



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES – FES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE



PROJET DE FIN D'ETUDES

Licence en Sciences & Techniques :
Sciences Biologiques appliquées et Santé

Profil de sensibilité de la bactérie Escherichia coli dans les infections urinaires

Présenté par : **Salma Hannaoui**

Encadré par :

- ✓ Dr. Ahmed Filali (Laboratoire Filali)
- ✓ Pr. Wifak Bahafid (FST, Fès)

Soutenu le : 16/06/2015

Devant le jury composé de :

- ✓ Pr. Wifak Bahafid
- ✓ Pr. Karima Mikou
- ✓ Dr. Ahmed Filali

Année Universitaire : 2014-2015

REMERCIEMENTS

J'aimerais en premier lieu remercier mon Dieu qui m'a donné la volonté et le courage pour la réalisation de ce travail.

*Mes vifs remerciements vont à **Dr Ahmed Filali** pour m'avoir accepté au sein de son laboratoire d'analyses médicales et m'avoir assuré toutes les conditions afin, que je puisse effectuer ce stage dans de meilleures conditions.*

Je le remercie particulièrement pour son encadrement, sa disponibilité et l'intérêt qu'il a porté à mon travail.

*J'exprime ma sincère gratitude et remerciements à mon encadreuse académique **Pr. Wifak Bahafid** pour ses conseils précieux, son aide dans le cheminement de cette étude et pour la peine qu'elle s'est donnée tout au long de ce travail afin de faire de ce document ce qu'il représente.*

Je la remercie de l'encadrement dont j'ai bénéficié, pour l'attention, la disponibilité dont elle a fait preuve, ainsi que le suivi pendant ma période de stage

*Mes sincères remerciements au **Pr. Karima Mikou** pour avoir accepté de faire partie de ce jury, j'ai pour vous l'estime et le respect qu'imposent votre compétence, votre sérieux et votre richesse d'enseignement.*

*J'adresse aussi mes remerciements à mes parents **Mme Aicha Nachit** et **Mr Hannaoui Hassane** pour leur soutien matériel, financier, moral et psychologique, leur patience, leur sacrifice, mais particulièrement pour l'amour qu'ils me portent. Que dieu vous garde et vous bénisse.*

*Un très grand merci à mes frères et ma sœur **Siham, Amine** et **Yassine** pour leur affection et leur encouragement qui ont toujours été pour moi des plus précieux.*

Je profite par le biais de ce rapport, pour exprimer mes remerciements à toute personne qui a, de près ou de loin, contribué d'une manière ou d'une autre au succès de ce travail, et spécialement mes amis et ceux que j'aime.

Présentation de la structure d'accueil

Notre stage est réalisé au sein du Laboratoire Filal. Il s'agit d'un laboratoire privé d'Analyses Médicales situé à l'avenue Slaoui -ville nouvelle. Il a été créé en 1975.

Le laboratoire occupe une superficie de 230m² et se compose de :

- Salle d'accueil
- Salle de prélèvement
- Local administratif
- Laboratoire

Ce laboratoire réalise une large gamme d'analyses de biologie médicale dans les différents domaines :

- Biochimie.
- Hématologie.
- Immunologie.
- Sérologie.
- Hormonologie.
- Toxicologie.
- Bactériologie et parasitologie.

Ainsi que quelques tests de dépistage virologique. Les analyses très spécialisées sont transmises à des laboratoires extérieurs.

Liste d'abréviation

- AB** : Antibiogramme.
- ADH** : Hormone antidiurétique
- AMM** : Autorisation de mise sur le marché.
- CMI** : Mesure d'une concentration.
- ECBU** : Examen cyto bactériologique des urines.
- I** : Intermédiaire.
- IU** : Infection(s) urinaire(s).
- IUC** : Infection urinaire compliquée.
- IUS** : Infection urinaire simple.
- LDC** : Lysine décarboxylase.
- MH** : MUELLER HINTON.
- ODC** : Ornithine décarboxylase.
- ONPG** : Ortho-nitrophényl-beta-galactoside.
- R** : Résistance.
- S** : Sensible.
- TDA** : Tryptophane désaminase.
- VP** : Vorges Proskauer.

Sommaire

| | |
|---|-----------|
| Introduction | 1 |
| Revue Bibliographique | 3 |
| 1. Généralités sur l'infection urinaire | 4 |
| 1.1. Définition | 4 |
| 1.2. Types d'infection urinaire..... | 4 |
| 2. Etiologies | 5 |
| 3. Traitement : Antibiothérapie | 5 |
| 3.1. Définition des antibiotiques | 5 |
| 3.2. Mécanisme d'action des antibiotiques | 6 |
| 4. Résistance bactérienne aux antibiotiques | 7 |
| 4.1. Notion de résistance..... | 7 |
| 4.2. Types de résistance | 7 |
| 5. Cas d'E. Coli | 7 |
| 5.1. Caractères généraux d' <i>Escherichia coli</i> | 7 |
| 5.2. Principaux antibiotiques utilisés contre <i>Escherichia coli</i> | 8 |
| 5.3. Résistance d' <i>E.coli</i> aux antibiotiques | 9 |
| 6. Diagnostique clinique | 9 |
| 7. Diagnostique biologique | 10 |
| 7.1. Bandelettes urinaires | 10 |
| 7.2. Examen cyto bactériologique des urines (ECBU) | 10 |
| 7.3. Antibiogramme..... | 11 |
| Matériel et Méthodes | 12 |
| 1. Population et période d'étude | 13 |
| 2. Recueil des urines | 13 |
| 3. Examen macroscopique | 13 |
| 4. Bandelettes urinaires | 14 |
| 5. Test ECBU | 15 |
| 5.1. Examen direct sans coloration | 15 |
| 5.2. Examen direct avec coloration de Gram | 15 |
| 5.3. Mise en culture..... | 16 |
| 6. Identification d'E. Coli | 17 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 6.1. | Identification macroscopique des colonies | 17 |
| 6.2. | Identification biochimique | 18 |
| 6.2.1. | Identification préliminaire : Test catalase | 18 |
| 6.2.2. | Galleries classiques..... | 18 |
| 6.2.3. | Galerie Api | 20 |
| 7. | Antibiogramme | 21 |
| | Résultats et discussions | 22 |
| 1. | Fréquence des infections urinaires | 23 |
| 1.1. | Numération des leucocytes..... | 23 |
| 2. | Répartition des germes responsables d'infection urinaire | 23 |
| 2.1. | Répartition en fonction des caractères morphologiques..... | 23 |
| 2.2. | Fréquence des germes identifiés..... | 24 |
| 3. | Profil de sensibilité d'E.Coli aux antibiotiques..... | 25 |
| | Conclusion..... | 28 |
| | Références | 30 |
| | Annexes | 31 |

Introduction

L'intérêt porté ces dernières années aux infections urinaires et leur prise en charge en thérapeutique anti-infectieuse reste encore d'actualité.

En effet, l'infection urinaire représente un véritable problème de santé publique avec des conséquences considérables tant sur le plan individuel que sur le plan économique. C'est une pathologie fréquente, aussi bien en communauté qu'à l'hôpital. Cette fréquence est en rapport avec des facteurs favorisants, et des facteurs d'uropathogénicité des germes en cause [1].

De point de vue bactériologique, les bactéries qui proviennent de la flore intestinale ou de la flore périnéale sont à l'origine de la plupart des infections urinaires. Certains travaux relèvent la prépondérance de *Escherichia coli* comme principale cause quelque soit l'âge et le type de prélèvement [2].

L'antibiothérapie, est le traitement le plus couramment utilisé pour ce type d'infection. Par ailleurs, les échecs thérapeutiques sont de plus en plus fréquents à cause de l'émergence et la diffusion des mécanismes de résistance acquise au sein des espèces bactériennes, spécialement au sein des entérobactéries. Ceci limite maintenant les indications d'un certain nombre d'antibiotiques de première intention [2].

A fin de proposer d'éventuelles mesures susceptibles de contrôler l'évolution de cette résistance, la surveillance de la sensibilité aux antibiotiques pour vérifier la validité des protocoles de traitement est fondamentale.

Ceci a motivé notre travail qui consiste à évaluer la sensibilité de *E. coli* à un certain nombre d'antibiotiques afin d'apporter une contribution à l'amélioration de l'antibiothérapie envers cette souche.

Pour cela nous avons fixé comme objectifs spécifiques :

- Diagnostique de l'infection urinaire chez le nourrisson, l'enfant et l'adulte.
- Détermination du germe responsable de l'infection.
- Evaluation des niveaux de résistance de la souche *E. Coli* isolée par rapport aux antibiotiques.

Ce travail est divisé en trois partis :

Le première partie est consacrée à un rappel bibliographique concernant les IU et la résistance bactérienne. La deuxième partie décrit les méthodes utilisées pour diagnostiquer les germes

responsables des IU et étudier leur sensibilité à un certains nombre d'antibiotiques. La troisième partie présente les différents résultats obtenus.

Revue Bibliographique

1. Généralités sur l'infection urinaire

1.1.Définition

L'infection urinaire "correspond à l'agression d'un tissu ou organe de l'appareil urinaire par un (ou plusieurs) microorganisme, générant une réponse inflammatoire et des signes et symptômes de nature et d'intensité variable selon le terrain [3]. Elle regroupe un ensemble hétérogène d'infections de l'un des constituants du tractus urinaire ou de ses annexes : rein, vessie, urètre ou prostate chez l'homme.

1.2.Types d'infection urinaire

L'infection de l'appareil urinaire est divisée en deux groupes. On parle d'infection urinaire simple (IUS), lorsque le sujet atteint n'a aucun facteur de risque, et d'infection urinaire compliquée (IUC), lorsque celle-ci survient chez un patient porteur d'au moins un facteur de risque tel que :

- Diabète
- Immunosuppression
- Grossesse
- Histoire ancienne de pyélite / calcul / anomalie des voies excrétrices
- Sonde à demeure ou transitoire en place / intervention urologique récente
- IU acquise à l'hôpital
- Age avancé
- Traitement antibiotique récent
- Infections récidivantes (≥ 4 épisodes / an)

De point de vue localisation, l'infection de l'appareil urinaire regroupe plusieurs entités en fonction de la zone de l'arbre urinaire infectée. En effet, il existe trois types d'infections urinaires, qui se distinguent selon l'organe touché (l'urètre, la vessie et les reins). Lorsque l'infection se localise au niveau de l'urètre, on parle d'urétrite. Lorsqu'elle remonte au niveau de la vessie, c'est la cystite et enfin, si elle atteint les reins, on parle de pyélonéphrite [8].

2. Etiologies

Les micro-organismes retrouvés le plus fréquemment chez les patients présentant une infection urinaire sont décrits comme uropathogènes [6], Ceci inclut :

➤ Les bacilles à Gram négatif

La plupart des infections du tractus urinaire sont dues à la propagation par voie ascendante des bactéries d'origine intestinale d'où la prédominance des entérobactéries au sein desquels:

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

Par ailleurs, d'autres bacilles à Gram négatif, *Pseudomonas aeruginosa* sont responsables des infections urinaires iatrogènes, résultant d'une contamination par manœuvres instrumentales endo-urinaires (sonde à demeure, urétrocystoscopie ...).

➤ Les Cocci à Gram Positif

Les infections urinaires à Cocci à Gram Positif sont rares. Ce sont :

- Staphylocoques: *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* et *S. aureus*.
- Streptocoque des groupes D,
- **Les bacilles à Gram positif**
 - ✓ *Listeria*
 - ✓ *Clostridium perfringens*

3. Traitement : Antibiothérapie

3.1. Définition des antibiotiques

Un antibiotique est une molécule naturelle ou synthétique qui détruit ou bloque la croissance des bactéries. Dans le premier cas, on parle d'antibiotique bactéricide et dans le second cas

d'antibiotique bactériostatique. Un même antibiotique peut être bactériostatique à faible dose et bactéricide à dose plus élevée.

3.2.Mécanisme d'action des antibiotiques

Les antibiotiques perturbent la vitalité des bactéries. Pour qu'il soit efficace, un antibiotique doit atteindre une cible précise dans la bactérie [4].

Deux types de cibles sont artificiellement distingués :

- Les cibles faisant partie d'une voie métabolique constituées par les partenaires d'une réaction enzymatique indispensable à la vie de la bactérie.
- Les cibles participant à la structure de la bactérie constituée par la paroi, la membrane cytoplasmique, les ribosomes et l'ADN.

Ainsi, selon leur nature, les antibiotiques interviennent de différentes manières sur les bactéries (figure 1) [4].

On distingue 5 modes d'action : (1) sur la synthèse du peptidoglycane ; (2) sur l'altération de la paroi ; (3) sur la synthèse des protéines ; (4) sur la synthèse des acides nucléiques ; (5) sur le métabolisme intermédiaire.

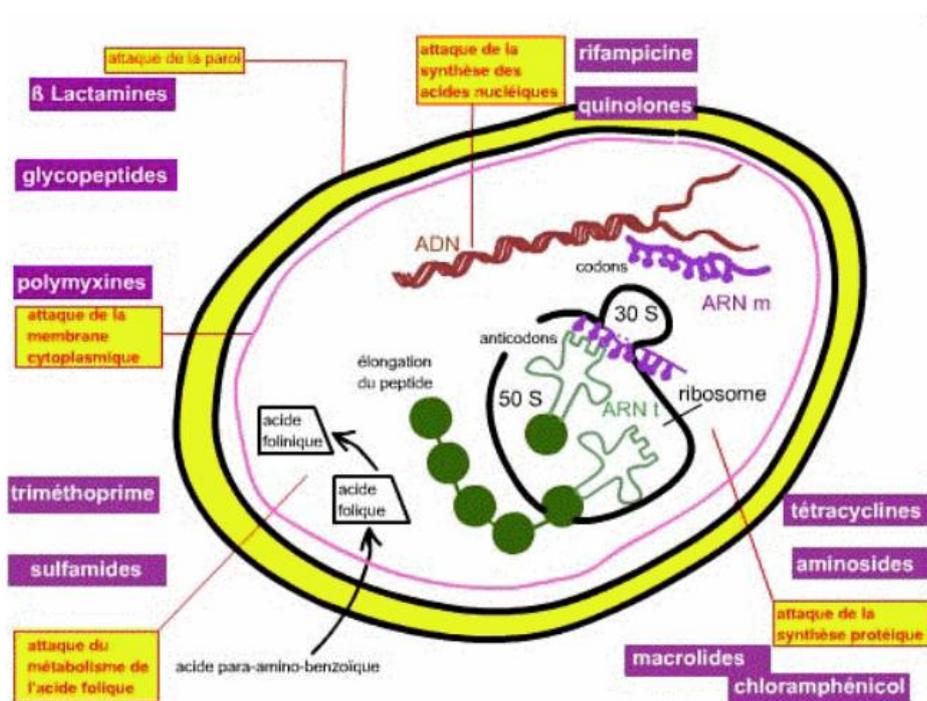


Figure 1 : différents mécanismes d'action d'antibiotiques contre *E.coli* [4]

4. Résistance bactérienne aux antibiotiques

4.1. Notion de résistance

Pour chaque antibiotique est défini un spectre d'activité, c'est-à-dire l'éventail des espèces bactériennes sensibles, et susceptibles d'être inhibées par des concentrations de cet antibiotique.

Une espèce non sensible, qui n'entre pas dans le spectre d'activité d'un antibiotique est dite résistante. Cette résistance est liée à un ou plusieurs mécanismes biochimiques, qui impliquent l'étude des interactions entre l'antibiotique et les voies métaboliques de la bactérie [11].

4.2. Types de résistance

➤ Résistance naturelle

On parle de résistance naturelle lorsque toutes les souches d'une même espèce bactérienne sont résistantes à un antibiotique donné. Il s'agit en fait de bactéries qui sont insensibles au mode d'action de l'antibiotique [11].

➤ Résistance acquise

On parle de résistance acquise lorsqu'une ou plusieurs souches d'une espèce bactérienne naturellement sensible à un antibiotique y deviennent résistantes.

Il s'agit un phénomène naturel, qui se produit rarement et expliqué par une mutation dans les gènes de la bactérie permettant à celle-ci d'échapper partiellement ou totalement à l'effet de l'antibiotique [11].

5. Cas d'*E. Coli*

5.1. Caractères généraux d'*Escherichia coli*

Escherichia coli est un bacille non encapsulé et mobile par ciliature péritriche à Gram-, étant aéro-anaérobies facultatif. Cette bactérie a différents caractères enzymatiques et biochimiques notamment : oxydase+, catalase+, glucose et nitrates+, gaz en glucose, lactose

+, ONPG +, H₂S -, mannitol +, sorbitol + (le plus souvent), indole +, citrate -, VP -, urée -, TDA ou APP -, gélatine -, malonate -, inositol -, adonitol -. LDC variable (90% +), ODC variable, ADH.

En outre, *E.coli* est un saprophyte de l'intestin qui dans certaines conditions va devenir virulent en déterminant des infections notamment les IU [11]. Le pouvoir pathogène de la souche *Escherichia coli* dépend en partie de sa structure antigénique. Elle possède:

- Un effet protecteur vis-à-vis des défenses.
- Un rôle de camouflage, qui est lié à l'existence de similitude entre certains composés de la capsule et ceux de l'hôte.

5.2.Principaux antibiotiques utilisés contre *Escherichia coli*

Les principaux antibiotiques utilisés contre *E. Coli* sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1 : les antibiotiques utilisés contre *E. Coli* et leurs noms de commerce

| Antibiotique | Nom de commerce (à titre indicatif) |
|----------------------------------|-------------------------------------|
| PENICILLINES A | |
| Ampicilline | Ampicilline, Totapen |
| Amoxicilline | Clamoxyl, Hiconcil |
| Ac clavulanique + Amoxicilline | Augmentin |
| CARBAPENEMES | |
| Imipénème | Tiénam |
| Ertapénème | Invanz |
| CEPHALOSPORINES | |
| Céfixime | Oroken |
| Céfalotine | Kéflin |
| Céfotaxime | Claforan |
| Céftriaxone | Rocephine |
| Céftazidime | Fortum |
| AMINOSIDES | |
| Amikacine | Amiklin |
| Gentamicine | Gentalline, Gentamen |
| QUINOLONES | |
| Ciprofloxacine | Ciproxine, Ciflox |
| DIVERS | |
| Sulfaméthoxazole + Triméthoprime | Bactrim |
| Colistine | Colimycine |

5.3.Résistance d'*E.coli* aux antibiotiques

La souche *E. coli* est naturellement sensible à l'ensemble des aminopénicillines et des céphalosporines. En revanche, une augmentation de la résistance à certains antibiotiques notamment les bêtalactamines a été rapporté [11]. Le mécanisme essentiel de la résistance aux bêtalactamines est de nature enzymatique par la production de bêtalactamase.

D'autres études indiquent une résistance d' *E. coli* :

- Faible (< à 10 %) pour les aminosides, les carbapénèmes, les C3G, les fluoroquinolones (pourcentages de résistance différents selon les populations étudiées), la fosfomycine trométamol et la nitrofurantoïne.
- Elevée (> 20 %) pour l'amoxicilline, l'amoxicilline + acide clavulanique, les céphalosporines de première génération, le pivmecillinam et le SMX-TMP.

6. Diagnostique clinique

L'examen clinique comprend l'interrogatoire (antécédents, symptômes...) du patient et son examen physique. Il s'agit de rechercher la présence de signes cliniques de l'IU et d'éventuels facteurs de complication. En effet, les infections urinaires sont souvent peu symptomatiques, en particulier chez les patients sondés. Elles peuvent être reconnues à l'occasion de complications : bactériémies, prostatites, pyélonéphrites.

Par ailleurs, la clinique des infections urinaires est variable. Les symptômes peuvent être locaux. Ils se manifesteront alors au niveau des voies urinaires et/ ou au niveau de l'abdomen. Le tableau 2 présente les différents signes cliniques d'une IU [11].

Tableau 2 : Variété des signes cliniques de l'infection urinaire

| Localisation | Signes cliniques |
|--------------|---|
| Urinaire | Troubles mictionnels : <ul style="list-style-type: none">- Pollakiurie- Brûlure- Mictions impérieuses- Enurésie- Incontinence- Hématurie avec ou sans pyurie Algies lombaires Algies pelviennes |
| Abdominale | Douleurs abdominales Nausées, vomissements, diarrhées |

Les signes cliniques révélateurs peuvent aussi être généraux comme la fièvre [11].

7. Diagnostique biologique

7.1. Bandelettes urinaires

La bandelette urinaire est le premier examen facile et rapide à réaliser en cabinet. Elle permet d'orienter le diagnostic. Elle est à réaliser devant tous signes fonctionnels urinaires, ou fièvre sans point d'appel.

7.2. Examen cyto bactériologique des urines (ECBU)

L'ECBU permet de déterminer s'il y a infection urinaire, et si oui d'identifier la bactérie responsable et d'évaluer l'importance de l'inflammation. Cette analyse comporte un examen direct des urines au microscope et une mise en culture afin de chercher et d'identifier la présence des germes. Il repose sur l'analyse cytologique et bactériologique de l'échantillon

d'urine recueillie. L'ECBU sert notamment à déterminer la numération des hématies et des leucocytes, la présence des cristaux et des germes.

7.3. Antibiogramme

Une fois le test ECBU est réalisé on passe à l'antibiogramme qui consiste à mettre en contact un panel d'antibiotiques avec une bactérie. Il permet de savoir comment une bactérie donnée, réagit avec un antibiotique donné. L'antibiogramme permet de mesurer la capacité d'un antibiotique à inhiber la croissance bactérienne, ainsi de jauger l'efficacité d'un antibiotique.

Matériel et **méthodes**

1. Population et période d'étude

Une étude prospective est menée sur une période de deux mois d'avril à juin 2015. Notre étude a porté sur les enfants et les adultes des deux sexes présentant des symptômes d'une infection du tractus urinaire et dont l'examen cytbactériologique des urines (ECBU) a été demandé. L'échantillonnage est effectué en fonction de l'arrivée des échantillons d'urine au Laboratoire. Ainsi un ensemble de 113 échantillons d'urine a été choisi.

2. Recueil des urines

L'urine contenue dans la vessie est normalement stérile mais elle peut être contaminée lors de la miction par la flore normale qui colonise habituellement l'urètre. Pour limiter cette contamination on doit recueillir l'urine du milieu de la miction et éliminer celle du début qui aura entraînée la majeure partie des bactéries de l'urètre.

L'urine peut être recueillie à n'importe quel moment de la journée, mais au mieux le matin après que le patient soit resté au moins 3 heures sans uriner.

Mode de prélèvement

- Lavage des mains suivi d'un lavage soigneux au savon ou antiseptique doux de la vulve chez la femme et du méat chez l'homme + rinçage.
- Elimination le 1^{er} jet d'urine (~20mL).
- Recueil le 2^{ème} jet (~20mL) dans un flacon stérile.
- Identification et transport immédiat au laboratoire (éventuellement conservation quelques heures à 4°C ou utilisation d'un tube boraté contenant un conservateur).

3. Examen macroscopique

L'examen macroscopique permet de noter les principaux caractères des urines émises, en l'occurrence :

- Aspect : Limpide, louche, trouble.
- Couleur : Jaune pâle, ambrée, hématurique ou éventuellement colorée par les médicaments.
- Présence de sédiments et leur abondance.
 - Culot blanchâtre: des phosphates.

- Culot rouge brique: acide urique.
- Culot rose: urate de soude.

4. Bandelettes urinaires

Cette technique a pour but de :

- Détecter l'existence d'une leucocyturie témoignant la réaction inflammatoire.
- Déterminer la présence d'une nitriturie indiquant la présence de bactéries productrices de nitrites.

Les bandelettes urinaires sont constituées de petits papiers buvards collés sur un support plastique servent à détecter en moins de 2 minutes la présence de globules blancs et de dérivés de bactéries (nitrites).

Ainsi, lors de la présence de signes d'infection urinaire, et après avoir prélevé les urines dans un récipient sec et propre, la bandelette urinaire est trempée dans les urines pendant 1 seconde. Il est conseillé de la maintenir horizontale pour éliminer l'excédent.

Il est nécessaire d'attendre au moins une minute pour lire les résultats. Ensuite, les zones réactives sont comparées avec la gamme colorimétrique présente sur le flacon aux temps indiqués.

➤ Interprétation

Une BU est dite négative quand la leucocyturie et les nitrites sont négatifs.

Une BU est dite positive si une leucocyturie ou des nitrites sont détectés.

La bandelette urinaire a une bonne valeur prédictive négative (99,4%), c'est-à-dire qu'une bandelette urinaire négative élimine le diagnostic d'infection urinaire. Cependant, la valeur prédictive positive n'est que de (33,5%), c'est-à-dire qu'une bandelette urinaire positive ne confirme pas une infection urinaire. Pour affirmer le diagnostic, il faut réaliser un examen cytobactériologique des urines.

NB : Il est important de vérifier avant l'utilisation d'une bandelette, sa date de péremption et de respecter les conditions de conservation (dans un endroit sec et frais, à l'abri de l'humidité, de la lumière, de la chaleur, à température entre 15°C et 30°C, hors du réfrigérateur).

5. Test ECBU

5.1.Examen direct sans coloration

A l'aide d'un dispositif à numération type cellule de Malassez, les différents éléments (leucocytes, hématies, cellules épithéliales) contenus dans un volume donné de l'urine sont dénombrés. Ainsi, une goutte de l'urine est déposée sur la lame. Le tout est recouvert d'une lame puis observé à l'objectif $\times 40$. Le nombre des leucocytes et des hématies est rapporté en ml.

A l'état physiologique, l'urine contient moins de 10^4 leucocytes et $5 \cdot 10^3$ hématies par ml. En cas d'infection urinaire, le processus inflammatoire se traduit le plus souvent par la présence d'un nombre :

- $> 5 \cdot 10^4$ leucocytes/ml.
- $> 10^4$ hématies/ml témoins de microhémorragies
- Cellules de revêtement urothélial (on prendra en compte la présence de cylindres leucocytaires si elle s'avère importante).

Les échantillons renfermant un nombre élevé de leucocytes (quelques, assez nombreux et nombreux leucocytes) font l'objet de la coloration de Gram.

5.2.Examen direct avec coloration de Gram

La coloration de Gram permet de différencier les bactéries Gram positif (colorées en violet) des bactéries Gram négatif (colorées en rose) au microscope à l'objectif 100 à l'immersion.

Ainsi, après avoir récupéré l'urine, celle-ci avait subi une centrifugation comme suit :

- Homogénéiser délicatement l'urine.
- Verser aussitôt dans un tube rempli au 3/4.
- Centrifuger 5 min à vitesse moyenne (4500 tr/min).
- Rejeter le surnageant puis agiter le tube pour remettre en suspension le culot.

Un frottis est réalisé à partir du culot puis coloré en Gram. L'observation du frottis coloré au microscope optique à l'objectif $\times 100$ nous permet d'observer les éventuels micro-organismes présents dans l'échantillon, mais aussi de déterminer leur type, leur forme et leur

morphologie. En outre, les résultats de cet examen nous orientent vers le choix des milieux de culture que nous devons utiliser pour l'isolement de ces microorganismes.

5.3. Mise en culture

A la fois qualitative et quantitative, l'isolement a pour but de dénombrer les bactéries et d'isoler la ou les bactéries en cause en vue de l'identification et de la réalisation de l'antibiogramme. L'isolement sur milieux gélosés va permettre aussi de vérifier la pureté de la souche qui s'est développée. Les milieux de culture utilisés pendant cette étape sont:

- ✓ **Gélose E.M.B** (Eosine Methylene Blue) : Milieu d'isolement des bacilles Gram⁻. Il est très utilisé pour l'isolement des coliformes,
- ✓ **Gélose C.L.E.D.** (Cystine-Lactose-Electrolyte-Déficient) : Milieu non sélectif, très utilisé dans l'étude des bactéries (Gram⁺ et Gram⁻) contenues dans l'urine.

Ainsi, l'homogénéisation des urines est réalisée en remuant délicatement le pot d'urine pendant quelques secondes et les échantillons d'urines sont ensemencés par épuisement sur les différentes boîtes de pétri contenant chacun des deux milieux. Les boîtes ensemencées sont ensuite incubées à l'étuve à une température de 37°C pendant 18 heures.

Après incubation pendant 24 heures à 37°C, les bactéries isolées sont dénombrées et la bactériurie est déterminée (figure 2).

➤ **Interprétation**

- 10^3 UFC/ml : Absence d'infection
- 10^4 UFC/ml : Infection probable
- 10^5 UFC/ml : Zone d'incertitude

On parle de bactériurie significative lorsqu'il existe au moins 10^5 UFC/ml d'urines. Cependant, il a été démontré qu'il existait des infections urinaires vraies avec un taux de 10^2 à 10^3 UFC/ml d'urines (cas d'*E coli*) [12].

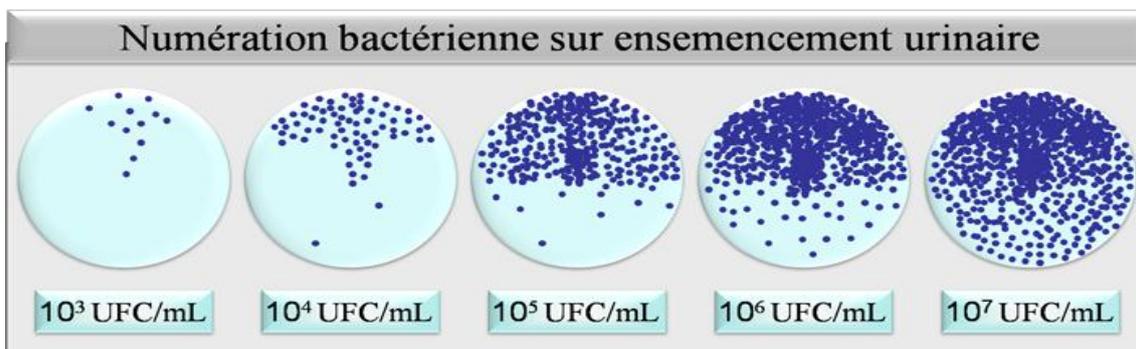


Figure 2 : Dénombrement des bactéries après incubation [12]

Le tableau 3 résume les différentes éventualités de l'examen cytologique.

Tableau 3 : Interprétation de l'examen quantitatif et qualitatif des urines [3]

| Leucocytes par ml | Bactéries par ml | Culture | Interprétation |
|----------------------------|---|----------|--|
| Inférieur ou égal à 10 000 | Supérieur à 1000 | Négative | Urines normales |
| Supérieur à 10000 | Supérieur ou égale à 100000 | Positive | Infection urinaire certaine |
| Supérieur à 10000 | Supérieur ou égale 1000 et inférieur à 100000 | Positive | Infection urinaire possible à reconstrôler |
| Supérieur à 10000 | Inférieur à 1000 | Négative | Infection urinaire décapitée par antibiotique. |
| Inférieur ou égal à 10000 | Supérieur à 1000 | Positive | Si les espèces appartiennent à des germes multiples. Reconstrôler l'ECBU |

6. Identification d'*E. Coli*

6.1. Identification macroscopique des colonies

Après 18 heures d'incubation à l'étuve à 37°C, chaque bactérie ou amas de bactéries présent dans l'urine donne naissance à une colonie visible à l'œil nue. Dans ce présent travail, nous nous sommes intéressés à étudier *E. coli*. Ainsi, pour l'identification de cette dernière, la technique à utiliser découle de la morphologie des colonies complétée si besoin d'une coloration de Gram et quelques tests biochimiques.

➤ **Interprétation**

Tableau 4 : Morphologie des colonies selon les types de gélose étudiés

| Type de gélose | Morphologie des colonies | Bactérie suspecte |
|--------------------|---|-----------------------------|
| Gélose EMB | Colonies violettes : semi-bombées de 2 à 3mm de diamètre avec éclat métallique, centre sombre | <i>E. coli</i> |
| | Colonies très bombées muqueuses de diamètre 5 mm centra gris marron sans reflet | <i>Klebsiella spp.</i> |
| | Colonies grisâtres : 1 à 2 mm de diamètre transparentes, grises ambrées | <i>Salmonella, Shigella</i> |
| | Colonie de 2 mm de diamètre, grisâtres avec une pellicule autour de la colonie : | <i>Proteus morganii</i> |
| | Colonies punctiformes et grisâtres | <i>Entérocoques.</i> |
| Gélose CLED | Colonies jaunes, opaques à centre légèrement plus foncé | <i>E. coli</i> |

6.2. Identification biochimique

6.2.1. Identification préliminaire : Test catalase

Une identification biochimique préliminaire a été réalisée en effectuant le test catalase. *La mise en évidence de cette enzyme se fait comme suit :*

A l'aide d'une pipette pasteur, une colonie est prélevée puis déposée sur une lame contenant une goutte de l' H_2O_2 . La réaction se traduit par le dégagement de gaz en bulles.

6.2.2. Galeries classiques

Elle est basée sur des tests biochimiques permettant l'étude des métabolites intermédiaires. La galerie est composée de différents milieux tel que : Hajna-Kligler, Citrate de Simmons le milieu Urée Tryptophane et Tryptophane désaminase.

Les techniques d'ensemencement, les caractères recherchés et l'interprétation des résultats attendus dans chacun des milieux sont résumés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Identification biochimique sur quelques milieux de culture

| Milieu | Technique d'ensemencement | Caractères recherchés | Résultats | Interprétation |
|---------------------------|---|-----------------------------|--|---|
| Hajna-Kligler | La surface par stries serrées ou par inondation Le culot par simple piqûre | Utilisation du glucose | Pente jaune/ Culot jaune | Glucose+/Lactose+ |
| | | Utilisation du lactose | Pente rouge/Culot jaune | Glucose +/Lactose- |
| | | Production H ₂ S | Culot rouge/ Pente rouge. | Glucose - /Lactose- |
| | | Production de gaz | Pente jaune / Culot rouge | Glucose - /Lactose+ |
| Citrate de SIMMONS | La pente par stries longitudinale | Source de carbone. | Virage de l'indicateur en couleur bleu | Citrate de SIMMONS + |
| | | | Absence de virage | Citrate de SIMMONS- |
| Urée | | Uréase | Coloration rouge | Alcalisation du milieu, suite à l'hydrolyse de l'urée : uréase+ |
| | | | Coloration orange ou jaune | Absence d'hydrolyse de l'urée: uréase - |

| | | | | |
|-------------------------------------|------------------------------|------------------------|------------------------------------|---------|
| Tryptophane désaminase (TDA) | Ajout du chlorure de Fer III | Tryptophane désaminase | Présence d'un précipité brun foncé | TDA + |
| | | | Absence de précipité. | TDA- |
| Indole | Ajout du réactif de Kovacs | Tryptophanase (indole) | Formation d'un anneau rouge | Indole+ |

Comme il a été décrit précédemment dans la partie bibliographique, la souche *E. coli* présente les caractéristiques suivantes : Glucose +, lactose+, Citrate-, uréase+, Indole. Ainsi, notre étude se poursuivra sur les colonies présentant ces caractéristiques.

6.2.3. Galerie Api

C'est une version miniaturisée des tests biochimiques classiques réalisés à partir d'une culture pure de 18 à 24h et destinés à l'identification des entherobacteriaceae (bactéries Gram négatif et anaérobie facultatives). Elle comporte 20 caractères biochimiques avec 20 microcupules contenant des substrats déshydratés.

Technique

L'inoculum est préparé à partir d'une souche bactérienne de 18 à 24 heures en mettant en suspension trois colonies de la bactérie à étudier dans 10 ml de solution stérile (NaCl à 0,85%) à un pH entre 5,5 et 7.

La suspension est bien mélangée puis déposée soigneusement (15µl) dans chaque cupule de la galerie. 150 µl de la suspension bactérienne est ajoutée aux cupules CIT, VP et GEL (total = 300 µl par puits).

Après l'inoculation et pour la réussite de certains tests qui nécessitent l'anaérobiose, les cupules ADH, LDC, ODC, H2S et URE sont remplis d'huile minérale. Les galeries sont

placées par la suite dans une chambre humide (boîte de plastique avec couvercle contenant un papier humide) et incubés à 30°C pendant 18 à 24 h.

➤ **Interprétation**

Les réactions produites au cours de l'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par addition de réactifs. L'utilisation du catalogue d'identification Api 20 E nous a permis d'identifier la bactérie étudiée.

7. Antibiogramme

L'étude de la sensibilité d'une souche bactérienne aux divers antibiotiques est réalisée à l'aide d'un antibiogramme. Cette sensibilité est définie par une concentration minimale inhibitrice (CMI). L'antibiogramme est réalisé selon la méthode de diffusion en gélose. Elle consiste à déposer à la surface de la gélose (MUELLER HINTON) préalablement ensemencée par une suspension bactérienne des disques de papier buvard imprégnés de différents antibiotiques testés (Annexe). Chaque antibiotique diffuse au sein de la gélose à partir du disque. La suspension va entrer en contact avec des concentrations variables de l'antibiotique et la croissance sera inhibée là où sera atteinte la CMI. Après incubation pendant 24h à 37°C, l'inhibition va se traduire par une zone circulaire dépourvue de culture autour du disque. La lecture de l'antibiogramme est faite en mesurant à l'aide d'une règle graduée, les diamètres d'inhibition autour des disques d'antibiotiques.

Les différents résultats ont été classés en sensible (S), intermédiaire (I) et résistant (R) selon les normes de la CMI et le diamètre qui entoure le disque [3,7].

Résultats et **discussions**

Dans le but de mesurer la fréquence de l'infection urinaire chez les patients, 113 échantillons ont été analysés durant une période de 2 mois de stage au sein du laboratoire Filali.

1. Fréquence des infections urinaires

1.1. Numération des leucocytes

Le test ECBU nous a permis de déterminer le nombre des leucocytes dans les échantillons prélevés. Les résultats sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Répartition en fonction de la numération leucocytaire

| Leucocytes | Effectif | Pourcentage % |
|--|-----------------|----------------------|
| Significative ($>10^4$) | 43 | 38.05 |
| Non significative ($<10^4$) | 70 | 60.46 |
| Total | 113 | 100 |

D'après les résultats présentés dans le tableau 6, 43 cas (soit 38.05%) des patients avaient une leucocyturie significative avec une valeur des leucocytes qui dépasse 10^4 , ceci nous permet de suggérer la présence d'une infection urinaire dans des échantillons testés. Ainsi parmi les 113 ECBU effectués, 43 ECBU sont considérés positifs soit (38,05%), et 70 sont considérés négatifs soit (61,95%).

2. Répartition des germes responsables d'infection urinaire

2.1. Répartition en fonction des caractères morphologiques

La coloration nous a permis d'identifier deux groupes de bactéries : les Bacilles Gram - et des Cocci à Gram +. Les résultats sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Répartition des microorganismes en fonction des caractères morphologiques

| Caractères morphologiques | Effectif | Pourcentage% |
|----------------------------------|-----------------|---------------------|
| Bacilles à Gram négatif | 26 | 60.46 |
| Cocci à Gram positif | 17 | 39.54 |
| Total | 43 | 100 |

Nous constatons d'après ces résultats que le groupe des bacilles à Gram négatif représente 60.46% des germes trouvés dans les échantillons d'urines analysés. Tandis que les cocci à gram positives ne représentaient que (39.51%).

Des résultats similaires ont été rapportés par Bahmani et al [14]. Ces auteurs ont montré que les entérobactéries ont été les bactéries les plus isolées (96,00%), tandis que les cocci à gram positifs ne représentaient que (2, 65%).

En accord avec ces auteurs les bacilles à Gram négatif sont également des germes commensaux du tube digestif. L'atteinte urinaire pourrait être donc favorisée par la mauvaise hygiène du siège lors de l'émission des selles.

2.2. Fréquence des germes identifiés

Les testes biochimiques nous ont permis d'identifier les microorganismes isolées. Les résultats sont présentés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Répartition des germes identifiés

| Gram | Germes | Espèces | Freq | % |
|------------------------|-----------------------|---------------------------------|------|-------|
| Cocci à Gram positif | <i>Streptococcus</i> | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 3 | 6.95 |
| | <i>Staphylocoque</i> | <i>Staph aureus</i> | 3 | 6.95 |
| | | <i>Staph haemolyticus</i> | 7 | 16.27 |
| | <i>Entérocoques</i> | <i>Entero faecalis</i> | 4 | 9.30 |
| Bacille à Gram négatif | <i>Enterobacterie</i> | <i>Escherichia Coli</i> | 22 | 51.16 |
| | | <i>Klesbsiella Spp.</i> | 2 | 4.65 |
| | | <i>Proteus Spp.</i> | 1 | 2.31 |
| | <i>Pseudomonaceae</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 1 | 2.31 |

D'après les résultats présentés dans le tableau 4, les entérobactéries sont les bactéries les plus isolées (58.15%) parmi lesquelles *Escherichia coli* a constitué le principal agent infectant (51.16%), suivi de *Klebsiella pneumoniae* (4.65%), puis de *Proteus mirabilis* (2.34%). *Pseudomonas aeruginosa* a été identifié chez 1 seul patient. Des résultats similaires ont été rapportés par Bahmani et al [14], qui ont mené une étude prospective à l'Hôpital Cheikh Zaid sur une période de 18 mois. Ces auteurs ont rapporté que parmi les souches isolées *E. coli* a constitué le principal agent infectant (72%), suivi de *Klebsiella pneumoniae* (11%), puis de *Proteus mirabilis* (3 %).

E. coli est de loin le germe le plus fréquemment isolé. Ceci peut être en rapport avec la physiopathologie de l'IU. En effet, il existe une forte colonisation du périnée par les entérobactéries d'origine digestive, et en particulier *E. coli*. Celle-ci possède des adhésines permettant la liaison de la bactérie à l'épithélium urinaire et d'empêcher son élimination par les vidanges vésicales. Tandis que *Klebsiella* et *Proteus* secrètent une uréase qui alcalinise l'urine, dont le pH est naturellement acide, ce qui empêche leur prolifération.

3. Profil de sensibilité d'E.Coli aux antibiotiques

Après l'identification des différentes souches isolées, le profil de sensibilité des souches *E.coli* à différents plusieurs antibiotiques a été réalisés. Les résultats sont présentés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Profil de sensibilité et de résistance des souches *E.Coli* isolées

| | Antibiotique | <i>Escherichia Coli</i> | | | |
|------------------|--------------|-------------------------|-------|--------|-------|
| | | Freq S | % S | Freq R | % R |
| Penicilines A | AML | 8 | 36.36 | 14 | 63.63 |
| | AMC | 15 | 68.18 | 7 | 31.82 |
| Cephalosporines | KF | 16 | 72.72 | 6 | 27.28 |
| | CRO | 21 | 95.45 | 1 | 4.55 |
| | CAZ | 21 | 95.45 | 1 | 4.55 |
| | CFM | 21 | 95.45 | 1 | 4.55 |
| Aminosides | CN | 20 | 90.90 | 2 | 9.1 |
| | AK | 22 | 100 | — | — |
| Divers | CT | 22 | 100 | — | — |
| | SXT | 13 | 59.09 | 9 | 40.91 |
| | NI | 19 | 86.36 | 3 | 13.64 |
| Quinolones | CIP | 16 | 72.72 | 6 | 27.28 |
| Carbapénèmes | IMP | 22 | 100 | — | — |

Dans cette étude 22 souches d'*E.coli* sont testées. D'après les résultats trouvés nous remarquons une résistance très élevée pour l'Amoxicilline (63.63 %). Par contre seulement (31.82%) des souches sont montrés résistantes à l'association Amoxicilline acide clavulanique.

Dans le cas des céphalosporines, nous avons noté une faible résistance, à la Céfixime (4.55%), la Céftriaxone (4.55%) et la Céftrizidime (4.55%). Cependant on note une bonne sensibilité à l'Imipénème(100%), la Colistine (100%) et l'Amikacine (100%) avec un pourcentage de (100%), et au Gentamicine avec un pourcentage de (90.90%).

Des résultats similaires ont été rapportés par Zahlane et al [15]. Ils ont montré que la résistance de cette souche à l'amoxicilline, aux céphalosporines, aux fluoroquinolones, à la

Sulfaméthoxazole + Triméthoprimine et aux aminosides était respectivement de 62,5% ; 54% ; 5% ; 28% ; 36% et 7%. Tandis que toutes les souches *d'E.coli* isolées étaient sensibles à l'Imipenème. Par ailleurs, elles étaient résistantes aux fluoroquinolones (61%) et à gentamicine (71%).

La résistance à l'AML et l'AMC peut être expliquée par la production d'une enzyme, la pénicillinase (β -lactamase) qui hydrolyse les pénicillines A. Cette résistance peut également être expliquée par l'exposition antérieure aux antibiotiques. Il est, en effet, actuellement reconnu que l'utilisation non équilibrée et l'automédication des antibiotiques est la cause de la progression de la résistance bactérienne.

Conclusion

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

Le présent travail réalisé au laboratoire Filali, avait pour objectif d'étudier in vitro le niveau de sensibilité de la bactérie *Escherichia coli* responsable vis-à-vis de plusieurs antibiotiques.

Du 16 Avril 2015 au 31 Mai 2015, nous avons effectué un examen cytobactériologique de 113 échantillons d'urine. 43 cas (soit 38.05%) se sont révélés positifs dont leur leucocyture s'est montrée significative.

Les germes les plus observés étaient des Bacille Gram négatif (60,46%) avec une prédominance marquée d'*E. Coli* (51,16%).

L'antibiogramme réalisé nous a permis d'établir le profil de sensibilité d'*E. coli* vis-à-vis de plusieurs antibiotiques. Une forte résistance d'*E. coli* a été révélée vis-à-vis de l'AML (63.63%). Toutefois, une sensibilité très importante de cette bactérie à l'IMP(100%), AK(100%) et CT (100%) a été marquée. D'après cette étude, les antibiotiques tel que : L'Imipénème, Amikacine et Colistine ont une bonne efficacité et peuvent donc être recommandés contre l'infection urinaire causée par *E. coli*.

Cette étude a permis donc d'évaluer l'état actuel de la sensibilité d'*E. coli* aux antibiotiques et d'informer les thérapeutiques des risques d'échecs potentiels qu'entraîne l'automédication. Ainsi, les résultats obtenus pendant cette étude, montrent l'intérêt de la surveillance afin de définir de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ralentir l'émergence de ces résistances [11].

REFERENCES

- [1] Mouy. D, Cavallo J. Les membres de l'AFORCOPIBIO. Update on acute uncomplicated urinary tract infection in women, Postgrad Med. 1999, vol. 119, 39–45.
- [2] Toure F. Résistance aux bêta-lactamines des souches bactériennes isolées d'hémoculture au CHU A.LE DANTEC. Dakar -SENEGAL. Thèse pour obtenir le grade de docteur en pharmacie.2004, 29-40.
- [3] Champetier D.Infections de l'appareil urinaire. Impact Internat Janvier. 1998, 139-141.
- [4] Yabi Foua A. R. Profil antibiotypique des bactéries responsables d'infections urinaires communautaires, thèse pour l'obtention de diplôme de doctorat en pharmacie. Mali 2006, 92.
- [5] Chilala Lj.Infections urinaires bactériennes et mycosiques chez le sujet VIH. Thèse Med. Abidjan. 1996, 17-78.
- [6] Hannedouche T. Infection urinaire Nephrohus online 2000. www.didier.deleglise.free.fr
- [7] Kouadio K.Infections urinaires nosocomiales : Etudes prospectives sur un an dans un service de réanimation du CHU de Treichville. Thèse de Med. Abidjan. 1992, 1381.
- [8] Jean-Nicolas Corru.Urologie, Infections urinaires de l'enfant et l'adulte, collection Hyppocrate, 2009, Edition Robert Laffont. www.e-santé.Fr. Centre Duke, encyclopédie pratique de la nouvelle médecine.
- [9] Kouakou K A. Etudes sur les urocultures réalisés à Abidjan : Les germes rencontrés et leur sensibilité aux antibiotiques, thèse Med. Abidjan,Mali 1984.
- [10] Vuillemin P. Antibiose et symbiose, Association française pour l'avancement des sciences, compte rendu de la 18^e session, seconde partie, Notes et mémoires, vol. 11 .1890, 525-543.
- [11] Seck R. Résistance des souches d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae* isolées d'infections urinaires. 2005,13-26
- [12] www.mémobio.fr/html/bact/ba-pr-ecbu.html
- [13] Guillaume P.Y.Les milieux de culture en microbiologie 2004.
www2.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/microbio/milieux.html
- [14] Bahmani Fz, Noureddine R, Benaouda A. les infections urinaires communautaires chez l'enfant: epidemiologie et prévalence de la résistance aux antibiotiques des germes isolés dans la ville de rabat, Maroc. Laboratoire de bactériologie, hôpital universitaire international Cheikh ZAD, Rabat.2009-2011.

[15] Zahlane K., Labial A., Bouzekraoui T., Soraa N., Chabaa L. La résistance des souches d'*Escherichia Coli* uropathogènes isolées chez l'adulte, CHU Marrakech. laboratoire des analyses biologiques, hôpital Ibn Tofail , CHU Marrakech.2009-2010.

ANNEXES

Les différents milieux utilisés dans ce travail sont :
CLED (cystine – lactose – électrolyte –déficient).

Composition :

| | | | |
|----------------------------|---|---------|---|
| Peptone bactériologique | 1 | 4g | 1 |
| Extrait de viande | 1 | 3g | 1 |
| Peptone pepsique de viande | 1 | 4g | 1 |
| L-cystine | 1 | 0,128g | 1 |
| Lactose | 1 | 10g | 1 |
| Bleu de bromothymol | 1 | 0,02g | 1 |
| Agar | 1 | 13g | 1 |
| Eau distillé | | 1000 ml | |

EMB (Eosine Bleu de Méthylène).

Composition :

| | |
|---------------------------------|---------|
| Peptone | 10g |
| Lactose | 10g |
| Eosine | 0.4g |
| Bleu de méthylène | 0.0625g |
| Hydrogénophosphate de potassium | 2g |
| Agar | 15g |
| Eau distillée | 1000ml |

MUELLER HINTON

Composition : (exprimée en gramme par litre : g/l)

| | |
|----------------------------|---------|
| Infusion de viande de bœuf | 300g |
| Hydrolysate de caséine | 17.5g |
| Amidon | 1.5g |
| Gélose | 17g |
| Eau distillée | 1000 ml |

Les antibiotiques utilisés contre *E. coli* et leurs valeurs critiques :

| Antibiotiques | Valeurs critiques |
|-------------------------------|--------------------------|
| Amoxicilline | (S \geq 21mm R<16mm) |
| Ac clavulanique+ Amoxicilline | S \geq 21 R<16mm |
| Céfalotine | S \geq 18mm R<12 |
| Céftriaxone | S \geq 26 R<23 |
| Céftazidime | S \geq 26 R<19 |
| Imipénème | S \geq 24 R<17 |
| Gentamicine | S \geq 18 R<16 |

| | |
|---------------------------------|------------------|
| Amikacine | S \geq 17 R<15 |
| Ciprofloxacine | S \geq 25 R<22 |
| Sulfaméthoxazole + Triméthoprim | S \geq 16 R<13 |
| Nitrofuranes | S \geq 15 R<15 |
| Céfixine | S \geq 18 R<18 |
| Colistine | S \geq 13 R<13 |

- ❖ Ne jamais rendre Imipénème R.
- ❖ Mettre un disque d'AMC à 2.5 cm d'un disque de CRO.