

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE BLIDA 1



FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE.
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

MEMOIRE DE MASTER EN BIOLOGIE.
OPTION: MICROBIOLOGIE/ BACTERIOLOGIE
THEME

**Etude de l'antibiorésistance et de la résistance à
l'effet bactéricide du sérum humain
d'entérobactéries isolées de divers prélèvements
biologiques au niveau de l'hôpital FABOR à Blida.**

Présenté par

M^r KOSSOKO K. Nadjib

Devant le jury:

| | | | |
|---------------------|----------------------|-----|------|
| Président | BENYAHIA N. | MAA | USDB |
| Promotrice | AISSANI-EL FERTAS R. | MAA | USDB |
| Examinatrice | CHERRALLAH A. | MAA | USDB |
| Examineur | RAHIM I. | MAA | USDB |

Année académique 2013/2014

REMERCIEMENT

Au terme de ce travail, je voudrais sincèrement remercier Madame El Fertas-Aissani R. pour avoir accepté de m'encadrer et de m'orienter tout au cours de ce travail et surtout pour la grande patience dont elle a toujours fait preuve.

Je remercie également les membres du jury qui ont accepté d'examiner ce travail notamment:

Mr Benyahia N.

Madame Cherrallah A.

Madame Rahim I.

A tous les enseignants du département de biologie pour la formation qu'ils m'ont fourni durant ces années d'étude.

A tout le personnel du laboratoire de l'hôpital FABOR de Blida en particulier au Dr TACHET H. et AMEL.

Enfin à tous ceux et celles qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail : ADEHAN W. ; CAKPO B. ; OUEDRAOGO E. ; GANAME A. ; NANA O. ; SANGARE M. et ... qui n'ont cessé de m'encourager indirectement.

DÉDICACE

Ce travail est en premier dédié à mon défunt père et à ma mère sans qui je ne serai surement pas arrivé au bout de ce tunnel, à mes 04 sœurs bien aimées Nawal, Nabigath, Nasrya et Nadjath, enfin à mes oncles Mr BOUSSARI ; El Hadj YEKINI et Mr ILBOUDO P.

LISTE DES TABLEAUX

| N° Ordre | Intitulé | Page |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| I | Principaux caractères biochimiques d'Escherichia coli | 4 |
| II | Principaux caractères biochimiques de Klebsiella pneumoniae | 8 |
| III | Classification des β -lactamases | 14 |
| IV | Résultat des tests de mise en évidence de l'uréase, de la tryptophane désaminase et de la tryptophanase | 28 |
| V | les antibiotiques utilisés pour le test d'antibiogramme | 30 |
| VI | Répartition des entérobactéries isolées des prélèvements | 33 |
| VII | Répartition des souches BLSE et non BLSE d' <i>E. coli</i> et de <i>K. pneumoniae</i> . | 41 |
| VIII | Profils de résistance aux antibiotiques des souches BLSE d' <i>E. coli</i> et de <i>K. pneumoniae</i> | 42 |
| IX | Les différents types de profil de résistance des souches BLSE | 43 |
| X | Résultat du test de sensibilité à l'effet bactéricide du sérum humain | 45 |

LISTE DES FIGURES

| N° Ordre | Intitulé | Page |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| 01 | Caractéristique des six pathotypes d' <i>Escherichia coli</i> des infections gastro-intestinales | 5 |
| 02 | Propriétés potentielles de virulence des souches invasives d' <i>E. coli</i> | 5 |
| 03 | Principaux facteurs de virulence exprimés par <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 8 |
| 04 | Structures de base de classification des différents groupes de β -lactamines | 11 |
| 05 | Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle β -lactame | 13 |
| 06 | schéma de la cascade du complément | 17 |
| 07 | activation du complément par les voies classiques et alternes | 18 |
| 08 | Répartition des prélèvements reçus au laboratoire selon leur origine | 32 |
| 09 | résultats de l'antibiogramme des souches de <i>E. coli</i> et de <i>K. pneumoniae</i> | 36 |
| 10 | Image de synergie d'une BLSE : <i>Escherichia coli</i> | 41 |
| 11 | Image de synergie d'une BLSE: <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 41 |
| 12 | image de sensibilité au sérum humaine: souche d' <i>Escherichia coli</i> | 45 |
| 13 | Image de résistance au sérum humain: souche de <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 45 |

ABREVIATION

ADH: Arginine dihydrolase.

ADN : Acide désoxyribonucléique

API : Analytique profil index.

ATB : Antibiotique.

BGT : Bouillon glucosé tamponné.

BHIB : Bouillon cœur cerveau.

BLSE : Béta-Lactamase à Spectre Elargie.

CTX-M : Céfotaximase Munich

C1G : Céphalosporine de 1^{ère} génération

C2G : Céphalosporine de 2^{ème} génération

C3G : Céphalosporine de 3^{ème} génération

C4G : Céphalosporine de 4^{ème} génération

D.ala : D-alanine

D O: Densité Optique

E.c : *Escherichia coli*

EDTA: ethylenediamintetraacetic acid

GES: Guyana Extended-Spectrum β - lactamase

IND: Indole.

K.p: *Klebsiella pneumoniae*

LDC: Lysine Décarboxylase.

LPS : Lypo-polysaccharide

MH: Muller-Hinton.

mm: Milli-mètre

ODC: Ornithine Decarboxylase.

ONPG: Ortho-Nitro-Phényl-Galactosidase.

RM: Rouge de Méthyle.

Spp: espèce

TDA: Tryptophane Désaminase.

TSI: Triple Sugar Iron.

VEB : Vietnam Extended-spectrum β - lactamase

VP: Voges proskauer.

MATERIEL ET METHODE

GENERALITE

RESULTATS ET DISCUSSION

ANNEXE

CONCLUSION

RESUME :

L'objectif de notre étude est de déterminer la prévalence et la résistance aux antibiotiques des espèces d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae* isolées de divers prélèvements, d'en déterminer la mise en évidence des souches productrices de Béta-lactamases à spectre élargi (BLSE) et de tester la résistance de ces derniers à l'effet bactéricide du sérum humain. L'étude a porté sur 279 prélèvements reçus au laboratoire, dans lequel ont été isolé 137 souches d'entérobactéries dont 57% d'*Escherichia coli* et 22% de *Klebsiella pneumoniae*. Ces souches ont montré une résistance à l'amoxicilline (AMX) [64% E.coli ; 50% K. pneumoniae] , à l'association amoxicilline-acide clavulanique [32% E. coli ; 40% K. pneumoniae] (AMC) et une sensibilité total (100%) à l'imipénème, à la céfoxitine (céphamycine) et à la nétilmicine. De ces isolats de *E. coli* et de *K. pneumoniae*, 35 (32%) souches sont productrices de BLSE, 23 *E.coli* et 12 *K. pneumoniae*, des souches qui se sont avérées multirésistantes à plusieurs familles d'antibiotique. Les résultats des tests de sensibilité au sérum humain de ces souches BLSE ont montré une résistance de 73,91% (5 souches) pour les *E. coli* et de 100% pour les *K. pneumoniae*. La résistance de ces souches BLSE au sérum humain est un donné grave pour la clinique des infections dues à ces germes qui pourrait évoluer vers une bactériémie ou une septicémie.

Mots clés : *Escherichia coli*, *K. pneumoniae*, Béta-lactamase à spectre élargi, effet bactéricide du sérum humain

Summary :

The objective of our study is to determine the prevalence and the resistance to the antibiotics of the species of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated of various withdrawals, to determine the percentage of the original producers of it of Extended-Spectrum Beta-lactamases (ESBL) and to test the resistance of these last to the bactericidal effect of the human serum. The study was about 279 withdrawals received to the laboratory, in which has been isolated 137 stumps of enterobacteria of which 57% of *Escherichia coli* and 22% of *Klebsiella pneumoniae*. These stumps showed a resistance to the amoxicilline (AMX) [64% *E.coli*; 50% *K. pneumoniae*], to the association amoxiciline-acidic clavulanique [32% *E. coli*; 40% *K. pneumoniae*] (AMC) and a sensitivity total (100%) to the imipeneme, to the cefoxitine (cephamycine) and to the netilmicine. Of these isolats of *E. coli* and of *K. pneumoniae*, 35 (32%) stumps are producers of BLSE, 23 *E.coli* and 12 *K. pneumoniae*, of the stumps that proved to be multi resistant to several families of antibiotic. The results of the sensitivity tests to the serum human of this original ESBL showed a resistance of 73,91% (5 stumps) for the *E. coli* and of 100% for the *K. pneumoniae*. The resistance of this original ESBL to the human serum is a given serious for the clinic of the infections due to these germs that could evolve toward a bacteremia or a septicemia.

Key words: *Escherichia coli*, *K. pneumoniae*, Extended-Spectrum Beta-lactamase, bactericidal effect of the human serum

ملخص

كان الهدف من دراستنا لتحديد مدى انتشار مقاومة مضادات الميكروبات والقولونية والكلبسيلا الرئوية الأنواع المعزولة من واختبار مقاومة هذا الأخير إلى تأثير (ESBL) عينات مختلفة، لتحديد وتحديد السلالات المنتجة للبيتا لكتام تمديد الطيف % 57 سلالة من 137 العينات الواردة في المختبر، والتي تم عزل 279 وشملت الدراسة. مبيد للجراثيم من مصل الإنسان (AMX) وكانت هذه السلالات مقاومة للأموكسيسيلين. القولونية و 22% من الكلبسيلا الرئوية *enterobacteria* من (AMC) [الرئوية K. 40% كولايا؛ 32] إلى أموكسيسيلين حمض الكلافولانيك [الرئوية K. 50% كولايا؛ 64] 35 الرئوية، K. من هذه العزلات كولايا و. ونيتيلميسين (سيفاميسين) لالاميبينيم، سيفوكسيتين (100%) وحساسية الإجمالي الرئوية كولايا، والسلالات التي أثبتت أن الأسرة المضادات. ك 12 و 23 و ESBL من سلالات المنتجة لل (32%) *ESBL* 73.91% وأظهرت نتائج الاختبار لحساسية مصل الإنسان من هذه السلالات المقاومة. *multiresistant* الحيوية مصل الإنسان العدوى *ESBL* ونظرا للمقاومة هذه السلالات. الرئوية K. لل 100 والإشريكية القولونية (سلالات 5) السريرية خطيرة بسبب هذه الكائنات الدقيقة التي يمكن أن تؤدي إلى تجرثم الدم أو إنتان الرئوية، بيتا اكتاماز تمديد الطيف تأثير مبيد للجراثيم من مصل الإنسان K. القولونية،: الكلمات الرئيسية

SOMMAIRE

| | |
|---------------------------|---|
| Introduction | 1 |
|---------------------------|---|

Généralité

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I. Entérobactérie..... | 2 |
| I.1 <i>Escherichia coli</i> | 2 |
| I.1.1 Caractéristique bactériologique | 3 |
| I.1.2 Pouvoir pathogène..... | 3 |
| I.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 6 |
| I.2.1 Caractère bactériologique..... | 6 |
| I.2.2 Pouvoir pathogène..... | 6 |
| II. Résistance des entérobactéries aux antibiotiques et β -lactamase à spectre élargi..... | 9 |
| II.1. Support de la résistance aux antibiotiques..... | 9 |
| II.2. Les β -lactamines..... | 10 |
| II.2.1. Structure des β -lactamines | 10 |
| II.2.2. Mode d'action des β -lactamines | 11 |
| II.3. Les β -lactamases | 12 |
| II.3.1. Mode d'action..... | 12 |
| II.3.2. Classification..... | 12 |
| III. Virulence des entérobactéries..... | 14 |
| III.1 Système du complément..... | 15 |
| III.1.2. Activation du système du complément..... | 15 |
| III.1.3. Rôle du système du complément dans la défense anti-infectieuse..... | 16 |
| III.2. Résistance au système du complément..... | 19 |

Matériel et méthodes

| | |
|-----------------------------------|----|
| I. Matériel | 20 |
| I.1. Matériel biologique | 20 |
| I.2. Matériel non biologique..... | 20 |
| II. Méthodes..... | 21 |
| II.1. Prélèvements..... | 21 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| II.2. Examen cyto bactériologique de l'Urine (ECBU)..... | 22 |
| II.2.1 Examen macroscopique..... | 22 |
| II.2.2 Examen microscopique : examen direct à l'état frais..... | 22 |
| II.2.3 Uroculture..... | 22 |
| II.3 Examen cyto bactériologique du pus..... | 22 |
| II.3.1 Examen macroscopique..... | 22 |
| II.3.2 Coloration au bleu de méthylène..... | 23 |
| II.3.3 Mise en culture..... | 23 |
| II.4. Identification des bactéries | 24 |
| II.4.1 Coloration de Gram..... | 24 |
| II.4.3 Identification par les galeries classiques..... | 24 |
| II.4.4. Les galeries API 20 ^E | 28 |
| II.5 Antibio gramme..... | 29 |
| II.6 Recherche de β -lactamases à spectre élargi (BLSE)..... | 30 |
| II.6.1 Test de synergie..... | 30 |
| II.6.2. Test de confirmation de double disque..... | 31 |
| II.7. Test de sensibilité au sérum humain | 31 |

Résultats et discussion

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I. Etude des prélèvements biologiques..... | 32 |
| I.1. Répartition des prélèvements selon l'origine..... | 32 |
| I.2. Répartition des bactéries isolées des prélèvements..... | 33 |
| I.3. Répartition des entérobactéries isolées..... | 33 |
| II. Etude de l'antibio-résistance des souches d' <i>E. coli</i> et de <i>K. pneumoniae</i> | 36 |
| II.1. Résistance aux β -lactamines | 38 |
| II.2. Etude de la résistance au quinolone/fluoroquinolone..... | 39 |
| III. Etude des souches productrices de β -lactamases à spectre élargi..... | 40 |
| IV. Etude de la sensibilité au système du complément..... | 44 |

| | |
|-------------------------|----|
| Conclusion | 48 |
|-------------------------|----|

Références bibliographiques

ANNEXES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Malgrange D, Leutenegger M. Le pied diabétique. In : Le généraliste et le diabétique non insulinodépendant. Paris : Éd. Frison-Roche, 1995 : 291-304.
- Richard JL. Le pied diabétique : le point de vue du diabétologue. Sang Thromb Vaiss 1995 ; 7 : 557-65.
- Bertin, E., M. Leutenegger (1999). Physiopathologie du pied diabétique et de ses complications. Sang Thrombose Vaisseaux. Volume 11, Numéro 1, 30-7, Janvier 1999, Mini-revues.
- Caputo GM, Cavanagh PR, Ulbrecht JS, Gibbons GW, Karchmer AW. Assessment and management of foot disease in patients with diabetes. N Engl J Med 1994 ; 331 : 854-60.
- Got, I. (1999). Physiopathologie du pied diabétique et problèmes diagnostiques. Revue de l'ACOMEN. vol.5, n°4.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Kobayashi, G. S., Pfaller, M. A (2002). Medical Microbiology, fourth edition, Mosby USA.
- Lennette, E. H., Balows, A., Hausler, W. J., Shadomy, H. J. (1985). Manual of clinical microbiology, fourth edition, American Society for Microbiology, Washington DC.
- Binns, M. M., J. Mayden et R. P. Levine (1982). Further characterization of complement resistance conferred on Escherichia coli by the plasmid genes traT of R100 and iss of ColV, I-K94. Infect. Immun. 35: 654-659.
- Achtman, M., N. Kennedy et R. Skurray (1977). Cell-cell interactions in conjugating Escherichia coli: Role of traT protein in surface exclusion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 5104-5108.
- Fluit, A. C. (2005). Towards more virulent and antibiotic-resistant Salmonella. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 43: 1-11.
- Heffernan, E. J., L. Wu, J. Louie, S. Okamoto, J. Fierer, et D. G. Guiney (1994). Specificity of the complement resistance and cell association phenotypes encoded by the outer membrane protein genes rck from Salmonella typhimurium and ail from Yersinia enterocolitica. Infect. Immun. 62: 5183-5186.
- Fang, C. T., Y. P. Chuang, C. T. Shun, S. C. Chang et J. T. Wang (2004). A novel virulence gene in Klebsiella pneumoniae strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. J. Exp. Med. 697-705.

- Fang, C.T., S. Y. Lai, W. C. Yi, P. R. Hsueh, K. L. Liu et S. C. Chang (2007). *Klebsiella pneumoniae* genotype K1; an emerging pathogen that causes septic ocular or central nervous system complication from pyogenic liver abscess. *Clin. Infect. Dis.* 45: 284-293.
- Lai, Y. C., H. L. Peng et H. Y. Chang (2003). RmpA2, an activator of capsule biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* CG43, regulates K2 cps gene expression at the transcriptional level. *J. Bacteriol.* 185: 788-800.
- Mainil, J. (2003a). Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* : Les adhésines et facteurs de colonisation. *Ann. Méd. Vét.* 147 : 105-126.
- Mainil, J. (2003b). Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* : Franchissement des muqueuses et propriétés invasives. *Ann. Méd. Vét.* 47 : 159-171.
- Mainil, J. (2005). Bactériologie générale. www2.ulg.ac.be/fmv/bacterio3c02.doc.
- Moll, A., P. A. Manning et K. N. Timmis (1980). Plasmid-determined resistance to serum bactericidal activity: a major outer membrane protein, the traT gene product, is responsible for plasmid-specified serum resistance in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 28: 359-367.
- Nassif, X. et P. J. Sansonetti (1986). Correlation of the Virulence of *Klebsiella pneumoniae* KI and K2 with the Presence of a Plasmid Encoding Aerobactin. *Infect Immun.* 54: 603-608.
- Nassif, X., J. M. Fournier, J. Arondel et P. J. Sansonetti (1989). Mucoid phenotype of *Klebsiella pneumoniae* is a plasmid-encoded virulence factor. *Infect. Immun.* 57: 546-552.
- Chen, Y. T., H. Y. Chang, Y.C. Lai, C. C. Pan, S.F. Tsai et H. L. Peng (2004). Sequencing and analysis of the large virulence plasmide pLVPK of *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Gene.* 337: 189-198.
- Alvarez, D., S. Merino, J. M. Tomas, V. J. Benedi et S. Alberti (2000). Capsular polysaccharide is a major complement resistance factor in lipopolysaccharide O side chain-deficient *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Infect. Immun.* 68: 953-955.
- Merino, S., S. Camprubi, S. Alberti, V.J. Benedi et J.M. Tomas (1992). Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. *Infect. Immun.* 60: 2529-2535.
- Tomas, J.M., V. J. Benedi, B. Ciurana et J. Jofre (1986). Role of capsule and O antigen in resistance of *Klebsiella pneumoniae* to serum bactericidal activity. *Infect. Immun.* 54: 85-89.
- Alberti, S., G. Marqués, S. Camprubi, S. Merini, J. M. Tomas, F. Vivanco et V. J. Benedi (1993). C1q binding and activation of the complement classical pathway by *Klebsiella pneumoniae* outer membrane proteins. *Infect. Immun.* 61: 852-860.

- Alberti, S., D. Alvarez, S. Merino, M. T. Cascado, F. Vivanco, J. M. Tomas et V. S. S. J. Benedi (1996). Analysis of complement C3 deposition and degradation on *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 64: 4726-4732.
- Ciurana, B. et J. M. Tomas (1987). Role of lipopolysaccharide and complement in susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* to nonimmune serum. *Infect. Immun.* 55: 2741-2746.
- Podschun, R. et U. Ullmann (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 589-603.
- Podschun, R., A. Fisher et U. Ullmann (2000). Expression of putative virulence factors by clinical isolates of *Klebsiella planticola*. *J. Med. Microbiol.* 49: 115-119.
- Sahly, H., H. Aucken, V. J. Benedí, C. Forestier, V. Fussing, D. S. Hansen, I. Ofek, R. Podschun, D. Sirot, J. M. Tomás, D. Sandvang, et U. Ullmann (2004). Increased serum resistance in *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 48: 3477-3482.
- Taylor, P.W. (1983). Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 47: 46-83.
- Benge GR. Bactericidal activity of human serum against strains of *Klebsiella* from different sources. *J Med Microbiol* 1988;27:11–5.
- Kaper, J. B., J. G. Morris, Jr., and M. M. Levine. 1995. Cholera. *Clin Microbiol Rev* 8:48-86.
- Bentley, R., and R. Meganathan. 1982. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) III bacteria. *Microbiol Rev* 46:241-280.
- Gyles, C. L. 1994. *Escherichia coli* enterotoxins, pp. 337-367. In C. L. Gyles (Ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans, CAB International, Guelph, Canada.
- Levine, M. M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* 155:377-389.
- Van Bost, S., J. Mainil (2003). Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* : Production de toxines. *Ann. Méd. Vét.* 147 : 327-342.
- Brisse, S., F. Grimont et P. A. D. Grimont (2006). The Genus *Klebsiella*. *Prokaryotes*. 6: 159-196.
- Ørskov, I. 1974. *Klebsiella*. In: R. E. Buchanan and N. E. Gibbons (Eds.) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams and Wilkins. Baltimore, MD. 321–324.

- Gordon, D. M., and F. FitzGibbon. 1999. The distribution of enteric bacteria from Australian mammals: Host and geographical effects. *Microbiology* 145:2663–2671.
- Dillon, R. J., C. T. Vennard, and A. K. Charnley. 2002. A note: Gut bacteria produce components of a locust cohesion pheromone. *J. Appl. Microbiol.* 92(4):759–763.
- Roberts, D. E., H. M. McClain, D. S. Hansen, P. Currin, and E. W. Howerth. 2000. An outbreak of *Klebsiella pneumoniae* infection in dogs with severe enteritis and septicemia. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12(2):168–173.
- Wilson, R. B. 1994. Hepatic hemosiderosis and *Klebsiella* bacteremia in a green aracari (*Pteroglossus viridis*). *Avian Dis.* 38(3):679–681.

INTRODUCTION

INTRODUCTION :

Depuis l'avènement des antibiotiques, le taux de bactéries résistant aux antibiotiques n'a cessé d'augmenter. De nos jours, certaines souches bactériennes sont multi-résistantes et posent un véritable problème de santé publique. Parmi ces bactéries multi résistantes, on distingue celles qui sécrètent des β -Lactamases à Spectre Elargie (BLSE), des enzymes capables d'inactiver les antibiotiques de la famille des β -Lactamines.

Les entérobactéries représentent les bacilles à Gram négatifs les plus isolés en infection humaine, elles provoquent 30 à 35% des septicémies et plus de 70% des infections urinaires et certaines infections intestinales (**Murray et al., 2002**). Certaines souches de ces entérobactéries sont sécrétrices de BLSE dont les prédominantes sont *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*. (**Cavallo et al. 2004**).

Une association entre des propriétés de résistance aux antibiotiques et l'expression de nombreux facteurs de virulence, est souvent observée chez les souches responsables d'infections profondes. La capacité des germes pathogènes à provoquer une bactériémie, étape ultime avant l'infection systémique, est surtout liée à leur pouvoir d'échappement au sérum humain, principalement représenté par les effecteurs du système immunitaire inné dont les protéines du système du complément (**Regnault, 2002**).

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un master en Microbiologie/Bactériologie. Nous avons entrepris d'étudier le profil de résistance aux antibiotiques d'entérobactéries, isolées de différents prélèvements biologiques et de déterminer la susceptibilité de ces souches vis-à-vis du sérum humain. Cette étude présente un intérêt épidémiologique, clinique et biologique ; elle nous permet d'évaluer la prévalence des souches multi-résistantes au sein de l'environnement hospitalier, de prédire l'évolution clinique de l'infection et d'orienter sur les propriétés de virulence portées par une bactérie.

GENERALITE

I. Entérobactéries

La famille des *Enterobacteriaceae* représente le groupe le plus grand et le plus hétérogène des bacilles à Gram négatif d'intérêt médical. Un total de 32 genres et plus de 130 espèces ont été décrits, en se basant sur les propriétés biochimiques, antigénique, l'hybridation des acides nucléiques et le séquençage. Malgré la complexité de cette famille, moins de 20 espèces sont responsables de plus de 95% des infections (**Murray et al., 2002**).

Les entérobactéries sont des organismes ubiquitaires, largement distribués dans le sol, l'eau, la végétation et font parti de la flore intestinal de la plus part des animaux à sang chaud incluant l'homme (**Murray et al., 2002 ; Lenette et al., 1985**). Diverses maladies humaines sont causées par les entérobactéries, dont 30 à 35% des septicémies, plus de 70% des infections urinaires et certaines infections intestinales. Cette famille regroupe les germes qui sont toujours associés à des maladies (*Salmonella typhi*, les espèces de *Shigela*, *Yersinia pestis*), les organismes qui font parti de la flore commensale normal, mais qui peuvent causer des infections opportuniste, quant les défenses des patients sont compromises (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*), et les organismes commensaux qui deviennent pathogéniques après acquisition de gènes de virulence (*Escherichia coli* dans les gastroentérites) (**Murray et al., 2002**).

I. 1. Escherichia coli

Escherichia coli est le microorganisme le plus étudié et le plus couramment utilisé en recherche fondamentale, dont le nom a été donné par Castellani et Chambers en 1919, en hommage à Théodore Escherich. Ce dernier a mis en évidence la présence du coccobacille, dans la flore fécale commensale d'un nourrisson en 1885. *E. coli* est le bacille à Gram-négatif le plus répandu dans la flore commensale de l'homme et des animaux à sang chaud (les mammifères et les oiseaux) (**Gyles, 1994**). En effet, dès la naissance, *E. coli* colonise rapidement la peau et les muqueuses de l'hôte et empêche, de ce fait, la colonisation par des bactéries pathogènes (**Kaper et al., 2004**). De plus, l'hôte bénéficie également de la production de certaines enzymes nécessaires dans le métabolisme d'hormones ainsi que dans la synthèse de certaines vitamines (vitamines K, B5, B6 et la biotine) (**Bentley et Meganathan, 1982 ; Savage, 1986**).

GENERALITES

Cependant, *E. coli* peut être potentiellement pathogène, particulièrement, quand les défenses de l'hôte sont affaiblies par des infections (bactériennes ou virales) ou des traitements immunodépresseurs (traitements contre le rejet de greffe ou chimiothérapie). Le sevrage et les changements de régime alimentaire sont également des événements qui perturbent la flore intestinale et peuvent entraîner une colibacillose (Nagy et Fekete, 2005).

I. 1. 1. Caractéristique bactériologique

Escherichia coli pousse aisément sur milieux ordinaire avec température optimale de croissance est de 35 à 37 °C. L'aspect de colonies sur gélose nutritives est florissant, de 1 à 3 mm de diamètre bombée, lisse et brillante (Bidet et Bingen, 2007). Les principaux caractères biochimiques des *E.coli* sont résumés dans le tableau I.

I. 1. 2. Pouvoir pathogène

L'espèce *Escherichia coli* est subdivisée en de nombreuses souches pathogènes, pour l'homme et les animaux sur la base de la possession de propriétés ou de la production de facteurs spécifiques. Ces souches pathogènes sont classiquement divisées en souches à tropisme intestinal et en souches à tropisme extra-intestinal (uropathogènes et invasives). Les souches invasives provoquent des septicémies et/ou des bactériémies avec localisations dans différents organes (infections systémiques) (Mainil et Van Bost, 2004).

Les *E. coli* responsables d'infections gastro-intestinales sont divisées en six classes: *E. coli* entéropathogènes (EPEC), *E. coli* produisant des toxines Shiga (STEC), *E. coli* entéroaggrégatives (EAEC), *E. coli* entéroinvasives (EIEC), *E. coli* à adhérence diffuse (DAEC) et *E. coli* entérotoxigènes (ETEC). Chaque classe présente des caractéristiques qui lui sont propres (Figure 1 et 2) (Levine, 1987 ; Kaper et al., 2004).

Les propriétés de virulence permettent aux souches invasives d'*E. coli* de réaliser les quatre étapes suivantes dans leur relation avec l'hôte afin de pouvoir véritablement exercer leur pouvoir pathogène (Mainil, 2003a ; 2003b; Van Bost et Mainil, 2003), à savoir :

- ✓ la colonisation des surfaces muqueuses ;
- ✓ le franchissement de ces muqueuses ;
- ✓ la résistance aux défenses internes de l'organisme ;
- ✓ la production d'un effet toxique.

GENERALITES

Cependant, toutes les souches invasives d'*E. coli* ne possèdent pas l'information génétique leur permettant de réaliser ces quatre étapes. Parfois, l'une des deux propriétés principales associées à la survie aux défenses internes (production d'un sidérophore, résistance au pouvoir bactéricide du complément) de l'hôte sera même absente. Selon leur pathotype, ces souches invasives seront donc plus ou moins pathogènes, utiliseront l'une ou l'autre porte d'entrée dans la circulation sanguine (intestin, amygdales, voire trachée), persisteront dans le sang et/ou les organes internes (poumons, rate, foie, reins, cerveau, articulations...), auront une action toxique directe (exotoxines) ou indirecte *via* la réaction inflammatoire ou les réponses immunes (endotoxine, antigènes de surface, superantigènes) (Mainil et Van Bost, 2004).

Tableau I: principaux caractères biochimiques d'*Escherichia coli* (Freney et al., 2006)

| REACTION DE DIAGNOSTIQUE | RESULTAT |
|--------------------------|----------|
| H2S (TSI) | - |
| Uréase | - |
| VP | - |
| Indole | + |
| Gaz sur glucose | + |
| Lactose | + |
| ONPG | + |
| Mannitol | + |
| Sorbitol | + |
| Citrate de Simmons | - |
| TDA | - |
| Gélatinase | - |
| Adonitol | - |

H2S : sulfure d'hydrogène ; **TSI** : Triple Sugar Iron ; **VP** : Voges proskauer ;
ONPG : Ortho-Nitro-Phényl-Galactosidase ; **TDA** : Tryptophane Désaminase

+ : réaction positive
- : réaction négative

GENERALITES

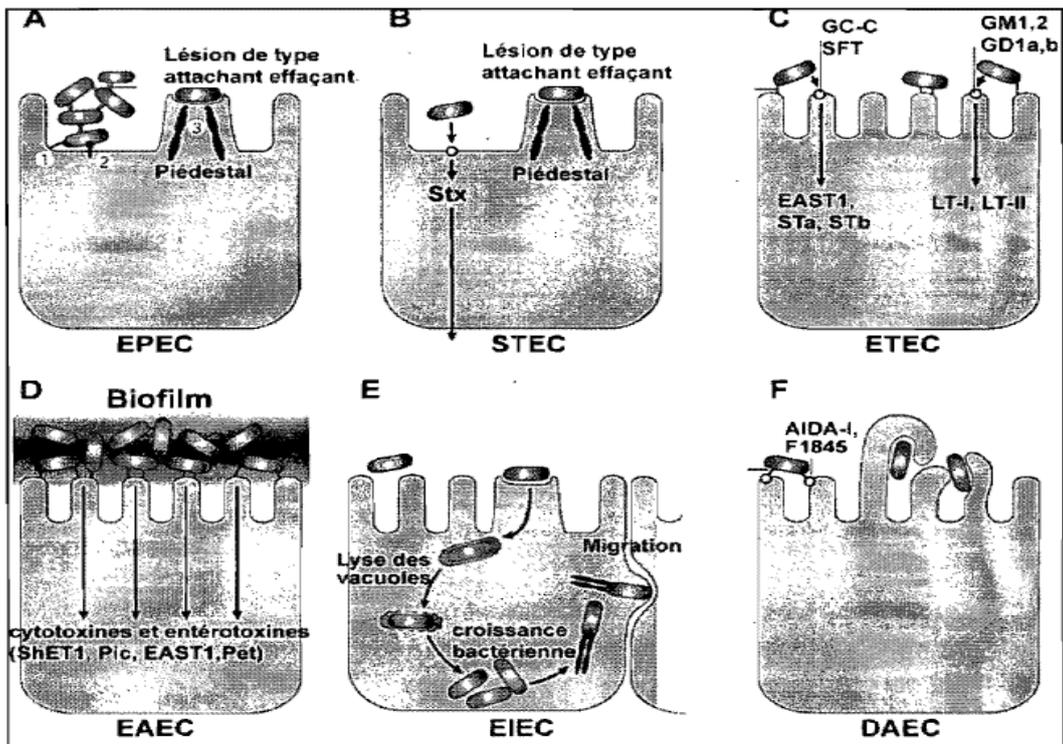


Figure 1: Caractéristiques des six pathotypes d'*E. coli* des infections gastro-intestinales

A) Les EPEC adhèrent à la surface des entérocytes (1), sécrètent des protéines dans la cellule hôte par le système de sécrétion de type III (2) et forment un piédestal (3). B) Les STEC produisent des toxines Shiga et induisent également des lésions de type attachant effaçant. C) Les ETEC produisent des entérotoxines ST (heat-stable) et LT (heatlabile) reconnues par des récepteurs spécifiques. D) Les EAEC forment un biofilm et produisent des cytotoxines et des entérotoxines. E) Les EIEC envahissent les cellules épithéliales, lysent les phagosomes et traversent le cytoplasme en utilisant le cytosquelette d'actine de l'hôte. F) En induisant l'élongation des microvillosités, les DAEC permettent ainsi leur internalisation et envahissent les cellules épithéliales (Kaper *et al.*, 2004).

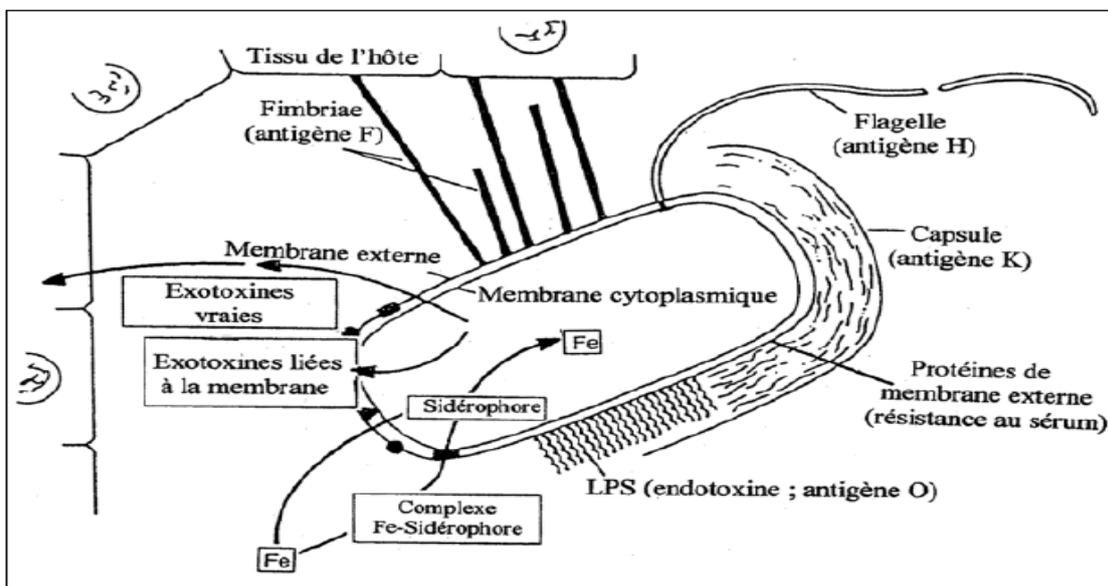


Figure 2: Propriétés potentielles de virulence des souches invasives d'*E. coli* (Johnson, 1991).

GENERALITES

I. 2. *Klebsiella pneumoniae*

C'est **Trevisan** en **1885** qui nomma pour la première fois le genre *Klebsiella*, en l'honneur d'**Edwin Klebs (1834-1913)** microbiologiste allemand. Depuis, six espèces et trois sous espèces ont été découvertes, avec comme espèce type *Klebsiella pneumoniae* (**Brisse et al., 2006**). L'espèce *K. pneumoniae* se subdivise en trois sous espèces : *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* et *K. rhinoscleromatis* comme c'est stipulé dans le manuel de systématique bactériologique de Bergey (**Ørskov, 1974**).

Les membres du genre *Klebsiella*, en l'occurrence *K. pneumoniae*, sont retrouvés dans l'environnement, qu'il s'agisse du sol, de la végétation ou de l'eau, en participant activement aux processus biochimiques et géochimiques. *Klebsiella pneumoniae* est aussi retrouvée chez un nombre important de mammifères mais aussi chez les insectes (**Gordon et FitzGibbon, 1999 ; Dillon et al., 2002**).

Klebsiella pneumoniae est un saprophyte appartenant à la flore microbienne du nasopharynx et du tractus intestinal de l'organisme humain, elle est rarement retrouvée sur la peau du fait de l'inhospitalité de cet environnement pour les Gram négatifs.

I. 2. 1. Caractère bactériologiques

L'aspect des cultures est en général très florissant, *Klebsiella pneumoniae* forme des colonies grasses souvent larges et luisantes de 3 à 4 mm de diamètre. La présence d'une capsule rend les colonies muqueuses (**Bidet et Bingen, 2007**). Les principaux caractères biochimiques de *Klebsiella pneumoniae* sont résumés dans le **tableau II**.

I. 2. 2. Pouvoir pathogène

Klebsiella pneumoniae est un pathogène opportuniste responsable de graves infections chez l'animal ; elle est associée à diverses infections chez les bovins, les canidés, les singes rhésus, les rats ainsi que les oiseaux (**Wilson, 1994 ; Roberts et al., 2000**). Chez l'homme, *K. pneumoniae* est à l'origine d'infections communautaires ; elle a été initialement décrite dans des pneumonies nécrosantes (pneumo-bacille de Friedlander) survenant essentiellement sur terrain éthylique. Elle est aujourd'hui surtout reconnue comme responsable d'infections

GENERALITES

nosocomiales (infections urinaires, intra-abdominales, infections de site opératoire, septicémies, pneumonies). *K. pneumoniae* serait responsable de 8% des infections nosocomiales et de 3% des infections communautaires (**Podschun et Ullmann, 1998**).

Ces infections sont souvent associées à un âge avancé et à des maladies sous-jacentes, qui affaiblissent le système immunitaire de l'individu, et pourraient avoir une issue fatale si aucune thérapie n'est adoptée (**Brisse et al., 2006**). En effet, les individus diabétiques ou souffrants d'obstruction pulmonaire chronique ou de cirrhose, sont des sujets à risque, qui peuvent développer une infection à *Klebsiella pneumoniae* au cours ou en dehors d'une hospitalisation. Une diminution du taux de plaquettes, une leucopénie ainsi qu'une augmentation du taux de l'albumines sérique sont observées durant l'infection (**Lin et al., 2010**).

La colonisation des milieux hospitaliers par *K. pneumoniae*, est souvent associée à l'utilisation massive d'antibiotiques ayant pour conséquence, d'une part l'émergence puis la dissémination rapide de souches multi-résistantes, et d'autre part le développement dangereux d'infections nosocomiales dans des services à risque tel que la néonatalogie. De plus, *K. pneumoniae* exprime une variété de facteurs de virulence, qui lui permettent de réaliser les différentes étapes de l'infection et de s'établir de manière stable dans l'organisme hôte. La **figure 3** illustre les principaux facteurs de virulence exprimés par *K. pneumoniae* : la capsule est le plus puissant des facteurs (**Podschun et Ullmann, 1998**).

GENERALITES

Tableau II: Principaux caractères biochimiques de *Klebsiella pneumoniae* (Freney et al., 2006)

| REACTION DE DIAGNOSTIQUE | RESULTAT |
|--------------------------|---------------|
| ONPG | + |
| H ₂ S, Indole | - |
| Mobilité | - |
| VP | + |
| Uréase | + lent |
| Citrate de Simmons | + |
| LDC | + |
| ODC | - |
| ADH | - |
| Gaz en glucose | + |
| Sorbitol | + |
| Gélatinase | - |
| DNase | - |

H₂S: sulfure d'hydrogène ; **TSI:** Triple Sugar Iron ; **VP:** Voges proskauer ;
ONPG: Ortho-Nitro-Phényl-Galactosidase ; **LDC:** Lysine Décarboxylase ;
ODC: ornithine décarboxylase ; **ADH:** Arginine Dihydrolase ;
DNase: enzyme dégradant l'ADN

+ : réaction positive
 - : réaction négative

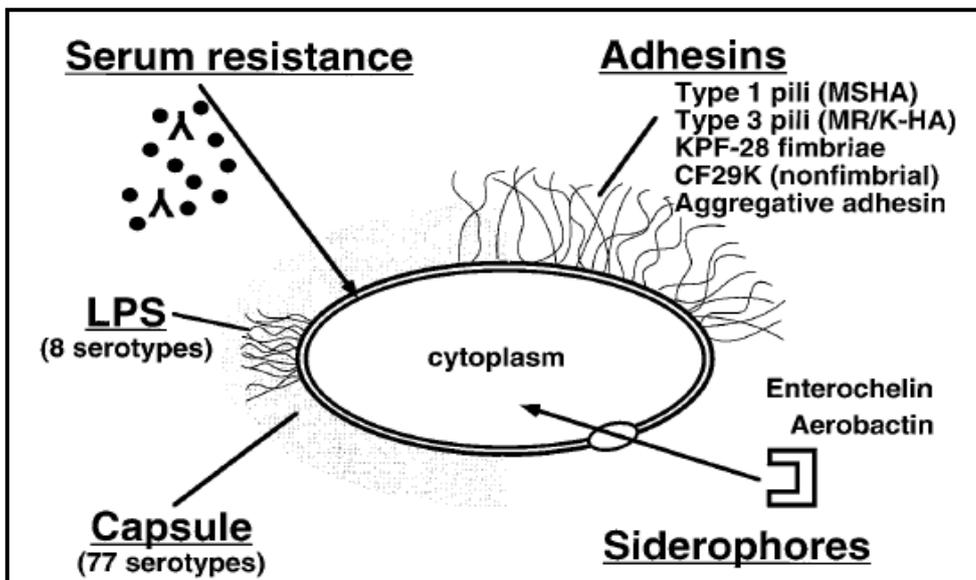


Figure 3 : Principaux facteurs de virulence exprimés par *Klebsiella pneumoniae* (Podshun et Ullman, 1998).

II. Résistance des entérobactéries aux antibiotiques et β -lactamase à spectre élargi

Stricto sensu l'antibiotique est « une substance produite par un microorganisme, habituellement une bactérie ou un mycète et qui, en petites quantités inhibe un autre microorganisme » (**Tortora et al., 2003**). Au sens large, dans la pratique médicale, l'antibiotique est une substance naturelle, semi synthétique ou synthétique utilisée spécifiquement contre les infections bactériennes. Plus de deux milles sortes d'antibiotiques sont connues aujourd'hui dans le monde, sachant que le premier a été découvert fortuitement il y'a moins d'un siècle (en 1928) par Alexander Fleming (**Dedet, 2007**).

Les bactéries sont dites résistantes lorsqu'un agent chimiothérapeutique (antibiotique) est sans effet sur eux (**Tortora et al., 2003**). Cette définition est reprise en d'autres termes par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2010) « Les souches catégorisées résistantes sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quels que soient le type de traitement et la dose d'antibiotique utilisée».

II. 1. Support de la résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est, comme tout phénotype, régit par des gènes spécifiques, présents sur le chromosome ou sur de l'ADN extra-chromosomique.

La résistance est dite naturelle lorsqu'il existe un ou plusieurs mécanismes de résistance innés, donc propres à l'espèce bactérienne. Elle intervient dans la définition du spectre clinique d'un antibiotique. La résistance naturelle est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce, qui sont qualifiées de sauvages, dont le caractère est lié à un gène chromosomique (**Philippon, 2008**).

La résistance acquise est présente chez quelques souches d'une espèce. Elle survient lors de l'acquisition d'un mécanisme de résistance chez une souche habituellement sensible (**Philippon, 2008**). C'est la conséquence d'une modification par mutation des gènes chromosomiques ou d'une acquisition de matériel génétique étranger (**Chopra et al., 2003**).

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans le mouvement des gènes de résistance d'une bactérie à une autre. Les gènes se transfèrent par conjugaison, transformation ou transduction ; ces transferts horizontaux jouent un rôle important dans la dissémination de la

GENERALITES

résistance aux antibiotiques entre espèces différentes, ils repoussent les limites liées à la transmission verticale des gènes et des mutations pendant la division cellulaire.

Les plasmides sont de loin le support génétique le plus fréquent de la résistance aux antibiotiques. Cette dernière est liée à la synthèse de protéines nouvelles et non à une modification des constituants bactériens normaux et concerne la quasi-totalité des antibiotiques. Les plasmides de résistance aux antibiotiques (Plasmide R) ont été découverts dans les années 1950. En plus des gènes de résistance qu'ils portent, ces plasmides correspondent à une association modulaire de gènes regroupés en unités fonctionnelles : l'unité de réplication et l'unité de transfert (Clewell, 1993).

II. 2. Les β -lactamines

II. 2. 1. Structure des β -lactamines

Les β -lactamines constituent une famille très complexe dont la structure du noyau de base, qui comporte toujours le cycle β -lactame, permet de distinguer trois grands groupes (Philippon et al., 1993 ; Bryskier, 1999 ; Cavallo et al., 2004 ; Babic et al., 2006) (Figure4) :

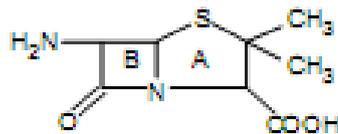
- ✓ **Les dérivés de l'acide 6-amino-pénicillanique** : leur structure de base associant un cycle β -lactame à un cycle thiazolidine, est à l'origine de trois noyaux. Selon que ce noyau est un pénème, un pénème ou un clavame, diverses substitutions confèrent à la molécule des propriétés et une activité antibactérienne variable qui explique les variations du spectre d'activité antibactérien.
- ✓ **Les dérivés de l'acide 7-amino-céphalosporanique** : Le noyau de base associe un cycle β -lactame à un cycle dihydrothiazine pour former l'acide 7-aminocéphalosporanique ou noyau céphème. Ce groupe comprend l'ensemble des céphalosporines dont la particularité du noyau céphème et les nombreux radicaux de substitutions permettent de distinguer plusieurs générations ayant des propriétés antibactériennes différentes.
- ✓ **Les monobactames** : La structure est limitée au cycle β -lactame. Le seul produit utilisé actuellement est l'aztréonam ; les substitutions latérales sur son noyau monobactame lui confère une très bonne activité contre les bactéries à Gram négatif aérobie, et plus particulièrement contre les entérobactéries pour lesquelles il possède une activité comparable à celles des C3G.

II. 2. 2. Mode d'action des β -lactamines

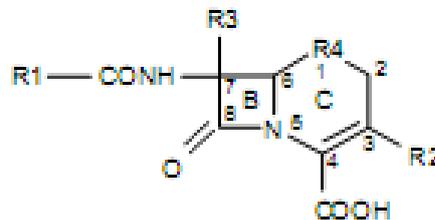
Les β -lactamines bloquent la synthèse du peptidoglycane qui est le polymère majeur spécifique de la paroi des bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Ce blocage intervient par inhibition de certaines enzymes responsables de la transpeptidation, une étape essentielle à la réticulation du peptidoglycane (Michel-Briand, 1986 ; Vandenesch et Etienne, 1997 ; McDermott et al., 2003).

Les β -lactamines présentent une analogie de structure avec le dipeptide D-Ala-D-Ala du pentapeptide faisant partie du précurseur du peptidoglycane. De ce fait, elles se comportent comme des substrat « suicides » pour les transpeptidases ; elles se lient spécifiquement au site actif de ces enzymes, appelées de ce fait PLP « Protéines Liant la Pénicillines », et aboutissent à la formation irréversible d'un complexe acyl-enzyme covalent, qui est physiologiquement inactif (Michel-Briand, 1986 ; Vandenesch et Etienne, 1997 ; McDermott et al., 2003).

Dérivés de l'acide 6-amino-pénicillanique
Cycle β -lactame (B) + cycle thiazolidine (A)



Dérivés de l'acide 7-amino-céphalosporanique
Cycle β -lactame B + cycle dihydrothiazine C
(noyau céphème)



Monobactames

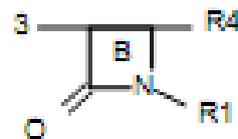


Figure 4 : Structures de base de classification des différents groupes de β -lactamines (Cavallo et al., 2004)

II. 3. Les β -lactamases

Chez les bacilles à gram négatif, l'inactivation enzymatique par production de β -lactamases est le principal mécanisme de résistance aux β -lactamines. Actuellement, plus de 530 β -lactamases ont été rapportées ; celles-ci constituent un groupe hétérogène d'enzymes capables d'inactiver les β -lactamines par ouverture du cycle β -lactame (**Babic et al., 2006**).

II. 3. 1. Mode d'action

Chez les bactéries à Gram négatif, les β -lactamases produites se concentrent dans l'espace périplasmique. Ces enzymes inactivent les β -lactamines selon deux mécanismes :

- ✓ le premier correspond à l'hydrolyse de l'antibiotique selon une réaction d'acylation qui prend place entre la liaison carbonyle de l'antibiotique et le groupement hydroxyl de la sérine du site actif de l'enzyme. Cette réaction aboutit à la formation d'un complexe acyl-enzyme qui, rapidement désacylé permet la restauration de l'enzyme et la libération d'un produit inactif (**Figure 5**) (**Matagne et al., 1998**).
- ✓ Le deuxième correspond à la séquestration de l'antibiotique. En effet, dans certains cas où l'affinité de l'enzyme pour l'antibiotique est très faible, les β -lactamases hyperproduites peuvent rendre l'antibiotique inactif en le séquestrant sans hydrolyse l'empêchant ainsi d'atteindre sa cible (**Frère et al., 1991**).

II. 3. 2. Classification

Il existe plus de 350 β -lactamases qui ont été décrites et nommées différemment : SHV « variable response to sulfhydryl inhibitors » du fait de l'inhibition de son activité par le p-chloromercuribenzoate est variable, TEM du nom d'un patient nommé Temoneira, OXA, CTX-M, IMP pour leur capacité à hydrolyser respectivement l'oxacilline, le céfotaxime et l'imipénème, KPC pour « Klebsiella pneumoniae carbapenemase »...etc (**Heritage et al., 1999 ; Paterson et Bonoma, 2005 ; Jacoby, 2006**).

Actuellement deux classifications s'imposent : la première dite structurale d'après Ambler est basée sur la séquence peptidique, en particulier au niveau du site actif de l'enzyme ou sur la séquence total du gène codant la β -lactamase. Elle permet de distinguer 4 classes moléculaires : A, C, D appelées sérine enzyme, et B contenant des enzymes qui comportent deux atomes de zinc au site actif (**Ambler, 1980**).

GENERALITES

La deuxième classification dite fonctionnelle d'après Bush-Jacoby-Medeiros, plus complète et plus récente, est basée sur le spectre de substrats des enzymes et de leurs réponses aux inhibiteurs (Ambler *et al.*, 1991 ; Bush *et al.*, 1995 ; Babic *et al.*, 2006). Elle permet de distinguer 4 groupes (Tableau III).

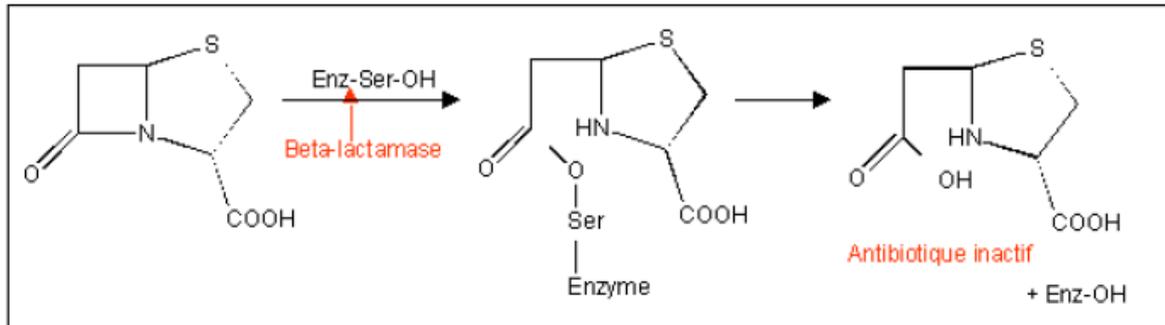


Figure 5 : Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle β-lactame

GENERALITES

Tableau III : Tableau de classification des β -lactamases (Cavallo et al., 2004)

| Classification moléculaire (Ambler) | Classification fonctionnelle (Bush) | Type de β -lactamase | Bactéries impliquées | Inhibition par l'acide clavulanique | β -lactamines hydrolysées | β -lactamines stables |
|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Sérine β -lactamases | 2a | Pénicillinasés | Bactéries à Gram positif (dont staphylocoques et entérocoques) | ++ | Pénicillines sauf pénicillines M | Pénicillines M, C1G, carbapénèmes |
| Classe A | 2b | β -lactamases à large spectre | Bactéries à Gram négatif | ++ | Amino-, carboxy- et uréido-pénicillines, C1G, C2G | Céphamycines, C3G, moxalactam, carbapénèmes, aztréonam |
| | 2be | β -lactamases à spectre élargi aux C3G et à l'aztréonam | Entérobactéries <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ++ | Idem 2b + C3G et aztréonam | Céphamycines, moxalactam, carbapénèmes |
| | 2br | β -lactamases à large spectre résistant à l'acide clavulanique | Entérobactéries | - | Idem 2b + associations aux inhibiteurs de β -lase | Idem 2b |
| | 2c | Carbénicillinasés | Bactéries à Gram négatif | + | Idem 2b | Idem 2b |
| | 2e | Céphalosporinasés inhibés par l'acide clavulanique | Bactéries à Gram négatif (surtout entérobactéries) | ++ | Amino-, carboxy-et uréidopénicilline, C1G, C2G, certaines C3G | Ceftazidime, céphamycines, aztréonam, carbapénèmes |
| | 2f | Carbapénémases à site actif sérine et inhibés par l'acide clavulanique | Entérobactéries | + | Idem 2b + aztréonam, carbapénèmes et certaines C3G | Certaines C3G |
| Classe C | 1 | Enzymes AmpC chromosomiques et plasmidiques | Bactéries à Gram négatif | - | Toutes les β -lactamines ¹ sauf les carbapénèmes | Carbapénèmes |
| Classe D | 2d | Oxacillinases | Bacilles à Gram négatif | +/- | Idem 2b (+ parfois C3G, aztréonam ou carbapénèmes) | Variable (voir texte) |
| Pas de classe attribuée | 4 | Enzymes indéterminées n'entrant pas dans une autre catégorie | Espèces variées | - | Variable (voir texte) | Variable (voir texte) |
| Zinc β -lactamases | 3 | Métallo- β -lactamases | Bactéries à Gram négatif | - | Large profil de substrats dont les carbapénèmes | Variable |
| Classe B | | | <i>Bacillus</i> groupe <i>ceruus</i> | | | (surtout aztréonam chez les enzymes de type IMP ou VIM) |

III. Virulence des entérobactéries

Les termes facteur de pathogénicité et facteur de virulence sont souvent utilisés comme synonymes. Mais certains auteurs font une distinction claire entre les deux : le terme pathogénicité définit la capacité de la bactérie à causer une maladie alors que la virulence est la mesure ou le degré de pathogénicité.

Les facteurs de virulence communs et associés aux entérobactéries sont principalement: les endotoxines, la capsule, le phénomène de variation de phase, la séquestration des facteurs de croissance et la résistance au sérum. La résistance intrinsèque aux antibiotiques est variable au sein du genre et de l'espèce (Lenette et al., 1985).

III. 1. Système du complément

Le système du complément est un mécanisme de résistance de l'organisme composé d'au moins 20 protéines sériques qui participent à la lyse des cellules étrangères, à l'inflammation et à la phagocytose. Certains de ces protéines sont désignées par un système de numérotation allant de C1 à C9 et d'autres sont nommés telles que facteur B, facteur D, facteur P. Ces protéines s'activent entre eux par des réactions en cascade, l'une activant généralement l'autre en la scindant (**Tortora et al., 2003**).

Lorsque les bactéries pathogènes dépassent la première ligne de défense innée que représentent les surfaces épithéliales du corps, elles se retrouvent immédiatement confrontées à d'autres lignes de défense comme l'attaque humorale par la voie alterne d'activation du complément, active de manière spontanée dans le plasma. Deux autres voies sont également connues, la voie dite classique, dépendante de la production d'anticorps et la voie des lectines (**Bach, 1986 ; Revillard, 2001**).

III. 1. 2. Activation du système du complément

L'effet bactéricide du sérum sur les bactéries à Gram négatif dont *E. coli* et *K. pneumoniae* met en jeu les deux principales voies d'activation du complément (**Ciurana et Tomas, 1987**). La voie alterne, indépendante des anticorps, est activée par les polysaccharides de surface dont l'antigène O du LPS. La voie classique est activée suite à l'interaction des anticorps avec les antigènes de la surface bactérienne. Cette dernière voie peut aussi être activée directement (indépendamment des anticorps) par interaction du composant C1 avec le lipide A ou les antigènes O du LPS (**Morrison et Kline, 1977 ; Vukajlovich et al., 1987**) (**Figure 6**).

- voie classique

La voie classique met en relation les effecteurs de l'immunité spécifique et ceux de l'immunité innée. Elle est amorcée par la liaison des anticorps qui reconnaissent les antigènes à la surface des microorganismes et s'y fixent. Ensuite, la protéine C1 du complément s'active en se liant au complexe antigène-anticorps. C1 active à son tour les protéines C2 et C4 en les coupant en deux, donnant C2a, C2b et C4a, C4b. Les fragments C2b et C4b se combinent pour former une nouvelle enzyme qui active la protéine C3 en la scindant en C3a et C3b. (**Tortora et al., 2003**).

- **Voie alterne**

La voie alterne ne fait pas intervenir d'anticorps. Elle est initiée par certains polysaccharides qui font partie de la paroi cellulaire de bactéries et de mycètes, ils interagissent directement avec des protéines du complément appelées facteur B, D et P. Cette voie ne fait pas intervenir les protéines C1, C2, C4, cette voie est particulièrement efficace pour combattre les bactéries à gram négatifs (**Tortora et al., 2003**).

III. 1. 3. Rôle du système du complément dans la défense anti-infectieuse

Les deux voies, classiques et alternes, aboutissent à la fragmentation de la protéine C3 en deux produits C3a et C3b. Ces molécules sont à l'origine de 03 processus qui détruisent les microorganismes : la cytolyse, l'inflammation et l'opsonisation (**Figure 7**).

- **Cytolyse**

C'est un processus qui consiste à la destruction des cellules étrangères par l'endommagement de leur membrane plasmique. Le dommage provoqué à la membrane entraîne la perte du contenu cytoplasmique et l'entrée massive de liquide aboutissant à la lyse bactérienne.

Le fragment C3b active une série de réaction comprenant les protéines C5 à C9 aboutissant à la formation du complexe d'attaque membranaire MAC (Membrane Attack Complex). Ce complexe protéique cause des lésions circulaires ou de véritable trou au niveau des membranes bactériennes (**Tortora et al., 2003**).

- **Inflammation**

Une inflammatoire aigüe peut être provoquée par les fragments protéiques C3a et C5a (issu de C3 et C5). Ces molécules se lient au mastocytes, aux granulocytes basophiles et aux thrombocytes (plaquette) et déclenche la libération d'histamine qui augmente la perméabilité des vaisseaux sanguins et par ricochet accentue la réaction inflammatoire (**Tortora et al., 2003**).

- **Opsonisation**

Le fragment C3b joue le rôle d'opsonine en enrobant le microorganisme et en facilitant l'adhérence du phagocyte au microbe. Ainsi le complément participe au phénomène d'opsonisation (**Tortora et al., 2003**).

GENERALITES

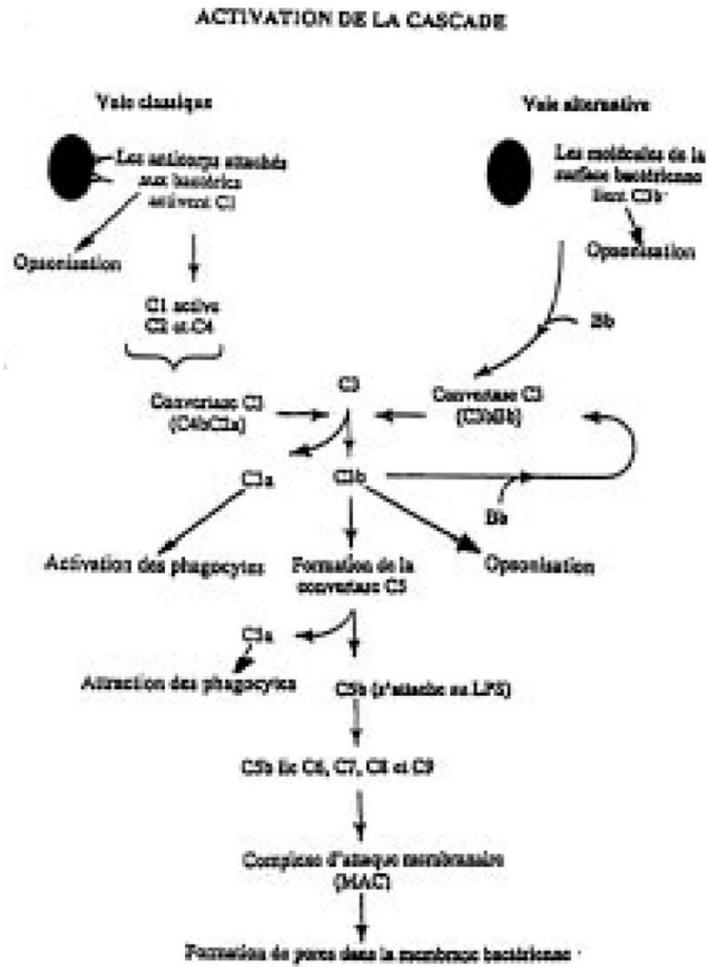


Figure 6: schéma de la cascade du complément (adapté de Salyers et Whitt, 1994)

GENERALITES

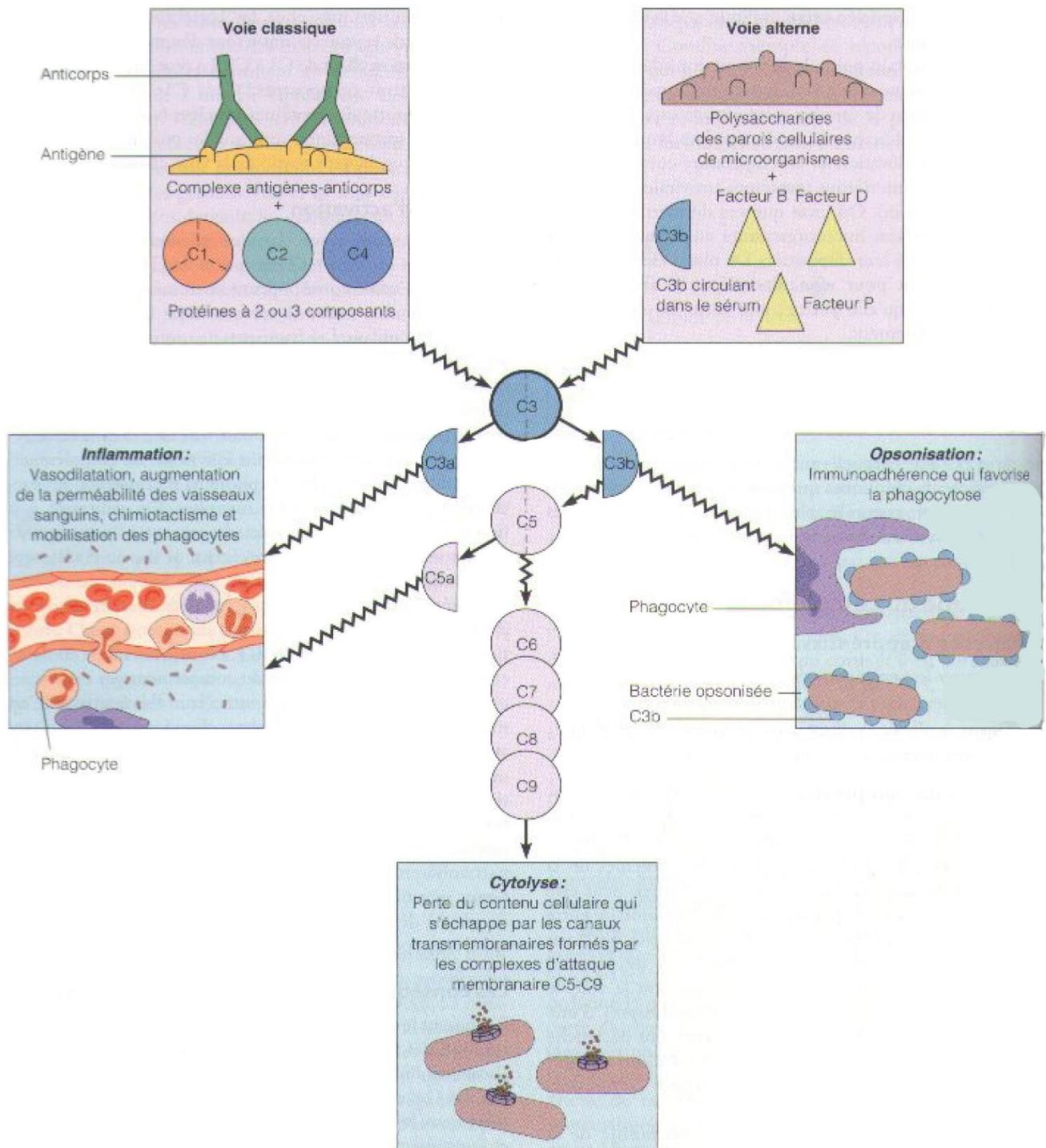


Figure 7: activation du complément par les voies classiques et alternes (Tortora *et al.*, 2003)

Les réactions des voies classique et alterne aboutissent à la fragmentation de C3 en C3a et C3b. La formation de ces fragments a pour conséquence la destruction des microorganismes par trois mécanismes : cytolyse, inflammation et opsonisation.

III. 2. Résistance au système du complément

La résistance à l'activité du complément trouve son origine dans les structures présentes à la surface du corps bactériens qui empêche l'activation de la voie alterne du complément : antigène O du LPS, capsules et protéines de membrane externe (**Mainil, 2003**). La résistance à l'activité bactéricide du complément est l'apanage des souches invasives et systématiques, responsables d'infections profondes. En effet :

- ✓ L'antigène O du LPS est le principal mécanisme impliqué dans la résistance à l'effet bactéricide du complément. Il a été démontré que des mutants (Gram négatif) de laboratoire n'exprimant pas l'antigène O (mutants O-) sont sensibles à l'action du complément (**Tomas et al., 1986**). De plus, cette résistance semble être influencée par la longueur de l'antigène O, ses ramifications ainsi que par sa composition biochimique. Ces structures préviennent le dépôt du facteur C3b dans la voie alterne. Dans d'autres cas, ils empêchent le dépôt stable du complexe C5b-C8 dans la membrane bactérienne avant la fixation du composant C9 (**Mainil, 2003**).
- ✓ La capsule, de par sa structure et sa localisation, confèrent aux souches, la possédant, d'importantes propriétés de virulence telles que : la résistance à la phagocytose (dans toutes ses formes) et la résistance au sérum. La capsule masquerait des structures activatrices du complément telles que les porines et le LPS. De plus, des études ont montré que cette résistance est intimement liée à la composition et à la teneur en exopolysaccharides ; ainsi il existe des sérotypes capsulaires plus virulents que d'autres (**Merino et al., 1992 ; Alvarez et al., 2000**).
- ✓ Il existe également certaines protéines produites par certaines souches qui s'insèrent dans leur membrane externe et leur permettent de résister à l'activité bactéricide du complément. Parmi ces protéines, nous pouvons citer Iss (Increased Survival in Serum), Tra T et OmpA. (**Bidet et al., 2012**).

Matériel et méthodes

Notre travail a concerné l'étude de l'antibio-résistance et l'effet du sérum humain sur des souches d'entérobactéries, isolées de milieux hospitaliers. Cette étude a été réalisée au niveau de l'unité de bactériologie de l'hôpital FABOR de Blida durant une période de six mois, de novembre 2013 à Avril 2014.

Dans un premier temps, nous avons analysé 279 prélèvements de diverses origines, à partir desquels nous avons isolé puis identifier les souches appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. La sensibilité à différents antibiotiques, notamment aux β -lactamines, n'a été testée que sur les espèces *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*. Enfin, seules les souches sécrétrices de BLSE ont été testées pour leur sensibilité à l'effet bactéricide du sérum humain.

I. Matériel

I. 1. Matériel biologique

Les souches objets de notre étude, ont été isolées à partir de divers prélèvements biologiques : urine, pus, prélèvement vaginal, crachat, liquide d'ascite, liquide pleural, ponction articulaire.

Le sérum humain utilisé a été obtenu à partir du sang d'individus sains de groupe sanguin O, A et AB qui ne suivent aucun traitement médical. La souche de référence utilisée comme témoin négatif de l'antibiogramme et du test de sensibilité au sérum humain est *Escherichia coli K12B21*.

I. 2. Matériel non biologique

Concernant la culture bactérienne, nous avons utilisé différents milieux de culture, solide et liquides. Leur composition est résumée dans l'**annexe1**. Par ailleurs, nous avons utilisé divers appareils, de la verrerie, des réactifs et des solutions compilés dans l'annexe 1.

II. Méthodes

II.1. Prélèvements

La qualité du prélèvement est essentielle ; le recueil et le transport doivent être effectués selon des règles précises pour éviter la contamination et la multiplication bactérienne. Tout prélèvement est obligatoirement accompagné d'une fiche de renseignement du patient. Sur celle-ci sont mentionnés le nom, le prénom, le sexe, l'âge, le service d'origine et surtout le diagnostic clinique détaillé, le traitement d'ATB administré au malade et sa durée en indiquant la date du début et la fin de ce traitement. Durant notre étude nous avons traité divers prélèvements : urine, pus, pertes vaginales, liquide d'ascite, ponctions articulaires, crachat et liquide pleural.

Les **prélèvements d'urine** sont en général apportés par les patients dans des tubes stériles. Chez l'adulte, le recueil des urines se fait après lavage hygiénique des mains et toilette soigneuse, au savon, de la région vulvaire chez la femme et du méat chez l'homme suivi d'un rinçage. Le recueil des urines doit se faire après élimination du premier jet dans un pot à prélèvement d'urine ou un tube stérile. Chez le nourrisson, les urines sont collectées à partir d'un sac collecteur, placée au niveau de région génitale. Une fois effectué, le prélèvement doit être rapidement acheminé vers le laboratoire. L'examen doit être effectué dans les 2 heures qui suivent le prélèvement. Au-delà, les urines doivent être conservées à +4°C.

Les **prélèvements de pus** englobent toutes suppurations qu'elles soient superficielles (impétigo, plaie traumatique et chirurgicale, escarres...) ou profondes (localisation abdominale, pelvienne, buccale, cérébrale, cervicale, ostéo-articulaire...). Selon la localisation du pus, le prélèvement se fait à l'aide d'une seringue stérile, pour les suppurations profondes, ou bien à l'aide d'un écouvillon stérile, pour les suppurations superficielle. Dans notre cas, la majorité du pus prélevé est celui des pieds diabétiques.

Les **liquides de ponction** regroupent le liquide articulaire, liquide pleural, liquide péritonéal, liquide d'ascite, liquide péricardique et le kyste. Les liquides de ponction sont en général stériles, ainsi tous les microorganismes qui s'y trouvent doivent être identifiés.

II. 2. Examen cyto bactériologique de l'Urine (ECBU)

II. 2. 1. Examen macroscopique

Il s'agit d'observer l'aspect, la couleur, le caractère éventuellement sanglant (hématurie) de l'urine. En effet, l'urine peut être limpide, trouble, hématurique ou peut contenir des sédiments.

II. 2. 2. Examen microscopique : Examen directe à l'état frais

L'examen microscopique à l'état frais, est un moyen d'observer les bactéries vivantes en absence de toute fixation ou coloration et, d'en apprécier la morphologie, le mode de regroupement et la mobilité. Après avoir déposé une goutte d'urine entre lame et lamelle, on procède à l'observation sous microscope photonique (grossissement x 40). De plus, cet examen permet de compter les éléments sur plusieurs champs : des éléments non organiques (cristaux) ou des éléments organiques (leucocytes, hématies, cellules épithéliales...).

II. 2. 3. Uroculture

Nous procédons à l'ensemencement du prélèvement d'urine sur gélose nutritive et hektoen selon le protocole suivant :

- On procède, d'abords, à une dilution au 1/100 dans de l'eau physiologique.
- Dans une zone stérile et à l'aide d'une anse de platine stérilisée, on prélève une à deux gouttes d'urine diluée qu'on ensemence en stries serrées.
- Le milieu est incubé pour une durée de 24h-48h à 37°C.

Lecture : La culture est dite négative si l'on ne note aucune colonie, alors qu'elle est dite positive s'il existe des colonies pures et uniques sauf dans les cas particuliers (patient immunodéprimé).

Remarque : l'urine est utilisée directement, sans dilution, pour la culture sur la gélose Hektoen.

II. 3. Examens cyto bactériologique du pus

II. 3. 1. Examen macroscopique

L'examen cyto bactériologique nous renseigne sur la consistance, la couleur, l'odeur, le caractère éventuellement sanglant (hémolyse) du pus, ainsi on peut évoquer des anaérobies devant un pus marron et fétide.

II. 3. 2. Coloration au bleu de méthylène

L'examen microscopique du pus nécessite une coloration au bleu de méthylène. Cette coloration permet de faire l'équilibre leucocytaire (lymphocytes, polynucléaires) et d'observer la forme et la disposition des bactéries, elle permet d'observer également la présence des levures, des hématies et des cellules épithéliales. Cette coloration est réalisée comme suit :

- Une goutte d'eau physiologique est déposée sur une lame propre, à laquelle sera ajoutée 1 à 2 gouttes du prélèvement.
- La lame est séchée à l'air ambiant, les éléments sont fixés par la flamme du bec bunsen. Le bleu de méthylène est utilisé pour colorer le frotti.
- Après 5 à 15 minutes, la lame est rincée à l'eau puis séchée.

Lecture : elle se fait par observation de la lame au microscope aux différents objectifs. Toutes les structures cellulaires apparaissent colorées en bleu.

II. 3. 3. Mise en culture

Le prélèvement de pus estensemencé sur différents milieux de culture (**Gélose nutritive, Gélose au sang frais et au sang cuit, Gélose Hektoen, gélose Chapman, Gélose Sabouraud, Bouillon cœur cerveau**), dans le but d'isoler les différents germes contenus dans le pus. Nous avons procédé comme suit :

- Dans une zone stérile, les boîtes de Pétri contenant les différents milieux de culture, sont directementensemencées, en utilisant l'écouvillon du prélèvement du pus. L'ensemencement de la boîte est poursuivi à l'aide d'une pipette pasteur stérile en faisant des stries serrées.
- Le milieu est ensuite incubé pour une durée de 24h-48h à 37°C. Les géloses au sang sont incubées en atmosphère riche en CO₂.
- Dans certains cas on procède à un enrichissement des prélèvements. Les bactéries sontensemencées dans un milieu d'enrichissement, qui peut être soit du Bouillon Glucosé Tamponné (BGT) ou Bouillon Cœur Cerveau (BHIB). Ainsi leur croissance est favorisée et nous permet de les réensemencer si la culture d'origine est faible ou absente.

Lecture : Une culture est dite positive, si elle présente de nombreuses colonies bactériennes.

II. 4. Identification des bactéries

En cas de cultures positives, nous procédons à l'identification des bactéries par une étude biochimique et d'autres tests spécifiques. La première étape étant la coloration de Gram.

II. 4. 1. Coloration de Gram

C'est une coloration différentielle qui permet de classer les bactéries dans deux groupes : les Gram positifs et les Gram négatifs, selon leurs affinités pour les colorants, liée à la structure générale de la paroi cellulaire. Cette coloration permet une meilleure appréciation de l'aspect morphologique des bactéries et leur mode de regroupement. Le mode opératoire est le suivant :

- Déposer au centre d'une lame propre une goutte d'eau physiologique.
- Prélever une petite colonie bien isolée et la déposer sur la goutte puis l'étaler.
- Fixer à la chaleur.
- La lame est ensuite colorée au violet de gentiane pendant une minute.
- Après avoir éliminé l'excès de colorant, ajouter du lugol et laisser agir une minute, c'est l'étape du mordantage. Eliminer l'excès de lugol.
- La décoloration est obtenue après avoir ajouté quelques gouttes d'alcool à 90°C et laisser agir durant 30 secondes.
- La fushine est utilisée pour recolorer la lame durant une minute de temps.

Lecture : Après avoir rincé et séché la lame, ajouter une goutte d'huile à immersion et observer au microscope optique à l'objectif×100 :

- ✓ Les bactéries à Gram(-) sont colorées en rose
- ✓ les bactéries à Gram(+) sont colorées en bleu violacé.

Cet examen permet d'orienter l'identification biochimique du germe isolé, ainsi si ce sont des bacilles à Gram négatif qui nous intéresse, puisque ce sont les *Enterobacteriaceae* qui font l'objet de notre étude.

II. 4. 3. Identification par les galeries classiques

Les galeries classiques sont un ensemble de tests biochimiques qui révèlent des voies métaboliques précises. Tous les tests sont effectués à partir d'une suspension bactérienne,

Matériel et méthodes

préparée dans de l'eau physiologique, de densité 0.5 McFarland. Les principaux tests effectués sont les suivants :

- **Recherche de la β -galactosidase par le test d'ONPG (Orthonitrophenyl- β -D-galactose)**

La β -galactosidase est une enzyme capable de scinder la molécule de lactose en glucose et galactose permettant de distinguer les bactéries **lactose (-)** des **lactose (+)**. Le substrat utilisé est l'ONPG, qui est une molécule incolore :

- Un disque imprégné d'ONPG est introduit dans un tube à essai contenant 0,5ml de suspension bactérienne.
- Incuber le tube dans l'étuve à 37°C pendant 24 h.

Lecture : Réaction positive : coloration jaune ; Réaction négative : pas de coloration.

- **Fermentation des trois sucres : Milieu Triple Sugar Iron (TSI)**

Le milieu TSI permet l'identification du germe par fermentation des trois sucres (Glucose, Saccharose, Lactose avec ou sans production de gaz) et la production de sulfure d'hydrogène (H_2S). Le mode opératoire est le suivant :

- A partir d'une suspension bactérienne, on ensemence la pente par stries et le culot par piqure centrale à l'aide d'une pipette pasteur.
- Incuber pendant 24 h à 37°C.

Lecture :

- S'il y a un virage du rouge au jaune au niveau de la pente, la bactérie est dite lactose et saccharose positive.
- S'il y a un virage du rouge au jaune du culot, la bactérie est dite glucose positive.
- La production de gaz entraîne la formation de bulles d'air dans le culot.
- S'il y a un noircissement du milieu c'est qu'il y a une production d' H_2S .

- **Utilisation du citrate comme : Milieu citrate de Simmons**

Certaines bactéries sont capables d'utiliser l'ion citrique comme unique source de carbone. L'un des milieux utilisés pour cette étude est le Citrate de Simmons. Ce milieu est ensemencé en surface par des stries longitudinales. La fermentation du citrate de sodium entraîne une acidification qui provoque une coloration bleue du milieu, en présence de bleu

Matériel et méthodes

de bromothymol (indicateur de pH). Les cultures citrate négatif n'entraînent pas de virage de couleur.

▪ **Recherche de la nitrate réductase**

La recherche du nitrate réductase permet de déterminer si une bactérie est capable ou non de réduire le nitrate. Le nitrate et le nitrite réductase appartiennent à l'oxydoréductase et catalysent la réduction des nitrates en nitrites ou en azote gazeux.

▪ **Recherche de la voie de fermentation du glucose : Milieu Clark et Lubs**

Cette réaction permet de connaître la voie de fermentation du glucose, à savoir la voie des acides mixtes, mise en évidence par réaction de Rouge de Méthyl (RM) et la voie butylène-glycolique, mise en évidence par la réaction de Voges Proskauer (VP). Le milieu utilisé pour cela est le milieu Clark et Lubs ; deux tubes sontensemencés et incubés à 37°C pendant 24h.

- **Test RM** : On ajoute quelques gouttes de rouge de méthyle à l'un des deux tubes du milieu de Clark et Lubs, préparé précédemment.

- **Test de VP** : On ajoute quelques gouttes du réactif VPI, puis quelques gouttes du réactif VP II au deuxième tube de Clark et Lubs, puis incliner pendant 5 minutes sur paillasse.

Lecture :

VP(+) : Apparition d'un anneau rouge.

VP(-) : Pas de changement.

RM (+): coloration rouge.

RM (-): coloration jaune.

▪ **Dégradation du Mannitol et mobilité: Milieu mannitol**

Ce milieu convient plus particulièrement à l'étude des bacilles à Gram négatif fermentatifs et à l'étude de leur mobilité. L'acidification du milieu est indiquée par le virage de l'indicateur du pH (rouge vers le jaune). Pour ce faire :

- Onensemence le milieu par une piqure centrale à l'aide d'une pipette pasteur stérile chargée en suspension bactérienne déjà préparée, incubation à 37°C pendant 18 à 24 h.

Lecture : Mannitol (+) : La fermentation de mannitol entraîne le virage du milieu au jaune ; Mannitol (-) : le milieu reste rouge. Les bactéries mobiles diffusent à partir de la

Matériel et méthodes

ligne d'ensemencement en créant un tourbillon. Les bactéries immobiles croissent uniquement au long de la piqûre d'ensemencement.

▪ **Mise en évidence de l'uréase, de la tryptophane désaminase et de la tryptophanase : Milieu urée-indole**

Le milieu urée-indole est un milieu synthétique, non nutritif, permettant la recherche des activités enzymatiques suivantes:

- **L'uréase** : qui est une enzyme qui hydrolyse l'urée en ions ammonium et en carbonate.
- **La tryptophane désaminase** : agit sur le tryptophane en donnant de l'acide indole pyruvique et de l'ammoniac, la réaction est lisible après addition du réactif TDA.
- **La tryptophanase** : est un complexe multienzymatique qui permet aux microorganismes de produire de l'indole à partir du tryptophane, après addition du réactif de KOVACS. Le mode opératoire est le suivant :
 - Distribuer stérilement 1ml du milieu urée-indole dans deux tubes stériles.
 - Ensemencer chaque tube à partir de la suspension bactérienne.
 - Incuber à 35°C pendant 18 – 24h.
 - La lecture des tubes est représentée dans le **tableau V**:

Matériel et méthodes

Tableau IV : Résultat des tests de mise en évidence de l'uréase, de la tryptophane désaminase et de la tryptophanase.

| Réactif et Tests \ lecture | RECHERCHE D'INDOLE | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------|
| Ajouter dans le 1 ^{er} tube quelques gouttes de réactif de KOVACS . | Indole (+) | Indole (-) |
| Lecture | Anneau rouge en surface | Anneau brunâtre |

| | RECHERCHE D'UREASE | |
|----------------|----------------------------------------------|-------------------|
| | Uréase (+) | Uréase (-) |
| Lecture | Virage du milieu au rouge, violet ou rose | Coloration orange |

| Ajouter quelques gouttes de réactif de TDA dans le 2 ^{ème} tube. | RECHERCHE DE TDA | |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| | TDA (+) | TDA (-) |
| Lecture | Coloration brun-rouge | Coloration jaune- orange |

TDA : Tryptophane Désaminase

II. 4. 4. Les galerie API 20E

La galerie API 20^E est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteraiceae* et quelques autres bacilles à Gram négatif. Elle comprend 20 microtubes contenant des substrats déshydratés permettant la mise en évidence des enzymes. L'identification par les galeries API 20^E se fait selon le Protocole suivant :

- Préparer une suspension bactérienne de 0.5 Mc Farland dans 5 ml d'eau physiologique.
- Les microtubes sont remplis avec la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette pasteur
- Le tube et la capsule sont remplis pour les tests CIT, VP et GEL
- L'anaérobiose est créée dans les tests : ADH, LDH, ODC, URE et H₂S en remplissant leur capsule d'huile de paraffine. Le kit est ensuite incubé à 37°C pendant 24h.

La lecture des réactions se fait en s'accordant au tableau de lecture des tests API 20E. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactif (**Annexes 2**). L'identification est obtenue par

Matériel et méthodes

le retour à l'index de profil analytique après transformation des profils biochimiques en profil numérique. L'ensemble des résultats est comparé à ceux qui figurent dans le catalogue accompagnant la galerie.

II. 5. Antibiogramme

L'antibiogramme est une technique qui permet d'apprécier la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis de divers antibiotiques, ce qui guide le médecin vers l'antibiotique convenu pour traiter l'infection. L'antibiogramme est réalisé selon la méthode de diffusion de disques sur milieu solide. Cette technique est réalisée de la manière suivante :

- Le milieu utilisé est le Mueller-Hinton : 20ml de milieu sont coulés dans chaque boîte Pétri, qui seront ensuite pré-incubées avant utilisation.
- La suspension bactérienne est préparée à partir d'une culture pure de 18 ou 24h, sur un milieu d'isolement. Quelques colonies sont prélevées, à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, puis déchargées dans 10ml d'eau physiologique stérile. La densité de la suspension bactérienne est ajustée à 0,5 Mac Farland ou à une DO entre 0.08 et 0.1.
- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- Frotter l'écouvillon sur toute la surface du milieu de culture du haut vers le bas en stries bien serrées.
- Répéter l'opération plusieurs fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois.
- Appliquer les disques d'antibiotiques à l'aide d'un distributeur de disque ou d'une pince stérile (il ne faut pas dépasser 6 disques sur une boîte de 90 mm de diamètre). Incuber à 35°C pendant 24 heures. Les antibiotiques utilisés sont résumés dans le **tableau VI**.

Lecture : Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique ou, simplement, avec un double décimètre ; puis comparer ces résultats aux valeurs critiques (**annexe 2**). Les bactéries sont, ensuite, classées dans l'une des catégories : résistante, intermédiaire, sensible.

Matériel et méthodes

Tableau V : les antibiotiques utilisés pour le test d'antibiogramme.

| FAMILLE | NOMINATION | SIGLE |
|---------------------------------|-------------------------------------|------------|
| B-Lactamine | Amoxicilline | AMX |
| | Amoxicilline+Ac. clavulanique | AMC |
| | Imipénème | IPM |
| | Ticarciline | TIC |
| | Céfalexine Céfazoline | CN CZ |
| | Céfoxitine | FOX |
| | Cefotaxime Ceftriazone | CTX CRO |
| Aminosides | Gentamicine Netilmicine | GM NET |
| Quinolone et fluoroquinolone | Acide nalidixique Ciprofloxacine | NA CIP |
| Sulfamide et association | Triméthoprime/Sulfaméthoxazole | SXT |
| Furane | Nitrofurane | NIT |

II. 6. Recherche de Beta-lactamase à spectre élargi (BLSE)

Certaines entérobactéries résistantes aux β -lactamines produisent des enzymes spécifiques, capables d'inactiver ces antibiotiques. Parmi ces enzymes nous retrouvons les β -lactamases à spectre élargi. Ces enzymes peuvent être mises en évidence par un test de préemption (test de synergie) et un test de confirmation (test du double disque).

II. 6. 1. Test de synergie

La recherche de la BLSE se fait dans les conditions standards de l'antibiogramme, en déposant un disque d'AMC (amoxicilline + acide clavulanique) à 30 mm d'un disque de céphalosporine de 3^{ème} génération (céfotaxime ou céftriazone). Il s'en suit une incubation à 37°C pendant 18h.

Lecture : La production d'enzyme se traduit par l'apparition d'une image de synergie ou bouchon de champagne entre les disques. En absence de synergie, la production de BLSE sera suspectée devant toute diminution du diamètre autour des disques de céphalosporine de 3^{ème} génération.

II. 6. 2. Test de confirmation de double disque

Ce test est complémentaire au test de synergie puisqu'il confirme la synthèse d'une Beta-lactamase à spectre élargie par la souche étudiée. Ce test est réalisé devant tout diamètre de céfotaxime CTX < 27mm. Le test se fait comme suit :

- A partir d'une culture de 18h, préparer une suspension bactérienne. A l'aide d'un écouvillon stérile trempé dans la suspension, frotter la totalité de la surface de la gélose (Muller-Hinton) avec des stries serrées.
- Déposer un disque d'AMC et un disque de céphalosporine de 3^{ème} génération à une distance de 25mm pour les entérobactéries.
- Laisser diffuser les antibiotiques durant une heure à température ambiante, puis remplacer le disque d'AMC par un disque de CTX.
- incubé pendant 18 à 24h

Lecture : Ce test est positif quand le diamètre d'inhibition autour du disque de céphalosporine de 3^{ème} génération appliqué après diffusion du disque d'AMC est supérieur ou égale à 5 mm par rapport au diamètre d'inhibition du disque de céphalosporine de 3^{ème} génération.

II. 7. Test de sensibilité au sérum humain

L'effet bactéricide du sérum humain par activation du complément a été étudié par la méthode dite en « spot » de **Fierrer et al. (1972)**.

Cette méthode consiste à ensemencer par étalement, 100µl d'une culture bactérienne (en bouillon) en phase exponentielle de croissance diluée au 1/500 sur boîtes de gélose Mueller-Hinton. Après décantation 15 min à température ambiante, 50 µl de sérum sont déposés au centre de la boîte. Après 24 heures d'incubation à 37°C, si une croissance bactérienne à l'endroit du dépôt du sérum est observée, ceci témoigne d'une résistance de la souche testée au sérum.

Le sérum utilisé est préparé à partir du sang humain. Celui-ci est récupéré d'individus sains et laissé coaguler à température ambiante pendant 2 à 4 heures. Après centrifugation à 4000 rpm pendant 15 min, le sérum est stérilisé par passage dans des microfiltres de 0.45µm puis aliquoté et conservé à -20°C.

RESULTATS ET DISCUSSION

Dans cette partie, sont présentés puis discutés les résultats des travaux effectués au sein du laboratoire de bactériologie de l'hôpital FABOR à Blida. Ces travaux se divisent en deux grandes parties : la phase de recherche des entérobactéries (*E. coli* et *K. pneumoniae*) sécrétrices de BLSE et la phase du test de sensibilité à l'effet bactéricide du sérum humain.

I. Etude des prélèvements biologiques

I. 1. Répartition des prélèvements selon l'origine

Durant notre période d'étude, nous avons reçu 279 prélèvements pouvant être répartis comme suit :

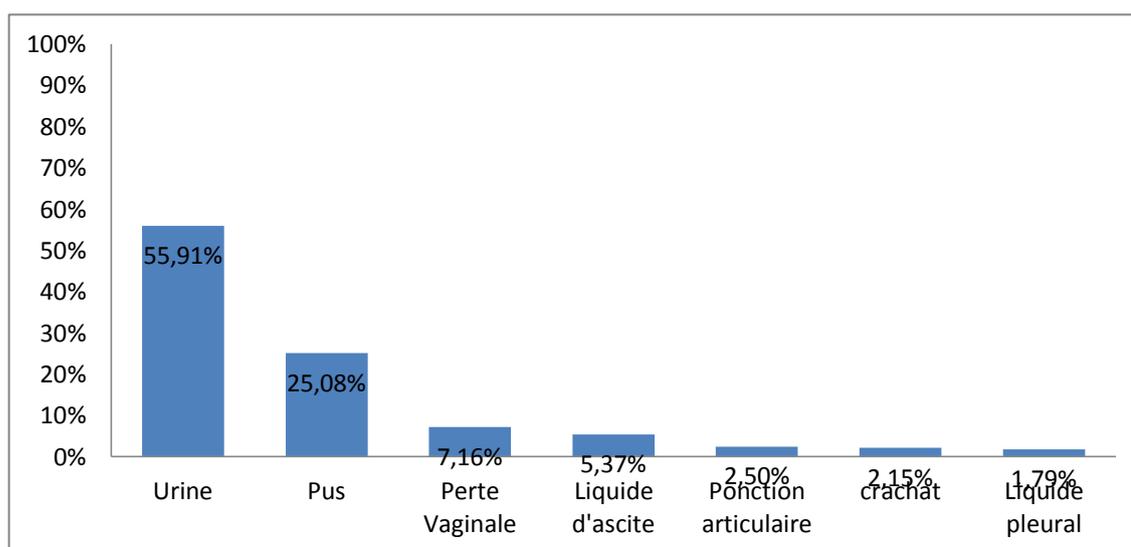


Figure 8 : Répartition des prélèvements reçus au laboratoire selon leur origine

Il ressort de l'analyse de la **figure 8**, les observations suivantes:

- ✓ Plus de la moitié des prélèvements, soit 55,91% (156), étaient d'origine urinaire.
- ✓ Le quart des prélèvements étaient représentés par le pus, soit un nombre de 70.
- ✓ Les prélèvements vaginaux, du liquide d'ascite, des ponctions articulaires, du crachat et du liquide pleural étaient rares et présentaient des taux de 7,16% (20), 5,37% (15), 2,5% (7), 2,15% (6) et 1,79% (5) respectivement.

Nous notons donc un nombre important de prélèvements d'urine et de pus représentant en somme 80,99% des prélèvements reçus. L'hôpital possédant un service de diabétologie, la quasi-totalité des prélèvements de pus proviennent des infections de pied diabétique.

RESULTATS ET DISCUSSION

I.2. Répartition des bactéries isolées des prélèvements

Les différentes études macroscopiques et microscopiques menées sur les prélèvements reçus nous ont permis d'identifier et d'isoler les bactéries responsables de la pathologie.

Au total, 195 bactéries ont été isolées de l'ensemble des prélèvements analysés au laboratoire réparties en 163 bactéries à Gram négatif et 32 à Gram positif. La famille des *Enterobacteriaceae* représente 84,94% (137) des bactéries Gram négatif isolées.

Toutes les entérobactéries ont été entièrement isolées des urines et du pus, comme par coïncidence ces prélèvements représentent ceux majoritairement reçus au laboratoire.

I.3. Répartition des entérobactéries isolées

Nous avons réussi à isoler **137 souches** de la famille des *Enterobacteriaceae*, correspondant à 9 espèces différentes, dont la répartition selon l'origine du prélèvement est illustrée dans le **tableau VI**.

Tableau VI: Répartition des entérobactéries isolées des prélèvements

| Espèces isolées | Nombre | pourcentage | Origine | |
|------------------------------|--------|-------------|---------|-----|
| | | | urine | pus |
| <i>Escherichia coli</i> | 78 | 56,93% | 63 | 15 |
| <i>Klebisella pneumoniae</i> | 30 | 21,89% | 13 | 17 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | 04 | 2,91% | 00 | 04 |
| <i>Proteus sp</i> | 15 | 10,94% | 05 | 10 |
| <i>Enterobacter sp</i> | 04 | 2,91% | 01 | 03 |
| <i>Serratia sp</i> | 02 | 1,45% | 00 | 02 |
| <i>Morganella morganii</i> | 02 | 1,45% | 00 | 02 |
| <i>Providencia sp</i> | 01 | 0,72% | 00 | 01 |
| <i>Citrobacter sp</i> | 01 | 0,72% | 00 | 01 |
| TOTAL | 137 | 100% | 82 | 55 |

L'analyse de ce tableau révèle la prédominance de deux espèces : *E. coli* suivie de *K. pneumoniae*. En effet :

- ✓ L'espèce *E. coli*, à elle seule, représentait 56,93% (78) des isolats d'origine urinaire et de pus.

RESULTATS ET DISCUSSION

- ✓ L'espèce *K. pneumoniae* était moins fréquente et comptait 30 (21,89%) isolats, alors que seuls 4 (2,91%) souches étaient des *K. oxytoca*. *Proteus sp* comptait 15 isolats correspondant à 10,94%.
- ✓ Les espèces d'*Enterobacter cloacae* (4 ; 2,91%), de *Serratia sp* (2 ; 1,45%), *Morganella morganii* (2 ; 1,45%), de *Providencia sp* (1 ; 0,72%) et de *Citrobacter sp* (1 ; 0,72%).

Dans les urines, les souches d'*E. coli* étaient en tête des isolats avec un taux de 76,82% (63), suivi de *K. pneumoniae* à 15,85% (13) puis de *Proteus sp.* à 6,09% (5). Ces mêmes bactéries étaient aussi majoritaires dans le pus mais à des proportions différentes : *K. pneumoniae* 30,90% (17), *E. coli* 23,63% (13) et *Proteus sp* 18,18% (10).

Les bactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* sont celles qui sont le plus souvent rencontrées en clinique. Les bactéries du genre *Escherichia* sont essentiellement des saprophytes du tube digestif et peuvent être responsable d'infections dans certaines circonstances. Les *Proteus* et les *Klebsiella* font partie des opportunistes ou des pathogènes occasionnels les plus souvent rencontrés. Bien que considérés comme opportunistes, ces bactéries sont capables de produire des facteurs de virulence comme les endotoxines qui peuvent être responsables d'infections fatales (**Freney et al., 2006**).

La prédominance des trois espèces bactériennes *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus sp.* parmi les entérobactéries responsables d'infection humaine ne date pas d'aujourd'hui. Plusieurs autres études rapportent la prévalence de ces espèces dans les infections nosocomiales et communautaires. Citons l'étude de **Souna, 2011** effectuée à Tlemcen et qui a trouvé 37,1% d'*E. coli*, 21,4% de *K. pneumoniae* et 19,3% *Proteus spp* dans un effectif de 140 isolats d'entérobactérie.

Dans notre étude, les entérobactéries isolées sont prédominants dans les infections urinaires, soit 59,85% (82) des isolats d'entérobactérie ; *Escherichia coli* étant majoritaire (76,82% ; 63). Loin de nous l'idée de comparer nos résultats avec ceux retrouvés dans la littérature, cependant il nous a semblé important de rapporter quelques chiffres concernant les souches d'*E. coli* isolées des urines. De ce fait, les études de **Mouy et al., 1996** de **Ben Abdallah et al., 2008** et de **Mahmoud et al., 2010** rapportent des taux de 70,2%, 76% et 72% respectivement pour des effectifs de 700, 8505 et 582 entérobactéries uropathogènes. Il est de

RESULTATS ET DISCUSSION

même pour *K. pneumoniae*, citons l'étude de **El Fertas-Aissani et al., 2012**, où les souches urinaires représentaient 48,14% pour un effectif de 54.

Les infections des voies urinaires (UTI) constituent l'une des infections bactérienne les plus communes, elle touche environ 40% des femmes à un certain moment de leur vie. Les UTI sont généralement peu sévères, toutefois, elles peuvent causer une septicémie mortelle. Ces infections peuvent avoir lieu dans différentes localisation dans le tractus urinaire. De cette manière nous pouvons avoir une cystite (infection de la vessie) une pyélonéphrite, une urétrite et une prostatite. Les UTI compliquées sont associées à des anomalies anatomiques ou fonctionnelles des voies urinaires (**Sheerin, 2011**).

Le taux élevé d'entérobactéries dans les pathologies urinaires est liée à l'histoire naturelle de cette infection. Elle débute par la colonisation du tube digestif par une souche uropathogène qui, grâce à la présence de facteurs de virulence, colonise l'aire périurétrale et migre le long de l'urètre vers la vessie, puis le long de l'uretère vers le rein (**Bower et al., 2005 ; Bidet et al., 2012**).

Comme nous l'avons précisé précédemment, la quasi-totalité des prélèvements de pus proviennent des infections de pied diabétique ; l'hôpital possédant un service de diabétologie. Le pied est une cible privilégiée du diabète pour différentes raisons. L'une d'elle est l'atmosphère confinée que constitue le pied et qui explique les macérations fréquentes, le risque d'infection (**Bertin et Leutenegger, 1999**).

L'infection, très fréquemment observée dans les troubles trophiques du pied chez le diabétique, en conditionne bien souvent le pronostic (**Caputo et al., 1994**). En effet, le déséquilibre du diabète s'accompagne d'une diminution de la mobilisation des leucocytes, d'une altération du chimiotactisme des leucocytes et d'une réduction de l'activité bactéricide des polynucléaires neutrophiles (**Got, 1999**). De plus, la présence d'une infection profonde risque d'aggraver l'ischémie en entraînant la formation de thrombus artériolaires qui vont perturber la diffusion des antibiotiques sur le site infecté. L'infection est très souvent polymicrobienne, aérobie et anaérobie ; les candidoses sont également très fréquentes (**Bertin et Leutenegger, 1999**).

RESULTATS ET DISCUSSION

II. Etude de l'antibio-résistance des souches d'*E. coli* et *K. pneumoniae*

L'étude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques n'a concerné que les espèces *E. coli* et *K. pneumoniae* vu leur prédominance parmi l'ensemble des isolats.

L'antibiogramme vise à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou de plusieurs antibiotiques. Ce test a été effectué sur les deux espèces qui prédominaient dans les urines et le pus à savoir : *E. coli* et *K. pneumoniae* soit un nombre de **108 souches**. Les résultats sont illustrés dans la **figure 9**.

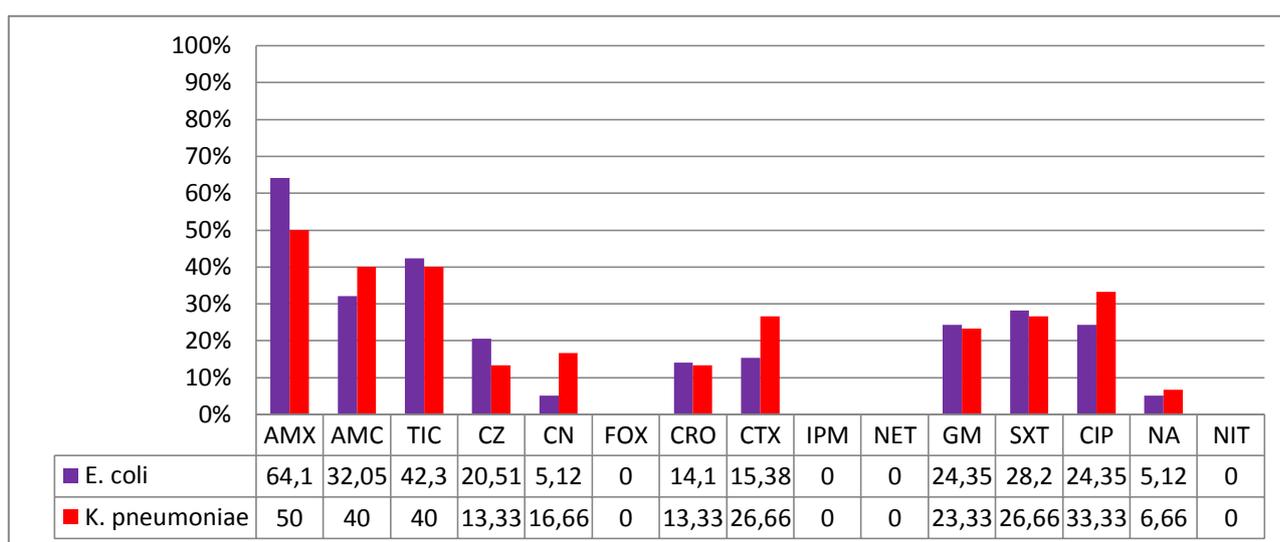


Figure 9 : résultats de l'antibiogramme des souches de *E. coli* et de *K. pneumoniae*

En somme, vis-à-vis des **β-lactamines**, 64,1% des isolats (50) d'*E. coli* étaient résistants à l'AMX, 32,05% (25) à l'AMC, 42,3% (33) à la TIC, 20,51% (16) à la CZ, 5,12% (4) à la CN, 14,1% (11) à la CRO et 15,38% (12) au CTX.

Concernant les **aminosides**, 24,35% (19) des isolats d'*E. coli* étaient résistants à la GM. La résistance à NA et la CIP, antibiotique de la famille des **quinolones et fluoroquinolones**, était de 5,12% (4) et 24,35% (19) respectivement. Enfin, pour les **sulfamides**, nous avons observé 28,2% (22) de résistants au SXT.

Pour les souches de *K. pneumoniae*, les taux de résistances aux **β-lactamines** étaient de: 50% (15) pour AMX, 40% (12) pour AMC, 40% (12) pour TIC, 13,33% (4) pour CZ, 16,66% (5)

RESULTATS ET DISCUSSION

pour CN, 13,33% (4) pour CRO, 26,66% (8) pour CTX. Nous avons noté un taux de résistance de 23,33% (7) à la GM ; une aminoside, de 26,66% (8) pour une sulfamide la SXT, de 6,66% (2) à NA et 33,33% (10) à la CIP, quinolone et fluoroquinolone respectivement.

De plus, aucune résistance, de l'ensemble des bactéries n'a été observée pour FOX, l'IPM, à la NET et à la NIT.

La résistance des bactéries aux antibiotiques a été reportée dès la découverte du premier antibiotique, la pénicilline G. Il s'agit de la résistance naturelle qui implique un ou plusieurs mécanismes innés à certaines espèces bactériennes. Elle permet de définir le spectre clinique d'un antibiotique (**Philippon, 2008**).

L'une des résistances naturelles des *E. coli* aux β -lactamines est médié par un gène *ampC* qui code pour une céphalosporinase de classe C d'Ambler. Elle est exprimée de manière constitutive à très bas niveau. Selon le niveau d'expression, le phénotype de résistance naturel varie entre une sensibilité à toutes les β -lactamines testées et une sensibilité intermédiaire aux céphalosporines de première génération et/ou aux aminopénicillines avec et sans inhibiteurs. Par contre, les *K. pneumoniae* possèdent une pénicillinase chromosomique constitutive exprimée à bas niveau (SHV-1). Leur phénotype de résistance naturelle est caractérisé par une résistance aux aminopénicillines et aux carboxypénicillines (**Robin et al., 2012**).

Outre cette résistance naturelle, propre à de nombreuses espèces bactériennes rencontrées dans la nature, la résistance acquise a été rapidement découverte. Cette résistance illustre l'extraordinaire plasticité du monde microbien, tant sur le plan génétique, avec en particulier les mutations, les transferts de gènes, plus récemment les mobilisations de gènes chromosomiques, que biochimique (impermeabilité, inactivation enzymatique, modification d'affinité, substitution de cible, efflux) (**Philippon, 2008**).

RESULTATS ET DISCUSSION

II. 1. Résistance aux β -lactamines

L'utilisation souvent excessive des β -lactamines a contribué à l'apparition de résistance acquise parmi les principales espèces bactériennes pour tous les produits de la famille des β -lactamines. Ces mécanismes de résistance acquise peuvent être de nature enzymatique ou non enzymatique. (**Cavallo et al. 2004**).

Dans notre étude, nous avons noté une résistance des *E. coli* à l'AMX à un taux de 64,1%. Cette résistance est très souvent citée dans la littérature, comme le rapportent les études de **Ben abdallah et al., 2008** (61%) et **Mahmoud et al. 2010** (72%). Ces taux de résistance élevés reflèteraient l'utilisation intensive des pénicillines, notamment en association avec les aminosides, en milieu hospitalier et leur usage courant en antibiothérapie empirique préventive et thérapeutique. Dans notre étude, il semblerait que les céphalosporines soient plus actives que les pénicillines. Ceci pourrait s'expliquer par la non prolifération de ces nouvelles molécules en thérapeutique communautaire et leur non utilisation de façon intensive en milieu hospitalier pour les infections urinaires dont sont responsables la plus part de nos souches.

La résistance aux β -lactamines peut s'expliquer par des mécanismes enzymatiques et non enzymatique :

- Le premier type de mécanismes non enzymatiques de la résistance acquise des bactéries aux bêta-lactamines est l'imperméabilité membranaire. Chez les bactéries à Gram négatifs, il s'agit de la diminution de la perméabilité des porines de la membrane externe qui empêche la pénétration de l'antibiotique ou limite fortement sa concentration dans l'espace périplasmique. Ces porines peuvent ne pas être fonctionnelles suite à une mutation du gène provoquant une modification structurale ou à une diminution quantitative de leur expression (**Livermore et Williams, 1996**). Deux porines principales sont présentes chez *E.coli* : OmpF et OmpC. (**Jaffe et al., 1982**)
- Le second mécanisme non enzymatique est la sélection d'une mutation qui aboutit à une hyper expression d'un système d'efflux actif et va permettre à la bactérie de rejeter davantage l'antibiotique dans le milieu extérieur. Le système d'Efflux est

RESULTATS ET DISCUSSION

constitué de plusieurs pompes qui permettent à la bactérie d'assurer les échanges avec le milieu extérieur (**Cavallo et al., 2004**).

- Les mécanismes enzymatiques constitués par la sécrétion des β -lactamase peuvent également expliquer ces taux de résistance bactérienne. Ces mécanismes enzymatiques constituent de loin le mécanisme le plus répandu de résistance des bactéries aux β -lactamines. Ces β -lactamase sont le plus souvent plasmidiques mais elles peuvent être portées par le chromosome (exemple de SHV-1 de *Klebisella pneumoniae*). Des β -lactames, certains sont appelées BLSE, ces derniers possèdent un large spectre d'activité (**Cavallo et al., 2004 ; Jacoby et Munoz-Price, 2005**).

Dans la collection de souches que nous avons étudiée, il semblerait que le principal mécanisme de résistance aux β -lactamines soit la production de β -lactamases. En effet, nous avons noté respectivement, chez les souches d'*E. coli* et *K. pneumoniae*, des résistances à l'amoxicilline 64,1%, 50% et à la ticarciline 42,3%, 40%, ce phénotype indique la production de pénicillinase. Ces résultats sont confortés par la présence, chez ces souches, de β -lactamases classiques de type pénicillinases TEM et SHV. De telles enzymes sont communément retrouvées chez des souches de *K. pneumoniae* et *E. coli* (**Bush et al., 1995 ; Mederios, 1997**). De plus, *K. pneumoniae* possède un phénotype de résistance naturel qui résulte de la production d'une pénicillinase chromosomique (SHV-1) exprimé de façon constitutive chez la plus part de souches de *K. pneumoiae* (**Livermore, 1995**). Cette enzyme est connue pour son activité sur l'amocxicilline et la ticarcilline et sa sensibilité à l'acide clavlanique (**Heritage et al., 1999**).

II. 2. Etude de la résistance au quinolones/fluoroquinolones

L'acide nalidixique possède un spectre antibactérien limité aux entérobactéries. Les fluoroquinolones sont actives sur les entérobactéries y compris sur les souches résistantes aux céphalosporines de troisième génération par production de β -lactamases, mais non sur celles qui sont résistantes par anomalie de la perméabilité membranaire. Ils agissent sur l'ADN gyrase et les topo-isomérase IV (**Bryskier, 1999**).

Les résultats de l'antibiogramme des *E. coli* présentent une résistance de 5% aux quinolones et de 24% au fluoroquinolone. Il est important de noter que l'utilisation de l'acide nalidixique, dans les antibiogrammes, n'est pas systématique au sein du laboratoire. Il est fréquent que les

RESULTATS ET DISCUSSION

disques de cet antibiotique soit en manque. Les études de **De Mouy et al., 1996** et de **Moreno et al., 2005 rapportent des taux de 10,6% et 21%** de résistance au quinolone et de 4,2% et 12 % de résistance aux fluoroquinolone respectivement.

Les taux de résistances observés à dans cette famille d'antibiotique peuvent être dus à au moins deux mécanismes, dont les principaux :

- Un défaut d'accumulation de l'antibiotique, du à la diminution, voire à l'absence de la pénétration transpariétale ou à une augmentation de l'efflux.
- La modification de la cible cellulaire par un ou plusieurs mutations des sous unité de l'ADN gyrase ou de la topoisomérase IV(**Bryskier, 1999**).

III. Etude des souches productrices de β -lactamases à spectre élargi

La BLSE est une enzyme inactivant les céphalosporines de troisième génération (C3G), et pouvant être synthétisée par la plupart des entérobactéries. Cette synthèse se traduit le plus souvent à l'antibiogramme par une image de synergie dite « en bouchon de champagne » entre un disque de céphalosporine de troisième génération et un disque imprégné d'un inhibiteur de β -lactamase (seul ou associé).

La recherche de BLSE a révélé une image de synergie pour 35 souches soit un taux de 32,40% (**Figures 10 et 11**), les non BLSE représentaient 67,59% (73) des souches. Parmi les 35 BLSE, 23 sont des *E. coli* et 13 souches *K. pneumoniae*. Les 23 souches BLSE d'*E. coli* représente 29,48% des isolats de *E. coli*, 11 de ces 23 souches proviennent d'urine et 12 du pus (**Tableau VII**). Par ailleurs nous avons défini les profils de résistance aux antibiotiques des souches sécrétrices de β -lactamases à spectre élargi, ils sont au nombre de 12 pour les *E. coli* et de 6 pour les *K. pneumoniae* illustrés dans le **tableau VIII et IX**.

RESULTATS ET DISCUSSION



Figure 10: Image de synergie d'une BLSE:
Escherichia coli



Figure 11: Image de synergie d'une BLSE:
Klebsiella pneumoniae

Tableau VII: Répartition des souches BLSE et non BLSE d' *E. coli* et de *K. pneumoniae*.

| | Souche BLSE | | Souche non BLSE | | TOTAL |
|----------------------|-------------|-----------|-----------------|-----------|------------|
| | Urine | Pus | Urine | Pus | |
| <i>E. coli</i> | 11 | 12 | 52 | 03 | 78 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 03 | 09 | 10 | 08 | 30 |
| TOTAL | 14 | 21 | 62 | 11 | 108 |

RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau VIII : Profils de résistance aux antibiotiques des souches BLSE d'*E. coli* et de *K. pneumoniae*

| | nomination | Profil de résistance | origine | Etat du patient |
|------------------------------|-------------------|--------------------------------------|----------------|------------------------|
| Escherichia coli | E.c1 | AMX, AMC, TIC, CZ, CTX, GM, CIP | urine | Externe |
| | E.c2 | AMX,AMC, TIC, CZ, CTX, GM, CIP, SXT | pus | Hospitalisé |
| | E.c3 | AMX, AMC, TIC, CZ, CRO, GM, CIP | urine | Hospitalisé |
| | E.c4 | AMX, AMC, TIC, CZ, CRO, GM, CIP, SXT | pus | Hospitalisé |
| | E.c5 | AMX, AMC, TIC, CZ, CRO, GM, CIP, SXT | pus | Hospitalisé |
| | E.c6 | AMX, AMC, TIC, CZ, CTX, GM, CIP, SXT | pus | Hospitalisé |
| | E.c7 | AMX, AMC, TIC, CZ, CTX, GM, CIP, SXT | pus | Hospitalisé |
| | E.c8 | AMX, AMC, TIC, CZ, CRO, GM, SXT | urine | Externe |
| | E.c9 | AMX, AMC, TIC, CZ, CRO, CIP, NA | pus | Hospitalisé |
| | E.c10 | AMX, AMC, CTX, GM, CIP, NA, SXT | urine | Externe |
| | E.c11 | AMX, AMC, CTX, GM, CIP, SXT | urine | Externe |
| | E.c12 | AMX, AMC, TIC, CTX, SXT | urine | Hospitalisé |
| | E.c13 | AMX, AMC, TIC, CZ, CRO, GM, SXT | pus | Hospitalisé |
| | E.c14 | AMX, AMC, TIC, CZ, CTX, GM, CIP | urine | Externe |
| | E.c15 | AMX, AMC, TIC, CZ, CRO, GM, CIP | urine | Hospitalisé |
| | E.c16 | AMX, AMC, TIC, CZ, CRO, GM, CIP, SXT | pus | Hospitalisé |
| | E.c17 | AMX, AMC, TIC, CZ, CRO,CIP, SXT | pus | Hospitalisé |
| | E.c18 | AMX, AMC, TIC, CZ, CRO, CIP, GM, SXT | pus | Hospitalisé |
| | E.c19 | AMX,AMC, TIC, CZ, CTX, GM, CIP, SXT | urine | Hospitalisé |
| | E.c20 | AMX, AMC, TIC, CZ, CRO, CIP, NA | pus | Hospitalisé |
| | E.c21 | AMX, AMC, CTX, GM, CIP, NA, SXT | urine | Externe |
| | E.c22 | AMX, AMC, TIC, CTX, GM, SXT | pus | Hospitalisé |
| | E.c23 | AMX, AMC, TIC, CTX, GM, CIP, SXT | urine | Hospitalisé |
| Klebsiella pneumoniae | K.p1 | AMX, AMC, TIC, CZ, CRO, GM, CIP, SXT | Urine | Externe |
| | K.p2 | AMX, AMC, TIC, CZ, CRO, GM, CIP, NA | Pus | Hospitalisé |
| | K.p3 | AMX, AMC, TIC, CTX, GM, CIP, CN | Pus | Hospitalisé |
| | K.p4 | AMX, AMC, TIC, CTX, GM, CIP, SXT | urine | Hospitalisé |
| | K.p5 | AMX, AMC, TIC, CTX, GM, CIP, CN | Pus | Hospitalisé |
| | K.p6 | AMX, AMC, TIC, CTX, SXT, CN | Pus | Hospitalisé |
| | K.p7 | AMX, AMC, TIC, CTX, CIP, CN | Pus | Hospitalisé |
| | K.p8 | AMX, AMC, TIC, CZ, CRO, GM, CIP, NA | Pus | Hospitalisé |
| | K.p9 | AMX, AMC, TIC, CZ, CRO, GM, CIP, SXT | Urine | Hospitalisé |
| | K.p10 | AMX, AMC, TIC, CTX, SXT, CN | Pus | Hospitalisé |
| | K.p11 | AMX, AMC, TIC, CTX, CIP, CN | Pus | Hospitalisé |
| | K.p12 | AMX, AMC, TIC, CTX, CIP, CN | Pus | Hospitalisé |

E.c: *Escherichia coli* ; **K.p:** *Klebsiella pneumoniae* ; **AMX:** Amoxicilline ; **AMC:** Amoxicilline+Acide clavulanique ; **TIC:** Ticarcilone ; **CTX:** Cefotaxime ; **CRO:** Ceftriazone ; **CZ:** Cefazoline ; **CN:** Cefalexine ; **CIP:** Ciprofloxacine ; **NA:** Acide Nalidixique ; **GM:** Gentamicine ; **SXT:** Sulfamide + Trimethoprime

RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau IX: Les différents types de profil de résistance des souches BLSE

| N° | Profil de résistance aux antibiotiques | Nombre de souches | Nomination des souches |
|------------------------------------|----------------------------------------|-------------------|-----------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | | | |
| 1 | AMX, AMC, TIC, CTX, SXT | 01 | E.c12 |
| 2 | AMX, AMC, CTX, GM, CIP, SXT | 01 | E.c11 |
| 3 | AMX, AMC, TIC, CTX, GM, SXT | 01 | E.c22 |
| 4 | AMX, AMC, TIC, CZ, CRO, CIP, SXT | 01 | E.c17 |
| 5 | AMX, AMC, TIC, CTX, GM, CIP, SXT | 01 | E.c23 |
| 6 | AMX, AMC, TIC, CZ, CTX, GM, CIP, | 02 | E.c1 ; E.c14 |
| 7 | AMX, AMC, TIC, CZ, CRO, GM, CIP | 02 | E.c3 ; E.c15 |
| 8 | AMX, AMC, TIC, CZ, CRO, GM, SXT | 02 | E.c8, E.c13 |
| 9 | AMX, AMC, TIC, CZ, CRO, CIP, NA | 02 | E.c9 ; E.c20 |
| 10 | AMX, AMC, CTX, GM, CIP, NA, SXT | 02 | E.c10 ; E.c21 |
| 11 | AMX, AMC, TIC, CZ, CRO, GM, CIP, SXT | 04 | E.c4 ; E.c5 ; E.c16 ; E.c18 |
| 12 | AMX, AMC, TIC, CZ, CTX, GM, CIP, SXT | 04 | E.c2 ; E.c6 ; E.c7 ; E.c19 |
| <i>Klebsiella pneumonia</i> | | | |
| 1 | AMX, AMC, TIC, CTX, CIP, CN | 03 | K.p7 ; K.p 11; K.p 12 |
| 2 | AMX, AMC, TIC, CTX, SXT, CN | 02 | K.p6 ; K.p10 |
| 3 | AMX, AMC, TIC, CTX, GM, CIP, SXT | 01 | K.p4 |
| 4 | AMX, AMC, TIC, CTX, GM, CIP, CN | 02 | K.p3 ; K.p5 |
| 5 | AMX, AMC, TIC, CZ, CRO, GM, CIP, SXT | 02 | K.p1 ; K.p9 |
| 6 | AMX, AMC, TIC, CZ, CRO, GM, CIP, NA | 02 | K.p2 ; K.p8 |

Le profil de résistance aux β -lactamines à large spectre des souches BLSE sont prédictives de la production d'enzyme CTX-M qui se distinguent par une résistance préférentielle au céfotaxime (ou céftriaxone) qu'à la céftazidimes (**Quinteros et al., 2003 ; Bonnet, 2004 ; Chen et al., 2005**). Les profils de sensibilité aux antibiotiques non β -lactames montrent une co-résistance élevée aux sulfamides et aux aminosides, tel que cela a été signalé dans de nombreuses études (**Paterson et al., 2000 ; Bell et al., 2002 ; Jain et Mondal, 2007**).

Les BLSE étaient dans un premier de temps (1985) de pénicillinases connus (TEM/SHV) ayant modifié leur affinité pour les β -lactamines dont les C3G par mutation (**Philippon, 2013**). De nos jours, on observe de nouvelles familles de BLSE chez les entérobactéries dont les principaux sont les CTX-M, les VEB et les GES (**Cattoir, 2008**). Les souches productrices de BLSE restent généralement sensibles aux céphamycines et aux carbapénèmes(imipénème).

RESULTATS ET DISCUSSION

Les BLSE de classe A sont inhibées par les inhibiteurs de β -lactamase comme l'acide clavulanique (**Cavallo et al., 2004 ; Livermore, 2008**).

Dans notre étude, les souches sécrétrices de BLSE sont majoritairement représentées par les *E. coli* (23 souches) et 12 souches de *K. pneumoniae*. C'est à partir de 1995 que cette situation épidémiologique a complètement changé au niveau mondial avec l'émergence explosive de « nouvelles » BLSE (notamment CTX-AM) chez les entérobactéries. En effet, la plupart des souches productrices de BLSE sont maintenant des souches de *E. coli* exprimant des BLSE de type CTX-M responsable d'infection communautaires, notamment urinaires (**Pitout et al., 2005**).

Les infections provoquées par ces bactéries ont un impact significatif sur les résultats cliniques. Les principaux risques liés à la production des BLSE par les souches bactériennes est associé à la durée des hospitalisations dans les hôpitaux et à la grande charge des antibiotiques utilisés. Les efforts pour contrôler leur explosion doit être redoublés par l'utilisation judicieux de tous les antibiotiques et la prise des précaution pour contrôler leur diffusion (**Lautenbach et al., 2001**).

IV. Etude de la sensibilité au système du complément

L'étude de la sensibilité a été effectué sur les souches productrices de β -lactamases à spectre élargi, à savoir 35 souches (23 *E. coli*, 12 *K. pneumoniae*). La méthode de **Fierrer et al., 1972**, dite la « méthode des spots » est celle que nous avons choisi et qui met en évidence deux phénotypes : **Sensible** et **Résistant**. Les résultats de ce test sont consignés dans le **tableau X**, un exemple de phénotype de sensibilité et de résistance est donné dans les **figures 12 et 13**.

RESULTATS ET DISCUSSION



Figure 12: image de sensibilité au sérum humaine: souche de *E. coli*

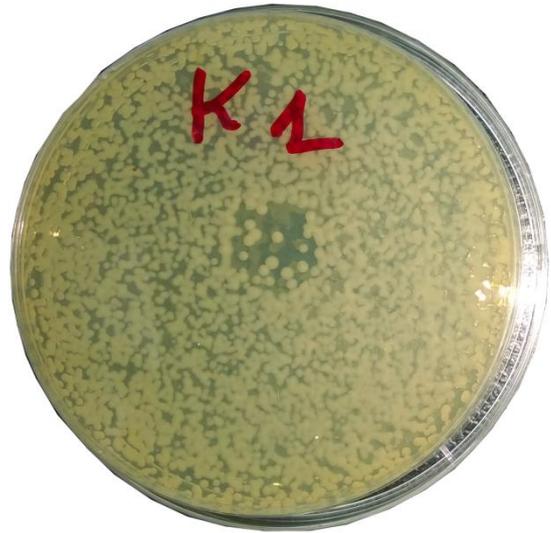


Figure 13: Image de résistance au sérum humain: souche de *Klebsiella pneumoniae*

Tableau X : Résultat du test de sensibilité à l'effet bactéricide du sérum humain

| | Positif au test | Négatif au test |
|----------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>E. coli</i> | 05 E.c2 ; E.c8 ; E.c13 ; E.c19 ; E.c23 | 18 E.c1 ; E.c3 ; E.c4 ; E.c5 ; E.c 6 ; E.c7 ; E.c9 ; E.c10 ; E.c11 ; E.c12 ; E.c14 ; E.c15 ; E.c16 ; E.c17 ; E.c18 ; E.c20 ; E.c21 ; E.c22 |
| <i>K. pneumoniae</i> | | 12 Kp1 ; Kp2 ; K.p3 ; K.p4 ; K.p5 ; K.p6 ; K.p7 ; K.p8 ; K.p9 ; K.p10 ; K.p11 ; K.p12 |
| TOTAL | 05 | 30 |

Le **tableau X** nous montre que 5 (21,73%) souches de *E. coli* sont sensibles à l'effet bactéricide du sérum humain tandis que 18 (78,26%) souches y sont résistantes. Nous remarquons également que 3 (60%) des souches sensibles à l'effet du sérum proviennent

RESULTATS ET DISCUSSION

d'urine (E.c8, E.c19 et E.c23) et 2 (40%) souches sont issues du pus (E.c2, E.c13). Les souches de *K. pneumoniae* sont tous résistantes à l'effet bactéricide du sérum humain.

L'adhésion aux surfaces muqueuses et aux épithéliums, est la toute première étape qu'entreprennent les bactéries dans leur relation avec l'hôte aussi bien dans le tractus urinaire que dans les autres organes. L'infection pourrait se limiter à une colonisation des surfaces cutanées ou des épithéliums muqueux. La majorité des bactéries pathogènes ne se limitent pas à cette étape et vont plus en profondeur après avoir franchit les muqueuses : elles peuvent traverser l'épithélium et atteindre les tissus sous-muqueux et sous-cutané, les ganglions régionaux ou l'organisme dans sa totalité *via* la circulation sanguine (**Mainil, 2005**).

Une fois dans le sang, les bactéries pathogènes invasives vont tenter de se multiplier et de se distribuer dans l'ensemble des organes internes. Pour ce faire, elles doivent surmonter diverses défenses de l'hôte, représentées principalement par les effecteurs du système immunitaire innée et adaptatif.

Le système du complément est l'un de ces mécanismes de défense dits « non spécifiques ». Il représente un ensemble de protéines sériques (C1 à C9) qui, suite à leur activation, par une cascade de réactions, développent diverses actions anti-microbiennes (attraction des phagocytes, opsonisation, cytolyse) (**Taylor, 1983**). La résistance à l'effet bactéricide du complément est une propriété de virulence importante pour les bactéries qui envahissent le système circulatoire. Les bactéries résistantes au complément peuvent être à l'origine d'infections profondes (septicémies et infections systémiques) (**Taylor, 1983 ; Mainil 2005**). Les réponses de nos souches à l'effet bactéricide du sérum, déterminées par la méthode des spots, montrent la résistance de toutes les souches de *K. pneumoniae* (12/12) et de la quasi-totalité des souches *E. coli* (18/23). Plusieurs auteurs rapportent une importante résistance des souches de *K. pneumoniae*, citons **Benge, 1988** (40%), **Podschun et al., 2000** (25%), **Sahly et al., 2004** (30%).

Il est logique que ces mécanismes de résistance trouvent leur origine dans des structures présentes à la surface du corps bactérien. Les tests phénotypiques couvrent l'ensemble des mécanismes possibles de résistance au complément mais ne peuvent identifier le mécanisme impliqué dans cette résistance. En se référant aux données de la littérature, nous suspectons l'implication de certains types capsulaires, certains antigènes O du LPS et certaines protéines de membrane externe dans la résistance au système du complément (**Mainil, 2005**).

RESULTATS ET DISCUSSION

Des études initiales sur des souches de *Klebsiella pneumoniae* ont montré que l'antigène O du LPS est le principal mécanisme impliqué dans leur résistance à l'effet bactéricide du complément. Des mutants de laboratoire n'exprimant pas l'antigène O (mutants O-) sont sensibles à l'action du complément (**Tomas et al., 1986**). Cette résistance est influencée par la longueur de l'antigène O, ses ramifications et aussi par sa composition biochimique comme l'ont montré les études de **Ciurana et Tomas (1987)**, de **Tomas et al. (1986)**, de **Merino et al. (1992)** et de **Alberti et al. (1993)** et **(1996)**.

Les études de **Merino et al. (1992)** et **Alvarez et al. (2000)** indiquent également le rôle de la capsule polysaccharidique dans la résistance de certaines souches de *K. pneumoniae* au complément. Ils ont montré que ce mécanisme de résistance concerne les souches qui ont une capsule masquant les activateurs du complément dont le LPS.

Bien que certaines protéines insérées dans la membrane externe confèrent aux souches qui les produisent la résistance au sérum, leur mécanisme d'action exact, direct (inhibition du dépôt du CAM) ou indirect (diminution de la fluidité membranaire) n'est pas bien connu (**Mainil, 2003b**). En 1980, **Moll et al.** ont montré que la résistance au sérum est due à une protéine plasmidique de la membrane externe. Cette dernière est codée par le gène *traT* qui fait partie de l'opéron *tra*, une unité de transcription responsable de la conjugaison bactérienne. Ce gène impliqué dans le phénomène de l'exclusion de surface (**Achtman et al., 1977 ; Moll et al., 1980**), conférerait aussi la résistance au sérum en bloquant l'action du complément plutôt que sa formation (**Moll et al., 1980 ; Binns et al., 1982**).

La présence de facteurs de virulence tels que la résistance au sérum, associée à la résistance aux β -lactamines de 3^{ème} génération, chez quelques souches d'entérobactéries, responsables d'infections nosocomiales et communautaires constituent une menace pour les populations vulnérables. Cette association résistance/ virulence est parfois d'ordre génétique, le support génétique des deux caractères étant le même. Le plus dangereux c'est l'association de la virulence des plasmides à l'origine du caractère BLSE. Ces plasmides étant généralement conjugatifs, pourraient disséminer et la résistance et la virulence chez d'autres espèces bactériennes voir d'autres genres, par transfert horizontaux.

CONCLUSION

CONCLUSION :

Les souches de *Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae* demeurent majoritaire parmi les entérobactéries responsables des infections humaines notamment urinaires et purulentes. Le tiers de ces bactéries sont productrices de Beta-lactamase à spectre élargi (BLSE), un pourcentage assez important qui doit maintenir l'alerte vis-à-vis du risque de dissémination des plasmides portant les gènes des Béta-lactamses dans le monde bactérien. La tendance des souches BLSE isolées ces dernières années est majoritaire chez les *E.coli* que chez les *K. pneumoniae*, un changement épidémiologique grâce à la dissémination des nouvelles BLSE de type CTX-M. Ces souches BLSE possèdent un caractère de multirésistance à l'endroit de toutes les bêta-lactamines et des autres familles d'antibiotique, ainsi qu'une résistance accrue à l'effet bactéricide du sérum humain. Ceci alourdi la clinique des infections aux souches BLSE pouvant facilement aboutir à une septicémie. Il alourdi également la durée et le coût des traitements médicaux. Pour ce faire, les différents efforts déjà mis en œuvre par les services compétents afin de contrôler la propagation des souches BLSE doit être maintenue, voire redoubler. Cette étude peut être poursuivie sur le plan moléculaire, afin de déterminer la corrélation entre les plasmides codant pour les facteurs de résistance et ceux codant pour la virulence. Des données qui rendront complets ce travail et qui aideront dans la politique de prévention et de lutte contre les bacilles multi-résistants.

Matériel non biologique :

Il est représenté par les appareillages, la verrerie, les réactifs, les colorants, les milieux de culture et les antibiotiques

a- Verreries et appareillages :

- Lames et lamelles
- Pipettes Pasteur stérile
- Tubes à essais stériles
- Bocal rempli de l'eau de javel
- Boite de pétri
- Ecouillons
- Poire
- Pied à coulisse
- Pince métallique
- Portoir a tubes
- Poupinelle
- seringue
- Bec Bunsen
- Vortex
- Cloche
- Etuve d'incubation à 35C°
- Réfrigérateur à 4C° et à 20C°
- Micropipette
- Microscope optique

b- Solutions :

- Eau physiologique stérile à (9%)
- Eau oxygénée (H₂O₂)
- Huile de vaseline stérile
- Sérum humain
- Alcool à 95C°

c- Les colorant

- Fushine
- Lugol
- Violet de Gentiane

| Les milieux liquides | | |
|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Milieu | Composition g/l | Utilisation |
| Urée-indole | -Tryptophanes.....3 -Phosphate mono potassique....1 -Phosphate bi potassique.....1 -Chlorure de sodium.....5 -Urée.....20 -Rouge de phénol.....0,025 -Alcool à 95°.....0,1 -PH.....6, 7 | La recherche de : - Urée - TDA - Indole |
| Bouillon nitrate | -Cœur cerveau infusion.....25 -Nitrate de sodium.....10 -PH.....7,2 | Recherche de nitrate réductase. |
| Clark et Lubs | -Peptone.....5 -Glucose.....5 -Phosphate.....5 -PH.....7,5 | Utilisé pour déterminer la voie fermentaire du glucose |
| BHIB | -Extrait cœur-cervelle17,5 g - Peptone pancréatique de gélatine10,0 g - Chlorure de sodium.....5,0 g - Phosphate disodique2,5 g - Glucose.....2,0 g pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,4 ± 0,2. | Milieu d'enrichissement |

| Les milieux solides | | |
|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Gelose nutritive | <ul style="list-style-type: none"> • extrait de viande 1,0g/L • extrait de levure 2.5g/L • peptone 5,0g/L • chlorure de sodium 5,0g/L • Agar 15,0g/L • pH = 7,0 | Elle permet le développement de toutes les bactéries |
| Milieu mueller-hinton | <ul style="list-style-type: none"> • infusion de viande de bœuf : 300,0 ml • peptone de caséine : 17,5 g • amidon de maïs : 1,5 g • agar : 17,0 g • pH = 7,4 | Milieu pour la réalisation d'antibiogramme |
| Milieu Chapman | <ul style="list-style-type: none"> • Peptone :.....10,0 g • Extrait de viande de bœuf :.....1,0 g • Chlorure de sodium :.....75,0 g • Mannitol :.....10,0 g • Rouge de phénol :.....0,025 g • Agar-Agar :.....15,0 g • Eau distillée :.....qsp 1 Litre • pH = 7,4 | Milieu sélectif pour <i>Staphylococcus aureus</i> |
| Milieu BCP | <ul style="list-style-type: none"> • peptone : 5,0 g • Extrait de viande de bœuf : 3,0 g • Lactose : 10,0 g • Pourpre de bromocrésol : 25 mg • Agar : 15 g (pH = 6,8) | Milieu différentiel pour les entérobactéries |
| Milieu Hektoen | <ul style="list-style-type: none"> -Peptone pepsique de viande... 12,0 g - Extrait autolytique de levure. 3,0 g -lactose..... 12,0 g - Saccharose 12,0 g - Salicine..... 2,0 g - Sels biliaires 9,0 g - Chlorure de sodium 5,0 g - Thiosulfate de sodium 5,0 g - Citrate ferrique ammoniacal... 1,5 g - Bleu de bromothymol 65 mg - Fuchsine acide 40 mg - Agar agar bactériologique... 13,5 g | Milieu sélectif des enterobactéries |
| Milieu gelose au sang (cuit et frais) | <ul style="list-style-type: none"> Melange de peptone 16g Extrait de levure2g D-glucose5g Chlorure de sodium.....7g Agar12g | Milieu enrichi pour bactéries exigeantes |

Annexe II

| Réactif | Composition | Utilisation |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| Kovacs  | -Diméthyle-amino 4 benzaldéhyde...50g -Acide chlorhydrique...250cm ³ -Pentanol.....750cm ³ | Recherche d'indole |
| TDA  | -Perchlorure de fer.....3,4g -Eau distillé.....100ml | Recherche de TDA |
| VPI  | -Naph-1-ol.....60g -Ethanol.....1cm ³ | Recherche de l'acétoïne |
| VPII  | Solution aqueuse d'hydroxyde de potassium à 4mol.cm ³ (10%) | Recherche de l'acétoïne |
| RM  | -Rouge de méthyle.....5g -Ethanol.....1cm ³ | Recherche des acides |

Tableau des réactifs utilisés pour le test API 20^E

Annexe II

| Antibiotiques testés | Sigle | Diamètres critiques (mm) | |
|--------------------------------------------|-------|--------------------------|----------|
| | | Résistant | Sensible |
| <u>B-Lactamines :</u> | | | |
| Amoxicilline | AMX | <16 | ≥21 |
| Amoxicilline+Ac. clavulanique | AMC | <16 | ≥21 |
| Ticarciline | TIC | <22 | ≥24 |
| Céfazoline | CZ | ≤14 | ≥18 |
| Céfoxitine | FOX | <15 | ≥22 |
| Céfotaxime | CTX | <23 | ≥26 |
| Céfalexine | CN | ≤13 | ≥18 |
| Ceftriazone | CRO | <23 | ≥26 |
| Imipénème | IPM | <17 | ≥24 |
| <u>Aminosides:</u> | | | |
| Gentamicine | GM | <16 | ≥15 |
| Netilmicine | NET | <19 | ≥22 |
| <u>Quinolone et fluoroquinolone</u> | | | |
| Acide nalidixique | NA | <15 | ≥20 |
| Ciprofloxacine | CIP | <22 | ≥25 |
| <u>Sulfamide et association</u> | | | |
| Triméthoprime/Sulfaméthoxazole | SXT | <13 | ≥16 |

Table de lecture des valeurs critique des diamètres des zones d'inhibition des entérobactéries. (CA-SFM 2010)