

# THESE

présentée à  
L'INSTITUT DE BIOLOGIE

pour obtenir

Le diplôme de Magister

en

ECOLOGIE ANIMALE

Option : MICROBIOLOGIE

par

Hafida TERKI - HASSAINE



مكتبة كلية العلوم  
ملحقة البيولوجيا

Etude des Coliformes dans la Microflore Fécale  
du Nouveau-né Humain au Niveau du  
C. H. U. de TLEMCEM



Soutenue le : ..... Devant la Commission d'Examen

MM A. SOULIMANE  
A. CHIKHI  
R. BAKOUR  
N. KARAM  
Z. FORTAS  
K. KERZABI

PRESIDENT  
PROMOTEUR  
  
EXAMINATEURS  
  
INVITÉ D'HONNEUR

*A*

*Mes Parents,*

*Ma soeur Samira ,*

*Mes frères Nazim et Choukri.*

*Tous les miens*

*Mes Amis (es)*

## **REMERCIEMENTS**

*Présenter ce travail, c'est y associer tous ceux qui, à divers titres, ont contribué à son élaboration qu'il me soit permis de leur rendre hommage.*

- *J'exprime ma très profonde gratitude à Monsieur A.CHIKHI professeur en microbiologie à l'institut de Biologie. U.S.T.H.B Bab-Ezzouar. Ses directives, sa compétence et ses critiques ont été pour moi un solide appui et un réconfort dans les moments difficiles. Puisse t-il trouver ici un hommage à ses qualités et à l'expression de mon profond respect.*

- *Monsieur K. KERZABI professeur en gynécologie au C.H.U Tlemcen. Vous nous avez accueilli dans votre service et accordé toutes les facilités pour mener à bien cette étude. Veuillez trouver ici notre sincère et amicale reconnaissance.*

- *Monsieur A. SOULIMANE professeur en épidémiologie au C.H.U Sidi-Bel-Abbes. Vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider le jury de cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de nos sincères remerciements.*

- *Monsieur R. BAKOUR maître de conférence à l'institut de Biologie U.S.T.H.B Bab-Ezzouar. Vous nous faites un grand plaisir en acceptant de juger ce travail, votre présence est pour nous un gage d'estime et de confiance. Veuillez trouver ici l'expression de notre gratitude.*

- *Monsieur N. KARAM maître de conférence à l'institut de Biologie d'Oran. Vous nous faites un grand honneur en siégeant à ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance.*

- *Madame Z. FORTAS maître de conférence à l'institut de Biologie d'Oran, a bien voulu accepter de juger ce travail. Puisse t-elle trouver ici l'expression de notre profonde sympathie.*

*Nous tenons à exprimer aussi notre profonde reconnaissance à*

- *Monsieur J. OUDAR professeur en microbiologie-immunologie a l'école nationale vétérinaire de Lyon. Pour l'aide et la sympathie dont vous nous avez entouré lors de notre stage à Lyon, on vous remercie vivement.*
- *Madame E. CHASLUS-DANCLA professeur en microbiologie à l'institut national de la recherche agronomique de Tours. Votre aide et votre efficacité nous ont permis de mener à bien ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de notre profond respect .*
- *A l'ensemble des membres de l'institut de Biologie de Tlemcen, pour leur sympathie, nous exprimons nos sincères remerciements.*

# SOMMAIRE

<b>A - INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>B - GENERALITES</b>	<b>3</b>
<b>I - DEFINITION DES ENTEROBACTERIES</b>	<b>3</b>
<b>II - DEFINITION DES COLIFORMES</b>	<b>3</b>
<b>III - POSITION TAXONOMIQUE</b>	<b>3</b>
<b>IV - LES ENTEROBACTERIES DANS LE TUBE DIGESTIF ET L'ENVIRONNEMENT</b>	<b>3</b>
<b>V - LE ROLE DES ENTEROBACTERIES DANS LA PATHOLOGIE INFECTIEUSE</b>	<b>11</b>
1 Chez le nouveau-né	11
2 chez l'adulte	11
<b>C - PARTIE EXPERIMENTALE</b>	<b>14</b>
<b>I - PRELEVEMENT</b>	<b>14</b>
1 Matériel utilisé	14
2 Nature et lieu des prélèvements	14
3 Modalités et réalisation des prélèvements	14
4 Nombre de prélèvements	15
5 Acheminement et conservation des prélèvements	15
<b>II - DENOMBREMENT</b>	<b>17</b>
1 Matériels et milieux utilisés	17
2 Méthodes	17
a - Dilutions	17
b - Ensemencements	17
3 Lecture	18
4 Résultats et discussion	18
<b>III - ISOLEMENT ET IDENTIFICATION</b>	<b>27</b>
1 Milieux de culture	27
2 Méthodes	28
a - Réisolement et sélection des souches à identifier	28
b - Tests biochimiques	28

3 Résultats	33
a - Entérobactéries identifiées et critère d'identification	33
a 1 <i>Escherichia coli</i>	33
a 2 <i>Klebsiella</i>	36
a 3 <i>Entérobacter</i>	36
a 4 <i>Proteus</i>	36
4 Répartition des coliformes en fonction du genre et de l'espèce	37
a - <i>Escherichia coli</i>	37
b - <i>Klebsiella</i>	40
c - Autres coliformes	41
5 Evolution de la microflore intestinale des nouveau-nés	41
a - Pendant la première semaine de vie du nouveau-né	41
b - Coliformes présents chez les enfants à domicile âgés de 1 mois	43
c - Origine des coliformes isolés	44
IV - ETUDE ANTIGENIQUE	45
1 Rappel sur les antigènes d' <i>E.coli</i>	45
a - Les antigènes somatiques ou Ag O	45
b - Les antigènes d'enveloppe ou capsulaires ou Ag K	46
c - Les antigènes flagellaires ou Ag H	48
2 Matériel	48
3 Méthodes	49
a - Agglutination rapide sur lame porte objet	49
b - Agglutination lente en tubes	49
4 Résultats	51
5 Discussion	51
V - ETUDE DE L'ANTIBIORESISTANCE	54
1 Rappels sur l'antibiorésistance	54
a - Généralités et définition	54
b - Mécanismes de l'antibiorésistance	55
c - Supports de l'antibiorésistance	55
d - Plasmides et transposons	57
e - Transfert de l'antibiorésistance et caractérisation de plasmide	63
2 Matériel et méthodes	67
a - Matériels	67
a 1 Matériel biologique	67

a 2 Les antibiotiques	67
a 3 Milieux utilisés	68
b - Méthodes	68
b 1 Réalisation de l'antibiogramme	68
b 2 Réalisation de la conjugaison	68
b 3 Caractérisation des plasmides par électrophorèse	72
3 Résultats de l'antibiorésistance	73
a - Antibiorésistance globale	73
b - Antibiotypes et comportement vis-a-vis de chaque antibiotique	73
b 1 Les colibacilles	73
b 2 <i>Klebsiella</i>	79
b 3 Autres coliformes	79
c - Evolution de l'antibiotype dans le temps	83
c 1 Nouveau-nés d'une semaine à l'hôpital et à domicile	83
c 2 Nouveau-nés à 37 jours	85
d - Discussion	85
4 Résultats du transfert de l'antibiorésistance	86
5 Résultats de la caractérisation de plasmide	90
6 Discussion	93
D CONCLUSION GENERALE	95
BIBLIOGRAPHIE	97
ANNEXE	104

## RESUME

L'étude a porté sur les coliformes présents dans les fécès de 30 nouveau-nés, ayant vu le jour au service de maternité du C.H.U de TLEMCEM; tous étaient bien portants, allaités au sein et non soumis à un traitement quelconque durant la première à la 5<sup>ème</sup> semaine de vie.

L'étude écologique et dynamique de cette microflore a révélé que l'installation de ce groupe de germes caractéristique du tube digestif pouvait être retardé jusqu'au environ de la 48<sup>ème</sup> heure. Au niveau quantitatif il n'a pas été noté de différence significative entre la 1<sup>ère</sup> et la 5<sup>ème</sup> semaine de vie, toutefois les différences individuelles peuvent être importants.

La détermination de plus de 800 souches a révélé la prédominance d'*E.coli* et de *Kb.pneumoniae*. Cette dernière se retrouve et peut dominer aussi bien au moment de l'installation qu'à un mois de vie contrairement à ce qui peut être observé chez des animaux tels que le veau nouveau-né.

L'étude du nombre de chimiotype a montré qu'il s'agissait d'une microflore très hétérogène au début avec une tendance à la stabilisation à la 5<sup>ème</sup> semaine, accompagnée d'une réduction de nombre de biotypes. La composition de cette microflore peut varier rapidement durant la même journée pendant la première semaine.

Cette hétérogénéité a été également observée pour les antibiogrammes établis avec 8 antibiogrammes pour les deux espèces présentes. Un mois après le retour des enfants à domicile, l'antibiorésistance observée persiste en général avec chez certains, la sélection de souches les plus résistantes.

Cette résistance s'est révélée de nature plasmidique et en partie transférable, puisque 11 souches sur 13 transfèrent au moins un caractère. L'étude physicochimique du contenu plasmidique a révélé que le nombre de plasmide chez les souches étudiées pouvaient varier de 1 à 6 avec des poids moléculaires allant d'au-moins 55Kb à 100Kb.

**MOTS CLEFS:** Coliforme - *E.coli* - nouveau-né sain - flore fécale - méconium - séquence de colonisation bactérienne - écologie tube digestif - chimiotype - hôpital - antibiorésistance - plasmides.



# *A - INTRODUCTION*

## INTRODUCTION

La microflore du tube digestif chez divers animaux a été fort étudiée par de nombreux auteurs parmi lesquels, il ya lieu de citer DUCLUZEAU, RAIBAUD et leur collaborateurs à Jouy - en - Josas ainsi que BORDERON et ses collaborateurs.

Tous ces auteurs se sont intéressés, non seulement à la composition mais aussi aux modalités d'installation de cette microflore dans des conditions naturelles ou artificielles, avec l'implantation de souches en milieu contrôlé en vue de mieux connaître son rôle, sa composition, les rapports existants entre les espèces et les facteurs susceptibles de l'influencer.

Les résultats obtenus à ce jour ont permis de mieux comprendre l'installation de cette microflore. Ainsi il a été prouvé que son déséquilibre pouvait, sous l'influence de différents facteurs, laisser place à diverses pathologies infectieuses et/ou organiques.

Aussi a t-on tenté d'y remédier par la préparation de divers vaccins ou par la sélection de souches en vue de leur implantation chez les nouveau-nés. CHIKHI chez le veau en 1976 et 1978, RAIBAUD et coll en 1978 chez le nouveau-né humain, ou par la préparation d'aliments modifiés tel que BOUSSEBOUA l'a fait en 1989 en utilisant du lait dé lactosé.

Toutefois la complexité de cette microflore et de son rapport avec le sujet, la fragilité du nouveau-né humain en particulier, les difficultés pour une approche expérimentale idéale, le nombre et le moment des prélèvements, le nombre de souches à sélectionner font que certains résultats peuvent différer selon les auteurs et, beaucoup d'aspects restent encore à élucider.

Nous avons donc décidé d'entreprendre au centre hôpitalo-universitaire de TLEMEN, en collaboration avec le Professeur KERZABI, l'étude des modalités d'installation du groupe des coliformes chez les nouveau-nés humains, depuis leur naissance à l'âge d'un mois. Il ya lieu de préciser que tous ces nouveau-nés étaient sains, bien portants, allaités exclusivement au sein maternel et non soumis à aucun traitement directement ou indirectement par le biais de leur mère.

Au cours de cette étude, nous réaliserons un volet écologique qui essaiera de mettre en évidence les genres espèces et biotypes dominants de coliformes. Une étude dynamique par le biais des dénombrements, avant et après détermination permettra de suivre le niveau d'installation des souches mises en évidence ainsi que leur évolution dans le temps.

En raison de la naissance de ces enfants en milieu hospitalier, nous rechercherons les colibacilles habituellement impliqués dans les gastroentérites infantiles (GEI), bien qu'il ne s'agisse pas de nourrissons diarrhéiques.

L'antibiorésistance de cette microflore sera étudiée en raison du milieu de naissance hospitalier et sera suivie dans le temps pour connaître son devenir à la 5<sup>ème</sup> semaine de vie.

Nous tenterons en dernier lieu de déterminer les supports génétiques de cette antibiorésistance chez quelques souches par deux méthodes, une physiologique basée sur la technique de conjugaison et l'autre physico-chimique par électrophorèse sur gel d'agarose.

Nous essayerons de comparer nos résultats avec ceux qui ont été obtenus jusqu'à ce jour et en particulier chez le veau nouveau-né qui rappelons-le est un ruminant.

En dernier lieu, ce travail devrait faire le point au niveau du service hospitalier, d'étude sur la nature des souches prévalant dans ce milieu et leur antibiorésistance, et, pourrait servir de repère épidémiologique pour les cliniciens.

*B - GENERALITES*

## B GENERALITES

### I DEFINITION DES ENTEROBACTERIES .

La famille des Enterobacteriaceae regroupe des bactéries de forme bacillaire ou cocoïde à Gram négatif dont la taille varie de 2 à 3µm de long et 0,6 µm de diamètre.

La mobilité quand elle existe se fait par une ciliature péritriche. Ces germes sont aéro-anaérobies facultatifs, chimio-organotrophes. Ils fermentent le glucose avec ou sans production de gaz, réduisent les nitrates en nitrites et sont dépourvus de cytochrome oxydase. Ils cultivent très bien sur milieux ordinaires.

Bien qu'ils ont été découverts à l'origine dans le tube digestif, ces micro-organismes peuvent se trouver dans le milieu extérieur: eau, sol, aliments, végétaux.

### II DEFINITION DES COLIFORMES

Selon BREED et NORTON in CHIKHI 1978, les coliformes sont constitués par les entérobactéries, capables de fermenter le lactose à 30°C avec production de gaz, en moins de 48 heures.

Les principaux genres du groupe peuvent être d'origine fécale ou non. Ce sont essentiellement les genres *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* et *Klebsiella*. En fait il s'agit d'une définition empirique car la difficulté réside dans l'existence de souches dites lactose lentes, fermentant en plus de 48 heures d'une β galactosidase. Cette définition ne concerne pas les germes appartenant à d'autres groupes tels que certains Vibrionaceae.

### III POSITION TAXONOMIQUE

Dans la 9<sup>ème</sup> édition de BERGEY en 1984, les Enterobacteriaceae sont représentés par 20 genres, 14 genres reconnus et 6 autres genres nouvellement admis dans la famille à application incertaine, tel que le tableau N° 1 (a et b) le résume.

### IV LES ENTEROBACTERIES DANS LE TUBE DIGESTIF ET L'ENVIRONNEMENT

L'homme héberge en permanence une population microbienne avoisinant 10<sup>14</sup> bactéries dans son tube digestif. Longtemps accusés d'être responsables de troubles divers, ces microbes intestinaux sont aujourd'hui réhabilités vis à vis de leur fonction digestive. En effet il a été prouvé qu'ils formaient avec leur hôte un système écologique dont l'équilibre était indispensable à la santé de l'individu.

La flore du tube digestif est composée d'un premier groupe de micro organismes parfaitement adaptés à leur site d'implantation, se multipliant au niveau des différents segments du tube digestif à des taux élevés et jouant un rôle physiologique important, ils constituent la flore autochtone ou résidente.

**Tableau N° 1 a :** Subdivision de la 5<sup>ème</sup> section du BERGEY'S MANUAL, 9<sup>ème</sup> édition (1984).

**Section N°5 : Bacilles Gram (-) Aéro - anaérobies facultatifs**

	- Genre I : <i>Escherichia</i>
	- Genre II : <i>Shigella</i>
	- Genre III : <i>Salmonella</i>
	- Genre IV : <i>Citrobacter</i>
	- Genre V : <i>Klebsiella</i>
S/Section I	- Genre VI : <i>Enterobacter</i>
Famille I	- Genre VII : <i>Erwinia</i>
ENTEROBACTERIACEAE	- Genre VIII : <i>Serratia</i>
	- Genre IX : <i>Hafnia</i>
	- Genre X : <i>Edwarsiella</i>
	- Genre XI : <i>Proteus</i>
	- Genre XII : <i>Providencia</i>
	- Genre XIII : <i>Morganella</i>
	- Genre XIV : <i>Yersinia.</i>
Genre à affiliation incertaine	- 6 genres.
S/Section II	
Famille II	- 4 Genres
VIBRIONACEAE	
S/Section III	
Famille III	- 3 Genres
PASTEURELLACEAE	
Autres Genres	- 7 Genres.

**Tableau N°1b** Classification des ENTEROBACTERIACEAE sur la base de caractères biochimiques. D'après BERGEY'S MANUAL, 9<sup>ème</sup> édition (1984)

Genre I <i>Escherichia</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Escherichia coli</i></li> <li>- <i>Escherichia adecarboxylata</i></li> <li>- <i>Escherichia blattae</i></li> <li>- <i>Escherichia coli</i>, inactive.</li> </ul>
Genre II <i>Shigella</i>	- 4 espèces
Genre III <i>Salmonella</i>	- 9 espèces
Genre IV <i>Citrobacter</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Citrobacter amalonaticus</i></li> <li>- <i>Citrobacter diversus</i></li> <li>- <i>Citrobacter freundii</i></li> </ul>
Genre V <i>Klebsiella</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Klebsiella oxytoca</i></li> <li>- <i>Klebsiella</i> p.Subsp. <i>Ozaenae</i></li> <li>- <i>Klebsiella</i> p.Subsp. <i>rhino scleromatis</i></li> <li>- <i>Klebsiella</i> p.Subsp. <i>pneumoniae</i></li> </ul>
Genre VI <i>Enterobacter.</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Enterobacter aerogenes</i></li> <li>- <i>Enterobacter agglomerans</i></li> <li>- <i>Enterobacter cloacae</i></li> <li>- <i>Enterobacter gergoviae</i></li> <li>- <i>Enterobacter intermedium</i></li> <li>- <i>Enterobacter sakasakii</i></li> </ul>
Genre VII <i>Serratia</i>	- 7 espèces -

Genre VIII <i>Hafnia</i>	- 1 espèce -
Genre IX <i>Edwarsiella</i>	- 4 espèces -
Genre X <i>Proteus</i>	- 3 espèces -
Genre XI <i>Providencia</i>	- 3 espèces -
Genre XII <i>Morganella</i>	- 1 espèce -
Genre XIII <i>Yersinia</i>	- 7 espèces -

6 Genres à affiliation incertaine.



Par ailleurs comme il s'agit d'un écosystème ouvert, un deuxième groupe de nombreux micro-organismes provenant de l'environnement, apportés avec l'eau ou les aliments peuvent transiter passivement sans trouver d'habitat convenable pour leur développement, ces micro-organismes sont qualifiés d'allochtones.

D'un point de vue qualitatif il est impossible de mentionner toutes les espèces microbiennes qui ont été détectées dans la flore intestinale de l'homme, plus de 300 à 400 espèces microbiennes ont en effet été identifiées. Le faciès microbien c'est à dire l'ensemble des associations caractéristiques d'un habitat varie en fonction de l'âge, des conditions de la vie et de l'état physiologique de l'hôte. C'est ainsi que les associations rencontrées chez le nouveau-né sont très différentes de celles de l'adulte par la nature des espèces rencontrées et leur importance quantitative. La flore microbienne intestinale de l'homme comprend en général une flore dominante et une flore sous-dominante tel qu'elle est rapportée sur le tableau N° 2. Les entérobactéries et les coliformes en particulier y constituent une flore sous dominante avec un taux élevé d'*E.coli* suivi des genres *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*. L'importance des genres semble différer selon LECLERC et coll en 1989. Les *Citrobacter* chez l'adulte seraient les plus fréquents.

Les *Klebsiella* seraient moins fréquentes, tandis que les *Proteus* et les *Enterobacter* seraient rarement isolés. De nombreuses divergences apparaissent selon les études, elles sont dues aux méthodes utilisées et surtout aux milieux sélectifs qui faussent naturellement ces observations.

Par comparaison à la flore de l'adulte, chez le nourrisson, on peut reconnaître un certain nombre d'associations caractéristiques tel que le montre le tableau N° 3. On peut y noter que *Escherichia coli* est présent à des taux élevés de l'ordre de  $10^6$  -  $10^9$  germes/g de fécès ainsi il se retrouve dans une flore dominante et représente une population importante, voisine et complémentaire de celle des anaérobies. Les *Klebsiella* de même forment des populations importantes à des taux de  $10^6$  à  $10^7$  germes/g de fèces. Tel que le cite LECLERC et MORIAMEZ en 1980 ce haut niveau de représentation des entérobactéries et leur diversité pourrait être la seconde caractéristique majeure de la flore du nourrisson. Elles peuvent présenter un risque si l'on prend en considération leur caractère de pathogénie opportuniste. Ainsi pour les autres bactéries, outre les espèces déjà citées, on peut rencontrer les genres *Enterobacter* et *Citrobacter*, qui constituent en partie la flore fluctuante.

La masse considérable de micro-organisme qui peuple le tube digestif ne peut être sans effet sur l'hôte. Elle représente un potentiel enzymatique et antigénique considérable. Bien qu'il soit difficile d'établir le rôle de chaque groupe, l'effet d'une population dominante de micro-organismes semble facile à percevoir lorsqu'il s'agit de pathogènes qui élaborent des métabolites éventuellement identifiables et mesurables. Par contre il est beaucoup plus difficile de définir le rôle global de l'écosystème naturel du tube digestif. LECLERC et MOSSEL en 1989 ont résumé les principaux effets dans le tableau N° 4 de cette microflore sur le tube digestif.

Tableau N° 2

Flore fécale de l'homme adulte.  
d'après IECLERC et MOSSEL (1989)

Flore	Genres ou Espèces	Taux/g
Dominante	* Anaérobies et bac lactiques	
	<i>Bacteroides</i>	$10^9 - 10^{10}$
	<i>Bifidobacterium</i>	$10^8 - 10^9$
	<i>Lactobacillus</i>	$10^8 - 10^9$
Sous-dominante	* Aérobie-anaérobies facultative	
	<i>Escherichia.coli</i>	$10^7 - 10^8$
	<i>Enterococcus</i>	$10^7 - 10^8$
Fluctuante	* Bactéries- Gram-	
	<i>Citrobacter levinea</i>	$10^4 - 10^5$
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	$10^4 - 10^5$
	<i>Enterobacter cloacae</i>	$10^4 - 10^5$
	<i>Proteus Providencia</i>	$10^2 - 10^3$
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$10^2 - 10^3$
	* Bactéries à Gram +	
	<i>Clostridium</i>	$10^5 - 10^6$
	<i>Staphylococcus</i>	$10^5 - 10^6$
	<i>Bacillus</i>	$10^4 - 10^5$
	* Levures	$10^2 - 10^3$
	* Champignons	$10^2 - 10^3$

Tableau N° 3

Flore fécale du nourrisson d'après LECLERC et MOSSEL (1989)

Flore	Genre ou Espèces	Taux/g
Dominante	* Anaérobies et bac lactiques	
	<i>Bifidobacterium</i>	$10^9 - 10^{10}$
	<i>Bacteroides</i>	$10^8 - 10^9$
	<i>Lactobacillus</i>	$10^8 - 10^9$
	* Aérobie	
Sous-dominante	<i>Escherichia.coli</i>	$10^6 - 10^9$
	* Aérobie	
	<i>Klebsiella</i>	$10^6 - 10^8$
	<i>Enterococcus</i>	$10^4 - 10^6$
Fluctuante	<i>Porteus - Providencia</i>	$10^4 - 10^6$
	* Bactéries Gram-	
	<i>Citrobacter - Levinea</i>	$10^2 - 10^3$
	<i>Enterobacter cloacae</i>	$10^3 - 10^4$
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$10^2 - 10^3$
	<i>Aeromonas</i>	$10^2 - 10^3$
	* Bactéries à Gram +	
	<i>Staphylococcus</i>	$10^4 - 10^5$
	<i>Clostridium</i>	$10^3 - 10^4$
	<i>Bacillus</i>	$10^2$
* Levures	$10^2$	
* Moisissures	$10^2$	

Tableau N° 4

Rôle de la flore microbienne du  
 Tube - digestif  
 (LECLERC et MOSSEL 1989)

- 1 - Anatomie - Histologie - physiologie  
 Augmentation :
  - Le volume des compartiments digestifs
  - La surface absorbante de la muqueuse intestinale
  - La taille des villosités et des cryptes glandulaires
  - Le renouvellement des cellules de la villosité
  - Le transit intestinal
  
- 2 - Métabolisme - Nutrition  
 Synthèse des vitamines (B12) et K  
 Actions sur les sécrétions endogènes
  - acides biliaires: déconjugaison-oxydation, déhydroxylation
  - cholesterol
  - hormones stéroïdiennes
  - urée et ammoniogénèse
 Action sur les nutriments
  - dégradation des glucides
  - hydrolyse des lipides
  - dégradation des protéines et des AA aromatiques
 Modifications physico - chimiques
  - variations de pH
  - abaissement du rH
  - production d'acides gras à courtes chaînes
  
- 3 - Défenses anti - microbiennes.
  - Effet de barrière
  - Accroissement du nombre de plasmocytes IgA sécréteurs
  - Augmentation de taille des plaques de Peyer.

Comme le souligne ANDREMONT en 1988, à côté de ces micro-organismes autochtones, l'homme ingère quotidiennement avec les aliments des millions d'autres micro-organismes qui vont entrer au contact du tube digestif. La majorité d'entre eux ne feront que transiter même si certains d'entre eux sont potentiellement pathogènes. Cet échec à la colonisation semble dépendre de nombreux facteurs regroupés par RAIBAUD et DUCLUZEAU en 1984 sur le terme d'"effet barrière" exercée par la flore "autochtone" du tube digestif. Ceci a été largement prouvé par l'utilisation d'animaux axéniques où il n'y a pas problème d'implantation par divers souches et d'animaux holoxéniques où les chances d'installation sont très faibles, Tel que le démontre TANCREDE en 1977.

## V LE ROLE DES ENTEROBACTERIES DANS LA PATHOLOGIE INFECTIEUSE

### 1 Chez le nouveau-né

Le rôle des entérobactéries dans les affections de nourrisson et de la première enfance est connu depuis fort longtemps. Parmi les germes les plus anciennement incriminés figurent les Salmonelles et les Shigelles qui peuvent causer des gastroentérites aiguës. Elles sont le plus souvent d'origine alimentaire et peuvent survenir à la suite de contaminations individuelles ou de l'environnement hospitalier en particulier. En ce qui concerne *Escherichia coli*, il est surtout connu pour les gastroentérites (EPEC) qu'il engendre chez le nourrisson, et de colibacillose chez le nouveau-né. Il peut être aussi à l'origine de septicémies et bactériémies et même de méningites colibacillaires chez des nouveau-nés de diverses espèces animales.

### 2 Chez l'adulte

Chez l'adulte les germes précités peuvent être également à l'origine de diverses affections tel que les salmonelloses, shigelloses, yersinioses et autres toxi infections à *Escherichia coli*. En fonction de l'importance de leur pouvoir invasif et de leur pouvoir toxigène,

On peut distinguer des affections dominées par la production d'une toxine comme c'est le cas de diarrhées à *Escherichia coli* entérotoxigène (ETEC). LECLERC en 1974 ainsi que SANSONETTI en 1989 précisent que le pouvoir pathogène dans ce cas est lié à des caractères de virulence codés par des gènes localisés sur des plasmides non autotransférables codant pour des facteurs adhésifs. CFA/I, CFA/II et E8775 chez l'humain, et par la production d'entérotoxines, les toxines thermostable (ST) et thermolabile (LT).

Certains colibacilles entérohémorragiques (EHEC) sont responsables en plus de colite hémorragique en produisant des toxines semblables à la toxine de shiga ou shiga-like (SLT). (Tableau N°5)

**Tableau N°5**

Les pathotypes d'*Escherichia coli* responsables de diarrhée.  
Selon SANSONETTI (1989)

<i>Escherichia-coli</i> Pathotypes	EPEC Entéropathogène	EHEC Entérohémorragique	ETEC Entérotoxinogène	EIEC Entéroinvasif	EAEC Entéroadhérent
Epidémiologie Pays Industrialisés	épidémies maternité et crèches 1940-1950	Colites hémorragiques épidémiques ou sporadi- ques		Diarrhée de l'adulte	Diarrhée du voyageur
Pays en voie de développement	Cause importante probable de diarrhées infantiles		Diarrhée du voyageur, diarrhée du nourrisson.		
clinique	gastro-entérite aigüe	Diarrhée sanglante	Diarrhée acqueuse de type sécrétoire	Diarrhée dysentérique (pus et sang dans les sel- les).	Diarrhée acqueuse
Adhésion et colonisation	Attachement aux entéro- cytes et enchâsse- ment; pas d'invasion (pas d'adhésines reconnues)	pas d'invasion	Adhésines de type fim- briae pas d'invasion	Invasion des entérocytes	pas d'invasion
Toxines	Shiga - like (SLT)	Shiga - like (SLT)	Entérotoxine LT(Thermolabile) ST-Thermostable)	Toxine dysentérique. (ST)	

Les *Escherichia coli* entéro-invasifs (EIEC), elles s'apparentent en effet aux *Shigella*, non seulement sur le plan de la pathogénèse, mais aussi par leurs réactions biochimiques et par leur structure antigéniques. Ces deux espèces, non seulement elles adhèrent à la muqueuse intestinale mais elles s'y multiplient et provoquent des ulcérations, des abcès et du pus. Ces bactéries élaborent la toxine de Shiga.

Enfin les *Escherichia coli* entéro-adhérents (EA - Agg EC) découverts en 1985 par MATHEWSON et coll n'élaborant pas de toxines LT ou ST (ETEC) ni de toxine SLT (EPEC), n'envahissant pas les cellules épithéliales (EIEC) et se caractérisant par un type d'adhérence particulier, seraient responsables de gastroentérites au cours de l'enfance et de certains cas de diarrhées du voyageur, mais sont pour l'instant, plus une curiosité dont il conviendra de définir le mécanisme pathogénique en même temps que le rôle épidémiologique.

D'autres entérobactéries telles que les *Salmonella*, les *Yersinia*, peuvent suivre ce mécanisme de type invasif ou le mécanisme de translocation, selon BERG en 1979 in LECLERC 1989, permettant ainsi le passage de bactéries viables de la lumière du tube digestif dans des ganglions mésentériques et dans d'autres organes.

L'action de toutes ces bactéries ne se limite pas uniquement au niveau du tube digestif, mais peut être à l'origine d'autres infections notamment au niveau de la sphère uro-génitale où presque toutes les espèces d'entérobactéries peuvent être incriminées avec une nette dominance d'*Escherichia coli* et de *Proteus*.

Elles peuvent être également à l'origine de pneumopathies et de septicémies tout particulièrement chez le sujet immunodéprimé.

*C - PARTIE EXPERIMENTALE*



## C PARTIE EXPERIMENTALE

### I PRELEVEMENTS

#### 1 Matériel utilisé

- boites de pétri
- cuillères à café
- écouvillons
- bouteille thermos jouant le rôle de glacière.

Remarque: Tout le matériel utilisé est stérile.

#### 2 Nature et lieu des prélèvements

Les prélèvements ont été effectués au niveau du service de gynécologie obstétrique (maternité) du CHU de TLEMCEM. Ils ont concerné 30 nouveau-nés ayant vu le jour à la maternité. Ils se sont étalés sur une semaine avec récupération dans la mesure du possible du méconium.

Les prélèvements ont été faits dès l'émission de selles avec une cuillère à café ou à défaut avec un écouvillon quand la quantité ne le permettait pas.

Ils ont été conservés dans une bouteille thermos et acheminés au laboratoire de l'université de Tlemcen où leur étude a commencé le jour même.

#### 3 Modalités et réalisation des prélèvements

Vu la délicatesse du matériel d'étude, la réalisation de l'échantillonnage a été effectuée selon 3 modalités.

Quand il nous a été possible de suivre le nouveau-né dès sa naissance à l'hôpital pendant une semaine, nous avons effectué nous même les prélèvements.

Dans le cas où le nouveau-né quittait l'hôpital 24<sup>h</sup> après sa naissance, les prélèvements ont été fait à domicile avec l'accord des parents.

Dans les 2 cas nous avons effectués un prélèvement par jour pendant 7 jours.

Les prélèvements faits chez les nourrissons au 30<sup>ème</sup> jour, ont été tous réalisés à domicile.

Tous les prélèvements ont été réalisés chez des nouveau nés venus au monde par voie basse, bien portants leur état a été vérifié par un bilan clinique et paraclinique satisfaisant, un transit normal, et l'absence de tout traitement antibiotique. Tous étaient allaités au sein maternel.

Les échantillons de selles ont été récupéré soit à leur émission par l'anus de nouveau-né quand cela a été possible, soit à partir de langes stériles, deux heures au maximum après la défécation. Ils ont été recueilli dans des boîtes de pétri à l'aide de cuillères à café et d'écouvillons stériles.

#### **4 Nombre de prélèvements**

Au total 115 prélèvements ont été récupéré à partir de tout les nouveau-nés dont l'âge variait de 0 à 36 jours tel que l'indique le tableau N°6 (et annexe) .

Le système de notation retenue est le suivant: un chiffre romain représente le numéro attribué au nouveau-né, un chiffre arabe au prélèvement. Les souches isolées de chaque prélèvement seront caractérisées par des lettres de l'alphabet par exemple pour l'enfant n°I, les souches du premier prélèvement ont été notées: I<sub>1a</sub>, I<sub>1b</sub>, I<sub>1c</sub>...

#### **5 Acheminement et conservation des prélèvements**

Dans la majorité des cas, les selles ont été récupéré en notre présence, d'où leur acheminement et leur traitement le jour même. Lorsque nous étions absente nous avons appris aux mères, à les recueillir selon les exigences et à les conserver au réfrigérateur à 4°C, jusqu'au moment de leur récupération et de leur étude, au maximum 12<sup>h</sup> après. Dans ce cas les numérations n'ont été faites qu'à titre indicatif et n'ont pas été prises en compte lors de la discussion.

**Tableau N° 6** Modèle de fiche de suivi pour chaque nouveau-né.

Enfant	Date	N° du Prélèvement	Lieu de Prélèvement	Diarrhée	Allaitement	ATB	Nbre de souches retenues par prélèvement	Référence
N° I Sexe: M Poids: 3kg200 Date de naissance 21/11/87 à 22 <sub>h</sub>	22/11/87 à 8 <sup>H</sup>	P <sub>1</sub> (Méconium)	Hôpital	non	sein	non	10	I <sub>1a</sub> , I <sub>1b</sub> ... I <sub>1j</sub>
	23/11/87 à 8 <sup>H</sup>	P <sub>2</sub> (Méconium)	"	"	"	"	10	I <sub>2a</sub> , I <sub>2b</sub> ... I <sub>2j</sub>
	24/11/87 à 8 <sub>H</sub>	rien fait	"	"	"	"		
	25/11/87 à 8 <sub>h</sub>	P <sub>3</sub>	"	"	"	"	4	I <sub>3a</sub> , I <sub>3b</sub> , I <sub>3c</sub> , I <sub>3d</sub>
	26/11/87 à 8 <sub>h</sub>	P <sub>4</sub>	"	"	"	"	5	I <sub>4a</sub> , I <sub>4b</sub> ... I <sub>4e</sub>

M : Masculin

F : Féminin

## II DENOMBREMENT

### 1 Matériels et milieux utilisés

- Pipettes graduées stériles de 1ml
- Compteur de colonies
- Solution de Ringer au quart en tubes de 9ml
- Gélose lactosée de Drigalski

### 2 Méthodes

Le milieu d'isolement et de dénombrement est la gélose lactosée de Drigalski, qui est un bon milieu sélectif pour les coliformes, où la présence de cristal violet inhibe la plupart des bactéries Gram-positives. Les colonies de coliformes y paraissent jaune par fermentation du lactose et acidification avec virage du bleu de bromothymol au jaune.

#### a - Dilutions

Le choix du liquide de dilution varie selon les auteurs: bouillon glucosé, bouillon au glycécol, sérum physiologique, liquide de Ringer, pour notre part nous avons choisi ce dernier.

Des dilutions ont été préparées comme suit: 1g de selles pesé stérilement a été rajouté à 9ml de solution de Ringer pour réaliser une dilution au 1/10 (-1). Pour obtenir la dilution au 1/100 (-2), on prélève à l'aide d'une pipette stérile 1ml de la dilution précédente homogénéisée que l'on introduit dans un autre tube de 9 ml de solution de Ringer. On procède de la même façon en homogénéisant et en changeant de pipette à chaque fois pour réaliser les dilutions, -3, -4, -5, -6, -7.

#### b - Ensemencements

Nous avons ensemencé deux boîtes par dilution, après y avoir déposé 0,1ml de dilution, nous avons procédé à l'étalement avec une pipette rateau jusqu'à assèchement de la surface. L'incubation est faite à 37°C pendant 24<sup>h</sup>.

Les dénombrements ont été effectués sur les boîtes présentant entre 30 et 300 colonies. Le résultat a été obtenu en calculant la moyenne des 2 essais pratiqués pour la même dilution.

### **3 Lecture**

L'aspect des colonies lactose positives a été noté selon les trois types principaux rencontrés.

-jaune oranges dans la majorité des cas,

\* soit petites, rondes et brillantes

\* soit grandes plates brillantes luisantes à bord irrégulier ou non.

- jaunâtres, plus ou moins grandes à centre plus foncé à bord irrégulier, punctiforme crémeuses

- très petites jaunes circulaires brillantes bombées

Nous n'avons pas tenu compte des colonies lactose négatives, qui sont d'un aspect bleuté.

### **4 Résultats et discussion**

Comme on peut le voir sur le tableau N° 7, dans les conditions d'études retenues, la colonisation par les coliformes du tube digestif du nouveau-né semble varier d'un enfant à un autre. En effet 8 sur 30 présentent un méconium exempt de coliformes et de bactéries aéro- anaérobies facultatives pouvant croître sur le milieu de sélection retenu entre 12<sup>h</sup> et 24<sup>h</sup> après la naissance qui, rappelons-le s'est faite dans tous les cas par voie basse; Cette voie selon certains auteurs tel que BETTELHEIM et coll en 1974, GOLD et BORDERON en 1985 ainsi que BHATIA en 1988, présente plus de risques de contamination précoce du nouveau-né, que la césarienne, car c'est avant tout au moment de l'expulsion et à partir des selles de la mère que se ferait la contamination initiale du nouveau-né.

Une étude réalisée par nous même en 1990, sur 11 nouveau-nés dont 6 sont nés par césarienne, a donné des résultats variant de 93 à 280.10<sup>6</sup> coliformes/gramme de fécès tel que le montre le tableau N°8 ce qui n'est significativement pas différent des chiffres des 5 autres nés par voie basse qui fluctuaient de 35 à 273.10<sup>6</sup>g/gr de fécès, ainsi que ceux de LENNOX-KING et coll en 1976.

L'absence du groupe bactérien étudié peut aller jusqu'à la 48<sup>ème</sup> heure, comme on peut le constater chez les enfants N° XII et XXII qui ont rejoint le domicile 12<sup>H</sup> après la naissance, nous ne savons pas s'il ya eu dans ce cas des précautions particulières qui ont retardé l'ensemencement du tube digestif de ces 2 enfants.

...

XXIV				266.10 <sup>6</sup> * .		160.10 <sup>6</sup> Δ			250.10 <sup>6</sup> Δ	188.10 <sup>6</sup> Δ		
XXV				* (0)		112.10 <sup>6</sup> Δ						
III					300.10 <sup>6</sup>							
IX					120.10 <sup>6</sup>	144.10 <sup>6</sup>	26,4.10 <sup>6</sup> .				12,4.10 <sup>6</sup>	
X					39.10 <sup>6</sup> ** (S)	0,58.10 <sup>6</sup> **	32,8.10 <sup>6</sup> **				64.10 <sup>6</sup>	
XXIII					380.10 <sup>6</sup> **	400.10 <sup>6</sup> **					180.10 <sup>6</sup>	
XXV	...	21jour:	132.10 <sup>6</sup>		120.10 <sup>6</sup> .							

\* :  
\*\* :  
. :

Méconium.  
Conservation au froid  
Hopital

Δ : Maison.  
M : Matin  
S : Soir

Tableau N° 8:

Numération des bactéries chez des nouveau-nés  
Selon la voie d'accouchement:

## Voie basse

Nouveau-nés	Prélèvement	Dénombrement N x 10 <sup>6</sup>
I	P <sub>1</sub>	Sterile(6 <sup>h</sup> )
	P <sub>2</sub>	Sterile(28 <sup>h</sup> )
	P <sub>3</sub>	273
	P <sub>4</sub>	260
II	P <sub>1</sub>	Sterile(24 <sup>h</sup> )
	P <sub>2</sub>	140
	P <sub>3</sub> -P <sub>4</sub> -P <sub>5</sub>	(-1gr)
III	P <sub>1</sub>	Sterile(24 <sup>h</sup> )
	P <sub>2</sub>	Sterile(24 <sup>h</sup> )
	P <sub>3</sub>	49
	P <sub>4</sub>	35
IV	P <sub>1</sub>	Sterile(6 <sup>h</sup> )
	P <sub>2</sub>	(-1gr)
	P <sub>3</sub>	189
	P <sub>4</sub>	(-1gr)
	P <sub>5</sub>	69
	P <sub>6</sub>	79
	P <sub>7</sub>	150
	P <sub>8</sub>	150
	P <sub>9</sub>	270
V	P <sub>1</sub>	(-1gr)
	P <sub>2</sub>	(-1gr)
	P <sub>3</sub>	(-1gr)
	P <sub>4</sub>	(-1gr)

## Par Césarienne (1990)

Nouveau-nés	Prélèvement	Dénombrement N x 10 <sup>6</sup>
I	P <sub>1</sub>	Sterile(4 <sup>h</sup> )
	P <sub>2</sub> -P <sub>3</sub> -P <sub>4</sub>	(-1gr)
II	P <sub>1</sub>	Sterile(8 <sup>h</sup> )
	P <sub>2</sub>	150
	P <sub>3</sub>	101
	P <sub>4</sub>	132
	P <sub>5</sub>	280
III	P <sub>1</sub> ,P <sub>2</sub>	(-1gr)
	P <sub>3</sub>	240
	P <sub>4</sub>	189
	P <sub>5</sub>	100
	P <sub>6</sub>	200
	IV	P <sub>1</sub>
P <sub>2</sub>		165
P <sub>3</sub>		93
P <sub>4</sub>		93
P <sub>5</sub>		103
P <sub>6</sub>		184
V	P <sub>1</sub>	Sterile
	P <sub>2</sub>	190
	P <sub>3</sub>	260
	P <sub>4</sub>	190
	P <sub>5</sub>	170
	P <sub>6</sub>	260
VI	P <sub>1</sub>	121
	P <sub>2</sub>	195
	P <sub>3</sub>	260
	P <sub>4</sub>	110
	P <sub>5</sub>	87

Ces observations sont différentes de celles rapportées à partir des animaux, en particulier par RAIBAUD et coll, en 1984 chez les souris et le rat qui sont aussi des monogastriques, CHIKHI en 1978 sur le jeune veau qui est un polygastrique, où il a été noté que le méconium était toujours contaminé massivement.

Si l'on considère ces nouveau-nés au cours de la 1<sup>ère</sup> semaine de vie, il semble que la colonisation soit déjà réalisée chez la majorité assez tôt, à partir de la 6<sup>ème</sup> heure si ce n'est avant, comme chez le sujet N° XVIII où l'on a dénombré à ce moment  $20 \cdot 10^6$  g/gr de fèces. Ces résultats ne sont pas en contradiction avec ceux de BORDERON en 1974 et TURCK en 1984 qui ont révélé que les coliformes s'installaient chez 50% des nouveau-nés au cours des premières 24 heures et 100%, au bout de la 48<sup>h</sup> avec une concentration moyenne de  $10^6$  à  $10^9$  g/gr de fèces et des extrêmes de  $10^6$ ,

Si les niveaux de colonisation sont variables d'un enfant à un autre, les chiffres varient de  $3,3 \cdot 10^6$  à  $1160 \cdot 10^6$  g/gr de fèces. Ils sont relativement stables chez le même sujet au cours de ce laps de temps. A ce niveau nous ne notons pas de différences significatives entre les résultats obtenus chez les enfants restés en milieu hospitalier et ceux qui ont rejoint le domicile familial au bout de 24<sup>h</sup>. Il est évident qu'il s'agit d'enfants bien portants allaités tous au sein maternel sauf pour le nouveau-né N° XII, qui suivait un allaitement mixte et pour lequel nous n'avons pas noté de particularité pendant cette première semaine de vie. Les variations observées peuvent être attribuées aux facteurs individuels, physiologiques et environnementales, mais aussi aux erreurs relatives de la technique de dénombrement.

Les prélèvements effectués sur les enfants âgés d'un mois à domicile durant une semaine également, ont permis de vérifier cette relative stabilité au niveau du nombre de coliformes par gramme de selle, soit  $0,58 \cdot 10^6$  à  $500 \cdot 10^6$  g/gr de fèces selon l'enfant considéré. L'allure générale de cette relative stabilité est donnée par les courbes du tableau N° 9. Le nombre global de coliformes à cette période est relativement plus faible que pendant la première semaine de vie.

Si l'on compare nos résultats à ceux qui ont été observés chez le veau nouveau-né par CHIKHI en 1978 ayant utilisé la même technique, la différence est notable. Cet auteur a constaté en effet une colonisation rapide et massive par les coliformes durant les 36 premières heures pouvant atteindre jusqu'à 6 milliards de g/gramme de fèces puis une chute progressive de cette population au cours du temps avec une stabilisation après environ un mois se situant entre  $10^6$  et quelque dizaines de millions de germes/gr de fèces selon l'animal considéré son état physiologique, son alimentation et son environnement. Ceci n'est pas surprenant puisque la composition et le niveau d'une microflore digestive dépend de l'hôte étudié et de ses conditions de vie.



La stabilisation de ce groupe est en rapport probablement avec l'installation d'autres groupes bactériens, par le régime alimentaire mais également fonction de l'état physiologique et des anticorps acquis par le lait lors de l'allaitement maternel.

A travers cette numération réalisée dans nos 2 études nous avons essayé de donner un aperçu quantitatif du peuplement du tube digestif chez le nouveau-né qui est et restera un domaine toujours délicat à manipuler .

### III ISOLEMENT ET IDENTIFICATION

#### 1 Milieux de culture

La plupart des milieux utilisés sont ceux fournis par l'institut Pasteur d'Alger.

- Gélose éosine au bleu de méthylène (EMB)
- Eau peptonée exempte d'indole
- Eau peptonée au rouge de phénol
- Milieu triple sucre ou milieu TSI
- Milieu citraté de Simmons
- Milieu mannitol - mobilité
- Disques ONPG (Orthonitrophénol Pyrano-Galactoside)
- Milieu de FALKOV, en vue de la recherche d'arginine dihyotrolase (ADH), de la lysine décarboxylase (LDC) et de l'ornithine décarboxylase (ODC)
- Milieu urée Indole
- Milieu de Clark et Lubs
- Languettes de film de gélatine.
- Solution de sucre stérile à 20% : glucose (Glu), Mannitol (Man), Inositol (Ino), Sorbitol (Sor), Rhamnose (Rha), Saccharose (Sac), Arabinose (Ara), Melibiose (Mel).
- Réactifs pour l'identification
  - \* Réactif d'Ehrlich Kovacs pour la recherche d'indole
  - \* Perchlorure de fer pour la recherche de la tryphophane désaminase ou TDA.
  - \*  $\alpha$  naphтол à 6% } Pour la recherche d'acétoïne
  - \* Lessive de potasse à 40% } (test de Voges Proskauer)
  - \* Rouge de méthyle
  - \* huile de vaseline pour les éprouves nécessitant l'anaérobiose: ADH, LDC, ODC, URE.

## **2 Méthodes**

### **a - Réisolement et sélection des souches à identifier**

Pour chaque prélèvement on choisit parmi les boîtes de Drigalski, une boîte où les colonies jaunes lactoses positives sont bien isolées. Selon le nombre de colonies obtenues sur les boîtes, on en prélève dans la mesure du possible dix au hasard et 3 au minimum, en vue de leur détermination. Dans le cas où les colonies présentaient des aspects particuliers, nous les avons retenues hors échantillon pour identification.

Toutes les colonies choisies ont été réisolées sur gélose EMB en raison de l'aspect caractéristique de certains genres de coliformes sur ce milieu.

- Violettes à reflet métalliques pour *Escherichia coli* et *Citrobacter*; en plus les colonies de ce dernier genre sont plus sèches.
- Colonies muqueuses en œil de poisson avec une odeur caractéristique pour les *Klebsiella*.
- Petites colonies rondes roses pour les *Enterobacter*.

### **b - Tests biochimiques**

L'identification est effectuée à partir d'une culture jeune de 18<sup>h</sup> à 24<sup>h</sup> issue d'une colonie isolée sur EMB ou d'une gélose nutritive inclinée. La lecture a été faite après 24 à 48<sup>h</sup> d'incubation à 37°C.

Nous avons retenu les tests suivants:

#### **b 1 Mannitol - mobilité**

Ce milieu nous permet de tester d'une part l'utilisation du mannitol et d'autre part la mobilité de la souche. L'ensemencement du milieu contenant du rouge de phénol comme indicateur de pH, est réalisé par piqûre centrale. L'utilisation du mannitol se traduit par une acidification du milieu, détectable par le virage au jaune de l'indicateur de pH, ce changement de coloration permet également de localiser les bactéries dans le tube et donc d'évaluer indirectement leur pouvoir d'envahissement et par conséquent leur mobilité.

#### **b 2 Test des 3 sucres (glucose, saccharose lactose, H<sup>2</sup>S, gaz).**

L'ensemencement se fait par piqûre centrale et par stries sur la tranche. Cette épreuve permet de tester l'utilisation avec ou sans production de gaz, du glucose, saccharose et lactose.

La fermentation du glucose se traduit par un jaunissement du culot avec ou absence de bulles de gaz, l'utilisation du lactose et (ou) du saccharose se traduit par une tranche jaune. La production d'hydrogène sulfuré est observée par une coloration noire due à la formation du sulfure de fer, par réduction du sulfate ferreux présent dans le milieu.

Cette épreuve permet également de rechercher la production d'hydrogène sulfuré par la souche

### **b 3 Recherche de la production d'indole**

Un tube d'eau peptonée exempte d'indole est ensemencé avec la souche à tester, après incubation on ajoute à la culture 2 à 3 gouttes de réactifs de Kovacs.

La présence d'indole qui résulte de la dégradation du tryptophane, se traduit par l'apparition d'un anneau pourpre en surface.

### **b 4 Recherche de l'ornithine décarboxylase (ODC), de la lysine décarboxylase (LDC) et d'arginine dihydrolase (ADH).**

Pour la recherche de ces enzymes la méthode de FALKOV a été utilisée trois tubes contenant du glucose, du pourpre de bromocrésol comme indicateur de pH, et l'un des acides aminés suivants. ornithine, lysine et arginine ont été ensemencés en présence d'un tube témoin exempt d'acide aminé tous sont recouvert d'huile de vaseline.

Dans un 1<sup>er</sup> temps, l'acidification par utilisation du glucose entraîne l'apparition d'une couleur jaune dans les 4 tubes. Si l'un des acides aminés est dégradé, l'alcalinisation du milieu par la libération d'amines ou d'ammoniac entraîne l'apparition d'une couleur violette.

### **b 5 Test de Simmons**

L'utilisation du citrate comme seule source de carbone est recherchée en ensemencant en stries le milieu de Simmons. Une réaction positive se traduit au plus tard 48 heures après incubation à 37°C par le virage du bleu de bromothymol au bleu.

### **b 6 Test pour la recherche de la $\beta$ galactosidase (ONPG).**

Ce test est recherché bien qu'il s'agisse de coliformes ayant révélé leur aptitude à fermenter le lactose. Dans ce cas le galactoside artificiel qui est l'orthonitrophenyl pyrano-galactoside (ONPG) est hydrolysé libérant l'orthophénol qui colore le milieu en jaune.

Le test est réalisé en plaçant un disque d'ONPG dans une suspension bactérienne dense. La lecture a lieu au bout de 24h d'incubation à 37°C; elle est positive lorsque la suspension se colore en jaune citrin.

**b 7 Recherche des produits de fermentation.**

Elle se fait par la mise en culture de la souche dans le milieu de Clark et Lubs pendant 24h à 37°C.

Le test au rouge de méthyle permet la mise en évidence d'une fermentation d'acides mixtes avec production d'acide formique, acétique, lactique ce qui abaisse fortement le pH et maintient la coloration rouge de l'indicateur de pH.

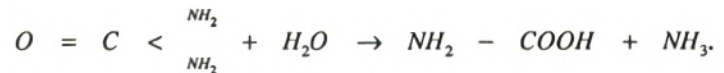
La mise en évidence d'acétoïne par le test de Voges Proskauer permet de déterminer une fermentation du butylène glycol.

**b 8 Recherche de l'uréase et de la tryptophane désaminase.**

La recherche de la tryptophane désaminase et de l'uréase est réalisée par l'ensemencement du milieu urée Indole, additionnée d'1 ml d'huile de vaseline.

Après incubation à 37°C pendant 24<sup>h</sup> la tryptophane désaminase est détectée après adjonction de perchlorure de fer, et l'apparition d'une coloration brunâtre.

La mise en évidence de l'uréase repose sur l'alcalinisation du milieu qui se traduit par une coloration rouge violacée du fait de la réaction suivante.



Les bactéries possédant une uréase très active sont capable de décomposer  
 $COOH - NH_2 \rightarrow CO_2 + NH_3.$

Les produits  $CO_2 + NH_3$  se combinent en carbonate d'ammonium  $[CO_3(NH_4)_2]$  qui alcalinise le milieu.

**b 9 Hydrolyse de la gélatine.**

Pour rechercher d'une façon rapide la présence d'une protéolyse de la gélatine, des languettes de film de gélatine imprégnées de charbon sont immergées dans une suspension épaisse de bactéries.

Après une incubation à 37°C au bain marie ou à l'étuve de 4 jours, le pouvoir protéolytique se manifeste par la libération de particules de charbon due à l'hydrolyse de la gélatine qui donne à la suspension bactérienne un aspect gris noir en même temps que la partie immergée du film devient transparente.

**b 10 Test d'utilisation de différents sucres.**

Des tubes d'eau peptonée contenant du rouge de phénol comme indicateur de pH, additionnés stérilement du sucre à tester à raison de 1%. sont ensemencés avec une goutte de culture bactérienne jeune, après une incubation de 24 à 48<sup>h</sup> à 37°C l'utilisation du sucre se traduit par une acidification franche, c'est à dire par un virage au jaune de l'indicateur de pH. En cas de doute le test est refait.

Remarque: Les tests retenus correspondent à ceux de la galerie API système. 20E; ceci nous a permis d'utiliser le même système d'identification.

Pour la méthode classique, la lecture est faite après 24 à 48<sup>h</sup> à 37°C. Après l'adjonction des réactifs appropriés, les résultats sont notés sur des fiches et le système de notation est le même que celui des galeries à 20 caractères.

A l'aide de ces résultats. On peut constituer un numéro d'identification à sept chiffres indiquant le type biochimique. En le reportant sur un catalogue d'identification livré par API système, on détermine la souche étudiée.

Principe et lecture

Les 20 caractères étudiés correspondent à un code formé de 7 chiffres. formant ainsi 7 plaques représentant chacune trois caractères biochimiques.

ONPG, ADH, LDC/ODC, CIT, H<sub>2</sub>S/URE, TDA, IND/VP, Gel, GLu/Man, Ino, Sor/Rha, Sac, MeL/Amy, Ara, oxydase/.

Pour chaque tranche suivant les caractères positifs obtenus et leur nombre, le chiffre indiqué est différent. Prenons A,B,C un ensemble de 3 caractères.

Numéros	7	6	5	4	3	2	1
A	+	-	+	-	+	-	+
B	+	+	-	-	+	+	-
C	+	+	+	+	-	-	-

Chaque numéro correspond à une combinaison des caractères A, B, C suivant qu'ils sont positifs ou négatifs.

### **3 Résultats**

#### **a - Entérobactéries identifiées et critère d'identification.**

Notre méthode nous a permis de récupérer 810 souches à partir de 30 nouveau-nés. Leur détermination par la méthode classique a permis la répartition globale suivante: (Tableau N° 11)

- 538 *Escherichia coli* (colibacilles)
- 206 *Klebsiella pneumoniae*
- 30 *Klebsiella oxytoca*
- 2 *Klebsiella ozaenae*
- 10 *Enterobacter aerogenes*
- 6 *Enterobacter gergoviae*
- 2 *Enterobacter cloacae*
- 15 *Proteus mirabilis*
- 1 *Proteus vulgaris*
- 5 non déterminées

#### **a 1 *Escherichia coli***

Cette espèce ne pose pas de problème particulier à l'identification. En plus de leur aspect caractéristique sur EMB, toutes les souches fermentent le glucose, le lactose, le mannitol, l'arabinose et sont toutes inodore positif. Aucune d'entre elles ne produit de l'hydrogène sulfuré, ni de tryptophane désaminase. Tel qu'on peut le voir sur le tableau N° 12, certains caractères sont variables tel l'arginine dihydrolase, lysine décarboxylase, ornithine décarboxylase et l'utilisation de sorbitol, rhamnose, saccharose, mélibiose, amygdaline et arabinose.

Ainsi le biotype 1044552 (ODC-,LDC-,Sac-) qui se retrouve en 4<sup>ème</sup> position chez le nouveau-né humain avec 10,6%, se retrouve au 19<sup>ème</sup> rang chez le veau avec 1,9%. Il faut remarquer que les 3 principaux biotypes (5144552, 5044552, 5144572) sont retrouvés par tri et dominant aussi bien chez le nouveau-né humain que chez les bovins, la seule différence réside dans leur classement.

Comme on le voit dans le tableau N° 14, ces 3 biotypes représentent dans les deux cas 64,5% environ, c'est à dire l'essentiel de la microflore colibacillaire. Si on rajoute le 4<sup>ème</sup> biotype la différence est peu perceptible puisque dans ce cas leur proportion se situe au niveau de 74%, cependant ce 4<sup>ème</sup> biotype est différent chez l'un et l'autre des lots: le biotype

- 1044552: classé en 4<sup>ème</sup> position chez l'humain et 19<sup>ème</sup> chez le veau.
- 5044572 classé 4<sup>ème</sup> avec 7,9% chez les bovins et 5<sup>ème</sup> chez le nouveau-né humain avec 9,5%.

Ceci est en faveur d'un pool de biotype majoritaire commun chez le nouveau-né humain et bovin même si il ya des différences de classement. Les autres chimiotypes seraient fluctuants en partie dans les autres groupes bactériens présents, et des conditions environnantes souvent complexes. Il serait bon de vérifier cette observation chez les adultes.

### **b *Klebsiella***

C'est le 2<sup>ème</sup> genre important dans cette microflore où il est représenté par 238 souches, soit environ 1/3 des coliformes rencontrés (30%). Après les colibacilles ce genre se retrouve avec 3 espèces.

-*Klebsiella pneumoniae*: largement favorisée par rapport aux 2 autres puisqu'elle comporte 206 souches soit 86,5% répartis en 5 chimiotypes. Le plus fréquent est le 5215773 caractérisé par l'utilisation du citrate et d'une LDC+ avec 156 souches, on le rencontre chez la majorité des enfants quel que soit le lieu de prélèvement aussi bien à une semaine qu'à 35 jours.

La place de ce chimiotype est négligeable parmi les coliformes du veau nouveau-né selon l'auteur précité.

Quand aux 4 autres chimiotypes, ils diffèrent par le citrate, l'ADH et l'ODC et leur fréquence est relativement faible.



semaine de vie en plus des colibacilles qui ne sont pas toujours dominants, d'autres coliformes, mais à partir du 4<sup>ème</sup> jour, les colibacilles constituent la quasi totalité de la flore, différemment à ce que nous avons observé chez l'humain.

### **c - Origine des coliformes isolés**

Cette origine a été évoquée dans le chapitre des dénombrements, l'ensemencement se fait à partir de tous les facteurs déjà cités, mère, personnel soignant, vêtement, matériel utilisé et de tous les chimiotypes préexistants dans la nature respectant une certaine chromologie et dont l'équilibre suit toutes les conditions du milieu. Les chimiotypes peu fréquents observés peuvent être des sous-dominants peu favorisés par le milieu ou simplement des variants des biotypes dominants.

Le domaine reste encore peu connu et les auteurs en sont réduits actuellement à des hypothèses. DUCLUZEAU et RAIBAUD en 1977, lors d'observations faites sur des animaux de laboratoire suggèrent que l'établissement des espèces chez le nouveau-né animal ne se fait pas au hasard des rencontres seulement. Ce ne sont pas les 1<sup>ère</sup> bactéries ingérées par hasard ou à cause de leur prédominance dans l'environnement qui s'établissent les premières, mais seulement certaines espèces déterminées.

Selon plusieurs auteurs tel que LEJEUNE et coll, GOLD et BORDERON en 1981, le nouveau-né posséderait les moyens d'exercer un tri parmi le très grand nombre d'espèces qu'il rencontre dès les premières heures. Parmi les facteurs qui contribuent à ce mécanisme il ya lieu de détecter les phénomènes de barrières une fois la flore installée. Ces derniers ont été étudiés par plusieurs auteurs tel que RAIBAUD et coll en 1977 et 1984, GHASSIA en 1979, DUVAL-IFLAH et coll, en 1982 et CERF en 1984. Les résultats obtenus à ce jour sont encourageants puisqu'ils ont servi de base aux expériences d'implantation de microflore chez des animaux et des humains nouveau-nés, en vue de les protéger, mais l'expérience quotidienne montre qu'il reste beaucoup à faire et à comprendre.

opt Microbiologie

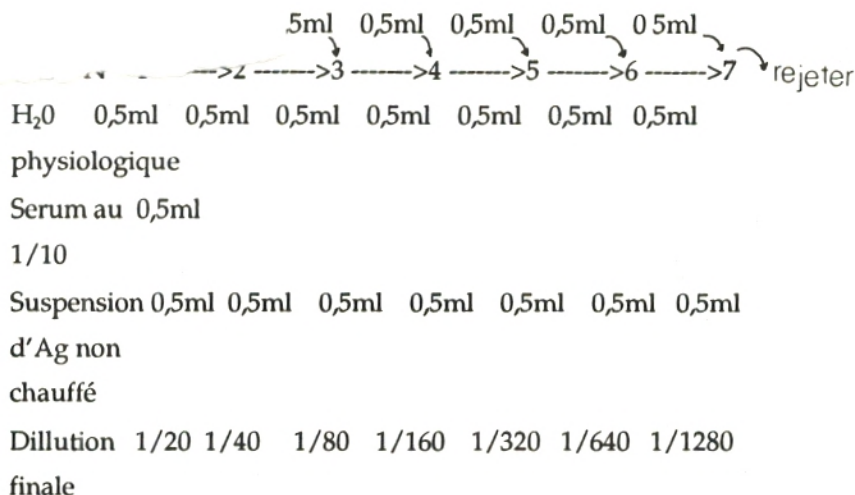
pot.

HAfidoTAKI-H.

### Titration lente en tubes à hémolyse

e des antigènes de surfaces B et L ou A

cultures jeunes de moins de 24 heures non chauffées, on prépare des s et des dilutions qui se présentent comme suit:



On réalisera un tube témoin contenant 0,5 ml d'eau physiologique et 0,5 ml d'Ag, le tout est mis 2 heures à 37°c au bain - marie puis une nuit à une température de + 4°c.

\* Recherche des antigènes somatiques.

Sérum dilué 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280  
0,5ml 0,5ml 0,5ml 0,5ml 0,5ml

Ag chauffé 1<sup>h</sup> à 100°c et 0,5ml 0,5ml 0,5ml 0,5ml 0,5ml  
incubé une nuit à 55°c.

Si l'épreuve est positive, on recherche le titre final jusqu'au 1/6400 et plus.

La procédure se fait de la même manière que précédemment avec les mêmes antisérums.

Tableau N° 15 Résultat de l'étude antigénique

Référence	Inagglutinable	Rough débutant	Rough
I	12	-	-
II	8	-	-
III	-	6	32
IV	8	-	-
V	21	-	-
VI	2	-	-
VII	9	-	-
IX	47	3	3
X	50	-	-
XI	-	-	6
XII	-	-	1
XIII	9	16	11
XIV	-	13	25
XV	18	-	-
XVI	8	-	-
XVII	25	-	-
XVIII	26	-	-
XIX	40	-	-
XXI	30	20	-
XXIII	46	-	-
XXIV	21	-	-
XXV	15	-	-
<b>Total</b>	<b>402</b>	<b>58</b>	<b>78</b>

## **b - Mécanismes de l'antibiorésistance**

Différents mécanismes souvent complexes permettent à une bactérie de résister aux antibiotiques. Ils peuvent être rangés en 4 types tel que le résumé le tableau N° 16

- modification et inactivation de l'antibiotique par des enzymes bactériennes.
- modification du site d'action ou "cible" de l'antibiotique.
- Diminution ou perte de la perméabilité de la bactérie à l'antibiotique, interférence avec le transport de l'antibiotique.
- Développement d'une autre voie métabolique suppléant la voie métabolique inhibée par l'antibiotique.

comme le souligne RICHARD en 1986 le premier mécanisme provoque la destruction de l'antibiotique alors que les trois autres entraînent une tolérance des bactéries à ces molécules. ces mécanismes ne s'excluent pas mutuellement et peuvent s'associer.

## **c - Supports de l'antibiorésistance**

Depuis l'introduction successive en thérapeutique des différents antibiotiques, la sensibilité des bactéries à ces substances a beaucoup évolué. Quelques espèces bactériennes possèdent une résistance naturelle à certains antibiotiques. Cette résistance est stable, non évolutive et concerne l'ensemble des souches de l'espèce bactérienne.

A côté de cette résistance, on a vu apparaître dans des populations bactériennes initialement sensibles, une proportion souvent importante de souches résistantes. Cette "résistance acquise" à l'aspect éminemment évolutif, va particulièrement nous intéresser.

La résistance de la bactérie dans ce cas est dans la modification du capital génétique qui peut se situer soit au niveau du chromosome (résistance chromosomique), soit au niveau de la structure extra - chromosomique (plasmides, transposons).

Tableau N° 16

Mécanismes biochimiques de la  
résistance aux antibiotiques  
(RICHARD 1986)

Antibiotiques	Mécanismes	Support Génétique
$\beta$ lactamines (Ampicilline)	$\beta$ lactamase	chromosome et plas- mides
Aminoside (Streptomycine Kanamycine Gentamicine)	Modificat° du site d'action (30S)	chromosome
	Acétyl transférases Phospho Transféreses nucleotidyl	Plasmide
Chloramphenicol	Perte de perméabilité Hydrolyse - Réductase	chromosome
	Acétyl transférase	Plasmide
Tétracycline	Perte de perméabilité	Plasmide
Macrolides et apparentés	modification de la cible (50S)	chromosome
	Méthylase	Plasmide
Sulfamides	Modification de la cible	plasmide
	Hyperproduction Diminution affinité pour enzyme de synthèse (DHPS)	Chromosome

## c 1 Résistance chromosomique

Elle peut être due à une mutation correspondant à la modification ou à la perte d'un gène, survenant au hasard pendant la réplication du chromosome. La résistance chromosomique présente toutes les propriétés habituelles des mutations chromosomiques. C'est un phénomène rare, le taux de mutation, ou probabilité d'apparition d'un mutant par bactérie et par génération est de l'ordre de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$ .

La probabilité d'apparition de chacune des deux mutations simultanément est égale au produit du taux de mutations ( $10^{-a} \times 10^{-b}$ ). L'importance pratique de cette forme de résistance va donc dépendre de la taille de la population bactérienne et de sa vitesse de multiplication. C'est un phénomène spontané: L'antibiotique n'intervient pas dans l'apparition d'une mutation, mais il en est le révélateur en sélectionnant le mutant dans une population sensible qui, elle est inhibée ou détruite par l'antibiotique. La résistance n'affecte, en général qu'un seul mécanisme d'action vis à vis d'une famille d'antibiotique. C'est un phénomène stable et transmis héréditairement. Enfin, une mutation entraîne généralement des déficiences de croissance défavorisant le mutant par rapport aux bactéries sensibles dans un milieu sans antibiotiques. Cet effet de contre sélection joint aux propriétés propres aux mutations, explique en partie que celles-ci ne rendent compte que d'une très faible proportion des résistances observées. La résistance chromosomique peut être le résultat d'une recombinaison à l'issue d'une conjugaison, transduction ou transformation.

## c 2 Résistance extrachromosomique

La résistance aux antibiotiques peut être codée par des plasmides et transposons.

### d - Plasmides et transposons

#### d 1 Circonstance et découverte

Le phénomène de résistance plasmidique a été décrit pour la première fois par les japonais OCHIAI et AKIBA en 1959, à la suite de l'observation d'une résistance multiple apparue brusquement au cours d'une épidémie de dysenterie à *Shigella flexneri* en 1955.

Les Shigelles primitivement sensibles étaient devenues résistantes simultanément à la streptomycine, au chloramphénicol, aux tétracyclines et aux sulfamides (S, C, T, Su). Dans les mêmes prélèvements étaient retrouvés par ailleurs des colibacilles non pathogènes

résistants aux mêmes antibiotiques (S, C, T, Su). La possibilité d'un nouveau type de résistance infectieuse pouvant se transférer d'une espèce d'entérobactérie à une autre fut alors envisagée et dès 1960. WATANABE réalisa des expériences de transfert *in vitro* et montra l'existence de facteurs porteurs de caractères de résistance (R. factors) chez les entérobactéries.

Depuis la nature et les propriétés des facteurs R ou plasmides de résistance ont été précisés par de nombreux auteurs dont ANDERSON 1967 et GARNIER en 1976.

## **d 2 Définition des plasmides**

DUVAL-IFLAH et CHAPPUIS en 1984 définissent les plasmides comme des molécules d'ADN bicaténaire circulaire, extrachromosomique, douées de répllication autonome et qui sont transmises de façon stable au cours des générations. Ils ne sont pas indispensables pour la croissance et les métabolismes de la bactérie. Néanmoins, ils portent des gènes permettant à la bactérie de survivre dans divers environnements.

Une bactérie peut héberger plusieurs copies d'un même plasmide ou de plusieurs plasmides différents. Ces plasmides peuvent être indépendants où se trouver intégrés au chromosome comme dans les souches Hfr par exemple. Ces éléments facultatifs peuvent être perdus par la bactérie qui les héberge. Cette perte peut être spontanée, ou provoquée on parle alors de cure.

COURVALIN et TRIEU-CUOT en 1982 rapportent que les gènes de résistance aux antibiotiques situés sur des plasmides peuvent être transmis par conjugaison, transduction ou encore par transformation d'une bactérie à une autre qu'elle soit de la même espèce, d'une espèce différente ou même d'un genre bactérien différent. Actuellement, il a été démontré par BRISSON-NOEL et coll en 1989 qu'un transfert de gènes peut avoir lieu entre bactéries à Gram positif et Gram négatif.

Ces transferts plasmidiques expliquent la facilité avec laquelle ces résistances acquises, par opposition aux mutations chromosomique peuvent être disseminées dans le monde bactérien, ils ne vont pas sans remettre sans cesse en cause les schémas thérapeutiques.

La résistance extrachromosomique est un phénomène très répandu chez les bactéries, et rares sont les antibiotiques pour lesquels ce type de résistance n'a pas été détectée. Parmi ces derniers on peut citer les quinolones, la novobiocine, les polypeptides, la rifampicine et les glycopeptides.

### **d 3 Fonctions codées par les plasmides**

Les plasmides bactériens peuvent coder de nombreuses propriétés que COURVALIN et TRIEU-CUOT en 1982 résumant dans le tableau N° 17.

Ces fonctions confèrent à la bactérie hôte une grande souplesse génétique et de grandes possibilités d'adaptation dans un environnement défavorable ou fluctuant, soit une implantation chez certains hôtes avec une compétition entre les micro-organismes présents de la même espèce ou d'espèces différentes.

Les plasmides les plus étudiés et les plus importants en pathologie infectieuse humaine et vétérinaire: sont les plasmides de résistance aux antibiotiques qui peuvent en même temps coder pour un ou plusieurs autres types de caractères. Enfin comme le souligne OUNISSI et COURVALIN en 1983 de nombreux plasmides restent encore de fonctions inconnues, ils sont dit plasmides cryptiques.

L'ADN plasmidique est répliqué à chaque génération bactérienne et transmis à la descendance de la division cellulaire. Parmi les plasmides d'entérobactéries, on distingue deux catégories: - Les plasmides à réplication dite relâchée, ayant une petite taille généralement non auto-transférables, plusieurs copies sont souvent présentes dans chaque cellule.

- Les plasmides à réplication dite stricte de plus grande taille, souvent auto transférables avec en moyenne une copie par cellule. La plupart de ces plasmides chez les bactéries Gram-négatives sont capables d'assurer leur propre transfert.

Le passage d'un des deux brins s'effectue par conjugaison d'une bactérie donatrice à une bactéries réceptrice.

Comme le souligne CHASLUS - DANCLA en 1984, les plasmides transférables sont ainsi responsables de la dissémination de l'antibiorésistance. Cette diffusion prend souvent un aspect épidémique "infectieux" particulièrement lorsqu'elle est favorisée par une pression de sélection. Ils peuvent conférer en outre les propriétés évoquées dans le tableau N° 17.



Tableau N° 17

Propriétés codées par les plasmides  
(COURVALIN et TRIEU-CUOT 1982)

Replication autonome et son contrôle  
Incompatibilité de plasmides apparentes  
Fertilité (autotransfert, chez les plasmides conjugatifs)  
Exclusion de surface  
Inhibition d'entrée  
Mobilisation  
Modification, restriction de l'ADN  
Recombinaison, transposition de gènes  
Fusion de replicons  
Résistance et sensibilité aux:  
    Antibiotiques, Bactériocines, Phage, Métaux-lourds  
    Détergents, Radiation, Agents radiomimétiques,  
    Sérum,  
Effets mutagènes, antimutagènes  
Facteurs d'adhérence et de pathogénicité (endotoxine)  
Production d'exotoxine, d'hémolysine  
Capacité d'induire des tumeurs chez les plantes

## d 4 Structure des plasmides

Comme le souligne NOVICK en 1981, les gènes plasmidiques semblent disposés de manière à rester stables tout en gardant une grande souplesse structurale. Contrairement au virus les plasmides peuvent acquérir de nouveaux gènes et réarranger les anciens de manière importante pour maintenir le stock d'informations génétiques compatibles avec les besoins de l'hôte habituel, sans compromettre leur propre capacité de réplication.

Chez les plasmides, il est difficile d'isoler des mutations qui affectent les fonctions de réplication quant à l'analyse de la recombinaison génétique, sa complexité et décourageante.

cependant, les plasmides répondent bien à certaines techniques de génétique moléculaire élaborées récemment.

On peut en particulier les étudier à l'aide des électrophorèses sur gel utilisés pour l'analyse de l'ADN et des techniques de coupures et de clonage des séquences d'ADN, ces dernières utilisent des endonucléases de restriction d'origine bactérienne.

## d 5 Classification des plasmides

Tel que le rapportent OUNISSI et COURVALIN en 1983 et CHASLUS-DANCLA EN 1984. Les plasmides peuvent être classés selon différents critères, dont le plus utilisé est le critère d'incompatibilité. On dit que deux plasmides sont incompatibles lorsqu'ils ne peuvent coexister de manière stable dans une bactérie. Inversement lorsque deux plasmides sont introduits dans une même bactérie, ils peuvent coexister et se répliquer indépendamment l'un et l'autre ils sont dit compatibles. Par définition deux plasmides incompatibles appartiennent au même groupe d'incompatibilité et deux plasmides compatibles appartiennent à des groupes différents. Des expériences d'hybridation ADN/ADN entre des plasmides appartenant à un même groupe d'incompatibilité confirme le bien fondé de cette classification en montrant un haut degré de parenté entre plasmides d'un même groupe.

Il a été ainsi possible de réaliser une classification plasmidique qui compte actuellement une quarantaine de groupes d'incompatibilité d'inégale importance épidémiologiques.

## d 6 Résistance bactérienne et transposons

Les plasmides R autotransférables sont structuralement et fonctionnellement constitués d'un facteur de transfert (TF) et des déterminants de la résistance. Le facteur de transfert fournit l'information pour la réplication et le contrôle, de son maintien, de la mobilisation et du transfert.

C'est une structure relativement stable. Les gènes de résistance, au contraire, sont souvent portés par des séquences d'ADN de petite taille, capables de passer ou de se transposer d'un réplicon à un autre (chromosome ou plasmides) d'où le terme de transposon.

Les caractères de résistance transposables ont été résumés par COUVALIN et TRIEU-CUOT en 1982 tel qu'on peut le voir sur le tableau N° 18.

Tableau N° 18

Caractères de résistance transposables  
(Selon COUVALIN et TRIEU-CUOT 1982)

- Bêta - lactamines (pénicillines, céphalosporines)
- Streptomycine - spectinomycine
- Kanamycine et aminosides structuralement reliés
- Gentamycine et aminosides structuralement reliés
- Chloramphénicol
- Tétracycline
- Macrolides, Lincosamides et streptogramines
- Triméthoprim
- Sulfamides
- Fosfomycine
- Mercure

ces transposons peuvent coder aussi pour la résistance aux métaux lourds, de la production de toxines et la capacité d'utiliser certains métabolites (lactose, raffinose, histidine, composés sulfurés). Les transposons dont la taille varie de 2,5 à 20 Kb portent en outre les gènes impliqués dans leur mécanisme de transposition et leur régulation.

La transposition a une fréquence variable selon le transposon considéré, elle s'effectue de façon indépendante des fonctions de recombinaison réciproque de la bactérie hôte. Elle ne nécessite pas donc d'homologie entre les ADN qui interagissent, d'où la présence de caractères de résistance identiques sur des plasmides non apparentés. La transposition peut s'effectuer sur tous les réplicons et, pour un réplicon donné, en de nombreux endroits. Il existe néanmoins des zones privilégiées d'insertion ou <<points chauds>>. Lorsqu'un élément de ce type se <<réfugie>> dans le chromosome, il devient alors partie du patrimoine héréditaire de la bactérie et est transmis de façon stable à sa descendance.

La transposition, de même que le transfert plasmidique entraîne une duplication (réplication) de l'information génétique, de sorte que le donneur et le receveur se retrouvent, chacun en possession d'une copie de l'information.

Les transposons véhiculant des gènes de résistance aux antibiotiques peuvent être structuralement et fonctionnellement divisés en trois catégories:

- 1 - Les transposons appartenant à la famille Tn<sup>3</sup>
- 2 - Les transposons composites
- 3 - Les transposons conjugatifs.

les éléments faisant partie des deux premières catégories possèdent a leurs extrémités des séquences inversées répétées plus ou moins parfaites leur intégration produit d'une duplication en orientation directe d'une courte séquence de l'ADN. Cette duplication résulte vraisemblablement de la formation de coupures décalées sur les deux brins de l'ADN cible puis de la réparation, après intégration de transposon des séquences d'ADN, tel que cela est schématisé sur la fig2 par COURVALIN et TRIEU-CUOT en 1982

### **e - Transfert de l'antibiorésistance et caractérisation de plasmides**

La démonstration de la nature plasmidique d'un ou de plusieurs caractères ainsi que leur caractérisation font appel à des techniques génétiques et biochimiques. Deux approches sont possibles: - La première consiste à "curer" c'est à dire à faire perdre le ou les plasmides de la souche étudiée et a corréler la perte du ou des caractère(s) et la disparition de l'ADN plas-

midique. Cette technique est particulièrement utile en cas de plasmide non autotransférable ou non mobilisable. Les produits qui inhibent sélectivement la réplication plasmidique entraînent la perte simultanée de l'ensemble des résistances portées par le plasmide. L'efficacité des agents

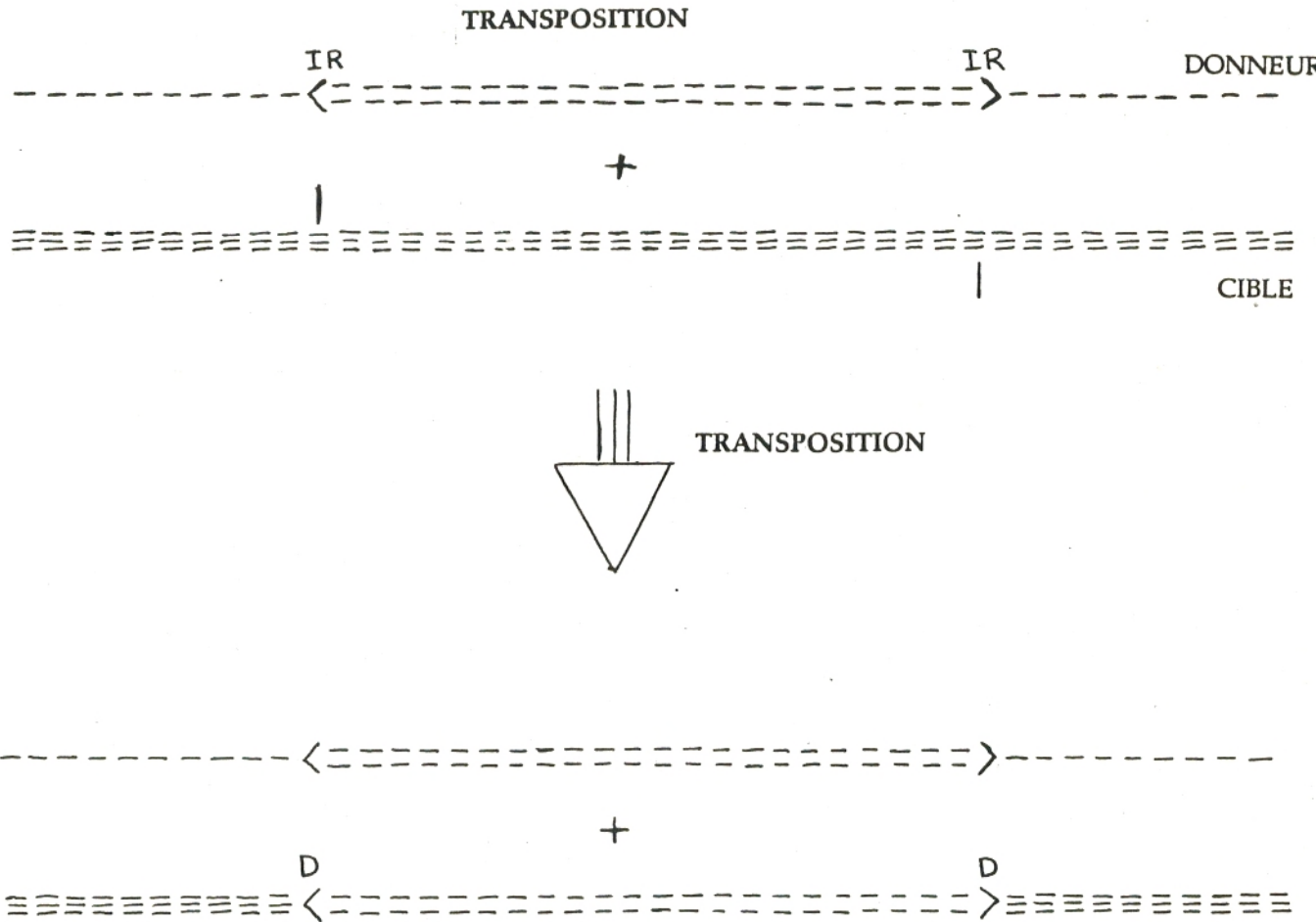


Fig N° 2

Schéma de la Transposition (COURVALIN,  
TRIEU - CUOT.1982)

Les flèches verticales représentent les coupures décalées effectuées sur les deux brins de l'ADN cible au site d'insection du transposon.

curants variant selon les plasmides étudiés, il n'y a pas de base logique au choix du produit à utiliser. Puisque le critère de la cure est la perte d'une (ou d'un ensemble de) propriété(s) phénotypique(s), il est important d'éliminer d'autres phénomènes tels que la mutation et ce d'autant que les agents intercalaires sont des mutagènes. Une fréquence de perte élevée est un argument contre la mutation, de même que l'absence de réversion de la perte.

- la seconde, inverse de la première, consiste à transférer le plasmide dans une souche qui en est dépourvue et à vérifier la corrélation entre l'acquisition du ou des caractères recherchés et l'antibiotique initial.

Le transfert d'un plasmide d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice peut se faire par conjugaison, transduction ou transformation. Le transfert d'un ensemble de caractères n'implique pas que tous ces caractères soient portés par un seul plasmide; il peut se faire par cotransfert de plusieurs plasmides.

Inversement, l'absence de transfert ne signifie pas l'absence de plasmide. Les systèmes de restriction - modification jouent un rôle limitant dans le transfert plasmidique.

la preuve de la nature plasmidique et surtout la caractérisation d'élément génétique ne peut provenir que de la confrontation de techniques génétiques et physico-chimiques. Parmi les techniques qu'on peut citer.

\* Transfert par conjugaison : que nous allons entreprendre lors de cette étude.

\* Transfert par mobilisation: En cas de plasmide non auto transférable, mais mobilisable, on procède par l'introduction préalable dans la bactérie donatrice, d'un plasmide auto transférable.

\* Transfert par transduction: Dans ce cas, le transfert du plasmide, qu'il soit conjugatif ou non, s'effectue par l'intermédiaire d'un bactériophage. Ce transfert n'est qu'entre bactéries phylogéniquement proches sur lesquelles le phage peut se fixer.

\* Transfert par transformation: c'est une technique d'étude des plasmides très utile notamment dans le cas des plasmides non conjugatifs et non mobilisables. Conjugatifs ou non, les plasmides peuvent être introduits dans une bactérie réceptrice préalablement rendue compétente. En cas de plasmide non conjugatif, cette approche est plus directe que la mobilisation. Une fois introduit dans l'hôte bactérien approprié, l'ADN plasmidique transformant se réplique normalement et la batterie des déterminants de la résistance qu'il porte est presque exprimée. Cette technique est complémentaire de la conjugaison dans la mesure où elle est beaucoup plus efficace pour les petits plasmides, que pour les grands qui sont conjugatifs.

\* Electrophorèse en gel d'agarose de Lysats brut bactérien : c'est l'approche la plus simple, la plus directe et la moins dispendieuse. Elle permet la détection et la caractérisation préliminaire principalement basée sur la taille de l'ADN plasmidique.

## **2 Matériel et méthodes**

### **a - Matériel**

#### **a 1 Matériel biologique**

- *E.coli* K12 (souche réceptrice)
- Souches sauvages ou donatrices: (N<sup>III</sup><sub>11c</sub>, IV<sub>20d</sub>, V<sub>21c</sub>, V<sub>22b</sub>, VI<sub>30a</sub>, IX<sub>36i</sub>, XIII<sub>65e</sub>, XIV<sub>62g</sub>, XV<sub>65j</sub>, XVIII<sub>76c</sub>, XVIII<sub>77a</sub>, XVIII<sub>79b</sub>, XXV<sub>113j</sub>).

#### **a 2 Les antibiotiques**

Nous avons choisi de tester 8 antibiotiques appartenant aux principales familles tel qu'ils sont énumérés ci-après. Les disques d'antibiotique utilisés sont ceux fournis par l'institut Pasteur d'Alger.

Antibiotiques	Famille	Charge en µg du disque
- Ampicilline (A)	B lactamines	10µg
- Streptomycine (S)	Aminosides	30µg
- Kanamycine (K)	Aminosides	30µg
- Gentamycine (Gm)	Aminosides	30µg
- Néomycine (N)	Aminosides	30µg
- Chloromphénicol (C)	Phénicolés	30µg
- Tétracycline (T)	Tétracyclines	30µg
- Sulfamides forts (Su)		200µg

Pour la réalisation du transfert, nous avons utilisés les antibiotiques en poudre suivants: ampicilline, streptomycine, tétracycline et chloramphénicol tous fournis par la PCA d'ORAN



### **a 3 Milieux utilisés**

- Bouillon Coeur - Cerveau (Brain Heart -infusion) en tube de 2ml, 10ml et en flacons
- Milieu de Mueller - Hinton
- Milieu gélosé E.M.B.
- Milieu de Drigalski
- Eau physiologique à 9%. en tube de 10ml.

### **b - Méthodes**

#### **b 1 Réalisation de l'antibiogramme**

A partir d'une culture pure et jeune de 24 heures dans un bouillon Coeur Cerveau, 2 gouttes sont prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur puis diluées dans 10 ml d'eau physiologique. Après homogénéisation, la dilution est versée dans les boîtes de Pétri contenant 20ml de gélose de Mueller Hinton. On obtient ainsi un étalement uniforme en nappe.

La suspension en excès est aspirée à l'aide d'une pompe à vide avant que la boîte ne soit mise à sécher 20 à 30mn.

A l'aide d'un distributeur de disques livré par l'Institut Pasteur d'Alger, les différents disques d'antibiotiques sont placés sur la gélose séchée, puis les boîtes sont laissées durant 20mn à la température ambiante pour permettre à l'antibiotique de diffuser. Elles sont ensuite incubées à 37°C pendant 18<sup>h</sup> à 24<sup>h</sup>.

Le diamètre de l'auréole d'inhibition est mesuré et rapporté à une échelle étalonnée fournie par l'Institut Pasteur de Paris; ceci permet d'évaluer la concentration minimale inhibitrice ou CMI. En parallèle on réalise un témoin avec une souche sensible aux antibiotiques.

#### **b 2 Réalisation de la conjugaison**

\* Principe: Basée sur la conjugaison bactérienne, la technique a été décrite, en 1960 par WATANABE, mise au point par CHABBERT et rapportée par CHIKHI en 1978.

De nombreux plasmides sont capables d'organiser leur propre transfert par conjugaison, c'est à dire par contact physique entre la bactérie donatrice, dans notre cas la souche sauvage polyrésistante, mais sensible à l'acide nalidixique et la bactérie réceptrice qui est la souche *E.coli* K12 sensible aux antibiotiques mais résistante à l'acide nalidixique. le contact entre donatrice et réceptrice peut être établie en milieu liquide ou solide. Le milieu solide assurerait un contact plus intime entre un grand nombre de bactéries et donnerait des fréquences de transfert plus élevées. Après conjugaison la suspension bactérienne est étalée sur un milieu de sélection qui permet de recueillir les trans-conjuguants à la fois résistants à l'acide nalidixique et aux antibiotiques étudiés, selon le milieu sélecteur utilisé.

\* Technique: Après avoir réisoler les souches a étudier sur gélose EMB, on prélève 3 colonies bien séparées qu'on note: a, b, c. Elles sont repiquées dans des tubes de 2ml de bouillon Coeur-Cerveau. Parallèlement on repique la souche d'*Escherichia coli* K12 dans un flacon de 10ml de bouillon Coeur Cerveau, l'incubation est faite à 37°C pendant 7h de manière à atteindre la phase exponentielle de la croissance.

Avant de procéder au mélanger on chauffe la souche réceptrice environ à 50°C pendant 10mn pour lever une restriction éventuelle. Le mélange des 2 souches se fait en ajoutant à chacun des tubes a, b, c de 2ml, 8ml de la culture obtenue avec la souche *E.coli* K12. Le mélange est incubé à 37°C pendant 18h. Pendant ce temps on prépare les milieux de sélection.

les antibiotiques en poudre nous permettent de préparer des solutions de concentrations connues dans l'eau physiologique stérile à l'exception du chloramphénicol qui est d'abord dissout dans 1ml d'alcool à 90°, puis complété au volume désiré avec de l'eau distillée.

Les concentrations de ces solutions mères sont les suivantes:

- Ampicilline	400 µg/ml
- Streptomycine	300 µg/ml
- Tétracycline	250 µg/ml
- Chloramphénicol	200 µg/ml

Pour l'acide nalidixique on prépare une solution à 10.000 µg/ml.

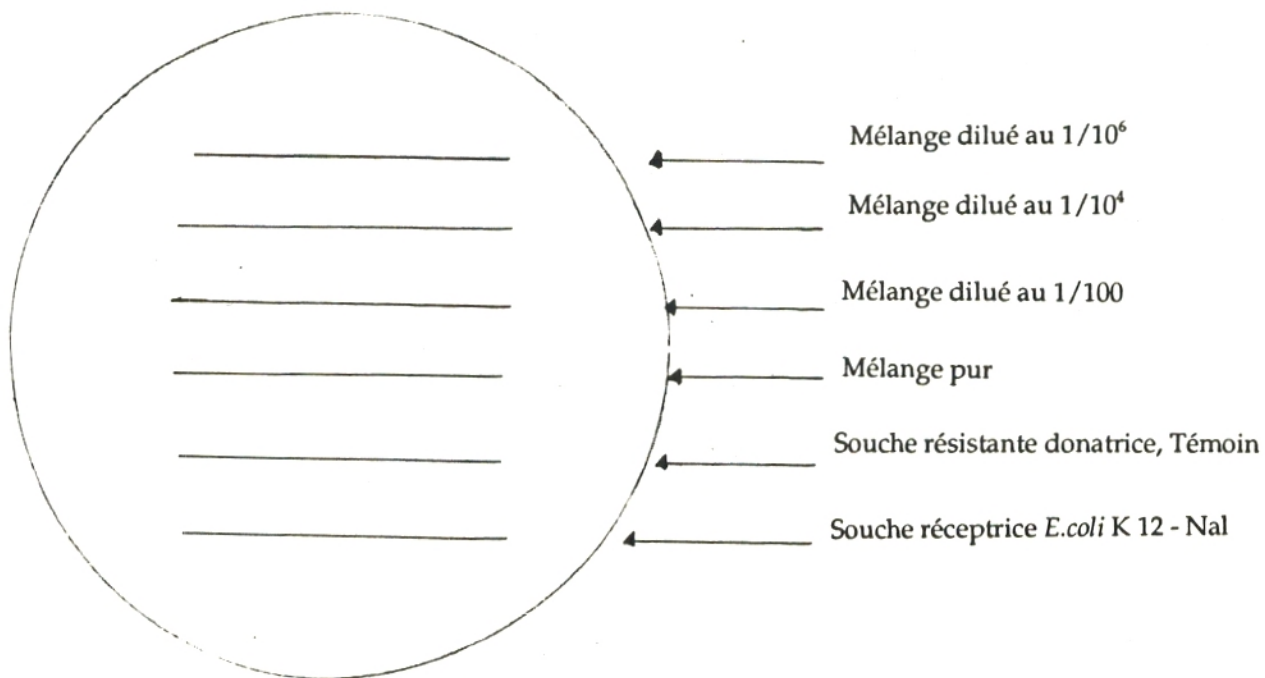


Fig N°3

Ensemencement sur boîte de sélection



### **b 3 Caractérisation des plasmides par électrophorèse**

Afin de confirmer l'existence de plasmides chez les souches de colibacilles isolées, et de les caractériser, nous avons étudié 11 souches par électrophorèse en gel d'agarose. Le travail a été effectué au centre de recherche INRA de Tours.

#### **\* Principe**

Les bactéries sont lysées, leur ADN est extrait partiellement, purifié et analysé par électrophorèse en gel d'agarose, cette méthode a été retenue parce qu'elle est simple, directe et peu coûteuse. Elle permet la détection et la caractérisation préliminaire principalement basée sur la taille de l'ADN plasmidique. Cette méthode présente des inconvénients notamment pour les grands plasmides qui sont fragiles et qui peuvent donner naissance à 3 bandes dans le gel, correspondant respectivement à la forme native circulaire superhélicoïdale (c-c-c), à la forme circulaire relâché (O.C) par coupure d'un seul brin, à la forme linéaire (L) par coupure des 2 brins de l'ADN. Ces trois formes d'un même plasmide ne possèdent pas les mêmes propriétés de migration dans le gel. Pratiquement on essaie de palier à cet inconvénient en effectuant cette analyse comparativement sur la souche sauvage et sur le(s) trans-conjugant (s).

#### **\* Méthode**

Les bactéries sont cultivées 24<sup>h</sup> à 37°C dans 10 ml de milieu complet additionné de 0,4% de glucose puis récoltées par centrifugation, lavées en tampon T.E (tris HCl 50mM; EDTA 50mM; pH 8,5) et resuspendues dans 400 µl de sucrose 15p. 100 en TE.

Le traitement au lysozyme (0,1ml à 5mg/ml) pendant 15' à 4°C permet l'obtention de sphéroplastes. Ces sphéroplastes sont lysés par addition de 0,3ml de Triton x-100 à 0,1% en T.E puis le lysat est centrifugé 10 mn à 15000 tours/mn (t/m) de façon à éliminer les débris bactériens et la majorité de l'ADN chromosomique ce qui donne un lysat clarifié. Deux ml de diéthoxydiformate sont ajoutés au surnageant de façon à inactiver les protéines, après 15' à 70°C, puis 15' dans la glace, le précipité protéique est centrifugé à 15000 t/mn et le surnageant ainsi déprotéinisé est récupéré. L'ADN est précipité par addition d'éthanol à la température du laboratoire puis récupéré par centrifugation de 10 mn à 15000 t/mn. Le culot d'ADN est alors dissous de nouveau dans 50µl de tampon (tris-HCl 10mM; EDTA 1mM, pH = 7,5) 20 µl de la solution d'ADN

sont ensuite analysés directement par électrophorèse sur gel contenant 0,8% d'agarose. La migration s'effectue à 100 volts pendant 4<sup>h</sup>. Le gel a été coloré par immersion dans une solution de bromure d'ethidium (0,4 µg/ml) pendant 15'

### **3 Résultats de l'antibiorésistance.**

#### **a - Antibiorésistance globale**

Toutes les souches isolées ont été testées vis à vis des 8 antibactériens retenus. Les résultats figurent dans les tableaux N° 19, 20 et 21. Leur examen fait ressortir une nette prédominance des souches résistantes à au moins un antibiotique, en effet les souches sensibles sont au nombre de 33 soit 4% seulement, d'ores et déjà ce chiffre paraît impressionnant.

Pour mieux cerner cet aspect, examinons le comportement de ces souches, genre par genre vis à vis de chaque antibiotique.

#### **b - Antibiotypes et comportement vis - à - vis de chaque antibiotique**

##### **b 1 Les colibacilles**

\* Résistance globale: Chez les colibacilles, on remarque qu'il n'y a pas seulement une diversité en chimiotypes, mais aussi en antibiotypes. Nous avons dénombrés près de 27 tel qu'on peut le voir sur le tableau N° 22. On remarque d'emblée une nette dominance des souches résistantes 445 soit 82,7% par rapport aux souches sensibles 29 soit 5,4%. Les antibiotypes AT, AT<sub>Su</sub>, AT<sub>SSu</sub>, ASSuCKN, AT<sub>SSu</sub>CKN représentent à eux seuls près de 52% de la résistance. Comme on peut le voir sur le tableau N° 20, les antibiotypes T<sub>T</sub>, A<sub>T</sub>, T<sub>Su</sub>, AT<sub>SSu</sub>, ASSuCKN et AT<sub>SSu</sub>CKN, ne concernent que les colibacilles.

##### \* Résistance à chaque antibiotique

Sur le tableau N° 19, on peut voir 76% des souches sont résistantes à l'ampicilline, antibiotique majeur en pédiatrie, une telle observation a été déjà faite dans une étude de BOURRILLON et coll en 1978 ainsi que celle de BORDERON et coll en 1976 et 1983. 9,3% seulement sont résistantes intermédiaires. 38% résistent aux sulfamides alors que près de 60% résistent aux aminosides, 32% pour la streptomycine, 14% pour la kanamycine et la néomycine. Toutes les souches d'*E.coli* sont sensibles à la gentamicine.

Les résistances à la tétracycline et au chloramphénicol sont présentes avec des pourcentages respectifs de 52% et 16% bien que ces drogues ne soient jamais utilisées dans ces services. Ceci laisse supposer un apport extérieur au service de souches ayant des structures génétique comportant, d'autres gènes de résistance en plus des marqueurs d'ampicilline et/ou des sulfamides. Les quelques souches qui résistaient seulement à la tétracycline peuvent être dotées d'autres caractères non recherchés permettant leur sélection.

Tableau N° 19

Comportemêt des coliformes vis-a-vis  
des antibiotiques testés.

Antibiotiques	$\mu$ Organismes CMI en ( $\mu$ g)	Colibacilles Nbre N/538	<i>Kb.pneumoniae</i> ● N/206	Autres Coli- formes N/50	Coliformes totaux N/794
Ampicilline	A > 16	410 (76,2%)	168 (81,5%)	43 (86%)	621 (78,2%)
	A <sub>1</sub> 4≤CMI>16	50 (9%)	30 (14,5%)	7 (14%)	91 (11,4%)
Tétracycline	T > 16	280 (52,0%)	90 (43,7%)	11 (22%)	381 (48%)
	T <sub>1</sub> 4≤CMI>16	128 (24%)	84 (41%)	24 (48%)	236 (28%)
Sulfamides	Su > 350	204 (38%)	101 (49,0%)	10 (20%)	315 (40%)
	Su <sub>1</sub> 100≤CMI>350	3 (0,55%)	3 (0,14%)	1 (2%)	7 (0,9%)
Streptomycine	S > 32	170 (31,6%)	25 (12,13%)	2 (4%)	197 (25%)
	S <sub>1</sub> 8≤CMI>32	9 (1,7%)	62 (30,1%)	6 (12%)	77 (9,7%)
Chloromphéni- col	C > 32	89 (16%)	45 (22%)	10 (20%)	141 (18%)
	C <sub>1</sub> 8≤CMI>32	0 (0%)	5 (2,4%)	2 (4%)	7 (0,9%)
Néomycine	N > 16	77 (14,3%)	1 (0,48%)	1 (2%)	79 (10%)
	N <sub>1</sub> 8≤CMI>16	2 (0,37%)	12 (6%)	2 (4%)	16 (2,0%)
Kanamycine	K > 32	76 (14,1%)	34 (16,5%)	0 (0%)	110 (14%)
	K <sub>1</sub> 8≤CMI>32	2 (0,37%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (0,25%)
Gentamycine	Gm > 16	0 /	23 (11,2%)	3 (6%)	16 (2,0%)
	Gm <sub>1</sub> 4≤CMI>16	0 /	0 /	0 /	0 /

**Tableau N° 22**

**Répartition des coliformes antibiorésistants chez tous les  
nouveau nés**

Résistants	Colibacilles N/538	%
1 ATB	102	19
2 ATB	138	25,6
3 ATB	72	13,4
4 ATB	57	10,6
5 ATB	0	0
6 ATB	51	9,4
7 ATB	25	4,6
Sensibles	29	5,4

Résistants	<i>Kb.pneumoniae</i> N/206	%
1 ATB	68	33
2 ATB	43	21
3 ATB	34	16,5
4 ATB	25	12,1
5 ATB	8	4
6 ATB	16	8
7 ATB	0	0
Sensibles	1	0,5

Résistants	Autres coliformes N/50	%
1 ATB	27	54,0
2 ATB	22	44
3 ATB	5	10
4 ATB	5	10
5 ATB	2	4
6 ATB	0	0
7 ATB	0	0
Sensibles	3	6



## **c - Evolution de l'antibiotype dans le temps**

Le tableau N° 25 nous indique la répartition et l'évolution des antibiotypes chez les différents nouveau-nés.

### **c 1 Nouveau-nés d'une semaine à l'hôpital et à domicile**

Pour les nouveau-nés d'une semaine à l'hôpital on constate à première vue une hétérogénéité des antibiotypes, leur nombre peut varier de 1 à 6, selon le nouveau-né considéré, en moyenne on en dénombre 3. Cette hétérogénéité est généralement conservée dans le temps, tel qu'on peut le voir chez l'enfant N° XII. Ces souches sont le plus souvent résistantes à plusieurs antibiotiques jusqu'à 7 dès la 24<sup>ème</sup> heure de vie, comme chez les enfants N° IV et XII. Cette antibiorésistance est très instable au cours de la semaine comme on le constate chez le nouveau né N° XV qui présente à 12<sup>h</sup>, 4 antibiotypes différents et une résistance à 3 antibiotiques, puis 2 antibiotypes à la 24<sup>h</sup> avec une résistance à 2 antibiotiques, au 4<sup>ème</sup> jour et au 6<sup>ème</sup> jour il se retrouve avec 2 antibiotypes et une résistance vis-a-vis de 4 antibiotiques. Dans la majorité des cas l'antibiorésistance doservée tend à devenir plus importante au cours du temps, comme chez l'enfant N° I et XVII. Existe t-il un facteur de sélection pour cela ? ou est ce Le seul fait de transfert in vivo en milieu favorable?

Pour les nouveau-nés à domicile, on remarque généralement qu'il n'existe pas de grande modification au niveau de leurs antibiotypes comme chez les enfants N° XXI et XIX

Chez tous les enfants nous remarquons une dominance de résistance à 2 antibiotiques seulement, sauf pour l'enfant N° XX qui présente une antibiorésistance à 4 antibiotiques (ATSSu), par rapport aux nouveau-nés de l'hôpital, représentant des antibiotypes à 7 marqueurs, ces derniers comportent uniquement les 4 principaux antibiotiques ampicilline, tétracycline, sulfamides et streptomycine.

A ce sujet de nombreux auteurs parmi lesquel TESSIER en 1971, MATHIEU en 1976 et 1978, BORDERON et coll en 1974 et 1980 ont signalés déjà la présence d'entérobactéries résistantes à un ou plusieurs antibiotiques, surtout les colibacilles et les *Klebsiella*, dans les selles d'enfants malades ou sains.

## c 2 Nouveau-nés à 37 jours

Pour les enfants agés de 1 mois, les antibiotypes rencontrés à la 1<sup>ère</sup> semaine surtout à l'hôpital sont généralement retrouvés avec des résistances à 7 antibiotiques tel les nouveau-nés N° XXV et IX. Pour la majorité des enfants à cet âge l'antibiotype de départ est maintenu durant toute la semaine, ce qui peut témoigner d'une adaptation de cet antibiotype.

A travers cette évolution nous constatons qu'il n'ya pas de relation entre la dominance de l'antibiotype et celle du chimiotype bien que pour certains l'antibiotype et le chimiotype de départ soient maintenus. Ceci est en rapport avec la dominance biochimique tel chez les enfant N° III, IX et X.

### d - Discussion

L'implantation rapide et importante des enterobactéries et surtout des coliformes est un phénomène bien connu, mais l'acquisition dès les premiers jours de la vie par les nouveau-nés de coliformes résistants et par contre un fait à retenir. Le problème qui se pose en milieu hospitalier, c'est l'environnement du nouveau-né avec des souches déjà résistantes à un ou plusieurs antibiotiques. Ceci peut constituer un danger en cas d'infections à germes sensibles ou non. Même sensibles ces derniers peuvent acquérir des caractères infectieux pour devenir résistants aux antibiotiques majeurs utilisés en pédiatrie tels que l'ampicilline, la gentamicine, le bactrim.

Le deuxième problème qu'il ya lieu de poser, c'est la source de dissémination de plasmides de résistance dans l'environnement extra-hospitalier.

Tel que le signalent TESSIER et DAGUET en 1971, l'antibiorésistance n'est que le reflet du milieu qui a permis son ensemencement, dans ce cas le service de maternité de l'hôpital. Contrairement aux états pathologiques décrit chez l'animal par CHIKHI en 1978, et chez l'humain par BORDERON et coll en 1974, il n'ya sélection d'un seul antibiotype que chez quelques nouveau-né. Il peut s'agir de la souche dominante qui a occupé le terrain au départ et qui persiste. Il ne semble pas exister d'autres facteurs susceptibles de la sélectionner puisqu'il n'y avait pas de traitement chez l'enfant.

L'hétérogénéité des antibiotypes à spectre réduit a tendance à se maintenir au cours du temps à domicile même sans pression de sélection d'antibiotiques et où il ya un renouvellement

Tableau N° 26

Résultats des transferts de l'antibiorésistance

Antibiotiques	Ampicilline			Tétracycline			Streptomycine			Chloramphénicol		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
Conjugués Souches Donatrices												
III <sub>11</sub> c	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IV <sub>20</sub> d	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0
	27à10 <sup>-4</sup>	4à10 <sup>-4</sup>	8à10 <sup>-4</sup>	6à10 <sup>-4</sup>	12à10 <sup>-4</sup>	6à10 <sup>-4</sup>						
V <sub>21</sub> c	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V <sub>22</sub> b	0	0	0	0	0	0	+	+	+	0	0	0

••

VI <sub>30a</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IX <sub>36i</sub>	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+
XIII <sub>65e</sub>	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0
XIV <sub>62g</sub>	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0
XV <sub>65j</sub>	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0
	$14 \times 10^{-4}$	$8 \times 10^{-4}$	$14 \times 10^{-4}$			$38 \times 10^{-4}$							
XVIII <sub>76c</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XVIII <sub>77a</sub>	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XVIII <sub>79b</sub>	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XXV <sub>113j</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+

+ : obtention de trans-conjugants+

Tableau N°27

Détermination des caractères transférés  
chez 13 souches de colibacilles

Identification	Souches donatrices(ref)	Antibiotype de la donatrice	Caractères transférés
5144142	III <sub>11</sub> c	ATSu	A
5044552	IV <sub>20</sub> d	ATSSuCK	A.T
7044552	V <sub>21</sub> c	ATSSu	A
5044572	V <sub>22</sub> b	ATSSu	S
5044572	IX <sub>36</sub> i	ASSuCKN	S.C
5144552	XIII <sub>55</sub> e	TSSu	T.S
5044552	XIV <sub>62</sub> g	ATSSu	A.T
5144572	XVIII <sub>77</sub> a	ATSu	A
5044552	XV <sub>65</sub> j	AT	A.T
5144572	XVIII <sub>79</sub> b	ATSu	A
5144572	XXV <sub>113</sub> j	ATSSuCKN	C

Les souches VI<sub>30</sub>a et XVIII<sub>76</sub>c n'ont transféré aucun caractère de résistance.

## **5 Résultats de la caractérisation de plasmide**

Le contenu de 11 souches de colibacilles ayant transféré 1 ou 2 caractères de résistance a été étudiée par la technique d'électrophorèse. Les résultats sont visualisés sur la photo suivante, où l'on peut considérer que chaque bande correspond à un plasmide si l'on exclut la zone blanchâtre large correspondant à l'ADN chromosomique, large trainée située à la même ligne pour toutes les souches.

Telqu'on peut voir sur le tableau N°28, on peut noter pour la totalité des souches l'existence d'au moins 2 plasmides; ce nombre peut aller jusqu'à 8 comme la IV<sub>20d</sub> et la VI<sub>30a</sub>. De même la souche XIII<sub>55e</sub> semble posséder 2 plasmides dont le poids moléculaire se situerait aux environs de 100 Kb et 4 à 5 plasmides non conjugatifs.

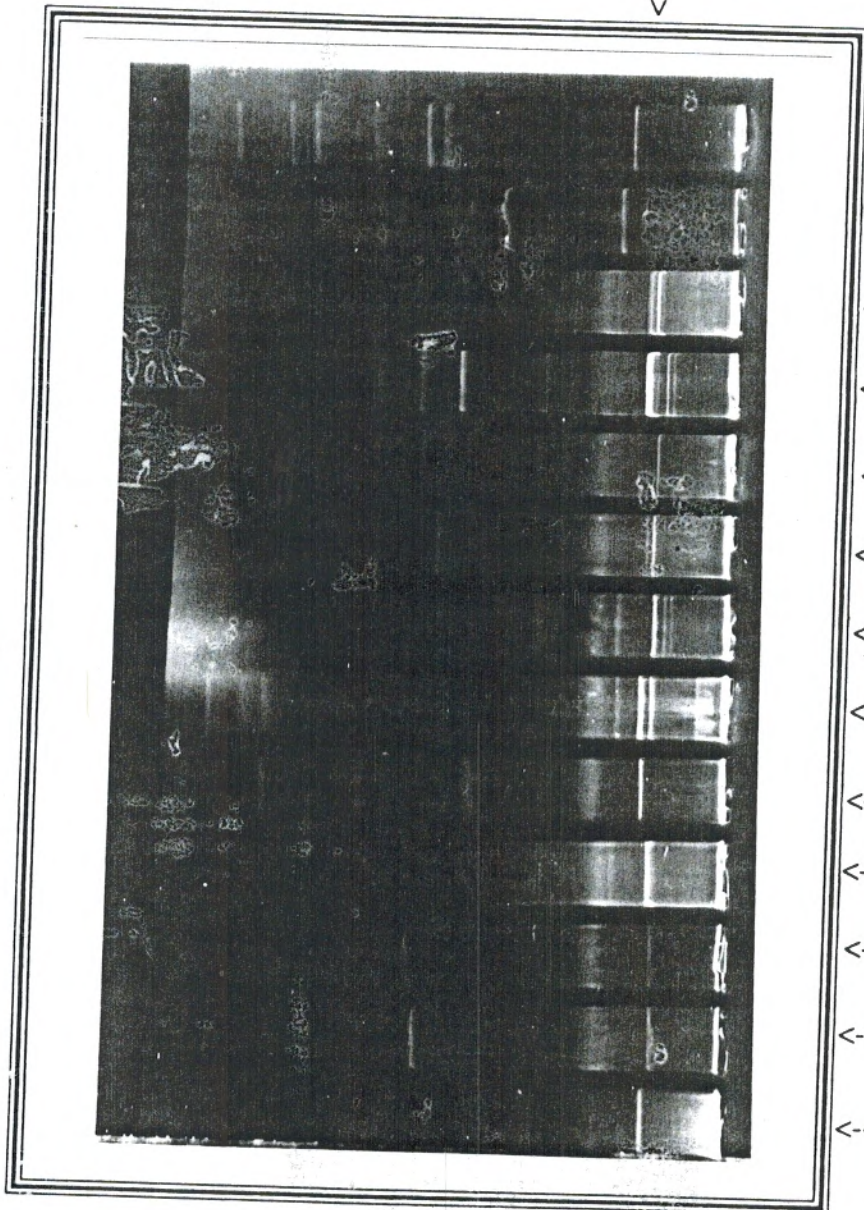
10 souches possèdent en commun au moins un plasmide de grande taille d'environ de 100 Kb, pouvant correspondre au plasmide de virulence de la souche EPEC entéropathogène ayant servi comme témoin, bien qu'aucun symptôme pathologique n'ait été constaté chez les enfants étudiés. Les trois souches IV<sub>20d</sub>, XIV<sub>62g</sub> et la XV<sub>65j</sub> ayant transférés les caractères AT semblent également posséder en commun un ou deux plasmides de 100Kb.

2 souches possèdent un plasmide dont la taille est comprise entre 55 et 100Kb donc ayant peut être la capacité de le transférer par conjugaison pourvu qu'il ait les déterminants nécessaires. Parmi ces souches la XIV<sub>62g</sub> avait transféré la résistance à l'ampicilline et à la tétracycline, l'autre la XIII<sub>55e</sub> n'avait apparemment transmis aucun caractère à la souche réceptrice.

Les souches XVIII<sub>79b</sub> et XVIII<sub>77a</sub> présentent 2 bandes qui leur sont communes et qui n'existent pas chez les souches V<sub>21c</sub> et III<sub>11c</sub>, pourtant toutes les 4 avaient transféré la résistance à l'ampicilline.

Parmi ces souches il faut tout de suite remarquer les souches VI<sub>30a</sub> et XVIII<sub>76c</sub> qui ont un plasmide de 100Kb et qui n'ont transféré aucun caractère de résistance ceci est peut être dû en fait que ces caractères soient portés par les plasmides de petite taille qui sont au nombre de 6 au moins chez la VI<sub>30a</sub> et de 2 chez XVIII<sub>76c</sub>. On peut également avancer une trop faible fréquence de transfert du grand plasmide.

55 Kb



- <----- v 517
- <----- 19<sub>1</sub>c
- <----- 32<sub>3</sub>c
- <----- 30<sub>2</sub>e
- <----- 38<sub>1</sub>c
- <----- 17<sub>4</sub>C
- <----- 33<sub>3</sub>j
- <----- 18<sub>3</sub>d
- <----- 20<sub>5</sub>a
- <----- 24<sub>2</sub>i
- <----- 38<sub>4</sub>b
- <----- 38<sub>2</sub>a
- <----- R 112



100.5 Kb  
chromosome

Tableau N° 28

## Caractérisation des plasmides

Souche n° Ref	Code	Nbre de plas- mides Proba- bles	Poids moléculaire	Caractères transfé- rés	Antibiotypes
19 <sub>1</sub> c	V <sub>21</sub> c	0 1 3	- 100 Kb - 55 Kb - < 55 Kb	A	ATSSu
32 <sub>3</sub> g	XIV <sub>62</sub> g	1ou2 2	- 100 Kb - 55 Kb - < 55 Kb	A.T	ATSSu
30 <sub>2</sub> e	XIII <sub>55</sub> e	2 4	- 100 Kb - 55 Kb - < 55 Kb	T.S	TSSu
38 <sub>1</sub> c	XVIII <sub>76</sub> c	1 1	- 100 Kb - 55 Kb - < 55 Kb	O	T
17 <sub>4</sub> c	III <sub>11</sub> c	1ou2 2	- 100 Kb - 55 Kb - < 55 Kb	A	ATSu
33 <sub>j</sub>	XV <sub>63</sub> j	2 1 1	- 100 Kb - 55 Kb - < 55 Kb	A.T	AT
18 <sub>3</sub> D	IV <sub>20</sub> d	2 1 5	- 100 Kb - 55 Kb - < 55 Kb	A.T	ATSSuCK
20 <sub>3</sub> a	VI <sub>30</sub> a	1 5à6	- 100 Kb - 55 Kb - < 55 Kb	O	AT
24 <sub>2</sub> l	IX <sub>36</sub> l	1	- 100 Kb - 55 Kb - < 55 Kb	S.C	ASSuCKN
38 <sub>4</sub> b	XVIII <sub>79</sub> b	1 2	- 100 Kb - 55 Kb - < 55 Kb	A	AT <sub>5</sub> Su
38 <sub>2</sub> a	XVIII <sub>77</sub> a	1 2	- 100 Kb - 55 Kb - < 55 Kb	A	ATSu



## 6 Discussion

Conjugaison et électrophorèse nous ont prouvé que les souches étudiées étaient porteuses de plasmides codant pour la résistance aux antibiotiques et peut être pour d'autres facteurs. Ces plasmides peuvent être divisés en 2 catégories. Les grands plasmides dont la taille est supérieure à 55Kb probablement conjugatif et les autres les plus petits non transférables isolément. Il faut rappeler que ces derniers peuvent passer chez une souche réceptrice par cotransfert. Il est évident que certains caractères de résistance peuvent être codés par des transposons localisés sur le chromosome impossible de mettre en évidence dans ces conditions.

Ces observations peuvent donc expliquer en partie le non transfert de tous les caractères de résistance constatés chez les souches. Une faible fréquence de ces transferts peut être dûe au fait d'une répression des plasmides avec une incompatibilité des souches utilisées.

Pour plus d'informations il serait souhaitable de procéder à des expériences de curage des souches, à une étude de stabilité des plasmides chez les trans-conjuguants, mais aussi à des études de profils de restriction et d'hybridation pour une meilleure caractérisation des plasmides. Enfin il serait utile d'établir leur groupes d'incompatibilité pour que cette étude ait une signification épidémiologique. Ces résultats nous permettent également de comprendre la variété des antibiotypes observés et les caractères présents chez les souches, et leur sélection au cours du temps puisqu'il s'agit de caractères transposables, malgré l'absence de pression de sélection.

Le caractère de résistance à l'ampicilline est présent chez 96% des souches, la présence de résistance à la tétracycline, à la streptomycine et au chloramphénicol, leur persistance à un mois s'explique par la présence de caractères très facilement disseminant, d'autant plus que le milieu intestinal représente un milieu idéal. Pour les autres caractères notamment pour la résistance aux sulfamides il est difficile de se prononcer.

Pour l'antibiorésistance et les plasmides observés, chez *Klebsiella*, le problème reste à étudier, notamment la possibilité de transfert direct ou indirect avec *E.coli* et éventuellement la possession de plasmides communs comme l'a déjà signalé FACINELLI en 1984.

De ce fait il faut insister sur le danger que représente ce réservoir à plasmides à large spectre, son extension reste un phénomène des plus préoccupants tout particulièrement en milieu hospitalier. D'autant plus que BRISSON-NOEL et coll en 1989 signalent 2 faits nouveaux: d'une part le transfert de gènes de résistance entre bactéries phylogénétiquement très éloignées et d'autre part l'apparition de mutants vis à vis de gène donné conférant un spectre de résistance large ainsi, ces plasmides de résistance, tel que le rapporte MICHEL-BRIANT en 1977 vont permettre à la bactérie

de survivre dans différents milieux, en particulier le milieu hospitalier, qui devient de plus en plus un endroit de sélection de plasmide comme le souligne AVRIL et GERBAUD en 1976 TANCREDE en 1988 ainsi que BENSALLAH et coll en 1984 à propos de résistance aux aminosides dans l'hôpital Charles-Nicolle (Tunis), de même CHASLUS-DANCLA en 1989 qui démontre que la résistance des entérobactéries à un antibiotique est due à des plasmides conjugatifs.

Pour éviter de contribuer à l'amplification de ce phénomène inévitable, vu la complexité des agents sélecteurs dans la nature (antibiotiques, métaux lourds...) On ne peut que conseiller une hygiène rigoureuse dans les services hospitaliers et autres afin d'éviter la sélection de souches, il faut des antibiothérapies dirigées par un antibiogramme et surtout éviter l'usage inconsidéré et anarchique d'antibiotiques aussi bien dans le milieu qui nous concerne que le milieu vétérinaire.

ETIENNE MOISTON - D  
CONCLUSION GENERALE

- BORDERON J.C., BORDERON E., CHABBERT Y.A. (1974). Etude quantitative de la colonisation par entérobactéries multirésistantes des enfants prématurés. *Ann. Microbiol. Inst Pasteur* . 125 B, 45-57.
- BORDERON J.C., BORDERON E., LAUGIER J., BOULARD P. (1976). Etude de la colonisation par entérobactéries résistant aux antibiotiques chez des nouveau-nés prématurés: Comparaison des enfants ne recevant pas d'antibiotiques et des enfants traités par ampicilline. *Ann. Pediat* 23, N°1, 53-61.
- BORDERON J.C., LAUGIER J., GOLD F. (1978). Essai d'établissement d'une souche de *Escherichia-coli* sensible aux antibiotiques dans l'intestin de nouveau-né. *Ann. Microbiol. Inst Pasteur*. 129B, 581-596.
- BORDERON J.C., TABARLY J.L., LAUGIER J. (1978). La colonisation par entérobactéries pendant la première semaine de la vie - *Arch- Franç.Pediat*. 35, 406-415.
- BORDERON J.C., BERNARD J.C., VERGNAUD R., GOLD F., SOUTOUL J.H., LAUGIER J. (1980). Effet de l'antibiothérapie de la mère sur la colonisation de nouveau-né par entérobactéries. *Arch. Franç de Pédiatrie* 37, 371 - 376.
- BORDERON J.C., GUILLOT J.F., (1981) Conséquences de l'antibiothérapie sur l'écologie du tube digestif du nouveau-né. *Journées Parisiennes de Pédiatrie*. 10-16.
- BORDERON J.C., GOLD F., LAUGIER J. (1981). Enterobacteria of the neonate. Normal colonization and antibiotic - Induced selection. *Bio Neonate*.39.1-7.
- BORDERON J.C., GOLD F., LAUGIER J.(1983). Infections materno-foetales de nouveau-né. Plaidoyer pour l'association ampicilline - Kanamycine. *Arch-franç- Pediat*.40.755-756.
- BOURRILLON A., LAMBERT-ZECHOVSKY N., BEAUFILS F., LEJEUNE C., BINGEN E., BLUM C., MATHIEU H. (1978). Antibiothérapie et pululation intestinale et risque infectieux chez l'enfant . *Arch - franç - Pediatre (Suppl)*. 35, 23 - 37.
- BOUSSEBOUA H. (1989) Etude de *Clostridium butirucum* dans l'entérite ulcero nécrosante de la caille (*coturnix. coturnix. Japonica*). gnotoxénique. Thèse de Doctorat Es - Science de pharmacie. UER de l'hygiène et de protection de l'homme et de son environnement. Université Paris sud.
- BRISSON-NOEL A., TRIEUT - CUOT P., SANGAKOFF W., GOURVALIN P. (1989). Aspects actuels de la résistance bactérienne aux antibiotiques. *Ann biol - clin*. 47, 98 - 101.
- BUCHANAN R.E., GIBSONS N.E.(1986). *BERGEY'S manual of determinative bactériologie*, 9<sup>ème</sup> edd. Watterley Press.

Enfant	Date	Prélevement	Lieu du Prélèvement	Diarrhée	Allaitement	ATB	Nbre de Souches par prélèvement	Référence
N° XIX Sexe F né le 12/7/88 Poids 3kg200 à 23 <sup>h</sup> 30	19/7/88	P <sub>80</sub> (1gr)Méconium	Hôpital	non	sein	non	Stérile	I <sub>80</sub> Stérile
	20/7/88	P <sub>81</sub> (Matin) (1gr)	Maison	-	-	-	10	I <sub>81a</sub> I <sub>81j</sub>
	21/7/88	P <sub>82</sub> (Soir) (1gr)	frigo	-	-	-	10	I <sub>82a</sub> I <sub>82j</sub>
	22/7/88	rien fait	-	-	-	-	10	I <sub>83a</sub> I <sub>83j</sub>
		P <sub>84</sub> (1gr)	frigo	-	-	-	10	I <sub>84a</sub> I <sub>84j</sub>
N° XX Sexe M Poids 3kg800 né le 9/9/88 0 <sup>h</sup> 30'	10/9/88	P <sub>85</sub> Méconium	Hôpital	-	Sein	non	10	I <sub>85a</sub> I <sub>85j</sub>
	11/9/88	rien fait	Maison	-	-	-	-	-
	12/9/88	rien fait	Maison	Constipa	sein	non	-	-
	13/9/88	rien fait	-	-	-	-	-	-
	14/9/88	P <sub>86</sub> (1gr)	-	grumots	-	-	10	I <sub>86a</sub> I <sub>86j</sub>
	15/9/88	P <sub>87</sub> (1gr)	-	-	-	-	10	I <sub>87a</sub> I <sub>87j</sub>
	16/9/88	P <sub>88</sub> (1gr)	-	normal	-	-	10	I <sub>88a</sub> I <sub>88j</sub>
	17/9/88	rien fait	-	-	-	-	-	-
18/9/88	P <sub>89</sub> (1gr)	-	-	-	-	10	I <sub>89a</sub> I <sub>89j</sub>	
N° XXI Sexe F née le 10/9/88 Poids 3kg500 16 <sup>h</sup>	11/9/88	P <sub>90</sub> (1gr)(Méconium)	Hôpital	non	sein	non	10	I <sub>90a</sub> I <sub>90j</sub>
	12/9/88	P <sub>91</sub> (1gr)Frigo soir	Maison	-	-	-	10	I <sub>91a</sub> I <sub>91j</sub>
	13/9/88	P <sub>92</sub> (1gr)frigo	-	-	-	-	10	I <sub>92a</sub> I <sub>92j</sub>
	14/9/88	P <sub>93</sub> (1gr)frigo	-	-	-	-	10	I <sub>93a</sub> I <sub>93j</sub>
	15/9/88	rien fait	-	-	-	-	-	-
16/9/88	P <sub>94</sub> (1gr)frigo	-	-	-	-	10	I <sub>94a</sub> I <sub>94j</sub>	
N° XXII Sexe F Poids 3kg200 née le 16/9/88 6 <sup>h</sup>	16/9/88	P <sub>95</sub> méconium	Hôpital	non	sein	non	Stérile	I <sub>95</sub> Stérile
	17/9/88	P <sub>96</sub> Méconium	Maison	-	-	-	Stérile	I <sub>96</sub> Stérile
	18/9/88	rien fait	-	-	-	-	-	-
	19/9/88	rien fait	-	-	-	-	-	-
	20/9/88	P <sub>97</sub> (1gr)	-	-	-	-	10	I <sub>97a</sub> I <sub>97j</sub>
	21/9/88	rien fait	-	-	-	-	-	-
	22/9/88	rien fait	-	-	-	-	-	-
	23/9/88	rien fait	-	-	-	-	-	-
24/9/88	P <sub>98</sub> (1gr)	-	-	-	-	10	I <sub>98a</sub> I <sub>98j</sub>	

Enfant	Date	Prélevement	Lieu du Prélèvement	Diarrhée	Allaitement	ATB	Nbre de Souches par prélèvement	Référence
N° XXIII Sexe M (1mois)	24/9/88	P <sub>99</sub> (1gr)Frigo	Maison	-	-	-	10	I <sub>99a</sub> I <sub>99j</sub>
	25/9/88	P <sub>100</sub> (1gr)Frigo	-	-	-	-	10	I <sub>100a</sub> I <sub>100j</sub>
	26/9/88	très diluée	-	-	-	-		
	27/9/88	très diluée	-	non	-	-		
	28/9/88	P <sub>101</sub> (Matin)	-	-	-	-	10	I <sub>101a</sub> I <sub>101j</sub>
	29/9/88	P <sub>102</sub> (Soir) P <sub>103</sub> (1gr)	- -	- -	- -	- -	10 10	I <sub>102a</sub> I <sub>102j</sub> I <sub>103a</sub> I <sub>103j</sub>
N° XXIV Sexe M né le 5/10/88 Poids 3kg650 à 10 <sup>h</sup>	6/10/88	P <sub>104</sub> (1gr)Méconium	Hôpital	non	sein	non	10	I <sub>104a</sub> I <sub>104j</sub>
	7/10/88	P <sub>105</sub> (1gr)Matin	Maison	-	-	-	10	I <sub>105a</sub> I <sub>105j</sub>
	7/10/88	P <sub>106</sub> (-1gr)soir	"	-	-	-	3	I <sub>106a</sub> I <sub>106c</sub>
	8/10/88	rien fait	"	-	-	-		
	9/10/88	P <sub>107</sub> (-1gr)	"	-	-	-	4	I <sub>107a</sub> I <sub>107d</sub>
	10/10/88 11/10/88	P <sub>108</sub> (1gr) P <sub>109</sub> (1gr)	" "	- -	- -	- -	10 10	I <sub>108a</sub> I <sub>108j</sub> I <sub>109a</sub> I <sub>109j</sub>
N° XXV Sexe M né le 30/10/88 Poids 3kg600 à 23 <sup>h</sup>	31/10/88	P <sub>110</sub> (-1gr)	Maison	non	sein	non	Stérile	I <sub>110</sub> Stérile
	1/11/88	P <sub>111</sub> (1gr)	-	-	-	-		
	2/11/88	P <sub>112</sub> (-1gr)	-	-	-	-		
	du 2/11/88 au 20/11/88	Selles très liquides Pas de prélèvements						
	21/11/88	P <sub>113</sub> (1gr)	-	-	-	-	10	I <sub>113a</sub> I <sub>113j</sub>
	du 22 au 29 30/11/88 1/12/88	rien fait P <sub>114</sub> (1gr) P <sub>115</sub> (-1gr)	- - -	- - -	- - -	- - -	10 5	I <sub>114a</sub> I <sub>114j</sub> I <sub>115a</sub> I <sub>115e</sub>

## ERRATUM

TERKI HASSAI- Etude des coliformes dans la microflore fécale du nouveau-né  
NE.H: humain au niveau du C.H.U de Tlemcen.

Page 34: en bas du tableau. TDA (-), Glu, Man (+).

Page 40: (3<sup>ème</sup> ligne) Par tri = tout les trois.

Page 67: PCA d'Oran: Pharmacie Centrale d'Algérie.

Page 72: INRA: Institut National de la Recherche Agronomique.

Page 91: V 517 et R 112 -----> sont des souches de référence.

Cuve 1: Contient la souche de référence V 517 (Macrina) et possède un plasmide de 55 Kb.

Cuve 13 Contient la souche 13 avec un plasmide de 100.5 Kb.

Page 101: Bibliographie

Après l'auteur Michel Briand

Mokrani F., Terki Hassaine.H. (1990). Contribution à l'étude des coliformes chez des nourrissons nés par voie basse et par césarienne. DES. Microbiologie. INES Biologie. Tlemcen.