structurale. Dans presque tous les cas, elles hydrolysent non seulement les agents antimicrobiens de la classe des carbapénèmes, mais aussi les pénicillines (ex : pipéracilline/tazobactam) et les céphalosporines de première, de deuxième et de troisième génération.

Les plus fréquentes sont : KPC (classe A d'Amblar), VIM, IMP, NDM (classe B), OXA-48 et OXA-23 (classe D). Ces enzymes sont retrouvées dans une grande variété d'espèces bactériennes (Entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*).

2-2- Origine des carbapénèmases

La conception des antibiotiques carbapénèmes a été inspirée par la thiénamycine produit naturel, produit par le sol organisme *Streptomyces cattleya*. En fait, les carbapénèmes et les acides olivaniques ont été parmi les plus puissants β -lactamines d'origine naturelle identifiées à partir de diverses sources naturelles dans les premiers programmes de dépistage de produits. En raison de la prévalence de ces molécules dans le sol, il est logique de s'attendre à ce que les enzymes capables de dégrader ces β -lactames seraient produits par des organismes environnementaux tels que *Bacillus cereus* et *Bacillus anthracis*, et que les bactéries caractérisées métallobetalactamases donneraient un avantage sélectif pour la croissance de ces espèces environnementales. Ces carbapénèmases chromosomiques peuvent être évoluées d'abord chez les bactéries comme un mécanisme de protection à leur paroi cellulaire contre des menaces extérieures et peuvent également jouer un rôle dans la régulation de la synthèse de la paroi cellulaire. [48]

2-3- Classification

Dans les premiers travaux de β -lactamases, avant que les gènes aient été clonés et séquencés régulièrement, la méthode de classification de l'enzyme bêta-lactamase impliquait l'analyse biochimique de l'enzyme, la détermination du point isoélectrique, la détermination de l'hydrolyse du substrat, la cinétique enzymatique et les profils d'inhibition. Actuellement la classification des β -lactamases peut être définie en fonction de deux propriétés : fonctionnelle et moléculaire. Il existe plusieurs classes de carbapénèmases. Chaque classe est désignée par un acronyme de trois lettres, par ex : KPC = *Klebsiella pneumoniae* carbapénèmase; NDM = New Delhi métallob- β -lactamases.

2-3-1- Classification fonctionnelle

Ce processus de classification fonctionnelle a évolué pendant de nombreuses années depuis la classification de Karen Bush en 1988 dans un régime largement accepté et divise actuellement les β -lactamases les plus connues en quatre grands groupes fonctionnels (groupes 1 à 4), avec plusieurs sous-groupes du groupe 2 qui sont différenciés selon le groupe spécifique substrat ou un inhibiteur de profils. Dans ce système de classification fonctionnelle, les carbapénèmases se trouvent principalement dans les groupes fonctionnels 2f, 3 et 2d (tableau 5). [49] [50] [51]

Tableau 05 : Classification fonctionnelle des carbapénèmases. [50]

Groupes fonctionnels	Type d'enzyme
2f	NMC
	IMI
	SME
	KPC
	GES
3	IMP
	VIM
	GIM
	SPM
	SPM
2d	OXA

Actuellement, il y a 239 enzymes d'OXA : oxacillinases, dont au moins 9 sont des BLSE et au moins 37 sont des carbapénémases. Ces derniers sont classés comme des sous-groupes 2df dans la classification fonctionnelle. [50]

2-3-2- Classification moléculaire

Ambler et d'autres ont classé les bêta-lactamases en fonction des séquences d'acides aminés en quatre groupes (A à D).

La classe A : pénicillinases de type sérine protéases, inhibées par l'acide clavulanique et le tazobactam.

La classe B : métallo-enzymes, dont le site actif contient un ion zinc, résistantes à l'acide clavulanique, mais inhibées par l'EDTA.

La classe C : céphalosporinases insensibles à l'acide clavulanique, mais inhibées par la cloxacilline.

La classe D : oxacillinases hydrolysant la cloxacilline et peu inhibées par l'acide clavulanique. [50] [51] [48]

2-4- Support moléculaire des gènes

Les vecteurs de la diffusion des carbapénémases peuvent être soit les souches, soit les gènes eux-mêmes. En effet, la plupart des gènes codant pour ces enzymes ont été isolés sur des chromosomes ou sur des structures génétiques mobiles (transposons, plasmides) et/ou de type intégrons, leur conférant un important pouvoir de dissémination.



Matériels et méthodes

1- Objectif

L'émergence des entérobactéries productrices de carbapénèmases (EPC) représente un véritable risque de santé publique. Ces bactéries présentent fréquemment de multiples mécanismes de résistances qui peuvent conduire à une impasse thérapeutique. [52]

Ces carbapénèmases sont identifiées de façon croissante chez les entérobactéries dans le monde entier. Leur détection très difficile (détection des infectés comme des porteurs), expliquerait leur diffusion à bas bruit aux conséquences thérapeutiques dramatiques.

Dans le cadre de la surveillance et de la lutte contre l'émergence et la dissémination des souches d'entérobactéries productrices de carbapénèmases, le laboratoire de bactériologie du Centre Hospitalo-Universitaire de Constantine (CHUC) a réalisé une étude prospective dans différents prélèvements biologiques provenant de différents services dont l'objectif est de déterminer parmi 200 souches d'*E.coli* quelles sont celles qui sont productrices des «carbapénèmases » ainsi que leur profil de résistance aux antibiotiques. [52]

2- L'identification

L'identification est l'étape qui précède toujours l'antibiogramme et elle est prise à partir des cultures pures représentées par des colonies que l'on peut différencier par leur aspect, forme, taille, bord, surface et chromogènes par :

2-1- Examen microscopique (coloration de Gram)

C'est la coloration de base en bactériologie et elle permet une classification des bactéries selon leur structure. Elle est l'un des caractères essentiels de la classification des bactéries. Plusieurs facteurs vont intervenir dans cette coloration :

- La différence de composition chimique de la paroi bactérienne.
- La différence de perméabilité de la paroi bactérienne.

Escherichia coli (entérobactérie) apparait sous la forme de bacille rose. [53]

3- Les tests biochimiques

On pratique une galerie biochimique classique contenant les milieux suivants :

Le milieu TSI (milieu triple sucres), Mannitol-Mobilité, Clark et Lubs, Citrate de Simmons, Urée-indole.

3-1- Préparation de la suspension bactérienne

La préparation de la suspension bactérienne met en jeu le transfert en condition aseptique, d'une colonie bien isolée vers un tube d'eau physiologique stérile.

Cette suspension sert à ensemencer différents milieux de culture en tube permettant ainsi de mettre en évidence les différents caractères biochimiques d'*Escherichia coli*.

L'identification a été réalisée par le test TSI pour différencier entre les espèces dites fermentant ou non-fermentant puis par les galeries d'identification.

3-2- Le test TSI (milieu triple sucres)

- Principe

Ce milieu permet d'étudier la fermentation de trois sucres (glucose, lactose, saccharose), d'apprécier la production ou non de l' H_2S et de noter la production ou non de gaz à partir du glucose.

- Technique

Elle consiste à ensemencer en stries serrés la pente de la gélose puis par piqûre centrale du culot, la lecture se fait après 18h d'incubation à 37°C.

- Lecture

a) Lecture de glucose et du gaz au niveau du culot

-La fermentation du glucose se traduit par le virage au jaune du culot.

-La production de gaz se traduit par la formation ou non de bulles de gaz dans la masse du culot.

b) Lecture de la pente

-La fermentation du glucose et /ou du saccharose se traduit par le virage au jaune de la masse du culot.

c) Production de l'H₂S se traduit par noircissement du milieu.

3-3- Milieu Mannitol-Mobilité

C'est une gélose molle conditionnée en tube et qui permet simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité. On ensemence le milieu par piqûre centrale jusqu'au fond du tube à l'aide d'une anse de platine ou une pipette pasteur. Incubation à 37°C pendant 24h.

- Lecture du mannitol

- Milieu jaune : mannitol +, milieu rouge : mannitol –.

- La mobilité

- Les bactéries mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement en créant un trouble du milieu faiblement gélosé.

- Les bactéries immobiles cultivent uniquement de la piqûre centrale.

3-4- Milieu Clark et Lubs (test RM et VP)

Milieu d'identification qui permet de déterminer les voies de fermentation des glucides :

La fermentation des acides mixtes (par le test RM=Rouge de Méthyle) et la fermentation butanédiolique (par le test VP=Voges-Proskauer).

On ensemence directement le milieu Clark et Lubs. Incubation 37°C pendant 24h, on divise le milieu en deux tubes :

- On rajoute dans le premier 3 à 4 gouttes des réactifs VPI et VPII.

Test VP : milieu rouge : VP + milieu incolore : VP –

- On rajoute dans le deuxième tube quelques gouttes de réactif RM.

Test RM : milieu rouge : RM+ milieu jaune : RM –

3-5- Citrate de Simmons

Ce milieu coulé en tube est utilisé pour l'étude de l'utilisation du citrate comme seule source de carbone, on ensemence le milieu par des stries longitudinales, réalisées à l'anse de platine, à partir d'une suspension bactérienne. Ne pas visser le bouchon à fond afin de permettre les échanges gazeux. Mettre à l'incubation 37°C pendant 24h.

La lecture se fait comme suit :

- Virage de l'indicateur de pH en bleu : il y a eu une alcalinisation du milieu et la souche est citrate de Simmons (+).

- Pas de virage de l'indicateur de pH : il n'y a pas une alcalinisation et le milieu ne présente pas de culture. La souche est citrate de Simmons (-).

3-6- Urée-indole

Le milieu urée-indole ou urée-tryptophane est un milieu synthétique complexe fournissant un ensemble de résultats utiles à l'identification des entérobactéries. Ce milieu contient de l'urée comme seule source de carbone. Elle permet la recherche de trois activités enzymatiques :

L'uréase, le tryptophane désaminase (TDA), et la production d'indole grâce à une tryptophanase. On ensemence directement le tube urée-indole. Incubation 37°C pendant 24h.

La lecture se fait comme suit :

3-6-1- Recherche de l'uréase

Les entérobactéries capables de dégrader l'urée qui est un composé organique et qui peut servir de source d'azote unique aux bactéries possédant une uréase.

Lorsque le milieu est rouge (basique) : uréase (+), lorsqu'il est orange ou jaune uréase (-).

3-6-2- Recherche de la TDA

Répartir le milieu urée-indole dans 2 tubes à hémolyse distincts :

- L'un servira à la recherche de la TDA et l'autre servira pour la recherche de la production d'indole.

- Transférer stérilement à l'aide d'une pipette pasteur 4 gouttes de milieu urée-indole dans un tube à hémolyse, ajouter 2 à 3 gouttes de réactif de TDA.

- Apparition d'un précipité brun rouge : TDA +
- Absence de précipité brun : TDA –

3-6-3- Recherche de l'indole

Certaines bactéries dégradant le tryptophane grâce à une tryptophanase en formant de l'indole, de l'acide pyruvique et de l'ammoniaque dans le milieu restant, ajouter trois gouttes de réactif de Kovacs.

Anneau rouge : indole (+)

Milieu jaune : indole (–)

4- Antibiogramme

Des études ont été faites sur quelques antibiotiques pour tester les souches Ec 01, Ec 02, Ec 03, Ec 04 et Ec 05. Pour déterminer la sensibilité d'*E.coli* vis-à-vis de divers antibiotiques, on utilise l'antibiogramme par diffusion en gélose (méthode des disques) adoptée à l'étude de l'action des antibiotiques sur la croissance des bactéries.

4-1- Milieu de culture

Le milieu utilisé est le Moëller-Hinton coulé dans une boîte de pétri de façon uniforme et jusqu'à une épaisseur de 4mm.

4-2- Les antibiotiques utilisés

Les antibiotiques utilisés sont les suivants :

La bêta-lactamine, la cefoxitine, l'imipénème et l'ertapénème.

4-3-L'ensemencement

A l'aide d'un écouvillon on prélève une colonie à partir d'une suspension (transférer en condition aseptique, d'une colonie bien isolée vers un tube d'eau physiologique stérile) on passe à l'ensemencement qui se fait par des stries serrés et en tournant la boîte de pétri à chaque fois de 60° et ceci trois fois afin d'assurer une bonne distribution des bactéries.

On réalise l'application des disques d'antibiotiques qui sont disposés à équidistance à la surface de la gélose de telle façon que les zones d'inhibitions ne se chevauchent pas, l'opération peut se faire grâce à des distributeurs de disques d'antibiotiques.

Pour obtenir une pré-diffusion des antibiotiques à partir de leurs disques, il est préférable de laisser les boîtes sur la paillasse pendant 30 minutes à la température du laboratoire avant de les placer à l'étuve pendant 24 h à 37°C.



Résultats et Discussion

Résultats

1- Les tests biochimiques

1-1- Coloration de Gram

L'observation microscopique après la coloration de Gram montre la présence des bacilles à Gram négatif colorés en rose.

1-2- Mannitol-Mobilité

Les souches d'*Escherichia coli* ont fermenté le mannitol qui se manifeste par un virage du milieu au jaune.

L'observation d'une culture dans tout le tube signifie que les bactéries ont diffusé dans la totalité du milieu (mobilité +).

Lorsqu'il y a culture uniquement au niveau de la pique centrale (mobilité -).

1-3- Clark et Lubs (tests RM-VP)

L'absence de la couleur rouge révèle que le test VP est négatif par contre si le milieu donne une couleur rose à rouge donc le test VP est positif.

Les souches d'*Escherichia coli*, étaient VP négatif car après ajout des réactifs VP1 et VP2 il n'y a pas eu de réaction.



Figure 05 : Aspect négatif du test VP

Concernant le test RM, les souches d'*Escherichia coli*, étaient RM positif car le milieu est devenu rouge après l'addition du réactif de rouge de méthyle.



Figure 06 : Aspect positif du test RM

1-4- Milieu urée-indole

1-4-1- Recherche d'uréase

Le milieu reste inchangé : couleur orange, test négatif.

Les souches d'*Escherichia coli* sont uréase négative.



Figure 07 : Aspect négatif du test uréase

1-4-2- Recherche d'indole

La présence d'indole se manifeste par un anneau rouge, après addition du réactif de Kovacs.

1-4-3- Recherche de TDA

Absence de précipité brun, absence d'acide indole pyruvique issu de la désamination du Trp ça veut dire que la souche est TDA négatif.

1-5- Milieu TSI

C'est un milieu coulé en pente et en culot, au niveau duquel nous avons recherché 4 caractères :

- La fermentation du lactose sur la pente qui se traduit par virage au jaune.
- La fermentation du saccharose également qui se matérialise par virage au jaune.
- La présence de gaz qui se manifeste par le décollement du culot et/ou la présence de bulles d'air.
- La production de H_2S qui se traduit par une coloration noire.

Les souches d'*Escherichia coli* ont fermenté le lactose ainsi que le saccharose, elles produisent du gaz mais pas du sulfure d'hydrogène H_2S .



Figure 08: Aspect du milieu TSI avec *Escherichia coli*

1-6- Utilisation du citrate

Les souches d'*Escherichia coli* n'utilisent pas le citrate comme seule source de carbone, elles sont citrate négative.



Figure 09 : Aspect du citrate de Simmons avec *Escherichia coli* (-)

2- L'antibiogramme

Les résultats des souches Ec01, Ec02, Ec03, Ec04 et Ec05. 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'un pied à coulisse appliqué le plus près possible de la surface de gélose.

Le diamètre mesuré est comparé à des diamètres critiques de référence :

-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** ».

Tableau10 : Résultats du test d'antibiogramme des souches d'*E.coli*

Antibiotiques	5 Souches d' <i>Escherichia coli</i>
	Phénotype
Bêta-lactamines	R
Cefoxitine	R
Imipénème	S
Ertapénème	R

3- Discussion

Les résultats ont montré que nos souches étaient Gram négatif et oxydase négative, ce qui indique probablement que ce sont des entérobactéries.

De plus, ne possédant pas de désaminase TDA- ce qui exclut les genres *Proteus*, *Morganella* et *Providencia*. Par contre nos souches fermentent le glucose par la voie des acides mixtes RM+ et VP-, ce qui exclut les genres *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia* et *Serratia* (typiquement le groupe des KEHS).

L'identification biochimique a révélé que nos souches d'*E.coli* ont présenté le même profil : mobiles, réduisant les nitrates en nitrites, sont ONPG+, gaz-, H₂S-, citrate-, indole+, mannitol+, RM+, VP-. Ce profil est semblable à celui de la souche de référence (BioMérieux) *E.coli* ATCC 25922 ce qui confirme que nos souches sont bien des *E.coli*.

Pour les températures d'incubation, la température de 44°C a permis d'avoir un bon rendement par rapport à celle de 37°C, probablement à cause de la thermo-tolérance connue d'*E.coli* à cette température.

Les résultats de l'antibiogramme des cinq souches testées ont montré une résistance vis-à-vis des antibiotiques appliqués à savoir les bêta-lactamines, les cefoxitines et les ertapénèmes. Par contre nos souches présentent une sensibilité vis-à-vis de l'imipénème.

La résistance aux bêta-lactamines implique que ces derniers produisent des bêta-lactamases qui les inactivent par hydrolyse du noyau bêta-lactame. Djerfi S. et al. (2013) et Filali et al. (2000) ont montré également cette résistance aux bêta-lactames ce qui est en adéquation avec nos résultats trouvés. [54][55]

Pour la résistance à la cefoxitine, Djerfi et al. (2013) ont trouvé des résultats qui vont à l'encontre des nôtres c'est-à-dire des souches d'*E.coli* sensibles à la cefoxitine. Quant à Serarba et al., ils montrent 20% de résistance des souches d'*E.coli* à la cefoxitine. [54][56]

La résistance à l'ertapénème est tout à fait alarmante vu la discordance avec Boutersa et al. qui ont révélés une sensibilité des souches d'*E.coli* à cette dernière mais confirment la sensibilité des souches vis-à-vis de l'imipénème. [57]

La résistance des souches d'*E.coli* à ces antibiotiques pourrait s'expliquer par l'origine hospitalière de nos souches.

Il faut donc considérer comme suspecte d'EPC toute souche de sensibilité diminuée (I/R) à au moins l'une des carbapénèmes. Nos souches se sont avérées résistantes à l'ertapénème. L'ertapénème est le carbapénème qui possède la meilleure sensibilité pour la détection des EPC. Ainsi nous pouvons considérer nos souches d'*E.coli* comme suspecte d'EPC. [58]

Résistance aux carbapénèmes

La résistance aux carbapénèmes n'est pas systématiquement induite par la production de carbapénèmases. Certaines bactéries Gram négatif peuvent être résistantes aux carbapénèmes par d'autres moyens. Cependant, si une résistance aux carbapénèmes est détectée, ces bactéries doivent être analysées afin de déterminer si elles produisent des carbapénèmases. Chez les entérobactéries : production de céphalosporinase plus perte ou modification des porines.

La résistance peut être due à des mécanismes chromosomiques à l'association de mécanismes de résistances (β -lactamase à spectre étendu [BLSE] et/ou céphalosporinase associée à une perte de la perméabilité membranaire en raison de la perte ou l'altération des porines chez les entérobactéries) ou à la production d'enzymes périplasmiques hydrolysant les carbapénèmes : autrement dit les carbapénèmases. [59] [60]



CONCLUSION

Conclusion

Conclusion

Les entérobactéries productrices de carbapénèmases représentent une nouvelle menace pour la santé publique. Ces souches nécessitent d'être rapidement et efficacement détectées afin de prendre au plus vite les mesures préventives et thérapeutiques appropriées vis à vis des patients qui les hébergent.

Nous ne pouvons pas prédire la vitesse de diffusion de ces producteurs de carbapénèmases et leurs prévalences réelles sont encore inconnues, car de nombreux pays qui sont susceptibles d'être leurs principaux réservoirs n'ont pas établi de protocoles de recherche pour leur détection.

Leur détection peut parfois se révéler difficile mais de nouveaux moyens font peu à peu leur apparition afin de faciliter leur mise en évidence au laboratoire de microbiologie.

Les nouvelles techniques de biologie moléculaire sont des outils puissants et robustes permettant la détection et l'identification des EPC. Dans le futur, la spectrométrie de masse, technique en plein essor en bactériologie, pourrait permettre la détection rapide et à moindre coût de ces enzymes. [65] [66]

La résistance des bactéries aux antibiotiques est une urgence de santé publique, résultat d'une gestion inconsidérée des ressources antibiotiques chez les populations humaine et animale. Elle nous impose de réduire de façon massive nos prescriptions d'antibiotiques, de mettre en place les outils de surveillance permettant de suivre les évolutions de ces résistances afin d'adapter au plus vite nos stratégies diagnostiques et thérapeutiques [67].

Ainsi, l'importance de lutter contre les principaux facteurs de risques tels les séjours en unités de soins intensifs et le port de matériels étrangers (les sondes d'intubation, les sondes vésicales et les cathéters de la voie centrale).



*Références
bibliographiques*

Les Références Bibliographiques

Les Références Bibliographiques

- [01] **Cristian Carip et Al. (2008)**. Microbiologie hygiène-bases microbiologiques de la diététique. Page 76.
- [02] **Zouhdi M. (2012)**. Cours de bactériologie, 3ème année Pharmacie).
- [03] **Joly B, Reynaud A. (2003)**. Entérobactéries : systématique et méthodes de diagnostic (Coll. Monographies de microbiologie).
- [04] **AVRIL J.L DABERNAT H, DENIS F et MONTEIL H. (2000)**. Bactériologie clinique. Paris : Ellipses. Pages 171-177.
- [05] **BIOMERIEUX SA. (2004)**. Api 20 NE Réf. 20 050. Système d'identification des bacilles à Gram négatif. Pages 1-4.
- [06] **AVRIL JL, DABERNAT H, DENIS F et MONTEIL H. (2000)**. Bactériologie clinique. Paris : Ellipses : Page 602.
- [07] **BEN REDJEB S, BEN HASSEN A, HAMMAMI A, KECHRID A**. Epidémiologie des résistances bactériennes en Tunisie, Faculté de médecine Tunis. [En ligne]. www.stmi.org.tn/docs/congfrancomarg/HTML/resbactbenrejeb.html. (Consulté le 09 Avril 2016).
- [08] **FERRON A. (1989)**. Bactériologie médicale à l'usage des étudiants en médecine. La Madeleine : Crouans et Roques : Page 375.
- [09] **FLANDROIS JP. (1997)**. Bactériologie médicale. Lyon : Presse universitaire : Pages 309, 105.
- [10] **NIANDOU MT. (2005)**. Sensibilité et évolution de la résistance des entérobactéries aux antibiotiques. Thèse Pharmacie, Bamako.
- [11] **DIOMAN A. (2008)**. EPIDEMIOLOGIE DES ENTEROBACTERIES PRODUCTRICES DE BETA-LACTAMASES A SPECTRE ELARGI AU CHU DU POINT G. thèse pharmacie, Bamako.
- [12] **BAKHOUM I. (2004)**. Contrôle qualité et validation de différentes microméthodes d'identification bactérienne. Thèse Pharm.N°8.
- [13] **BOSSERT I. D., YOUNG L.Y. (1986)**. Anaerobic oxidation of paracresol by a denitrifying bacterium. Applied and environmental Microbiology. Pages 1117-1122.
- [14] **DRAME B. (2001)**. Microméthode d'identification et d'étude de la sensibilité des entérobactéries : Intérêts thérapeutiques. Thèse Pharm.N° 86. Dakar.

Les Références Bibliographiques

- [15] **LE MINOR L., VERON N. (1989).** Bactériologie Médicale Flam Med. Science, Paris. Pages : 318-333-773-823.
- [16] **NDOYE R. (2004).** Algorithme d'identification des Entérobactéries et des bacilles gram négatifs non fermentaires. Thèse Pharm.N° 83.
- [17] **Djelouat S. (2009).** Les entérobactéries : L'essentiel. [En ligne]. <http://knol.google.com/k/salim-djelouat/mes-knols>. (Consulté le 11 Avril 2016).
- [18] **Entérobactéries A. Decoster, FLM.** [En ligne]. <http://anne.decoستر.free.fr/bgn/enterob.html>. (Consulté le 14 Avril 2016).
- [19] **LE MINOR L, NICOLLE P, BUTTIAUX R , R CHABBERT Y , ET LE MINOR S.** « Studies on Escherichia coli isolated in infantile gastroenteritis». Ann inst Pasteur.
- [20] **LE MINOR L, BUTTIAUX R , GAUDIER B, LE MINOR S, ET NICOLLE P.** « epidemiologic research on gastroenteritis due to Escherichia coli in a Hospital in Northern France .
- [21] **ARIL JL, DABERNAT H DENIS F , MONTEIL H. (1987).** La bactériologie clinique 2^{ème} édition section IV.
- [22] **CristianCarip et Al. (2008).** Microbiologie hygiène-bases microbiologiques de la diététique. page 79.
- [23] **Bergey's manual 2012**
- [24] **JAMES B. KAPER, JAMES P. NATARO, ET HARRY L. T. MOBLEY. (2004)** « pathgenic *Escherichia coli* ». Nat RevMicrobiol. Pages 123-140.
- [25] **Avril J.L., Denis F., Dabernat H., Monteil H. (2000).** *Bacteriologie clinique*. 2^{ème} édition Marketing, paris. Pages 148-280.
- [26] **AVRIL JL, MONTEIL H, DOBERNAT H, DENIS F. (2006).** Bacteriologie clinique. Edition ELLIPSE.
- [27] **FLAUDROIS JP. (2004).** BactérioGéné/croissance bactérienne. Cours de Bactériologie Médical DCEMI, UFR Médecine Lyon Sud-laboratoire de Biométrie .Pages 1-3-10.
- [28] **EDLER L. (2001).** The Role of the biostatistician. Introduction to the clinical Drug Resaerch. Vienna School oh Clinical Drug Resaerch. 22-26. Page 15.
- [29] **LOBRIL JR. (1998).** Réévaluation du modèle de croissance de Monode : effet des antibiotiques sur l'énergie de maintenance. Thèse université de Lyon I France 1998.

Les Références Bibliographiques

- [30] **SURVILLANE E.** Surveillance des infections à *E. coli* entérohémorragiques(EHEC) et du syndrome hémolytique et urémique (SHU) en Europe. DVG Commission des communautés européennes.
- [31] **Classification et mode d'action des antibiotiques, D.MOHAMMEDI** [en ligne]. <http://www.sante.dz/aarn/classification>. (Consulté le 20 Avril 2016).
- [32] **Takpara I., Attolou V., De Souza J., Djimegne F., AlihonouE. (1996).**p 85-86.
- [33] **Eslahpasir J. (1993).** Etude prospective de sensibilité des bacilles Gram négatif en milieu tropical .Thèse de médecine, n° :534.page 131.
- [34] **Shacoori T. Z. (2011).**Résistance bactérienne aux antibiotiques. Laboratoire de Microbiologie pharmaceutique, Université de Renne, France.
- [35] **BergogenB. E. (1998).** Base biologique de l'antithérapie. Edition Masson, Paris p 280.
- [36] **Caillon Jocelyne. (2007).** Lecture et interprétation de l'antibiogramme.
- [37] **FRANCOIS.J, CHOMARAT.M, WEBER.M, GERARD.A. (2003).**De l'antibiogramme à la prescription. BIOMERIEUX, 2ème édition.
- [38] **LE MINOR L., VERON M. (1989).** Bactériologie Médicale Flammarion.
- [39] **YALA D., MERAD A.S., MOHAMEDI D., OUAR-KORICHI M.N. (2001)** Médecine du Maghreb.
- [40] **Toure Fatoumata. (2004).** Résistance aux bêta-lactamines de souches bactérienne isolées d'hémoculture au CHU A.LE DANTEC. Thèse pour obtenir le grade de docteur en pharmacie.
- [41] **Allain P. (2008).** Bêta-lactamines, pénicillines et céphalosporines. Les médicaments. 3ème édition.
- [42] **Hincky-Vitrat Virginie. (2008).** Les céphalosporines de 3ième et 4ième générations. Service de Maladies infectieuses et Tropicales., CHU Grenoble.
- [43] **Cavallo J.D., Fabre R., Jehl F., Rapp C., Garrabé E., 2004.** Bêta-lactamines. EMC-Maladies infectieuses. 1 : 129-202.
- [44] **Institut de veille sanitaire InVS.** Surveillance des infections associées aux soins (IAS) Publié Le 18/10/2010 - Dernière mise à jour le 12/06/2012.
- [45] **Institut national de santé publique du Québec. (Octobre 2010)** Prévention et contrôle de la transmission des entérobactéries productrices de carbapénémases dans les milieux de soins aigus du Québec.

Les Références Bibliographiques

- [46] **Samy FIGUEIREDO. (17 Octobre 2011)** Acinetobacterspp Et réservoir de gènes de carbapénèmases, thèse de doctorat université paris-sud. Pages 5-10.
- [47] **Rémy Gauzit, Yves Péan, Serge Alfandari, Jean Pierre Bru, Jean Pierre Bedos, Christian Rabaud, Jérôme Robert.** Utilisation des carbapénèmes dans les établissements de santé en 2011. Journées Nationales d'Infectiologie, Tours, 14-15 juin 2012.
- [48] **Anne Marie Queenan and Karen Bush. Carbapenemases. (2007).** The Versatile *BETA*Lactamases Clin. Microbiol. Rev.
- [49] **Bush K, Jacoby GA. (2010).** Updated functional classification of β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother . P 969-76.
- [50] **Sridhar Rao P.N Assistant Professor (27 May 2012).** Dept of Microbiology JJMMC Davangere. Carbapenemases and metallo-beta-lactamases).
- [51] **Andres Opazo, Mariana Domínguez, Helia Bello, Sebastian G. B. Amyes², Gerardo González-Rocha. (2012).** OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. J Infect Dev Ctries. P 311-316.
- [52] **MedQual. ENTEROBACTERIES PRODUCTRICES DE CARBAPENEMASES. (2011).** Synthèse des recommandations et des données épidémiologiques.
- [53] **Biotechnologie** The biotechnological site for the future. . [En ligne]. <http://www.technobio.fr/article-16615932.html>. (Consulté le 03 Mail 2016).
- [54] **Djerfi et Al. (2013).** Isolement et identification d'*Escherichia coli* au niveau des eaux usées d'Oued Boumerzoug Chaabat Erssas, etude de la résistance aux antibiotiques ».
- [55] **Filali, B.K et Al. (2000).** Waste water bacterial isolats resultat to heavymetals and antibiotics current microbiology.
- [56] **SERARBA ZAHRA et Al. (2013).** Etude comparative de la résistance aux antibiotiques d'*E.coli* souches isolées des eaux usées des coprocultures et des urines.
- [57] **Dr. Laurent DORTET. (2015).** Identification et antibiorésistance de souches d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae* des infections urinaires à l'aide des moyens classiques et des moyens automatisés.
- [58] **Dr. Laurent DORTET, Dr. Gaëlle Cuzon et Pr. Patrice Nordmann. (2014).** CNR associé de la résistance aux antibiotiques, « Entérobactéries productrices de carbapénèmases ». Hôpital de Bicêtre, Service de Bactériologie-Hygiène.
- [59] **P. Nordmann, A. Carrer. (2010).** Carbapenemases in enterobacteriaceae . Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés. Archives de Pédiatrie. Pages 154-162.

Les Références Bibliographiques

[60] **Lucie Beaudreau, Lise-Andrée Galarneau, Marie Gourdeau. (2010).** Institut national de santé publique du Québec. Prévention et contrôle de la transmission des entérobactéries productrices de carbapénèmases dans les milieux de soins aigus du Québec. Pages (Réf 29031).

[61] **Pfeifer Y, Cullik A, Witte W.(2010).** Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial. *Int J Med Microbiol.* Pages 300-371.

[62] **Nordmann P. (2010).** Résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif. *Med Sci.*

[63] **Nordmann P, Naas T, and Poirel L.(2011).** Global Spread of Carbapenemase producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.*

[64] **P. Nordmann, A.Carrer. (2010).** Les carbapénèmes des Entérobactéries. *Archives de Pédiatrie .* Volume 17.

[65] **Comité sur les infections nosocomiales du Québec (CINQ).(2010).** Prévention et contrôle de la transmission des entérobactéries productrices de carbapénèmases dans les milieux de soins aigus du Québec.

[66] **ANNE BERGER-CARBONNE. (2012).** *Paris.* PL02 – BACTERIES HAUTEMENT RESISTANTES (BHR) MISE EN ŒUVRE. APPLICATION DES RECOMMANDATIONS. XXIIIe Congrès national de la SF2H – LILLE.

[67] **Centers for Disease Control and Prevention. (2009).** Guidance for Control of Infections with Carbapenem-Resistant or CarbapenemaseProducing. Enterobacteriaceae in Acute Care Facilities. *MMWR*, 58(10):256-260. [En ligne].

<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5810a4.html>. (Consulté le 16 Mail 2016).



ANNEXES

ANNEXE

Annexe 1 : Matériels et Milieux de culture

➤ Matériels utilisés

- Etuves à 37°C et 44°C
- Portoirs
- Anse de platine
- Pince
- Four pasteur
- Bain marie
- Tubes à essais stériles
- Flacons
- Boîtes de pétri
- Distributeurs d'antibiotiques
- Les lames et lamelles
- Pipettes pasteur
- Ecouillons
- Microscope électronique

➤ Milieux de culture utilisés

- L'eau peptonée
- Milieu BCP
- Gélose nutritive
- Gélose Moëller-Hinton
- Bouillon nutritif
- Milieux Mannitol-mobilité
- Milieux Citrate de Simmons
- Disques d'antibiotiques

ANNEXE

- Disques d'ONPG
- Milieux Clarks et Lubs
- Milieux Moëller (témoin, ODC, LDC, ADH)
- Eau distillée stérile
- Milieu Urée-Indole
- Huile de vaseline stérile

➤ Réactifs

- Kovacs
- Rouge de méthyle
- VP 1 Alpha naphthol à 6%
- VP 2 KOH à 40%
- Réactif de TDA solution de per chlorure de fer

ANNEXE

Annexe 2 : Composition des milieux de culture (g/l)

Milieu BCP

Peptone.....	5
Extrait de viande.....	3
Lactose.....	10
Agar.....	15
Poupre bromocrésol.....	0.025

pH=7

Milieu Mannitol-mobilité

Peptone	20
Nitrate de K.....	1
Mannitol.....	2
Rouge de phénol à 1%.....	4ml
Agar.....	4

pH=8.1

Milieu Clarck et Lubs

Peptone.....	10
Phosphate dipotassique.....	2
Glucose.....	5

pH=7

Milieu Citrate de Simmons

Sulfate de Mg.....	0.2
Phosphate mono ammoniac.....	1
Phosphate dipotassique.....	1
Citrate de Na.....	2

ANNEXE

NaCl.....	5
Bleu de bromothymol.....	80mg
Agar.....	12

pH=6.8

Milieu Urée-Indole (g/l)

Peptone.....	20
Nitrate de K.....	1
Mannitol.....	2
Rouge de phénol à 1%.....	4ml
Agar.....	4

pH=8.1

Milieu Moëller

Peptone.....	5
Extrait de viande.....	5
BCP.....	0.1
Rouge de crésol.....	5mg
Pyridoxal.....	5mg
Glucose.....	0.5

pH=6