

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université d'Alger I Ben Youcef Ben Khedda
Faculté de Médecine d'Alger



THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES MEDICALES

*Apport de la cristallurie et impact de l'étude bactériologique
de l'urine pyélique et/ou du calcul urinaire dans la prise en charge
de la lithiase d'infection*

Docteur. BERRAHAL Mounir

Maître – Assistant Hospitalo-universitaire

Hôpital Mohamed Seghir Nekkache. Faculté de Médecine d'Alger

Microbiologie Médicale

Soutenance le : 28/09/2020

Directeur de Thèse : Professeur SQUID Mohamed Bachir

Professeur en Urologie – Université d'Alger

Memebre du jury :

Président : Professeur S. BOUMEDINE

Professeur D. YALA DJAMEL

Professeur Y. BOULAHIA

Professeur S. BOUZGHOUB

RESUME

Objectif : Évaluer l'apport de la cristallurie et analysé l'impact de l'étude microbiologique d'urine pyélique et/ou du calcul urinaire dans la prise en charge de la lithiase d'infection.

Matériels et méthodes : L'étude a porté sur des cristaux urinaires ainsi que des souches bactériennes provenant des urines de 114 patients atteints d'infection-colonisation du calcul urinaire.à l'Hopital Mohamed Seghir Nekkache, Alger. Nous avons réalisé 44 Cristalluries du réveil par microscope à polarisations, 114 ECBU préopératoires, 54% examens cyto bactériologiques de l'urine pyélique et 65% examens bactériologiques du calcul (fragments) urinaire. Après, enrichissement et mise en culture (selon Stamey), l'identification des cultures positives a été faite par méthode conventionnelle et automatisée suivie d'antibiogrammes selon CLSI 2020. En plus, CMI E-test EBLSE des entérobactéries résistantes à la céphalosporine de troisième génération, avec étude des gènes β -lactamase à spectre étendu(EBLSE) par PCR et séquençage.- Le génotypage par MLST des *k pneumoniae* β -lactamase à spectre étendu.La métagénomique directe de la pyurie pyélique et le projet de séquençage du génome complet d'*Enterobacter cloacae complex* .

Résultats : Parmi 4200 patients, **114 (03%)** d'âge moyen de **48ans**, de **sexe masculin** (64%), avaient un calcul infecté (ou colonisé) .Taille moyenne du calcul était de 15 mm, de siège **rénal (70%)** avec 80% de **douleurs lombaires**, 48% **d'hématurie** et **39%** de **brulures mictionnelles**.

Cristallurie : 40% oxalocalcique(25% whewellite), 25% Struvite pure et 23% phosphocalcique. pH urinaire : compris entre 6.5 et 8. L'ECBU préopératoire était **négatif à 90%**, la culture du calcul urinaire (EBC) était **positive à 65%**, l'examen cyto bactériologique d'urine pyélique (ECBUP) était positif à 54% dont 60% d'hématurie et 20% d'éléments leucocytaires à l'examen direct. **Les espèces uréalytiques** retrouvées dans le calcul urinaire : 22% *Proteus mirabilis*, 15 % *Staphylococcus aureus*, 11%. *K.pneumoniae*. Les espèces **émergentes** : 12% *Pseudomonas.sp*, 09 % *E.coli* et 08% d'*Enterobacter cloacae complex* (ECC).**L'antibio-résistance** : 60 % d'*Ecoli* et 40 % de *k.pneumoniae* résistants au Céfazoline (CIIG) avec une résistance au ciprofloxacine de 60% chez *E.coli* et 20 % chez *K.pneumoniae* .**Nous avons eu 05 souche β -lactamase à spectre étendu : 02 *E.cloacae complex* et 03 *k.pneumoniae* avec 0% de résistance au carbapénème.**

Taux d'urosepsis post opératoire était de : **10 % (11/114)** avec **0.9 % de mortalité**.

La VPN des tests ECBUP et EBC dans la prédiction du risque septique est de **98%**.

-Gènes β -lactamase à spectre étendu détectés : CTX-M-15 chez *K pneumoniae* et des gènes

qnr-B 1 chez *Enterobacte cloacae complex* et *kp* et aucun gène de résistance aux aminoglycosides de type *acc (3')*-I n'a été retrouvé. Le génotypage des *K.pneumoniae isolés du calcul* a détecté deux

ST : 29 et 405.

La métagénomique directe de la pyurie pyélique de la fillette avec défaillance rénale a détecté des germes virulents : *Bactériodes fragilis* et *Fusobacterium nucleatum* et autres.

Le projet de séquençage du génome complet d'*Entérobactérie hormaechi* fait ressortir **4956 gènes**, dont **78 gènes tRNA** et **10 gènes rRNA** avec des protéines endonucléases pouvant être impliquées dans la virulence et l'antibiorésistance par dégradation de l'ADN extra-cellulaire dans le biofilm calculaire expliquant les multiples épisodes de récives cliniques et d'urosepsis de la patiente exploré.

Conclusion: La cristallurie , l'examen cyto bactériologique d'urine pyélique et la culture du calcul urinaire pourraient être le leitmotiv de la prise en charge adéquate des patients lithiasiques .La surveillance des micro-organismes virulents colonisants ou inféctants le calcul et leurs explorations moléculaires se posent avec acuité afin d'éclaircir les zones d'ombre de l'étiopathogène , de la récive et du risque infectieux problème émergeant de santé publique .

Mots Clés : Cristallurie, urine pyélique, calcul, antibio-résistance, séquençage génétiques, urosepsis.

REMERCIEMENTS

Je remercie, en premier lieu, **Dieu** le très puissant, de m'avoir donné du courage et surtout de la patience pour pouvoir achever ce travail.

A Messieurs le **Professeur Souid Mohamed-Bachir**, mon maître et mon directeur de thèse, en me faisant l'honneur d'accepter de m'encadrer

Jusqu'au bout et pour m'avoir accordé cet axe de recherche et de m'avoir guidé. Qu'il trouve ici tout mon respect, ma reconnaissance et ma profonde gratitude.

Je remercie exceptionnellement le : **Pr S.Boumedine, Pr.D.Yala, Pr.Y.Boulahia, Pr.S.Bouzghoub.**

Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer ma thèse. J'ai également été honoré de votre participation à mon jury de soutenance, et ce malgré un emploi du temps surchargé.

Je vous remercie aussi pour votre regard critique et plus que pertinent sur l'ensemble de mon travail. Cela m'a apporté sans doute des éclairages intéressants, et m'a permis de soulever certaines interrogations pour poursuivre ma réflexion dans des travaux de recherche futurs.

Je remercie également le : Pr. Rahal, Pr. Tiouit, Pr. Naim, Pr.Benamrouche, Pr. Ghaffour, Pr.Djidjijik, Pr.Benrabah, Dr. Daudon, Dr. Drici, de m'avoir appris ce que je ne peux pas apprendre sans leurs lumières.

Je tiens aussi à remercier vivement le : Pr.Belabas, Pr.Amhis, Pr.Ziane,Pr.Gourari, Pr.Benslimani, Pr.Talimaamr, Pr.Lounici, Pr.Chaid, Pr.Zerrouki, Dr.Chabani, Dr. Henniche, et toute l'équipe médicale du service de Microbiologie médicale, d'Anatomopathologie et particulièrement d'urologie de l'Hôpital Mohamed Seghir Nekkache .HCA .

Sans oublier, le service d'informatique, le service de réalisation et de maintenance pour leurs étroites collaborations et disponibilités.

Les membres de ma famille et de ma belle-famille qui m'ont toujours soutenus et encouragés et pour leur aide précieuse.

A tous ceux ou celles qui ont participé de près ou de loin à la finalisation de cette thèse.

En définitive, à tous les honorables **patients.**

LISTE DES ABBREVIATIONS

- ADNc** : Acide désoxyribonucléique complémentaire;
- AMC** : Amoxicilline-acide calvulanique ou clavulanate;
- APIweb** : Interface de programme pour identification bactérienne;
- ARNr** : Acide ribonucléique ribosomique;
- AST** : Antimicrobial susceptibility testing;
- ATB** : Antibiotiques;
- ATCC** : American Type Culture Collection;
- ATCD**: Antécédent;
- BGN** : Bacille à Gram negative;
- BGP** : Bacille Gram positive;
- BGT** : Bouillon enrichi à base de glucosé tamponnée;
- BHIB** : Bouillon enrichi à base d'extrait de cœur et de cervelle;
- BHRe** : Bactérie hautement résistante émergente;
- BLSE** : β -lactamase a spectre étendu;
- BMR** : Bactérie multi-résistante;
- BSI** : British society of infectiology;
- CAT**: Catalase;
- CE-IVD** : communauté européen Dispositifs Médicaux de Diagnostic in Vitro;
- CG** : Cytosine Guanine;
- CGN** : Cocci à Gram negative;
- CGP** : Cocci à Gram Positive;
- Chrom ID** : Milieux de culture chromogènes assurent l'isolement direct et l'identification fiable et rapide de bactéries, levure;
- CLSI** : The clinical and laboratory standards institute;
- CMI** : La concentration minimale d'inhibition;
- CTX** : Céfotaxime;
- CTX-M** : Betalactamase de type céfotaximase;
- ddNTP n** : Didésoxyribonucléotide;
- DFG**: Débit de filtration glomérulaire;
- EAU** : European Association of Urologiste;
- EB** : Examen bactériologique;

EBC : Examen bactériologique du calcul urinaire;

EBLSE : Entérobactérie betalactamase à spectre étendu;

ECBU : Examen cyto bactériologique des urines;

ECBUP : Examen cyto bactériologique de l'urine pyélique ;

EBC : Examen bactériologique du calcul urinaire ;

ECC: Enterobacter cloacae complex;

EDTA : Éthylène diamine tétra acétique;

EI : Endocardite infectieuse;

EPS : Substances polymérisées extracellulaires;

EQUC : Enhanced quantitative urine culture;

GISA : Staphylococcus aureus de sensibilité diminuée aux glycopeptides;

GN : Gélose nutritive;

GSC : Gélose sang cuit;

HCA : Hôpital central de l'Armée;

HGT: Horizontal gène transfer /gène transférable horizontalement;

HK : Gélose Hektoen, milieux sélective pour BGN;

HMP: Human microbiome project;

HTA : Hypertension artérielle;

IPA : Institut Pasteur Algérie;

IRT : Insuffisance rénale terminale;

KPC : Klebsiella pneumoniae carbapenemase;

L-Ara : Sucre arabinose;

LEC : Lithotripsi extra corporelle;

LJ : LÓWENSTEIN-JENSEN, milieu spécifique pour le complexe Mycobacterium tuberculosis;

LPS : Antigènes membranaire des bactéries, Lipopolysacharide;

MBL : Métallo-bêta-lactamase;

MBTC : Méthylène Bis Thio Cyanate;

MDA : Multiple déplacement amplification;

MGIT : Mycobacterium Growth Indicator Tube;

MGTB : Magnésium transporteur des bactéries;

MH : Mueller Hinton,(le seul milieux à ce jour, qui permet de tester la sensibilité des bactéries aux antibiotiques);

MLST : Multilocus séquence typing;

START2 :Sequence Type Analysis and Recombinational Tests.Version 2

LB: lysogeny broth ou milieu Luria-Bertan ;

NDM : New Delhi métallo-bêta-lactamase 1;

NGS : Next-generation sequencing;

NLPC : Néphrolithotomie percutané;

NMC-A: Non metallo carbapénèmase class A;

NTS : Nouvelle techniques de séquençages ;

OMP: Outer membrane proteins;

ONPG : Ortho-nitrophenyl-b-D-galactopyranoside;

ORI: Origin of replication;

OTU: Operational taxonomic unit;

OX : Oxydase;

OXA : Enzyme Oxacillinase;

PACC : Cristaux phosphate amorphes de calcium carbonate;

PAM : Phospho-amoniaco-magnésiens ou de struvite;

PBP : Penicillin-binding proteins;

PCR : Polymérase chaine reaction;

PFGE: Pulsed-field Gel Electrophoresis;

PG : Membrane du peptidoglycane;

PLP : Facteur de Pyridoxal 59-phosphate;

PNA : Pyélonéphrite aigue;

PSM II : Poste de sécurité microbiologique niveau 02;

PSM : Poste de sécurité biologique;

SARM : Staphylococcus aureus résistant à la méticilline;

SB : Sabouraud , milieux spécifique pour levure;

SCN : Staphylococcus a coagulase negatives;

SFAR : Société française d'anesthésie et de reanimation;

SFM : Société Française de Microbiologie;

SHV : Enzyme β -lactamases plasmidiques/transposables de type BLSE;

SPILF : Société de Pathologie Infectieuse de Langue Français;

ST : Séquence types dans le génotypage par MLST;

TB: Mycobacterium Tuberculosis;

TEM : Enzyme la première β -lactamase plasmidiques/transposable;

UFC : Unité format colonies;

UPEC : Uropathogènes *E.coli*;

URS : Technique d'end-urologie d'urétéroscopie souple;

UTI : Infection du tractus urinaire;

VEB : β -lactamase vietnam extended spectrum;

WBC : White Blood cells ou éléments leucocytaires;

WGS : Whole génome sequencing ou séquençage du génome complet;

Wohnet : Logiciel standardisé par l'IPA pour la surveillance nationale des résistances aux antibiotiques (Pr.Rahal et autres)

DIP: Dossier informatique patient. service d'informatique. HCA

IUAS : Infection urinaire associées aux soins.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	01
DONNÉES DE LA LITTÉRATURE	04
1. Rappel anatomique de l'appareil urinaire	04
1.1. Rein.....	04
1.1.1. Rapports du rein	05
1.1.2. Vascularisation rénale	05
1.2. L'uretère	05
1.2.1. Segments de l'uretère	06
1.2.2. Vascularisation, innervation et drainage lymphatique	06
2. Physiologie de l'appareil urinaire	07
2.1. Filtration glomérulaire.....	07
2.2. Sécrétion tubulaire.....	08
2.3. Fonction exocrine du rein	08
2.4. Fonction endocrine du rein	08
LITHIASÉ URINAIRE D'INFECTION	09
1. Historique.....	09
2. Définition	11
3. Étude épidémiologique de la lithiasé d'infection	12
4. Étiopathogénies de la lithiasé urinaire d'infection	15
4.1. Facteurs étiopathogéniques.....	15
4.1.1. Infection-colonisation-urinaire dans la lithiasé d'infection	15
4.1.1.1. Prostate et rein.....	15
4.1.2. Facteurs de risque de l'infection urinaire	20
4.2. Agents pathogènes associés à la lithiasé d'infection.....	20
4.2.1. Agents associées à la lithiasé urinaire d'infection	22
4.2.2. Métagénomique et lithiasé d'infection	23
5. Physiopathologie de la lithiasé d'infection	25
5.1. Lithogénèse.....	25
5.2. Biofilm infectieux dans la lithiasé d'infection	30
5.2.1. Étapes du développement de biofilm	31
5.3. Microbiote urinaire	35
6. Diagnostic de la lithiasé d'infection	37

6.1. Étude clinique	37
6.2. Étude radiologique.....	37
6.3. Étude biochimique de la lithiase d'infection	40
6. 4.Étude microbiologique de la lithiase urinaire d'infection	40
6.4.1. Phase pré-analytique	40
6.4.1.1. Indications, modalités et acheminement des prélèvements :	40
6.4.1.2. ECBU	41
6.4.1.3 .Cristallurie.....	42
6.4.1.4. L'urine pyélique et le calcul urinaire	44
6.4.2. La phase analytique :	46
6.4.2.1. Examen cyto bactériologique (ECBU) et urine pyélique dans la lithiase d'infection	46
6.4.3. Phase post –analytique.....	55
7. Traitement de la lithiase d'infection	65
7.1. Traitements médicaux.....	66
7.2. Traitements chirurgicaux	68
8. Évolution de la lithiase d'infection	69
8.1. Bactériémie–urosepsis	69
8.2. Les complications infectieuses de la lithiase d'infection	74
8.3. L'insuffisance rénale aiguë (IRA)	74
MATERIELS ET METHODES	76
1. Problématique et justificatif.....	76
1.1. Sur le plan épidémiologique	76
1.2. Sur le plan diagnostique Microbiologique.....	76
1.3. Sur le plan du risque infectieux	77
1.4. Sur le plan récurrence clinique	78
1.5. Sur le plan de la résistance aux antibiotiques	78
2. Objectif de l'étude	80
2.1. Objectif principal	80
2.2. Objectifs secondaires	80
3. Matériel d'étude	81
3.1. Type d'étude	81
3.2. Population	81
3.3. Critère d'inclusion	81

3.4. Critère d'exclusion.....	81
4. Méthodes	82
4.1. Recueil des données	82
4.2. Déroulement d'étude.....	82
4.2.1. Étapes préopératoire.....	82
A- ECBU préopératoire	82
4.2.2. Étapes per-opératoires	85
A- Examen cytobactériologique de l'urine pyélique (ECBUP).....	85
B- Examen bactériologique du calcul urinaire (EBC).....	86
4.2.3.Étape post-opératoire	88
4.2.4.Étude moléculaire de l'antibiorésistance des isolats du calcul urinaire	88
A- Caractérisation moléculaire des gènes de résistance des β -lactamines, aminoglycosides et fluoroquinolones	88
4.2.5. Typage moléculaire par MLST de <i>klebsiella pneumonie</i> BLSE positive isolées du calcul urinaire	91
4.2.5.1. Principe de la technique MLST des <i>kp</i> BLSE positive	91
4.2.5.2. Amplification par PCR.....	91
4.2.5.3. Séquençage des sept gènes de ménages.....	93
4.3. Étude de la métagénomique directe dans la pyurie pyélique.....	93
4.3.1. Principe de métagénomique	93
4.3.2. Premier cas clinique	94
4.4. Projet du séquençage du génome complet de <i>l'Enterobacter cloacae</i> <i>complex</i>	94
4.4.1. Principe du séquençage complet du génome utilisé par macrogen	94
4.4.2. Deuxième cas clinique	95
4.5. Outils statistiques et collaborations scientifiques	95
4.5.1. Analyse statistiques.....	95
4.5.2. Collaboration scientifique	96
4.6. Outils bio-informatiques.....	96
4.6.1. Génotypage MLST.....	96
4.6.2. La métagénomique	96
4.6.3. Séquençage du génome complet (WGS).....	97
5. Limité de l'étude	97

RESULTATS	98
I. Analyse de la population	98
1. Répartition selon l'âge	98
2. Répartition selon le sexe	98
3. Manifestations cliniques.....	99
4. Répartition en fonction du siège	99
5. Répartition en fonction de la taille du calcul	100
6. Répartition de l'ECBU antérieur.....	100
7. Répartition d'ECBU antérieur par tranche d'âge.....	101
8. Répartition d'ECBU antérieur selon le sexe	101
II. Analyse des tests d'explorations	102
1. Tests préopératoire	102
1.1. Répartition des ECBU.....	102
1.2. Fréquence de cristallurie chez les lithiasiques	102
1.3. Fréquence de cristallurie chez les témoins.....	103
1.4. Fréquence de cristallurie positive et négative	103
1.5. Répartition de cristallurie positive par tranche d'âge et sexe	104
1.6. Répartition de cristallurie négative par tranche d'âge et sexe.....	104
1.7. Répartition de cristallurie selon la tranche d'âge et le sexe	105
1.8. Profils de cristallurie chez les lithiasiques	105
1.9. Profils de cristallurie chez les témoins.....	106
1.10. Profils de cristallurie chez les lithiasiques et les témoins	106
1.11. pH urinaire.	107
1.12. Automate de cytologie urinaire urised-Max	107
III. Analyse des tests peropératoires	108
1. Répartition de l'examen cyto bactériologique de l'urine pyélique ECBUP.....	108
2. Répartition de l'étude bactériologique du calcul urinaire (EBC).....	109
3. Répartition des tests ECBUP et EBC en positives et négatives	109
4. Répartition de l'urine pyélique (ECBUP) par tranche d'âge.....	109
5. Répartition de l'urine pyélique (ECBUP) selon le sexe	110
6. Répartition de la culture du calcul urinaire (EBC) par tranche d'âge	111
7. Répartition de la culture du calcul urinaire (EBC) selon le sexe.....	111
8. Répartition de l'urine pyélique et de la culture du calcul par tranche d'âge et sexe.....	112

IV. Étude microbiologique de la lithiase d'infection	113
1. Répartition par famille de germes dans l'ECBU positif pré-opératoire	113
2. Répartitions par espèces bactériennes dans ECBU préopératoire	113
3. Répartition de l'examen direct dans l'urine pyélique.....	114
4. Répartitions par groupe dans la culture d'urine pyélique.....	114
5. Répartitions par groupe dans la culture du calcul EBC.....	115
6. Répartitions par famille dans l'urine pyélique ECBUPet la culture du calcul EBC	115
7. Répartition de l'examen direct dans l'urine pyélique.....	116
8. Répartition des espèces retrouvées dans la culture d'urine pyélique (ECBUP).....	116
9. Répartition des espèces retrouvées dans la culture du calcul (EBC).....	117
10. Répartition par espèces dans l'urine pyélique et le calcul.....	118
V. Antibio-résistance et lithiase d'infection	119
1. Résistances aux antibiotiques dans l'ECBU pré-opératoire	119
1.1. Entérobactéries et Pseudomonas	119
1.2. Cocci à Gram positifs	119
2. Résistances aux antibiotiques dans l'urine pyélique.....	120
2.1. <i>Entérobactéries et Pseudomonas</i>	120
2.2. Cocci à Gram positifs	120
3. Résistances aux antibiotiques dans le calcul urinaire	121
3.1. <i>Entérobactéries et Pseudomonas</i>	121
3.2. Cocci à Gram positifs	121
4. Résistance aux antibiotiques des entérobactéries par β lactamase à spectre étendu	122
4.1. Résistance par β -lactamase à spectre étendu et culture du calcul urinaire	122
4.2. Résistance aux Céfotaxime par β -lactamase à spectre étendu.....	122
4.2.1. Image de synergie	122
4.2.2. CMI E-test° de β -lactamase à spectre étendu (BLSE)	123
4.2.3. Résistance par carbapénèmase et la culture du calcul urinaire	124
4.2.4. Résistance au fluoroquinolones et la culture du calcul urinaire.....	124
4.2.5- Autres résistances	124
VI. Aspect microbiologique des tests de diagnostic dans la lithiase d'infection	125
VII. Répartition cristallurie et culture du calcul urinaire	125
VIII. Complications postopératoire associées à la lithiase d'infection	126
1. Le risque infectieux.....	126
1.1. Bactériémies- urosepsis-chocs septiques.....	126

1.2. Répartition des Hémocultures	126
1.3. Répartition des tests dans le risque infectieux post opératoire.....	127
1.4. Analyse épidémiologique des complications infectieuses.....	128
IX. Récidive de la lithiase d'infection	130
1. Cristallurie de récurrence	130
X. Caractérisation moléculaire des résistances aux antibiotiques.....	131
1. Réaction de PCR et support génétique des β -lactamines, aminoglycosides et fluoroquinolones (<i>bla_{CTX-M}</i> , <i>aac</i> (3')-I et <i>qnrB</i>).....	131
1.1. Résultats de la détection des gènes chromosomiques	131
1.2. Résultats de la détection des gènes plasmidiques.....	131
1.3. Étude du séquençage des gènes d'entérobactéries BLSE (positive)	134
XI. Génotypage par MLST des souches <i>K pneumoniae</i> BLSE positive.....	135
1. Phylogénies des <i>k.pneumoniae</i> (1-3-6)	135
XII .Résultat de la métagénomique directe dans la pyurie pyélique	136
1. Représentation phylogénétique des espèces bactériennes par la métagénomique....	138
XIII. Résultats préliminaire du projet de séquençage du génome complet de <i>l'Enterobacter hormaechei</i> (WGS).....	139
DISCUSSION	142
1. Étude épidémiologique de la lithiase d'infection.....	142
2. Cristallurie par automates de cytologie urinaire dans la lithiase d'infection.....	144
3. Cristallurie par lumière polarisée.....	146
4. Impact de l'étude microbiologique de l'urine pyélique et/ou du calcul urinaire	147
5. Aspect microbiologique de la lithiase d'infection	148
6. Résistance aux antibiotiques	151
7. Typage moléculaire par Multilocus séquence typing (MLST)	153
8. Étude de la métagénomique	154
9. Projet du séquençage du génome complet	156
10.Évolution de la lithiase d'infection	156
11. Récurrence	157
CONCLUSION.....	158
RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES	161
BIBLIOGRAPHIE	165
ANNEXES.....	175

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Image montrant les différents segments des uretères	07
Figure 02: Évolution de la lithiase d'infection.....	10
Figure 03: Évolution thérapeutique de la lithiase d'infection	11
Figure 04: Étapes de la lithogénèse - calculogénèse de la lithiase urinaire	27
Figure05: Principaux facteurs de formation de la lithiase urinaire dont d'infection	28
Figure06: Représentation du mécanisme de la lithiase infectieuse.....	30
Figure 07: Formation de Biofilm urinaire dans la lithogénèse infectieuse	32
Figure 08: Mécanismes hypothétique dans la lithiase urinaire d'infection.....	33
Figure 09: Calcul coralliforme d'infection	38
Figure 10: Calcul d'infection radio-opaque coralliforme	38
Figure 11: Uro-Scanner de la lithiase rénale d'infection	39
Figure 12: Cristallurie calcique à lumière polarisée	43
Figure 13: Cristallurie de Struvite (infectieuse).....	43
Figure 14: Fragmentation de calcul coralliforme	45
Figure 15: Urine pyélique	45
Figure 16: Calcul d'infection	45
Figure 17: Présentation de la cellule de Malassez	47
Figure 18: Appareil Vitek2 (HCA.2016)	51
Figure 19: Position des disques de synergies à la recherche de BLSE	53
Figure 20: Test de synergie de <i>k pneumoniae</i> BLSE +	53
Figure 21: Automate d'incubation pour flacon hémocultures.....	70
Figure 22: Fréquences des lithiases d'infection par tranches d'âge	98
Figure 23 : Fréquence des lithiases d'infection selon le sexe	98
Figure 24: Répartition des signes cliniques dans la lithiase d'infection	99
Figure 25: Fréquence selon la taille et le siège de la lithiase d'infection.....	99
Figure 26: Fréquence d'ECBU antérieurs en positive et en négative	100
Figure 27: Fréquence d'ECBU antérieur par tranche d'âge.....	101
Figure 28 : Fréquence d'ECBU antérieur selon le sexe.....	101
Figure. 29 : Fréquence d'ECBU	102
Figure 30: Fréquence de la cristallurie positive	102
Figure 31 : Fréquence de la cristallurie négative	103

Figure 32: Fréquence de la cristallurie positive et négative.....	103
Figure 33 : Fréquence de la cristallurie positive par tranche d'âge et sexe	104
Figure 34: Fréquences de la cristallurie négative par tranche d'âge et sexe.....	104
Figure 35: Fréquence de la cristallurie positive et négative par tranche d'âge	105
Figure 36: Fréquence de la cristallurie positive et négative selon le sexe	105
Figure 37 : Profils (%) de la cristallurie chez les lithiasiques.....	106
Figure 38: Profils (%) de la cristallurie chez les lithiasiques et les témoins	106
Figure 39: Fréquence de l'ECBUP et de l'ECB en positives.....	108
Figure 40: Fréquence des tests ECBUP ET EBC négatives	109
Figure 41 : Fréquence des tests ECBUP et EBC.....	109
Figure 42 : Fréquence des tests ECBUP par tranche d'âge.....	110
Figure 43: Fréquence des tests ECBUP selon le sexe.....	110
Figure 44 : Fréquence de culture du calcul ECB par tranche d'âge.....	111
Figure 45: Fréquence de la culture du calcul (ECB) selon le sexe	111
Figure46 : Fréquence des ECBUP ET EBC par tranche d'âge et sexe.....	112
Figure 47: Nombre d'espèces dans l'ECBU + lors de la lithiase d'infections.....	113
Figure48 : Fréquence des gemes par famille dans l'ECBU	114
Figure49: Fréquence des germes par famille dans la culture du calcul	115
Figure 50 : Fréquence par famille par l'ECBUP et EBC	115
Figure 51: Fréquences des espèces retrouvées dans l'ECBUP	117
Figure 52: Fréquences des espèces retrouvées dans le calcul urinaire.....	117
Figure 53: Fréquences des espèces retrouvées dans l'urine pyélique et le calcul Urinaire.....	118
Figure 54 : <i>K.pneumoniae</i> (3) BLSE + image de « bouchon champagne »	123
Figure 55: <i>K.pneumoniae</i> (1-3-6) BLSE +.....	123
Figure 56: <i>Enterobacter cloacae complex</i> BLSE +	123
Figure 57: <i>k pneumoniae</i> urease positive	123
Figure 58: <i>K.pneumoniae</i> sensible à l'ertapénème.....	124
Figure 59: <i>Enterobacter cloacae complex</i> sensible à l'ertapénème	124
Figure 60: Fréquence d'urosepsis	124
Figure 61: Fréquences de sensibilité, spécificité , VPP et VPP	127
Figure. 62: Gel des produits amplifiés par PCR TEM	132
Figure 63 : Gel des produits amplifiés par PCR SHV	132
Figure 64 : Gel des produits amplifiés par PCR CTX-M-3	133

Figure 65 : Gel des produits amplifiés par PCR CTX _{M-9}	133
Figure 66 : Gel des produits amplifiés par aac(3')-I	133
Figure 67 : Gel des produits amplifiés par PCR <i>qnrB1</i>	134
Figure 68 Phylogénie entre les <i>k pneumoniae</i> BLSE + (1-3-6)	135
Figure 69 : Aspect macroscopique de la pyurie pyélique	136
Figure 70 : Arbre phylogénétique des espèces bactériennes dans la métagenomique.....	138
Figure 71 : Débit de données brute génome d' <i>Enterobacter hormaechei</i>	140
Figure 72 : Scores Q20 / Q30 de données brute génome d' <i>Enterobacter hormaechei</i>	140

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01 : Nouvelle classification de la lithiase urinaire	12
Tableau 02 : La répartition mondiale des lithiases urinaires	13
Tableau 03 : Fréquence de la lithiase d'infection en Algérie	14
Tableau 04 : Espèces bactériennes associées dans les infections-colonisations urinaire	19
Tableau 05 : Fréquence des bactéries selon le type d'infection urinaire	19
Tableau 06 : Aspects microbiologiques des lithiases urinaires d'infection mixte.....	21
Tableau 07 : Principaux micro-organismes associés à la lithiase urinaire d'infection.....	25
Tableau 08 : Indication ECBU dans la lithiase d'infection	40
Tableau 09 : Délais et condition d'acheminement de l'ECBU	41
Tableau 10 : Les principales caractéristiques des automates de cytologie urinaire.....	48
Tableau 11 : Cristaux urinaires dans l'examen direct des urines.....	56
Tableau 12 : Orientation de la cristallurie et sa signification clinique.....	57
Tableau 13 : Seuils de significativité de la bactériurie en fonction des uropathogènes	62
Tableau 14 : Représentation d'infection urinaire communautaire liées à lithiase d'infection.	63
Tableau 15 : Représentation d'infection urinaire associées à la lithiase d'infection.....	64
Tableau 16 : Caractéristiques des modalités de prélèvements d'hémocultures.....	71
Tableau 17 : Interprétation des résultats d'hémoculture avec prélèvements multiples	72
Tableau 18 : Interprétation des résultats d'hémoculture avec prélèvements uniques.....	73
Tableau 19 : Amorces utilisées dans la PCR et le séquençage d'étude moléculaire	89
Tableau 20 : Taille des calculs urinaire	100
Tableau 21 : Aperçus du pH urinaire chez les lithiasiques et les témoins	107
Tableau 22 : Nombres d'éléments cytologiques par Uri-sed Max	107
Tableau 23 : Le nombre des tests peropérateur en positif ou négatif	108
Tableau 24 : Répartition par famille des microorganismes dans l'ECBU.....	113
Tableau 25 : Fréquence des éléments urinaires dans l'urine pyélique.....	114
Tableau 26 : Fréquence des éléments microscopiques par Uri-sed Max.....	116
Tableau 27 : Fréquence de résistance dans ECBU	119
Tableau 28 : Fréquence (%) de résistance dans l'urine pyélique.....	120
Tableau 29 : Fréquence (%) des résistances dans culture du calcul	121
Tableau 30 : Profils de résistances aux antibiotiques des entérobactéries BLSE positive.....	122
Tableau 31 : Aperçus de similitude et de différence des microorganismes.....	125
Tableau 32 : Calcul d'infection et cristallurie.....	125

Tableau 33 : Fréquence des hémocultures	126
Tableau 34 : Fréquence de l'urosepsis sévère en fonction des tests	127
Tableau 35 : Répartition de l'urosepsis détecté par ECBUP et EBC.....	127
Tableau 36 : Caractéristique des patients avec choc septique ou urosepsis sévère.....	129
Tableau 37 : Cristallurie de récurrence dans la lithiase d'infection.....	130
Tableau 38 : Illustration des gènes chromosomiques de résistance aux antibiotiques	131
Tableau 39 : Illustration des gènes plasmidiques de résistance aux antibiotiques.....	132
Tableau 40 : Résultats phénotypiques et génotypiques de la résistance aux antibiotiques	134
Tableau 41 : Séquences types des <i>K pneumoniae</i> BLSE + dans le calcul urinaire.....	135
Tableau 42 : Principales espèces détectées par la métagénomique dans la pyurie pyélique ..	137
Tableau 43 : Apport de la métagénomique directe dans la pyurie pyélique	139
Tableau 44 : Résultat du séquençage du génome complet d' <i>Enterobacter hormaechei</i>	141

INTRODUCTION

La cristallurie est un phénomène naturel qui contribue à diminuer la sursaturation des substances présentes en très forte concentration dans l'urine. Elle peut être la signature précoce de la présence en excès de certaines substances potentiellement cristallisables susceptibles d'engendrer un processus lithogène associé le plus souvent à des infections-colonisations urinaires.

La recherche de cristaux dans les urines du réveil peut orienter le diagnostic étiologique chez certains patients. Elle peut orienter vers la cause de formation du calcul chez d'autres. Elle permet aussi la surveillance de la récurrence clinique chez le patient lithiasique, estimée par certains auteurs à 50 %. [1.2.3.4.5.6]

La lithiase urinaire est due à la formation d'un calcul dans les reins ou dans le tractus urinaire. Le terme « Lithiase » vient du grec *lithos* (pierre). « Calcul » vient du latin *calculus* (caillou).

Il s'agit d'une affection fréquente qui touche 10 % à 15 % de la population dans les pays industrialisés[1.2.3.7]. Les études épidémiologiques européennes, américaines et asiatiques montrent que sa prévalence a progressivement augmenté au cours des 50 dernières années.

La lithiase d'infection est un calcul lié à une colonisation-infection du tractus urinaire. Elle est le plus souvent liée à des bactéries uréasiques qui sont à l'origine de la formation de calculs composés de phosphate ammoniac-magnésien « Struvite ». Plus rarement, d'autres microorganismes dépourvus d'uréase peuvent favoriser la formation de calculs oxalocalciques, phosphocalciques et de calculs d'acide urique [2.5.8.9.10.11-36].

La lithiase d'infection occupe actuellement une place importante dans la pratique médicale quotidienne dans les services d'urologie, d'uropédiatrie et de néphrologie. Elle représente selon les statistiques disponibles entre 10 à 15 % des lithiases urinaires [1]. Cette proportion est très controversée car, selon les experts, elle est sous-estimée. Les données récentes rapportent sa participation, et parfois son implication, dans des phénomènes complexes et multifactoriels de la formation d'autres types de lithiases ; classées jusque là comme métaboliques.

En Europe, il apparaît que les calculs liés en totalité ou en partie à un processus d'infection des voies urinaires sont en nette progression par rapport au milieu des années 1990, et qu'ils comptent aujourd'hui plus de 20 % des calculs de la femme et environ 6,5 % des calculs chez l'homme [1.2.37.38].

En Algérie, il a été rapporté que la proportion des lithiases d'origine infectieuse représentait 40 % chez des enfants opérés pour pathologie lithiasique, ces lithiases étant le plus souvent associées à des malformations urinaires de stase. Les principaux agents bactériens objectivés grâce à un Examen cytbactériologique d'urine (ECBU) antérieur étaient des entérobactéries du genre *E.coli* et *Proteus.sp* [1.2.3.7].

L'évolution des outils de diagnostic radiologique, biochimique, génétique et microbiologique, notamment l'ECBU, la culture du calcul et/ou de l'urine pyélique et la cristallurie permettent actuellement l'exploration et la prévention précoce de la lithiase urinaire d'infection.

La lithiase d'infection a bénéficié des mêmes approches thérapeutiques actuelles des pathologies lithiasiques.

La disponibilité et l'efficacité des traitements médicamenteux, notamment les anti-urésiques, les antibiotiques (les β -talactamines) et ceux de la chirurgie, tels que les techniques endourologiques (urétéroscopie et néphrostomie percutané), ont permis de prendre en charge les lithiases d'infection dans des délais très courts avec des résultats satisfaisants.

Cependant, des complications à fort risque infectieux dues à la nature de la lithiase et son caractère infectieux endogène (lithiase piégée) peuvent apparaître et être très redoutables, engageant le pronostic vital des patients avec un taux de mortalité avoisinant les 60 % lors d'un choc septique [1.7.39-43].

La prise en charge adéquate de ce type de lithiase ne peut se faire sans la compréhension de son étiopathogénie basée principalement sur l'étude propre de la lithiase et de son profil cristallurique.

La connaissance de la vraie écologie microbiologique par culture du calcul urinaire a pour but d'identifier les germes multi-résistants enchâssés ou colonisant le calcul. Cette approche permet d'établir le profil épidémiologique phénotypique ou moléculaire nécessaire dans la prévention des complications infectieuses ou fonctionnelles et les conditions nécessaires du contrôle de la récurrence.

L'utilisation de la biologie moléculaire permet le diagnostic, la surveillance épidémiologique et la prévention de la dissémination des germes multi-résistants, et les mécanismes de résistance au niveau des structures hospitalières.

En Algérie, aucune étude microbiologique n'a été entreprise pour évaluer l'aspect épidémiologique et microbiologique de la lithiase d'infection. Il n'existe pas de données sur le profil cristallurique de ce type de pathologie ni sur l'épidémiologie moléculaire des germes associés.

Notre principal objectif est de décrire l'apport de la cristallurie et l'impact de l'étude microbiologique (phénotypique et moléculaire) du calcul urinaire et/ou de l'urine pyelique dans la prise en charge de la lithiase urinaire d'infection.

DONNEES DE LA LITTERATURE

1. Rappel anatomique de l'appareil urinaire

1.1. Rein

Le rein est comparé à un haricot dont le hile est situé à la partie moyenne de son bord interne creusé d'une cavité appelée le sinus rénal. Il mesure en moyenne 12 cm de hauteur, 6 cm de largeur et 3 cm d'épaisseur (Figure 1).

Le rein est constitué d'une région externe : le cortex ; d'une région interne : la médulla, ainsi que d'une cavité centrale : le bassinot, qui assure la collection de l'urine avant de l'évacuer vers la vessie par l'intermédiaire de l'uretère.

Les reins sont des organes richement vascularisés ; l'artère et la veine rénale assurant leur irrigation possèdent des ramifications très développées. Les unités de filtration élémentaires, ou néphron, sont situées dans le cortex et la médulla, et sont au nombre d'environ 1,2 million de néphrons par rein.

1.1.1. Rapports du rein : Les rapports du rein se présentent comme suit :

- Les rapports postérieurs (Figure 1) :
 - ✓ Sur la moitié supérieure : le diaphragme et les culs-de-sac pleuraux ;
 - ✓ Sur la moitié inférieure : la paroi lombaire avec le psoas et le carré des lombes.
- Les rapports antérieurs :
 - ✓ En avant, par l'intermédiaire du péritoine, et les viscères péritonéaux correspondant :
 - * À droite : foie, côlon droit et D2 du duodénum ;
 - * À gauche : queue du pancréas, rate et côlon gauche.
- Les rapports médiaux ou internes :
 - ✓ Le rein droit, par son bord médial, entre en rapport, de haut en bas, avec :
 - * Les gros vaisseaux du tronc représentés par la veine cave inférieure ;
 - * Le pédicule rénal.
 - ✓ Le rein gauche a des rapports internes représentés essentiellement par l'aorte abdominale.

– Les rapports latéraux ou externes :

Le bord externe du rein répond au diaphragme et à la ligne de réflexion du péritoine pariétal postérieur. Il en est de même pour le rein gauche [44.45] .

1.1.2. Vascularisation rénale

Les reins ont de part et d'autre de gros vaisseaux pré-vertébraux auxquels ils sont reliés par leur pédicule.

– **Artère rénale** : les artères rénales naissent de la face latérale de l'aorte à la hauteur du disque intervertébral L1-L2, se terminent habituellement en se divisant en deux branches avant d'atteindre le hile : antérieure ou pré-pyélique et postérieure ou rétro-pyélique qui contourne le bord supérieur du bassin. Ces deux branches se subdivisent et forment : une arborisation pré-pyélique en avant du bassin et des calices.

- **Veines rénales** : La vascularisation veineuse est de type anastomotique. Du parenchyme sortent les veines interlobaires entre les pyramides de Malpighi, et se réunissent pour former les branches intra-sinusales qui se disposent en deux plans pré- et rétro-pyélique. Ces branches intra-sinusales se réunissent pour former la veine rénale. Celle-ci se moule sur la face antérieure de l'aorte (pince aorto-mésentérique).

1.2. L'uretère

L'uretère est un long canal musculo-membraneux, cylindrique, étendu du bassin à la vessie. Sa longueur varie avec l'âge : 6 cm à la naissance, 9 cm à 1 an, 12 cm à 2 ans, 14 cm à 6 ans, 20 cm à 12 ans, pour atteindre chez l'adulte de 25 à 30 cm, dont 10 cm au niveau lombaire, 3 cm au coude iliaque, 12 cm sur le segment pelvien, 3 cm pour le segment intra-pariéto-vésical [44.45].

1.2.1. Segments de l'uretère

Ils présentent trois portions :

– L'uretère lombo-iliaque

Il naît au niveau de la deuxième vertèbre lombaire et descend vers le pelvis en traversant la région rétro-péritonéale latérale et en se projetant au niveau des sommets des processus transverses ; des vertèbres lombaires. Le plus habituellement, cette portion se termine en croisant les vaisseaux iliaques externes du côté droit et les vaisseaux iliaques primitifs du côté gauche. Là encore, il existe un rétrécissement de calibre.

– **L'uretère pelvien**

Il présente une première partie pariétale où l'uretère est plaqué contre les muscles de la paroi pelvienne interne avec un trajet descendant courbe et concave en avant. Puis la deuxième portion devient viscérale, dirigée horizontalement vers l'avant et croisant le plexus hypogastrique inférieur à l'origine de l'innervation des organes pelviens. Les rapports diffèrent alors chez l'homme et chez la femme.

– **L'uretère intra-mural ou intra-vésical**

Il comprend les derniers centimètres qui traversent la paroi vésicale en « chicane », ce qui forme une valve anti-reflux empêchant les urines de remonter vers les uretères.

Les uretères s'abouchent alors dans le trigone vésical par les méats urétéraux.

1.2.2. Vascularisation, innervation et drainage lymphatique

- **Les artères** : les artères de l'uretère naissent successivement, de haut en bas, de l'artère rénale, l'artère spermatique ou urétero-ovarienne, l'artère iliaque primitive, l'artère vésicale, l'artère vésiculo-différentielle ou artère utérine.
- **Les veines** : les veines se jettent dans les veines rénales, capsulaires, spermatiques ou utéro-ovariennes, vésicales inférieures.
- **Les nerfs** : l'innervation de l'uretère est sous dépendance végétative. Elle provient des plexus rénaux pour l'uretère lombo-iliaque, du plexus hypogastrique pour l'uretère pelvien.
- **Drainage lymphatique** : les lymphatiques de l'uretère se rendent pour le segment lombo-iliaque jusqu'aux ganglions latéro-aortiques à gauche et aux ganglions latéro-caves et inter-aortico-caves à droite, aux ganglions hypogastriques pour l'uretère pelvien et, pour la portion intra-mural, aux ganglions vésicaux.

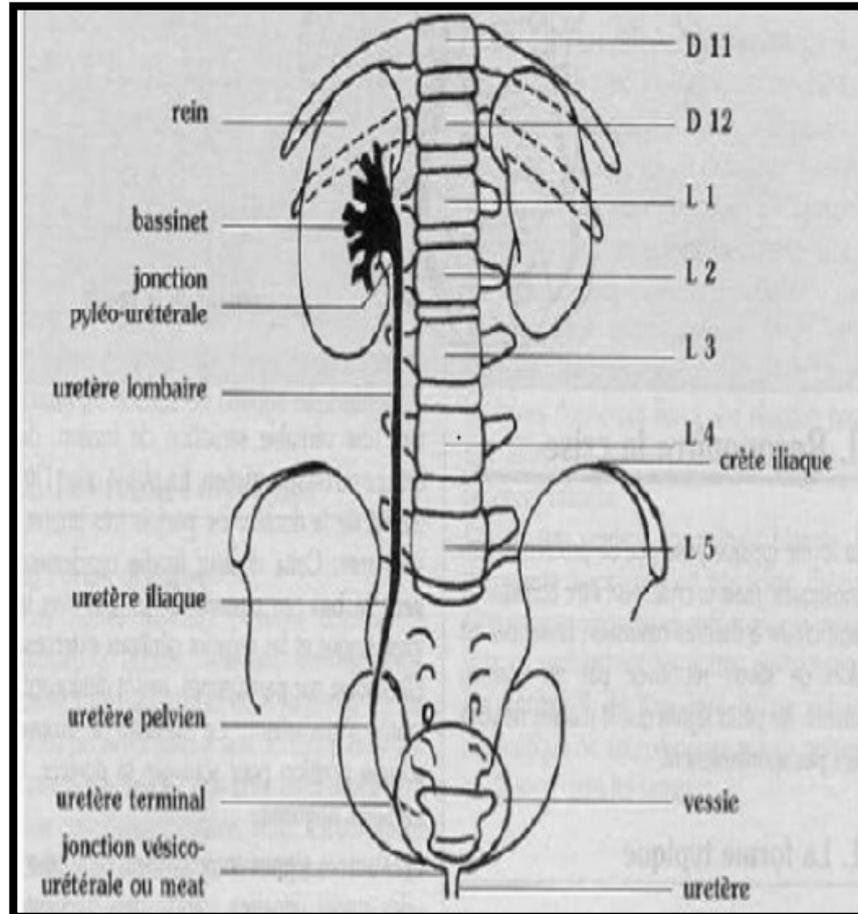


Figure 1 : Image montrant les différents segments des uretères.

2. Physiologie de l'appareil urinaire

2.1. Filtration glomérulaire

Dans la capsule de BOWMAN, le sang du glomérule, l'eau et les substances dissoutes, à l'exception des protéines, sont filtrés en dehors des capillaires, correspondant à la première étape de la formation de l'urine. Environ 180 litres de filtrat glomérulaire sont formés chaque jour, soit environ 65 fois le volume plasmatique. Le liquide passant par filtration des capillaires glomérulaires à la capsule de Bowman doit traverser la membrane basale glomérulaire constituée par la paroi des capillaires glomérulaires.

La paroi glomérulaire est constituée d'une seule couche de cellules épithéliales et est perforée de nombreux pores. Le feuillet interne de la capsule de BOWMAN est fait de podocytes dont les nombreuses ramifications et pédicelles s'enchevêtrent avec les pédicelles des podocytes voisins. Pendant la réabsorption tubulaire et le passage du filtrat dans le tubule, de nombreuses substances repassent dans le plasma : c'est la réabsorption tubulaire. Les substances réabsorbées passent dans les capillaires péri-tubulaires et la circulation veineuse puis recirculent

dans le même circuit. Environ 178,5 sur 180 litres filtrés sont réabsorbés; la différence de 1,5 litre est éliminée sous forme d'urine.

2.2. Sécrétion tubulaire

Il s'agit du transport sélectif de substance du sang des capillaires péri-tubulaires vers la lumière du tubule. La sécrétion tubulaire est le mode d'élimination sélective de substances contenues dans 80 % du plasma circulant dans les capillaires péri-tubulaires. Ces substances s'ajoutent à la substance filtrée dans le glomérule. L'excrétion consiste en l'élimination hors de l'organisme de tous les constituants du plasma filtrés ou secrétés qui ont gagné les tubules et n'ont pas été réabsorbés.

2.3. Fonction exocrine du rein

Il assure le maintien du bilan et de la composition (concentration) ionique d'un grand nombre d'ions mono ou divalents Na, K, Ca, Mg, Cl, Li, CO_3 , PO_4 . Cette fonction dite homéostatique est assurée par la filtration glomérulaire et la modification tubulaire. Le rein prend en charge l'élimination des toxines (les médicaments en général) ainsi que leurs métabolites (révélés lors du microbiome urinaire). Le mécanisme d'élimination (sous forme de cristaux urinaires) varie selon la substance considérée (filtration glomérulaire et modification tubulaire) ; de ce fait, le rein est la voie principale d'excrétion des déchets métaboliques non volatils, certains d'entre pouvant être potentiellement toxiques.

2.4. Fonction endocrine du rein

Il s'agit d'un rôle important dans la régulation endocrine du volume extracellulaire et de la pression artérielle par la rénine, ainsi que par les prostaglandines rénales ; notamment PGI_2 PGI_2 qui jouent un rôle important dans l'adaptation de la microcirculation rénale en cas d'hypo-volémie et dans l'excrétion rénale du sodium (cristaux d'urate de sodium).

Le rein héberge trois populations principales de cellules endothéliales avec des architectures et des fonctions distinctes. Les cellules endothéliales sont reliées par les jonctions intercellulaires et prolongées dans la direction de l'écoulement du sang glomérulaire. Elles sont fortement fenêtrées et couvertes sur leur surface luminale par un glycocalice épais, qui participe au tamisage de la barrière glomérulaire de filtration.

LITHIASSE URINAIRE D'INFECTION

1. Historique

L'existence de la lithiase urinaire est connue depuis la plus haute Antiquité. Un calcul vésical a été découvert parmi les os du bassin d'un garçon de 15 ans vivant à « El-Amrah », en Haute-Égypte, 4800 ans avant notre ère. Des calculs rénaux ont été découverts en regard des vertèbres lombaires chez un homme, dans un tombeau égyptien de la seconde dynastie datant de 4400 av. J.-C. La momie de Ramsès II contenait un calcul en position pelvienne [31.32]. Deux types de lithiases bien distinctes sont à signaler, d'une part la lithiase urique, chez les adultes des classes aisées et, d'autre part, la lithiase phosphatique, voire phosphocalcique (ou infectieuse), chez les enfants des classes pauvres [1.2].

Jusqu'au XIX^e siècle, les calculs vésicaux ont été retirés par le périnée (zone située entre les organes génitaux et l'anus), opération effectuée sans anesthésie. Il y avait un risque élevé de décès par saignement ou infection. La position de lithotomie est de nos jours toujours utilisée pour décrire la position dans laquelle les patients sont placés pour une intervention chirurgicale.

Le projet suivant a été la fragmentation trans-urétrale du calcul urinaire. Cela a été réalisé à l'aveugle. Certains chirurgiens ont rapporté avoir passé un clou dans l'urètre pour fissurer le calcul.

Plus tard, des dispositifs de lithotritie ont été développés pour saisir et écraser le calcul urinaire avant de le retirer via l'urètre (pipe à eau). Au cours des 30 dernières années, de grands progrès ont été faits dans la technologie utilisée pour traiter les calculs rénaux. Au début des années 1980, les premiers lithotripteurs ont été utilisés en clinique et, au cours des 20 dernières années, des urétéroscopies flexibles et semi-rigides ont été développées pour rechercher à l'intérieur de l'uretère des calculs rénaux et fragmentaires.

La néphrolithotomie percutanée (PCNL) a également été mise au point en tant que méthode mini-invasive pour éliminer les grosses pierres du rein. Ces procédures sont généralement très sûres et efficaces pour éliminer les calculs urinaires, notamment d'infection (Figure 03).

La situation actuelle dans les pays en développement reproduit quelque peu l'évolution observée dans les pays occidentaux cent ans auparavant. Dans les zones rurales pauvres, la lithiase vésicale du jeune garçon est toujours endémique, de même qu'en Europe avant l'ère industrielle. Dans les zones urbaines, la lithiase rénale oxalocalcique gagne en fréquence au fur

et à mesure de l'urbanisation, de l'élévation du niveau de vie et de l'adoption du mode d'alimentation occidental. La lithiase urinaire apparaît désormais comme une maladie des sociétés d'abondance, au même titre que l'obésité et l'hypertension artérielle, auxquelles elle est d'ailleurs souvent associée (Figure 02).

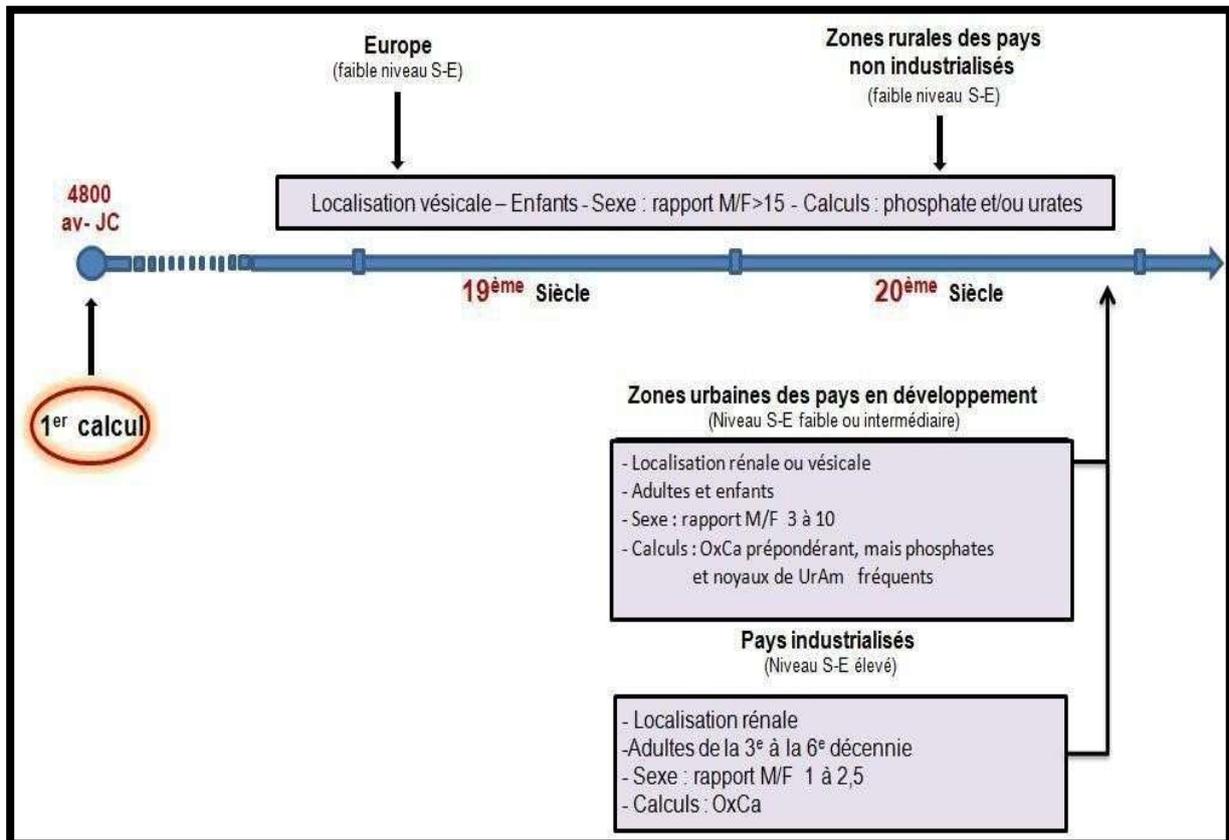


Figure 02 : Évolution de la lithiase urinaire.

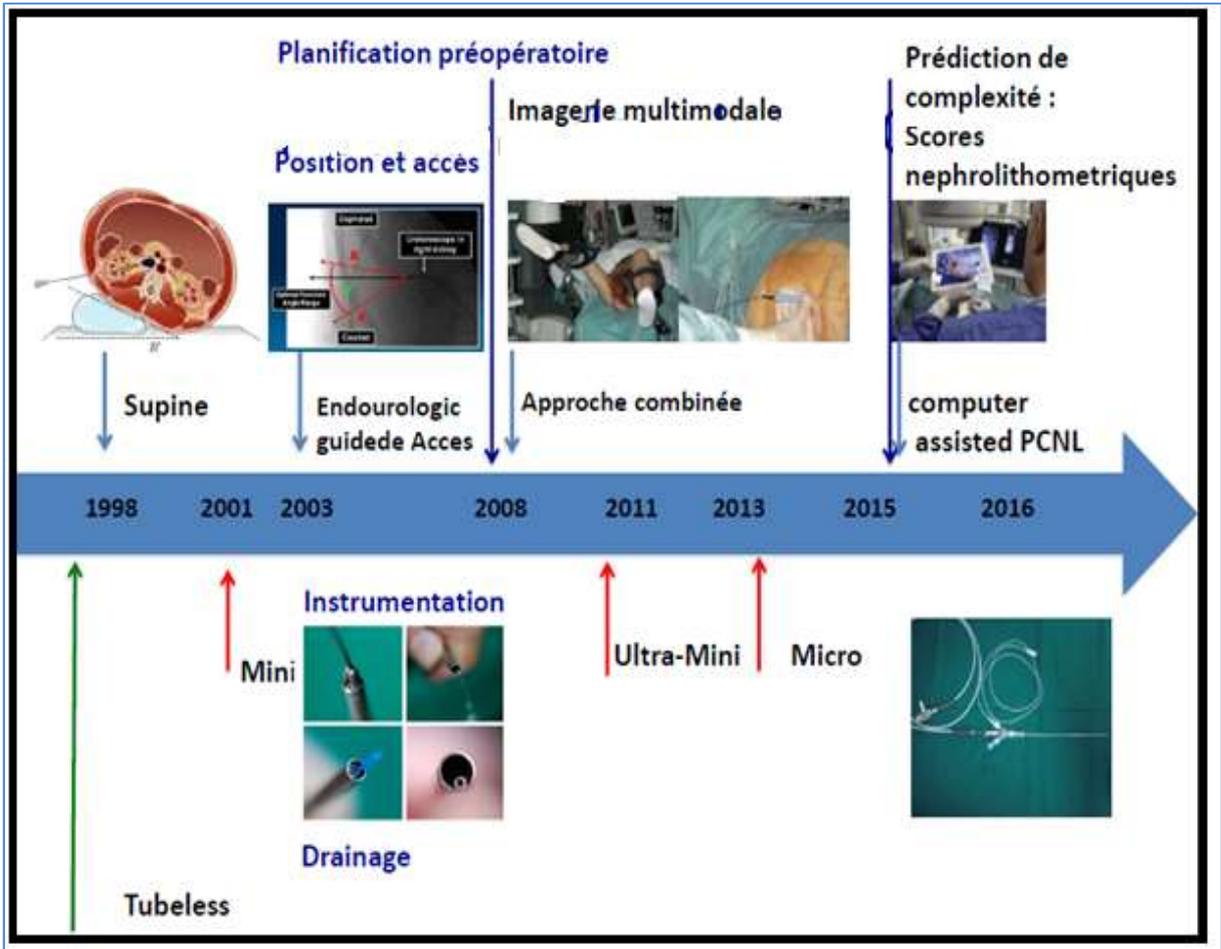


Figure 03 : Évolution thérapeutique de la lithiase urinaire.

2. Définition

La lithiase urinaire est due à la formation de calculs dans les reins ou les voies urinaires. Pendant longtemps, la lithiase urinaire a été appelée « maladie de la pierre ».

Elle était souvent aussi désignée sous le nom de « gravelle », car les concrétions d'acide urique trouvées dans les urines ressemblaient à du petit gravier.

Elle est la résultante de la sommation de facteurs endogènes et environnementaux, classés selon la nature morphologique et biochimique, rapportés dans le tableau 01, ci-dessous [1.2.3.7.37].

Tableau 01 : Nouvelle classification de la lithiase urinaire

Calcul urinaire	Composition	Formation-pH	Fréquences %	Facteurs de risque
Calcul calcique Hétérogène	Whewellite C1 : <i>Oxalocalcique monohydraté</i> weddellite C2 : Oxalocalcique dihydraté Phosphocalcique : <i>Carbapatite (PACC)</i> <i>Bruschite</i> <i>Whitlockite</i>	80 % Mixte : oxalocalcique et <i>phosphocalcique</i> 06 < pH ≤ 07	70-80 %	Hypercalciurie Hyperoxalurie (C1 et <i>Oxalobacter. sp</i>) Hypocitraturie pH alcalin ≥ 06 + hypercalciurie (calcul phosphate)
Calcul urique	C ₃ H ₂ N ₄ O ₃	pH acide < 5	10-15 %	pH acide Hyperuricurie (infection par des levures)
Calcul de struvite	Mg NH ₄ PO ₄ ·6 H ₂ O	Infection du calcul associée ou pas à la <i>carbapatite</i>	10-15 %	Infection du calcul à germe urealytique direct ou indirect (plasmide optionnel)
Autres : génétique, calcul cystinique Médicamenteux	C ₃ H ₁₂ N ₃ O ₄ S ₂	Défaut d'absorption de la cystine - Cristallisation Hypercystinurie	1-2 % (cystine < 1%)	Excès de cystinurie Surdosage ou intoxication Mauvaise clearance des antibiotiques - Volume urinaire bas

La lithiase urinaire d'infection est le plus souvent liée à l'infection-colonisation urinaire chronique avec un taux de 15 à 20 % [1.2.11]. Elle pose un sérieux problème médical et sociétal, en particulier en raison du taux de récurrence clinique qui peut dépasser les 50 % de cas [1.2.6.7.9.46].

Elle n'est pas dénuée de complications parfois fatales. Cette lithogénèse infectieuse est connectée aux multiples espèces de micro-organismes colonisant ou infectant le tractus urinaire avec leur virulence et leur résistance.

3. Étude épidémiologique de la lithiase d'infection

L'étude biochimique du calcul urinaire faite par Bouslama en 2015 (Tableau 02) révèle que le taux d'oxalate de calcium est de 83,6 %, suivi par des taux de calcul infectieux phosphocalcique de 15,1%, et de Struvite pure de 11,1 %. Cette progression des calculs

d'infection est rapportée récemment chez l'homme aux États-Unis. Des enquêtes épidémiologiques répétées conduites dans la région de Rochester entre 1970 et 2000 ont montré que l'incidence des épisodes lithiasiques symptomatiques était de 47,8 à 77,7 pour 100 000 chez les femmes, soit une augmentation de 62 %, tandis qu'elle avait diminué chez les hommes, si bien que le sex-ratio s'est réduit de 3,1 à 1,3 en 30 ans [47].

Tableau 02 : Répartition mondiale des types de lithiases urinaires (toutes natures confondues).

Pays	Europe				Amérique du nord	Amérique du sud	Afrique		
	Allemagne	France	Espagne	Russie	États-unis	Brésil	Algérie	Tunisie	Afrique du sud
Références	[25]	[1]	[100]	[101]	[77]	[47]	[49]	[18]	[102]
Calculs calciques	78	85.4	73.8	86.8	ND	75.1	83.6	ND	ND
Oxalates de calcium	ND	71.8	49.1	66	68.6	65.1	68.5	58.6	60.8
Phosphates de calcium	ND	13.6	2.9	20.8	10.3	10	15.1	8.9	4.6
Calculs mixtes	ND	ND	24.7	ND	8.6 ^a	ND	ND	ND	13.1
Struvite/ Calculs d'infection	6	1.3/3.5 ^b	ND	ND	ND	6.7	3.9/11.1 ^b	3.8	9.2

a : Struvite et cystine. b : Struvite pure. ND : non déterminé

Dans les pays développés, la lithiase vésicale de l'enfant ne représente que 5 à 10 %. En revanche, elle est plus fréquente dans les pays en voie de développement. Aux États-Unis, la prévalence des hospitalisations des enfants pour calcul urinaire varie selon les états. Elle est actuellement en augmentation selon Kroovand et Stapleton. Au Royaume-Uni, l'incidence chez l'enfant est estimée à 2/100 000, alors qu'elle est de 2/1000 chez l'adulte. En France, près de 300 000 personnes sont concernées chaque année. Chez l'enfant, les cas sont beaucoup plus rares, et on estime qu'ils sont 50 à 100 fois moins fréquents que chez l'adulte. La lithiase vésicale de l'enfant représente encore 37,2 % des lithiases pédiatriques. Plus de 69 % des cas ont une lithiase haute. Ce qui nous conduit vers un profil épidémiologique intermédiaire entre les pays développés et les pays en voie de développement [1.7.9.48].

Il apparait également que les calculs liés en totalité ou en partie à un processus d'infection des voies urinaires sont en nette progression par rapport au milieu des années 1990 et qu'ils comprennent aujourd'hui plus de 20 % des calculs de la femme et environ 6,5 % des calculs de l'homme [1]. Un des arguments en faveur d'une origine partagée de phosphate de calcium (soit infectieuse) interstitielle et tubulaire formant la plaque de Randall à la surface de la papille rénale, peut être tiré de l'examen du taux de carbonatation des apatites, marqueur biochimique pathognomonique d'infection du calcul, constitutive des plaques isolées de la surface des calculs. Ce taux de carbonatation a révélé une très grande hétérogénéité suggérant que, chez certains patients, la plaque était presque entièrement d'origine interstitielle sur la base d'une carbonatation élevée $\geq 20\%$, alors que, dans d'autres cas, la faible carbonatation ($< 10\%$) était plutôt en faveur d'une origine intra-tubulaire. [1.2.4.7]

Les études biochimiques (morpho-constitutionnelles et à spectrophotométrie infrarouge) réalisées dans les régions de l'Est, de l'Ouest et du Sud-ouest algériens, associés à la lithiase d'infection (calcul infectieux mixte), peuvent être représentées dans le tableau 3, ci-après :

Tableau 03 : Fréquence de la lithiase urinaire d'infection en Algérie

Caractéristiques / études	Djelloul et al., 2006 [125]	Sebahi et al., 2017 [3]	Habbani et al., 2016 [50]	Sekkoum et al., 2012 [51]
Nombre de calculs analysés	1354	119	82	62
Sex-ratio	H/F 2,23	H/F 2,23	H/F 1,75	1,43
Région	Sidi –Bel-Abbass	Mostaganem	Constantine	Bechar, Beyad
Lithiase Oxalocalcique -wedhellite -whewellite	(50,3 % - 16,7 %)	(52,1 % - 17,1 %)	(49,4 % -12,3 %)	58,1 % Oxalocalcique
Lithiase d'infection	carbapatite : 14,1 % Struvite : 4,8 %	carbapatite : 10,3 % Struvite : 7,7 %	carbapatite : 25,8 % purine : 12,9 %	carbapatite : 1,1 % Struvite : 8,6 %
Lithiase urique	8,8 %	6,8 %	13,5 %	12,9 %

4. Étiopathogénies de la lithiase urinaire d'infection

L'examen des urines a été l'une des premières méthodes utilisées par les médecins pour une recherche diagnostique, étiologique et pronostique des maladies, notamment la lithiase urinaire. La lithiase urinaire répond à des mécanismes et des processus complexes et multifactoriels d'agglomération de cristaux urinaires liés par une matrice organique pouvant être infectieuse, métabolique, ou les deux à la fois. La lithogénèse comporte plusieurs phases qui s'expriment successivement ou simultanément et qui conduisent au développement d'un calcul dans les voies urinaires.

Les calculs urinaires sont donc composés d'une agglomération de cristaux liés par une matrice protéique.

4.1. Facteurs étiopathogéniques

4.1.1. Infection-colonisation urinaire dans la lithiase d'infection

L'infection urinaire est l'inflammation du tractus urinaire à l'occasion d'une colonisation par un micro-organisme d'origine digestive. Le plus souvent, elle se définit par la présence dans les urines d'un micro-organisme à une concentration supérieure à 10^5 / ml. [11.52]

La classification, selon le NIH (National Institute of Health) a un intérêt pour l'exploration microbiologique de la lithiase d'infection selon les organes atteints, notamment la vessie.

4.1.1.1. Prostate et rein

– **Cystite** : Il s'agit d'une infection, strictement vésicale, qui associe dysurie, pollakiurie et brûlures mictionnelles, sans fièvre ou douleurs lombaires. On parle de cystite récidivante lorsqu'il existe au moins quatre épisodes par an ou un dernier épisode datant de moins de trois mois.

La cystite est due à la présence de bactéries confinées dans le réservoir urinaire, le plus souvent associées à une pyurie et à une hématurie, pouvant s'accompagner d'une véritable infection urinaire lithiasique par lésion du parenchyme du tractus urinaire. L'infection peut être classée comme simple ou compliquée. La cystite non compliquée s'observe en l'absence d'anomalies fonctionnelles, en dehors de la grossesse et d'exposition aux dispositifs médicaux (les cathéters urinaires). La cystite simple se manifeste chez les hommes et les femmes, mais est principalement présente chez les jeunes femmes, avec une incidence de 0,5-0,7 épisode par personne annuellement. [11.52]

– **Urètre** : Le syndrome urétral : il se présente chez la femme par un tableau clinique de cystite avec dysurie et pollakiurie alors que l’ECBU ne révèle aucune bactériurie significative.

Dans certains cas, il peut s’agir d’une infection urinaire débutante ou pauci-bactérienne, et l’éventualité d’une urétrite à *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* ou à Mycoplasmes dont *Mycoplasma genitalium* doit être envisagée.

– **Prostatite** : elle se définit comme l’inflammation de la glande prostatique avec augmentation des cellules inflammatoires dans les sécrétions exocrines.

Elle peut être aiguë et donc témoigner d’une infection bactérienne active, de survenue brutale, avec des signes urinaires francs associés à une hyperthermie nette, ou bien chronique, caractérisée par la persistance d’agents pathogènes dans les voies séminales et urinaires difficilement accessibles au traitement antibiotique. Les signes cliniques sont alors sourds, et le patient souvent apyrétique. Il faut enfin distinguer la prostatite de la prostatodynie, terme plus général qui regroupe des symptômes prostatiques non spécifiques (classification du NIH).

– **Pyélonéphrite** : C’est une inflammation microbienne du parenchyme rénal et/ou des cavités pyélo-calicielles (tube collecteur, calices, bassinet), précédée ou non de cystite.

La pyélonéphrite aiguë (PNA) est un état inflammatoire transitoire d’origine infectieuse, atteignant le rein et sa voie excrétrice, responsable d’un œdème, d’un afflux leucocytaire et d’une ischémie localisée du parenchyme rénal.

L’infection urinaire masculine peut devenir grave lors de sepsis, ou de choc septique, de drainage ou d’intervention uro-chirurgicale (hors sondage vésical simple). Chez l’homme, l’infection urinaire est toujours à risque de complications, du fait de la fréquence des anomalies anatomiques ou fonctionnelles sous-jacentes avec un impact direct de passage à la chronicité par le potentiel rapide de l’infection de la paroi de la prostate et du non-respect des modalités du traitement adéquat selon l’antibiogramme durant la phase initiale.

Parfois, une véritable pyélonéphrite, liée à une lithiase urinaire d’infection ou non, peut être un signe de cystite souvent discrète, précédant de quelques jours la PNA, accompagnée de fièvre ou de frissons (provoqués par palpation ou empâtement des fosses lombaires) et, parfois, de signes digestifs (vomissement, diarrhée, météorisme abdominal) au premier plan.

Par exemple, en cas de signe de gravité lors d’une lithiase urinaire d’infection obstructive ou non, l’infection urinaire peut être révélée par une pyélonéphrite aiguë grave obstructive avec bactériémie constante ou d’urosepsis où l’ECBU montre le plus souvent une leucocyturie. La

culture permet l'identification d'un germe urésique ou non (*E.coli*) dans environ 75 % des cas. Une bactériurie inférieure $10^5/ml$ est ici significative. L'ECBU peut être stérile dans 25 % des cas [2.4.5.9], sans oublier la bactériurie asymptomatique avec présence de micro-organismes dans l'urine ou le tractus urinaire et une leucocyturie ($\geq 10^4/ml$).

Les bactéries pathogènes virulentes notamment l'*Escherichia coli* uropathogène (UPEC) concernent 80-90 % des cas (Tableau 04) ; le *Staphylococcus saprophyticus* est responsable de 5-10 % des infections ; on peut également compter les uropathogènes *Enterococcus sp*, *Streptocoque agalactie*, *Proteus mirabilis* et *Klebsiella pneumoniae*. Puisque le traitement de telles infections est fortement dépendant du mécanisme d'action des agents suscités, il est important de connaître la pathogénie de ces derniers, responsables de la cystite simple. Ici, nous décrivons le facteur de virulence utilisé par *ECUP*, *S. saprophyticus*, *Entérocoque faecalis* et *S. agalacties*. [7. 11.52.53]

La pyélonéphrite est plus fréquente chez les femmes que chez les hommes, cela est dû à un urètre plus court. Les BGN tel que l'*E.coli* représentent la majorité des bactéries tandis que des espèces de *klebsiella* et des espèces de *Proteus* constituent les deuxièmes et troisièmes bactéries les plus communes. Les Bactéries à Gram positifs telles que le *S. saprophyticus*, *E.faecalis*, *S.agalacties* et la tuberculose (mycobactérie) sont également impliquées dans des cas rares de pyélonéphrite.

Dans la voie ascendante les bactéries migrent vers le haut par l'action du reflux de réservoir de la vessie et dans une certaine mesure par les flagelles qui permettent le mouvement bactérien.

En outre, l'obstruction de l'écoulement physiologique de l'urine contribue également à la conservation de l'urine colonisée ou infectée dans la vessie qui peut se propager en amont vers les reins ou la prostate en passant par les canaux éjaculateurs et donner une prostatite. Il faut signaler également la notion d'infection iatrogène, lors de manœuvres instrumentales (cystoscopie, cathétérisme vésical, sondage vésical...).

- **Pyonéphrite** : c'est un abcès du rein. Il s'agit en fait le plus souvent d'un aspect évolutif de la pyélonéphrite, dans lequel les lésions ont fini par s'excaver.
- **Pyonéphrose** : C'est l'infection des cavités et du parenchyme rénal en amont d'une lithiase d'infection (à germe anaérobie) avec destruction rapide voir sournoise du parenchyme rénal.

–

En revanche, le parenchyme rénal peut parfois être infecté par passage des bactéries dans la circulation sanguine (bactériémie) grâce à des récepteurs spécifiques ou à des adhésines (fimbria ou pili). [7.11.52.53]

En dépit de la différence dans les mécanismes d'infections, tous les mécanismes sont employés par le même ensemble de bactéries (*E.coli*, espèces de *klebsiella*, et espèces de *Proteus*). Il est important de noter, que la plupart des mécanismes de virulence des bactéries uropathogènes se concentrent sur le mécanisme bien connu d'*E.coli*. Cependant les espèces suivantes : *k.pneumoniae* et *P.mirabilis*, sont des espèces complètement différentes, mais partagent des mécanismes semblables de virulence dans la pyélonéphrite.

Dans le cas par exemple de la colonisation du calcul urinaire par voie ascendante, ces bactéries proviennent du microbiote intestinal et lors de l'introduction dans l'urètre, ces derniers peuvent se disséminer vers le haut via la vessie par l'utilisation des flagelles, Andésine, fimbriae de type P (pyélonéphritogène) et fimbriae de type 1.

Ces structures bactériennes favorisent l'attachement de ces uropathogènes à l'urothelium et protègent les bactéries contre l'écoulement urinaire. À titre d'exemple, cette adhérence s'effectue par l'interaction des LPS-TLR4 (antigène bactérien et médiateur de l'inflammation). La rupture des cellules de sang par des hémolysines déclenche le céramide signalant les voies d'activation des cytokines pro-inflammatoires (principalement IL-6 et IL-8) et chemokines (Cc-chemokines), entraînant un recrutement des cellules immunitaires.

Pour surmonter ce défi, les uropathogènes expriment le polysaccharide capsulaire (LPS) à leur surface. Ce dernier forme une couche protectrice épaisse qui empêche leur opsonisation et phagocytose par le complément et les macrophages activés, respectivement. L'infection bactérienne étant la cause de la pyélonéphrite, les dommages tissulaires ne sont pas nécessairement provoqués par les bactéries elles-mêmes, mais plutôt, par la réaction immunitaire qu'ils activent. Il est connu que, *P.mirabilis* et quelques espèces d'*E.coli* expriment l'uréase, une enzyme qui décompose l'urée en ammoniac dans l'urine entraînant une élévation significative du pH urinaire.

Ce processus peut mener à la cytotoxicité de l'épithélium rénal et à l'augmentation du pH urinaire, la précipitation du phosphate d'ammonium de magnésium et la formation de lithiase d'infection pure (de Struvite). Dans certains cas, ces calculs peuvent se développer rapidement et former des lithiases infectieuses compliquées, qui peuvent bloquer en grande partie la fonction rénale. [1.2.6.7.9]

Tableau 04 : Espèces associées dans les infections-colonisations du tractus urinaire

Espèces	Infections urinaires communautaires		Infections urinaires associées aux soins		
	Femmes de 15 à 65 ans	Tout patient	Cathéter urinaire		Tout patient Données cumulées
/	%	Données cumulées	Non (%)	Oui (%)	
<i>E.coli</i>	75-80	66-75	40-54	25-40	31-50
<i>Proteus sp</i>	4-5	4-6	5.5-7	5-7	5-7
<i>Klebsiella sp</i>	2-3	4-5	7.5-10	7.5-10	7.5-10
<i>Citrobacter sp</i>	1-2	1-2	2.5	3	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.5	0.5-3	4-5.5	10-10.2	7-8
<i>Acinetobacter sp</i>	0.1	0.2	< 1	1	< 1
<i>Enterococcus sp</i>	2-4	3-8	6.5-16	10-13	7.5-14
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2-4	2-3	2.5	-	< 1
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.5	0.5-1	2.5-3	4-5.5	3.5
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1-4	2	< 1	< 1	< 1
Autres <i>Staphylococcus</i> à coagulase négatif	1	2	3	2	2
<i>Candida sp</i>	< 0.5	2	< 1-7	2.5-16	13

Une étude effectuée à Alger en 2006 (Hôpital Beni-Messous), chez des enfants de 1 mois à 16 ans qui consultaient pour une infection urinaire, a donné des résultats différents entre infections survenant sur appareil urinaire sain et sur uropathies préexistantes [53].

Tableau 05 : Fréquence des bactéries selon le type d'infection urinaire.

	Appareil sain	Anomalies ou uropathies
<i>E.cloacae</i>	0	6
<i>E.coli</i>	75	49
<i>K.pneumoniae</i>	9	16
<i>M.morgani</i>	0	5
<i>P.mirabilis</i>	11	15
<i>P.vulgaris</i>	0,1	2
<i>P.aeruginosa</i>	0	5
<i>S.aureus</i>	0,1	0,5
SCN	2	1
<i>Streptococcus</i>	2	1

4.1.2. Facteurs de risque de l'infection urinaire

Les facteurs de risque ont été revisités :

- **La grossesse** : trouble hormonaux et modification anatomique favorisant la stase urinaire ;
- **L'anomalie organique ou fonctionnelle de l'arbre urinaire** (notamment la lithiase urinaire d'infection) ;
- **L'immunodépression sévère** ;
- **Chez les sujets âgés**, selon les critères de Fried, la perte de poids involontaire au cours de la dernière année, la vitesse de marche lente, la faible endurance, la faiblesse ou la fatigue sans effort, l'activité physique réduite et l'âge > 75 ans (sauf exception) ;
 - **L'indication à un drainage chirurgical ou instrumental des voies urinaires** (hors sondage vésical simple).

Actuellement, selon les recommandations des sociétés savantes (Haute Autorité de santé), le diabète n'est plus considéré comme un facteur de risque de complication infectieuse. [52.53]

4.2. Agents pathogènes associés à la lithiase d'infection

Plusieurs auteurs, lors de l'évaluation microbiologique, ont révélé la présence de différents miro-organismes uréalytiques ou non (Tableau 06) qui pourraient être associés à la lithogénicité infectieuse. L'évaluation des micro-organismes associés à des calculs urinaires est le plus souvent effectuée en utilisant la culture microbiologique du calcul urinaire après fragmentation de ce dernier. Les communautés microbiennes signalées pour les calculs urinaires comprennent des bactéries telles que *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. mirabilis* . [1.2.4.6.7.9.13]

Tableau 06 : Aspects microbiologiques des lithiases urinaires d'infection mixte

Nature du calcul	N. patients	Infection du calcul	Culture de calcul (ou fragmenté) %	Auteurs
ND	221	06 %	<i>P. aeruginosa</i> (41.66 %) ; <i>E. coli</i> (16.66 %) ; <i>Klebsiella spp</i> (16.66 %) ; <i>P. mirabilis</i> (8.33 %) ; <i>Citrobacter fruendii</i> (8.33 %) ; <i>S. aureus</i> (8.33 %).	Asha T. Kore et al ; 2013 [18]
Calcium oxalate (mixed)	100	66 %	<i>E. coli</i> (20 %) ; <i>Staphylococcus spp</i> (15 %).	Barr-Beare, E. et al., 2015 (Résumé) [12]
Non-struvite	132	24 %	<i>E. coli</i> (31.3 %) ; <i>P. aeruginosa</i> (28.1 %) ; <i>K.pneumoniae</i> (9.4 %) ; <i>P. mirabilis</i> (9.4 %) ; <i>Enterobacter spp</i> (6.3 %) ; <i>C. albicans</i> (3.1 %) ; <i>Citrobacter spp</i> (3.1 %) ; <i>S. marcescens</i> (3.1 %) ; <i>S. cohnii</i> (3.1 %).	Maier, A. et al., 2015 [25]
ND	100		<i>E. coli</i> (39 %) ; <i>Pseudomonas spp.</i> (05 %) ; <i>K. pneumoniae</i> (10 %) ; <i>Proteus spp</i> (13 %) ; <i>Enterobacter spp.</i> (05 %) ; <i>Citrobacter spp</i> (05 %) ; <i>Acinetobacter spp</i> (05 %) ; <i>Salmonella spp</i> (01 %) ; <i>Candida albicans</i> (0 %).	Tavichakorntrakool R. et al ., 2012 [98]
Oxalate calcium ; struvite	63	Struvite (27 %) Calcium oxalate (11%)	<i>E. coli</i> (50 % struvite ; 53 % calcium-oxalate) ; <i>P.mirabilis</i> (86 % struvite ; 7 % calcium-oxalate).	Sohshang, H.et al ., 2000 [13]
Struvite ; oxalate calcique	100	80 % Struvite 20 % Phosphcalcique (PACC)	<i>E. coli</i> (35 %) ; <i>Pseudomonas spp</i> (10 %) , <i>K. pneumoniae</i> (10 %) ; <i>Proteus spp.</i> (10 %) ; <i>Enterobacter spp</i> (10 %) ; <i>C. albicans</i> (3.1 %) ; <i>Citrobacter spp</i> (10 %) ; <i>Staphylococcus spp</i> ; (2 %) ; <i>Enterococcus spp</i> (01 %).	Golecha et al ., 2001 [55]
Struvite ; calcium oxalate ; brushite	86	76 % Struvite 56 % Oxalo-calcique 15 % ND	Struvite : culture mixte 40 % ; monoculture 60 % (<i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella spp.</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Pseudomomas spp.</i> , <i>Escherichia coli</i> , et <i>candidas sp</i>) calcul calcique monoculture : 100 % (<i>E. coli</i> , <i>P. Mirabilis</i> et <i>Pseudomonas spp</i>)	Lewi, H. J. E. et al., 1984 [19]

Calcium oxalate ; calcium oxalate et calcium phosphate ; Struvite ; struvite et calcium Oxalate ; calcium phosphate	86	Oxalate - calcium phosphate (15 %) Struvite (84 %) Struvite calcium oxalate (61 %) Calcium phosphate (PACC) (20 %b)	Struvite : <i>E. coli</i> (27 %), <i>Pseudomona spp</i> (27 %), <i>Proteus spp</i> (18 %), <i>Enterobacter spp</i> (9 %), <i>Citrobacter spp</i> (9 %), <i>S. aureus</i> (9 %)c Struvite et oxalate-calcium : <i>E. coli</i> (37 %), <i>Proteus spp</i> (12 %)c, <i>Citrobacter spp</i> (25 %)c, <i>Klebsiella spp</i> (12 %), <i>E. faecalis</i> (12 %)c phosphate oxalate : <i>Candida albicans</i> (100 %)	Thompson R.-B. et al., 1973 [20]
ND	198	16 %	<i>E. coli</i> (23 %) ; <i>Enterococcus spp</i> (23 %) ; <i>K.pneumoniae</i> (18 %).	Korets R. et al., 2011 [18]
ND	75	48 %	<i>Enterococcus spp</i> ; (36 %), <i>E. coli</i> (27 %) ; <i>K. pneumoniae</i> (11 %)	Margel. D. et al., 2006 [23]

ND : non déterminé

4.2.1. Agents associés à la lithiase urinaire d'infection

– Lithiase d'infection à micro-organismes uréasiques

Plus de 200 espèces de bactéries ont une activité uréasique. Elles utilisent l'urée comme source d'azote. Le groupe des *Proteus* est le principal responsable des calculs d'infection. Ce sont des hôtes peu abondants du tube digestif, des téguments, des orifices naturels et des bactéries saprophytes répandues dans le sol et les eaux. *P.mirabilis* est retrouvé dans les selles des femmes dans 25 % des cas, et il est responsable de 3 à 4 % des premiers épisodes d'infections urinaires communautaires (ville). *Pseudomonas sp*, *Klebsiella sp*, *Providencia sp* et *Serratia sp* sont surtout des micro-organismes nosocomiaux.

L'activité uréasique est inconstante et doit donc être recherchée au laboratoire de bactériologie après isolement des souches.

Les Staphylocoques ont une activité uréasique faible et sont rarement responsables de calculs de struvite pure. Les *Corynebacterium urealyticum* possèdent une forte activité uréasique. Ils sont plutôt responsables de cystites et de pyélites incrustantes chez les patients immunodéprimés. *Ureaplasma urealyticum* appartient à la famille des mycoplasmes et peut exister à l'état commensal sur les muqueuses. Il est responsable de 10 à 20 % des urétrites non gonococciques et est parfois impliqué dans la formation de calcul de Struvite. [9.26.27]

– **Lithiase d’infection à micro-organismes non uréasiques (uréase optionnelle)**

- ✓ **Lithiase phosphocalcique** : La présence de plus de 15 % de phosphate amorphe de calcium carbonaté, avec un faible taux de carbonatation ou de plus de 20 % de whitlockite, doit faire suspecter la participation d’une infection urinaire à germe non uréasique dans la croissance du calcul. La whitlockite est un phosphate mixte de calcium et de magnésium hydraté. Exemple : *E.coli*.
- ✓ **Lithiase urique** : la principale cause de lithiase urique est l’acidité des urines. Celle-ci peut être favorisée par une infection urinaire chronique à *Candida albicans* (ou *glabratas*). Dans ce cas, les calculs d’acides uriques contiennent des filaments mycéliens facilement identifiés lors de l’examen direct d’urine et de l’analyse biochimique du calcul. [2.9.29]
- ✓ **Lithiase secondaire aux nanobactéries** : L’existence de « nanobactéries » impliquées dans le processus de nucléation de l’hydroxyapatite retrouvé dans le noyau de la plupart des calculs oxalo-calciques a été suggérée par plusieurs études, bien que leur existence et leur origine bactérienne aient été remises en question par plusieurs équipes. [2.7.9]

– **Autres formes d’infection lithiasique**

On peut avoir des pyélonéphrites emphysémateuses obstructives lithiasiques associées à des bactériémies à micro-organismes rarissimes émergents, tels que *Oligella uréthralis*, tige Gram négatif, aérobic, oxydase-positif, non fermentaire, autrefois du genre *Moraxella* (retrouvé dans le microbiote uro-génital par analyse protéomique du MALDI-TOF MS) et des Anaérobies avec *Gardnerella*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*. [7.14-34]

La tuberculose urogénitale à culture positive reste rarissime ; elle fait partie des étiologies possibles de pyélonéphrite emphysémateuse, et peut être associée à la lithiase de rétrécissement pyélocaliciel et être masquée. Elle est le plus souvent de diagnostic présomptif. [58-61]

4.2.2. Métagénomique et lithiase d’infection

Séquençage du génome bactérien

Il repose sur l’allongement par l’ADN polymérase d’un brin à partir d’une amorce, en utilisant un autre brin d’ADN comme matrice. Cet allongement est réalisé en présence des quatre désoxyribonucléotides triphosphate (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), et d’un analogue didésoxyribonucléotide (ddNTP) qui joue le rôle de terminateur de chaîne (Annexe 10).

Le séquençage d’ARN 16S (NTS) des calculs rénaux a permis la découverte de bactéries non habituellement reconnues comme gîte ou habitat de la dite lithiase urinaire : par exemple,

l'*Ochrobactrum sp.* (BGN), cette formation calculaire, marche de concert avec des cristaux urinaires d'origine calcique pathologique de grand diamètre et agglomérés, habituellement corrélée aux troubles métaboliques et non infectieux. [10.21-24. 31.62.63]

À l'inverse de la génomique qui consiste à séquencer un unique génome, la métagénomique séquence les génomes de plusieurs individus d'espèces différentes dans un milieu donné par l'analyse directe des micro-organismes (bactéries, virus, champignons, levures) permettant l'expertise des micro-organismes autrefois inconnus et innombrables.

Avant la métagénomique, les biologistes étaient seulement capables de conduire des analyses génétiques sur des micro-organismes pouvant être cultivés (ou se développer) dans le laboratoire. Cependant, ces derniers représentent une très petite fraction de tous les micro-organismes qui existent.

En utilisant la métagénomique, un biologiste peut analyser simplement un échantillon (par exemple l'urine). De ce fait, le biologiste obtient une image de tous les micro-organismes vivants, y compris les taxons qui n'ont jamais été caractérisés. Cette approche peut également être employée pour étudier des populations à l'intérieur d'un autre environnement, notamment intestinal, le microbiome intestinal .

Les aspects microbiologiques de la lithiase d'infection ont évolué avec l'apport des outils de biologie moléculaire, notamment le séquençage du calcul, et grâce à l'analyse métagénomique de l'urobiome des patients lithiasiques qui viennent renforcer les associations déjà connues des lithiases d'infection à micro-organismes uréasiques ou non uréasiques, d'après le tableau 07 ci - après . [2.7.9.10.12-37.64.65]

Tableau 07 : Principaux micro-organismes associés à la lithiase urinaire d'infection.

Familles	micro-organisme uréasique	micro-organismes non uréasiques (uréase optionnelle)	micro-organismes émergents
<p>Bacille à Gram négatif (BGN) : <i>Entérobactérie</i> : les Proteaes : <i>P. mirabilis</i>, <i>P. vulgaris</i>, <i>K. pneumoniae</i>, <i>Providencia spp.</i>, <i>Serratia spp.</i>, <i>Morganella morganii</i> <i>Salmonella spp.</i></p> <p>Bacille à Gram négatif non fermentaire : <i>Pseudomonas spp.</i>, <i>Acinetobacter spp.</i></p>	+++	<i>E. coli</i> ++	<i>E. coli</i> ++
<p>Cocci à Gram positif : <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Staphylococcus coagulase négatif</i>, <i>S. epidermidis</i>, <i>Enterococcus sp. (Faecalis.)</i> <i>Streptococcus spp.</i>, <i>Corynebacterium urealyticum</i></p>	+++	/	/
<p>Bacilles à Gram positif : (BGP) : <i>Bacillus spp.</i></p>	+	/	
<p>Anaérobies : BGN : <i>Bacteriodes fragilis ...</i></p>	/	/	+++
<p>Autres : <i>Ureaplasma urealyticum</i>, <i>Gardnerella</i>, <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Oligella uréthralis</i>, <i>Chryseobacterium indologenes</i>, <i>Leuconostoc</i> <i>Pseudomesenteroides</i></p>	+++	/	+++

5. Physiopathologie de la lithiase d'infection

5.1. Lithogénèse

Elle suit diverses étapes qui se succèdent ou se superposent, sursaturation de l'urine, germination cristalline, croissance, agrégation et agglomération des cristaux, rétention des particules cristallisées, croissance du calcul. Un calcul peut mettre de quelques mois à trois ou quatre ans à se constituer.

La formation de l'urine débute dans des néphrons, au niveau des corpuscules rénaux. La

composition de l'ultra filtrat (nutriments, minéraux, déchets dissous, médicaments...) résultant de cette filtration initiale du plasma est modifiée par des processus de sécrétion et de réabsorption entre les capillaires et les tubules rénaux pour donner le produit final, l'urine. Celle-ci quitte le rein au niveau des papilles rénales pour s'accumuler dans le bassinet (ou pyelon) avant de gagner l'uretère.

Il y a sursaturation de l'urine lorsque la concentration d'un sel minéral qui y est dissous est supérieure à sa solubilité. Ce phénomène s'explique à la fois par l'excrétion excessive de l'eau, mais y participent également une diurèse insuffisante, une transpiration accrue, non compensée par un apport hydrique adapté. Dans un milieu sursaturé, des micro-organismes cristallins de sel minéral se forment à partir des ions en solution dans l'urine. Cette étape peut être limitée par des inhibiteurs de la cristallisation (citrate, glutamate, protéines, glycosaminoglycanes, Zn^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} ...) : ils réduisent le risque de cristallisation ou se fixent à la surface des micro-organismes cristallins pour les empêcher de grossir et de s'agréger. Les cristaux grossissent par captation de nouvelles molécules ou de nouveaux ions de la substance en sursaturation pour former des particules dont la taille varie du micromètre au dixième de millimètre.

L'agrégation des cristaux est un processus rapide qui met en jeu des phénomènes d'attraction électrostatique en fonction de la charge superficielle des cristaux. Les agrégats formés, par leur forme irrégulière et la présence d'aspérités, sont retenus plus facilement dans les segments terminaux des néphrons, sur l'épithélium papillaire ou dans les cavités excrétrices du rein. L'agglomération des cristaux implique des macromolécules urinaires protéiques chargées négativement, pouvant se fixer à la surface des cristaux et servant de point d'ancrage pour de nouveaux cristaux (Figure 04).

Une fois constitués, les calculs peuvent séjourner dans les voies excrétrices rénales ou bien migrer jusqu'aux uretères et la vessie. La rétention a essentiellement lieu dans le haut appareil urinaire (cavités pyélocalicielles et uretère).

Le développement intravésical représente un cas particulier et s'observe principalement chez des patients souffrant de pathologies neurologiques lourdes (paraplégie, tétraplégie, sclérose en plaques...). Le calcul grossit par poussées au gré des phases de sursaturation urinaire. Il peut fixer des composants divers, ce qui explique le fait que la plupart des concrétions renferment plusieurs espèces cristallines.

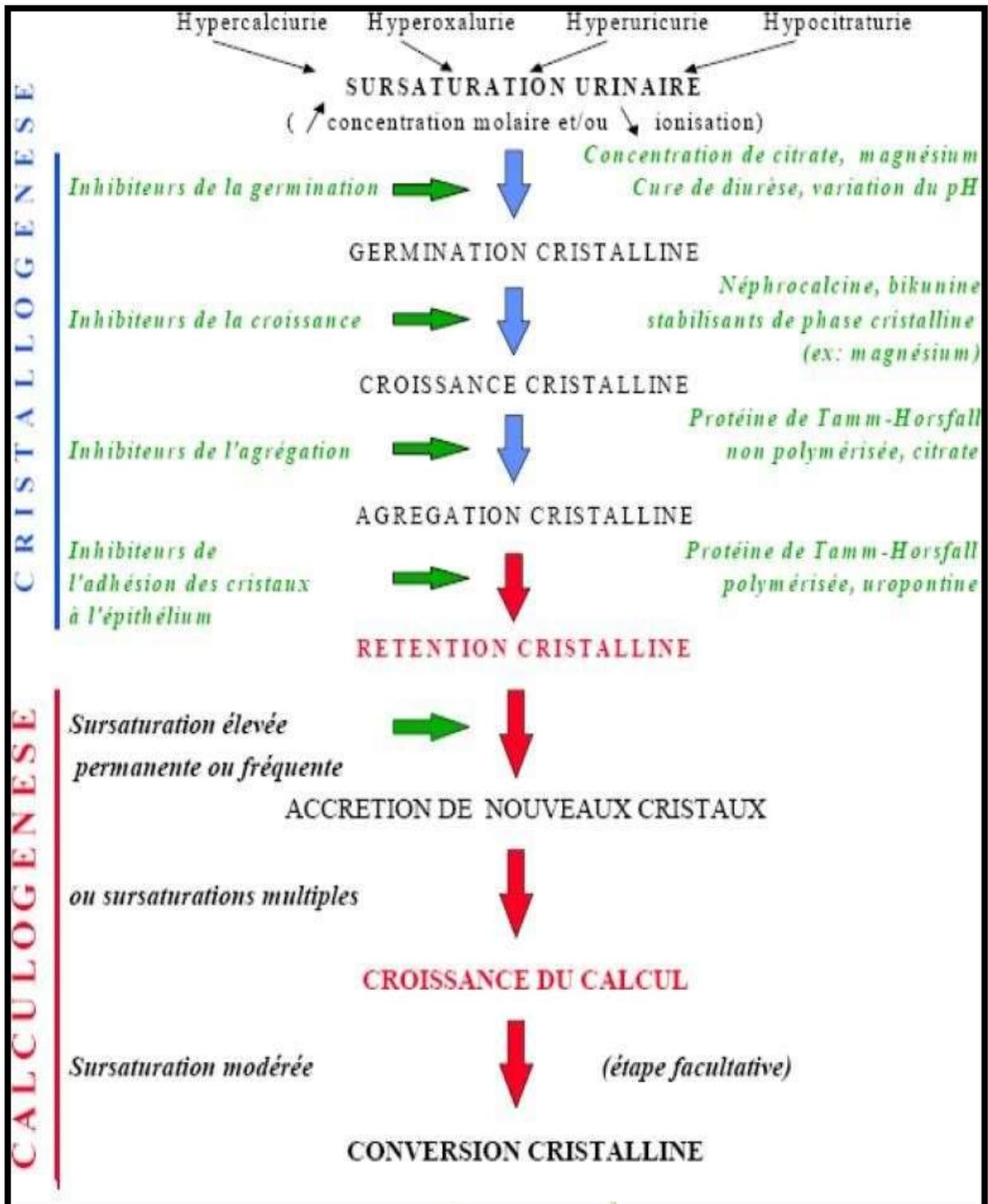


Figure 04 : Étapes de la lithogénèse - calculogénèse de la lithiase urinaire. [2.3.7]

Par ailleurs, il existe différentes étapes ou facteurs impliqués dans la lithogénèse et calculogénèse de la lithiase urinaire infectieuse, associés aux inhibiteurs et précurseurs de ces derniers. Ainsi, les ions qui participent à la formation des espèces insolubles sont appelés « promoteurs de la cristallisation » (Figure 05).

Ils s'associent très souvent à deux ou trois pour former une substance cristallisable qui, elle-même, peut se présenter sous plusieurs espèces cristallines. Pour s'opposer aux effets des promoteurs, différentes substances de l'urine, également ionisées, sont capables de former des espèces chimiques solubles qui vont réduire le risque de cristallisation ou vont se fixer à la surface des nouveaux cristallins pour les empêcher de grossir ou de s'agréger. Il sont appelés « inhibiteurs de la cristallisation » (par ex., le *Citrate* produit par le microbiote intestinal : *Oxalobacter fumigatus*) . [1.2.7.37.64]

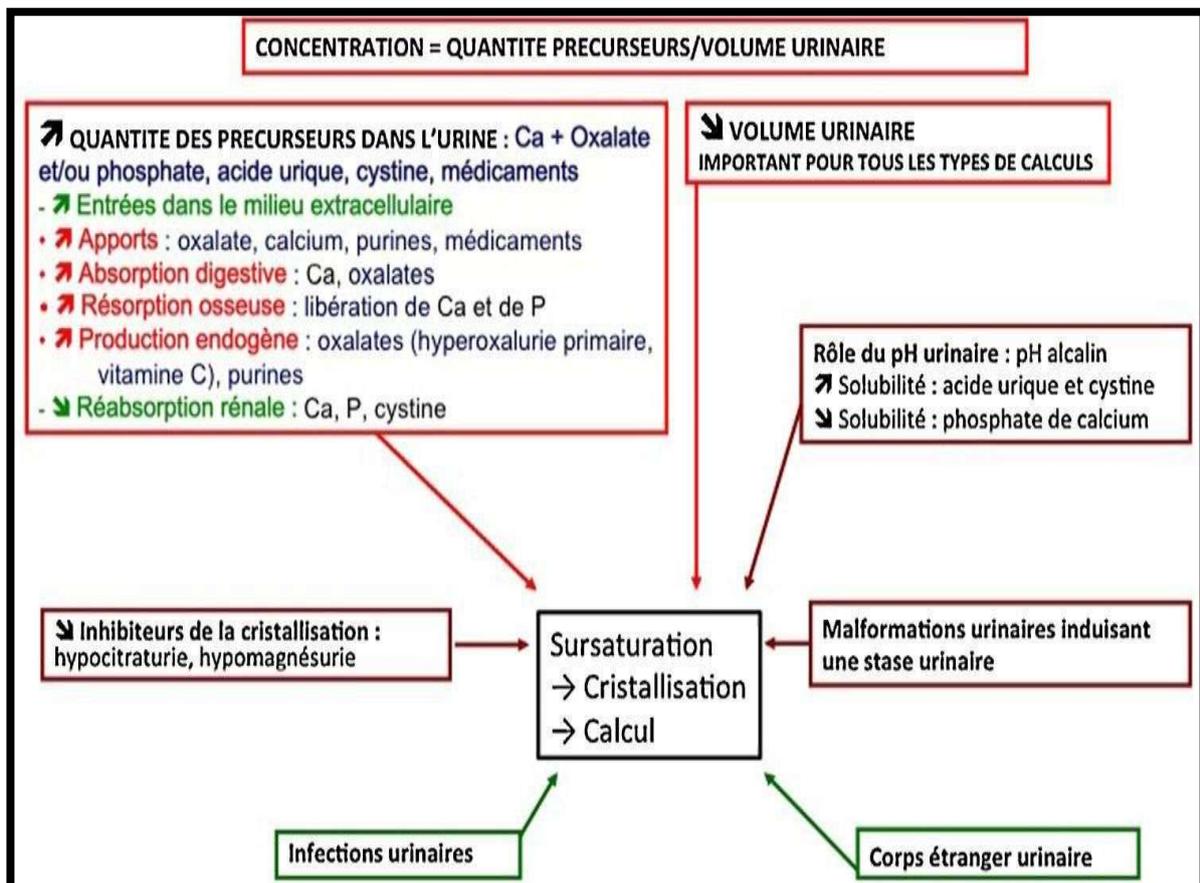


Figure 05 : Principaux facteurs de formation de la lithiase urinaire dont d'infection [66].

La formation des calculs d'infection dépend de la nature chimique des urines, qui est déterminée par deux processus principaux : le pH urinaire ; un pH > 7-8 est généralement considéré comme un seuil pour la précipitation de Struvite, et la sursaturation de l'urine pour la solubilité du magnésium (Mg^{2+}), ammonium (NH_4^+) et phosphate (PO_4^{3-}). L'urine contient normalement Ca^{2+} , Mg^{2+} et PO_4^{3-} , mais la concentration de NH_4^+ en urine n'est habituellement pas assez haute pour favoriser la précipitation de Struvite. La formation des calculs d'infection semble être associée aux infections-colonisations du tractus urinaire (UTI), en particulier avec la présence des micro-organismes uréalytiques de manière directe ou indirecte.

Les micro-organismes uréalytiques produisent l'uréase (Figure 09), qui catalyse l'hydrolyse de l'urée ($Co(NH_2)_2$) (également connu comme ureolysis), et mène à la production de l'ammoniaque (NH_3) et de l'anhydride carbonique (CO_2). Cela produit ainsi des ions de l'hydroxyde (OH^-), ayant pour résultat l'alcalisation d'urine et la production de NH_4^+ pour finalement déclencher la précipitation de Struvite. Il en est de même de la production de CO_2 pendant la réaction uréalytique qui mène à la production du carbonate (CO_3^{2-}) et d'ion de bicarbonate (HCO_3^-).

La formation de CO_3^{2-} peut favoriser la précipitation du carbapatite et carbonate de calcium, qui nécessitent un pH > 06 pour leur production. Les cristaux de Carbapatite semblent s'agréger à mesure que le pH augmente pendant la réaction uréasique. Donc, la combinaison particulière de NH_4^+ élevée concentration et pH urine alcaline favorisent la précipitation de struvite qui est presque exclusivement associée à l'infection du tractus urinaire avec les micro-organismes uréalytiques, le plus généralement de *Proteae spp.*, de *klebsiella spp.*, de *Pseudomonas spp.*, de *Staphylocoque spp.*, et quelques *E. coli*.

Le *P. mirabilis*, un micro-organisme fréquent, impliqué dans l'infection-colonisation chronique du tractus urinaire, est connu depuis longtemps dans la formation de calcul de Struvite pure ou hétérogène. Il apparait que d'autres micro-organismes peuvent également faire partie de cette dite lithogénèse infectieuse, notamment les levures et les anaérobies. [3.5.7.67]

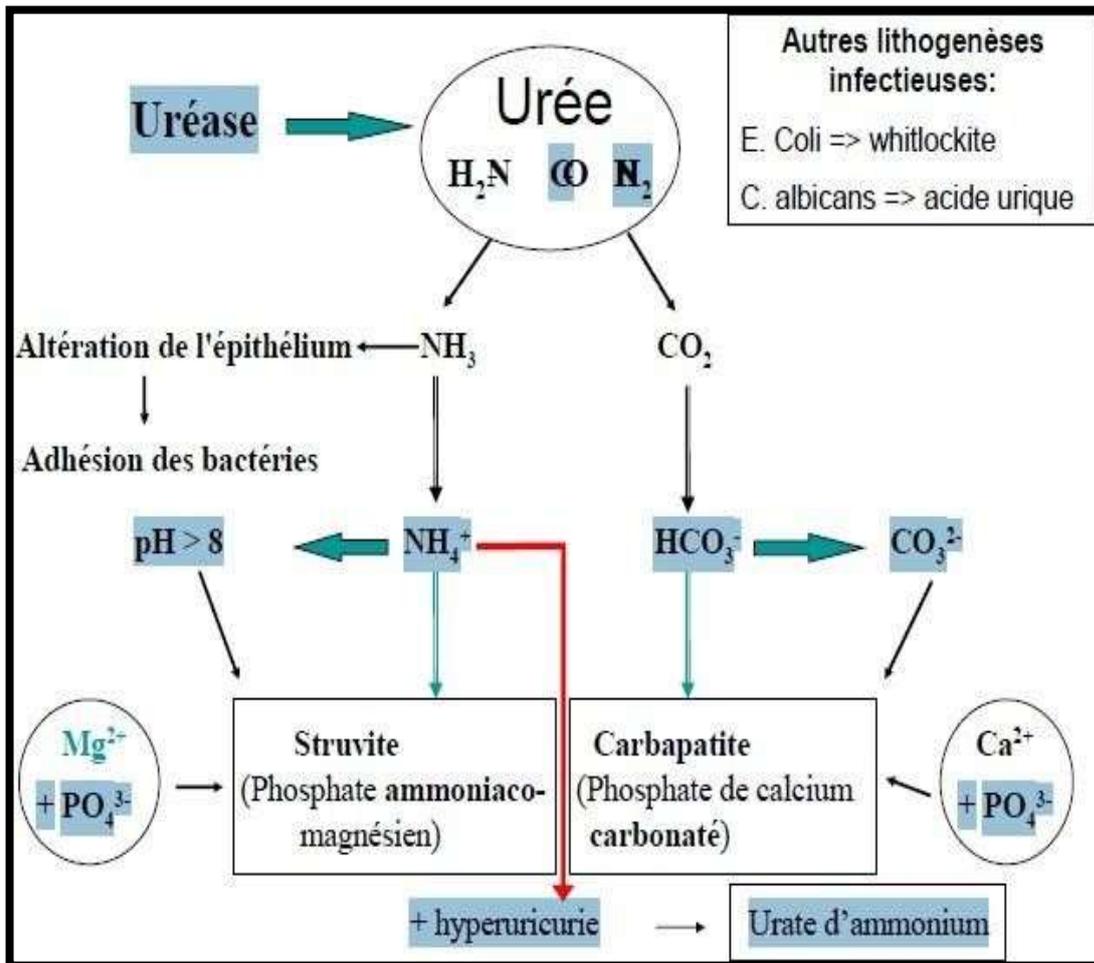


Figure 06 : Représentation du mécanisme de la lithiase infectieuse. [2.4]

5.2. Biofilm infectieux dans la lithiase d'infection

La présence des micro-organismes pathogènes dans le tractus urinaire peut mener à la formation de biofilm, attaché à la surface extracellulaire des substances polymères (EPS) de ces micro-organismes. Ces biofilms sont généralement plus résistants à l'antibioprophylaxie. La résistance du biofilm est attribuée à l'effet protecteur de la matrice d'EPS qui peut gêner le transport des antibiotiques dans le biofilm. La formation de biofilm uréalytique dans l'appareil urinaire peut jouer un rôle principal dans le Struvite. La formation du calcul en tant que micro-organisme urealytique peut fournir les conditions appropriées pour la précipitation de Struvite et de la matrice d'EPS qui peut agir en tant que nucléation additionnelle pour le développement de cristaux Struvite ou autres. [7.26.68.69.70]

5.2.1. Étapes du développement de biofilm

Le développement de Biofilm et la précipitation de minéraux dans le tractus urinaire semblent suivre une série d'étapes :

- **Attachement** : les micro-organismes uréalytiques adhérents à l'appareil urinaire : une couche mince est composée de cellules planctoniques et de métabolites urinaires. La réaction uréalytique (RU) débute ultérieurement.
- **Formation de micro-colonies** : c'est souvent la première phase du développement de biofilm accompagnée de production d'EPS ; RU augmente le pH, concentrations de NH_4^+ et CO_3^{2-} dans l'urine.
- **Formation de cristaux solubles** : la formation de cristaux due à l'état alcalin et l'augmentation de NH_4^+ et CO_3^{2-} dans l'urine (la sursaturation mène au carbapate, précipitation de carbonate, de struvite et probablement de calcium, cristaux pouvant être enfermés dans la matrice d'EPS (un détachement des microbes du biofilm peut se produire) (Figure 07).
- **Croissance en cristal/agrégation et nucléation** : les cristaux formés commencent à croître autour des bactéries attachées et en dehors de l'EPS matrice. Les bactéries planctoniques (virulentes) adhèrent aux cristaux préexistants avec pour résultat la formation de plusieurs microcolonies qui précipitent également des minéraux chimiques (fins cristaux); cela a comme conséquence la formation de couches de bactéries emballées en minéraux cristallins ; l'agrégation en cristal est influencée par les organites ou macromolécules présentes dans l'urine (ex. protéines, lipides, glycosaminoglycane...), qui favorisent l'agrégation en cristaux insolubles ;
- **Formation du calcul infectieux** : elle est le résultat de cycles répétés des étapes précédentes (attachement bactérien, formation de biofilm et croissance/agrégation des cristaux) pour intégrer des minéraux chimiques en dedans du biofilm bactérien, et vice versa, favorisant la récurrence clinique de manière sournoise et rapide (pouvant se faire suite à la colonisation ou /et internalisation dans l'urothélium respectivement).

Ce biofilm est influencé par les processus de bio-minéralisation dans le tractus urinaire infecté ou colonisé. Pendant que le biofilm se développe plus profondément, la sursaturation urinaire augmente de façon linéaire ; la précipitation des minéraux chimiques autour du biofilm peut potentiellement se produire de manière rapide, car le flux urinaire transporte efficacement ces

minéraux (tous cristaux) présents à la surface du biofilm de façon physiologique

Par conséquent, il apparaît que la lithiase d'infection peut être subdivisée comme suit :

- La lithiase infectieuse de Struvite pure ;
- La lithiase d'infection d'enrobage ;
- Lithiase mixte (métabolique + infectieuse).

La lithiase d'infection peut se présenter comme un défaut de migration de ce dernier par endossage ou par les dépôts de bactéries, fibrine, débris immunitaires et autres, pouvant promouvoir son biofilm infectieux qui le rend imperméable à l'antibiotique et peut engendrer des transferts d'informations génétiques (conjugaison) entre les micro-organismes enchâssés dans ce derniers. [11.26.70.71.72]

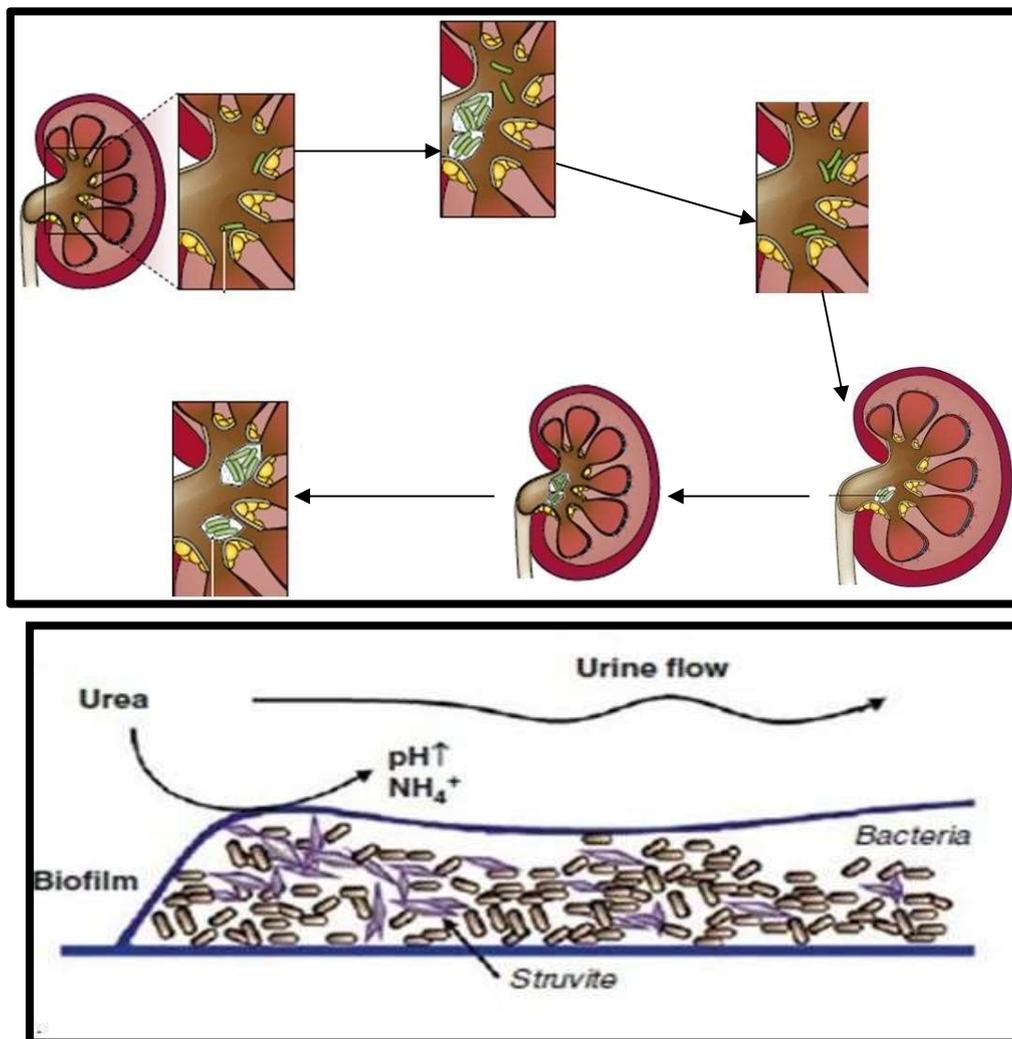


Figure 07 : Formation de Biofilm urinaire et leurs récives [73.159].

Dans la même optique, une expérience réalisée chez les souris a révélé la présence de cristaux d'oxalate de calcium lors d'épisodes de pyélonéphrite. Les cristaux de calcium peuvent fournir un gîte pour la pyélonéphrite ou persister dans un état de latence clinique. Le déficit bactérien en citrate a pour résultat la sursaturation accrue de CaOx (Figure 8). La forme des cristaux de CaOx fournit un élément principal de lithogénèse. La sécrétion des facteurs pro-inflammatoires de l'immunité innée de l'urothélium et l'attachement des bactéries aux cristaux calcique via leurs protéines (EPS) peuvent être une matrice du calcul urinaire d'infection (Figure 11-D). En outre, ces bactéries peuvent adhérer aux cristaux calciques et contribuer potentiellement à la néphropathie calcique. [12.22.36.73.74]

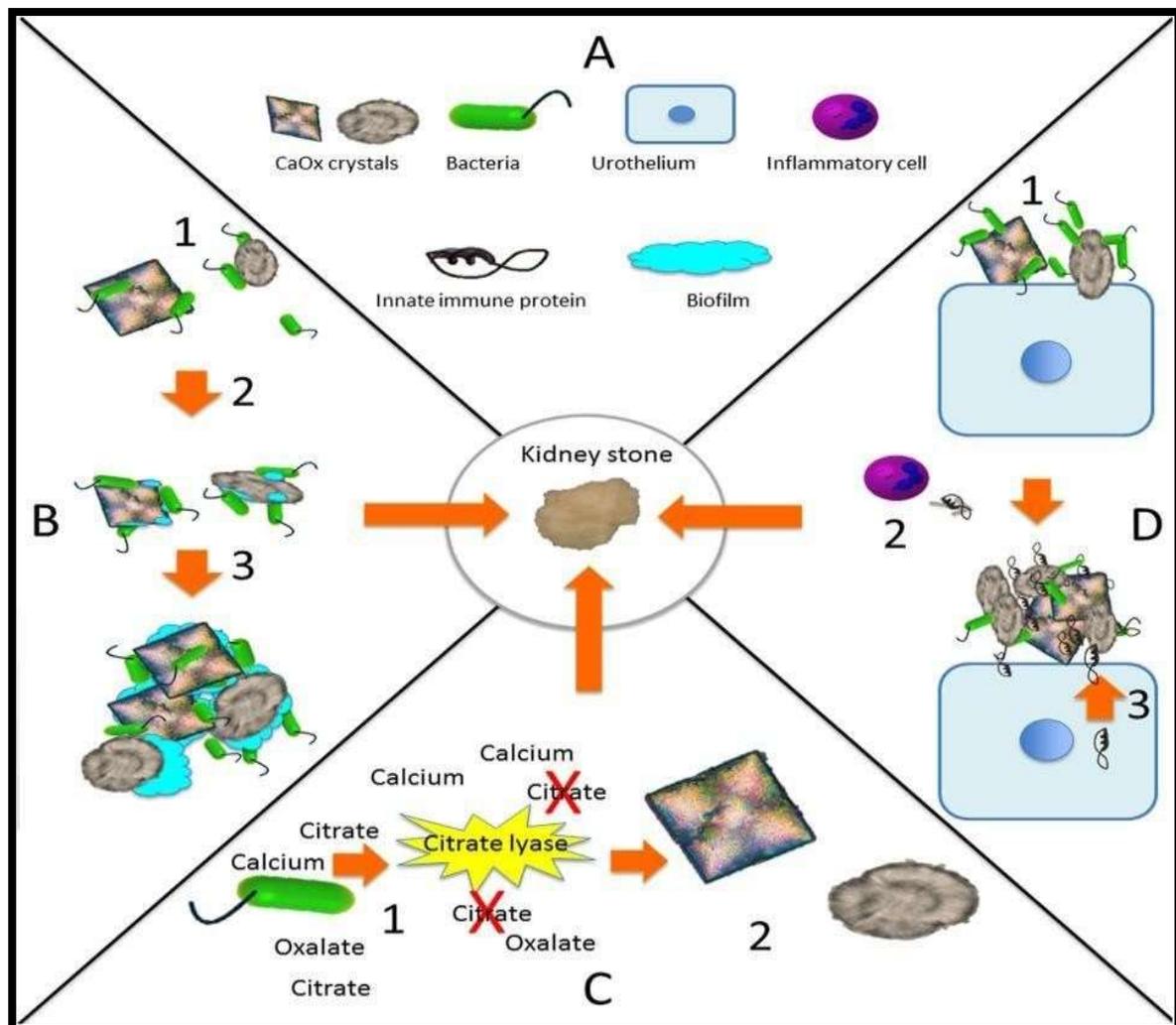


Figure 08 : Mécanismes hypothétique dans la lithiase urinaire d'infection [12].

Intracellular Biofilm Communities : Elles sont des bactéries intracellulaires considérées comme des populations vitales contribuant à la persistance et à la récurrence des infections urinaires. Ces communautés se développent dans les cellules parapluie différenciées en phase terminale de la vessie et peuvent contenir plus de 10 000 organismes par cellule hôte.

Quiescent intracellulaire Réservoirs : Le développement des réservoirs intracellulaires au repos (QIR) est le résultat de bactéries qui se trouvent dans les couches cellulaires de la vessie sous-jacente.

Les QIR contiennent de petits groupes d'*Escherichia coli* uropathogène (UPEC) logés dans une membrane associée à une membrane dérivée de lysosomes, compartiments vacuolaires positifs pour la protéine 1 (Lamp-1+). Les bactéries dans les QIR sont des cellules non répliquantes, principalement dormantes, qui sont très résistantes aux antibiotiques, et donc capables de persister dans l'hôte malgré des conditions environnementales défavorables à la toxine Hémolysine A.

Hémolysine A (α -Hly, Hly A) : Elle est un membre prototypique de 110 kDa de la famille des toxines RTX, un grand groupe d'exotoxines pyrogènes produites par diverses bactéries Gram négatif, exprimées à des niveaux élevés dans les glomérulonéphrites, ce qui suggère son importance au cours des progressions intracellulaires.

Dans l'ensemble, les données appuient une régulation stricte de l'expression de l' α -hémolysine par l'UPEC pour équilibrer les niveaux optimaux d'exfoliation des cellules hôtes, l'activité immunitaire, l'inflammation locale et la toxicité (mort cellulaire pour une infection réussie).

Acquisition du fer : Le fer est un macronutriment essentiel chez les eucaryotes et les procaryotes, agissant comme cofacteur enzymatique dans de nombreux processus cellulaires. La défense la plus importante est la raison pour laquelle les isolats *E. coli* uropathogènes (ECUP) expriment généralement jusqu'à trois lipocalines supplémentaires.

Le fer peut également lier le cuivre, ce qui peut aider à prévenir l'UPEC phagocytose par les leucocytes de l'hôte. L'aérobactine est un sidérophore hydroxamate qui peut fournir du fer directement aux cibles bactériennes intracellulaires sans subir l'hydrolyse, permettant un recyclage rapide pour une réutilisation. Les Salmochelins sont un groupe de variantes glucosylées de l'entérobactine dont le récepteur peut également jouer un rôle secondaire dans la promotion de l'internalisation urothéliale ECUP.

5.3. Microbiote urinaire

Le Microbiome est l'ensemble des organismes et de leurs génomes qui colonisent le tractus urinaire. La communauté médicale et scientifique a longtemps cru au dogme vieux d'un siècle qui énonce que «les urines sont stériles». Ce dogme a contribué à créer une barrière dans la recherche sur le microbiome de l'appareil urinaire.

Une autre barrière ayant entravé la recherche sur le microbiome urinaire concernait les méthodes bactériennes traditionnelles de culture. Typiquement, ces méthodes sont employées pour identifier les micro-organismes pathogènes aérobies à croissance rapide, les micro-organismes pathogènes à croissance lente et les bactéries anaérobies.

Le protocole (EQUC) a été développé pour surmonter cet obstacle, utilisant des conditions atmosphériques diverses et la prolongation des temps d'incubation. Il existe de nouvelles techniques de biologie moléculaire telle que la PCR 16S ou le séquençage de deuxième génération (NGS ou la métagénomique) qui ont révolutionné la prise en charge médicale et la recherche appliquée.

Pour mémoire, il est intéressant d'avoir un petit aperçu de la composition sommaire du microbiote intestinal. Il se compose de Bactériodètes (Gram négatifs ou positifs et Bactériodes *fragilis* multirésistants), Firmicutes (*Enterococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, Anaérobies) *Actinobacteria* (*Bifidobacterium* Aerobies et Anaérobies) et *Proteobacteria* (Entérobactérie, Anaérobies) impliqués dans le dysbiose et la promotion des lithiases urinaires, dont d'infection [18.73.74].

– **Cas particuliers :** La grossesse s'accompagne de modifications physiologiques des voies urinaires augmentant le risque de formation de calculs urinaires d'infection. Les modifications hormonales ainsi que la compression extrinsèque de l'utérus conduisent, dès le deuxième trimestre, à une hypotonie des cavités pyélocalicielles, en particulier à droite. Une hypercalciurie physiologique est fréquente. La glycosurie physiologique favorise, quant à elle, l'adhésion des bactéries à l'urothélium et, de ce fait, augmente le risque d'infection-colonisation urinaire.

L'augmentation de la fréquence respiratoire engendre une alcalose respiratoire,(et l'augmentation du pH urinaire) avec la précipitation de cristaux de Struvite, voire de phosphate de calcium (PACC) , majorée en cas de vomissement .Cela favorise la formation de de calculs d'infection mixte , le plus souvent sous forme de calculs infectieux de carbapatite et de phosphocalcique , électivement, plus fréquente au cours des deux derniers

trimestres de gestation qu'en dehors de la grossesse [2.7.75-77].

Dans le cas d'infection urinaire à *candidas albicans*, la croissance n'est pas le seul mode d'évolution spontanée que puisse subir un calcul retenu dans les voies urinaires. En effet, d'autres phénomènes peuvent s'exprimer et conduire à des modifications de phases cristallines. Il en résulte une instabilité de certaines formes hydratées qui ont tendance à évoluer progressivement dans le temps vers des formes thermodynamiquement plus stables et moins hydratées.

Ainsi, l'acide urique dihydraté (associé à l'infection-colonisation par la *Candida spp.*), qui se forme facilement lorsque l'urine est très acide, se convertit peu à peu au sein du calcul en acide urique anhydre, avec quelques remaniements morphologiques qui attestent de ce processus de conversion. De même, la wedhellite, sous certaines conditions, peut se transformer en whewellite (cristaux hématiformes). D'autres espèces cristallines sont concernées, comme la Struvite, qui peut perdre son ammonium, dont une partie de ses molécules d'eau, pour se transformer en cristaux newbéryites (cristaux calciques associés à $\text{pH} > 06$). [2.4.5.6.7.9.29]

La lithiase urinaire, toutes natures confondues, peut être un facteur de risque et fait appel à des prédispositions génétiques et des facteurs environnementaux, notamment diététiques. De surcroît, elle peut produire des comorbidités telles que le syndrome métabolique, l'hypertension artérielle, le diabète de type 2, l'ostéoporose et l'insuffisance rénale chronique ainsi que l'ancrage de micro-organismes dans le tissu nodal cardiaque émanant de la fragmentation.

Selon de récentes constatations, les femmes jeunes porteuses de calculs rénaux peuvent avoir des maladies coronariennes, expliquées par un excès en vitamine D (variant dans le gène codant pour CYP 24 A 1), une hypercalémie et une hypercalcurie associés à des calculs parfois infectés ou colonisés par des microorganismes circulant dans le sang.

Il est à noter que la mémoire douloureuse de colique néphrétique peut motiver les patients à modifier leurs habitudes de vie ou les inciter à prendre contact avec le monde médical, alors que l'investigation et l'enseignement thérapeutique adéquat doivent être au rendez-vous, cela permettant d'éviter qu'un calcul à 40 ans ne se transforme en infarctus du myocarde (parfois, en endocardite infectieuse) à 60 ans . [1.2.7.64.66.78.79]

6. Diagnostic de la lithiase d'infection

6.1. Étude clinique

La lithiase d'infection calcul d'infection (Figure 9) peut se révéler par une colique néphrétique aiguë (CNA) dans 80 % des cas, une hématurie macroscopique ou par un épisode infectieux aigu (pyélonéphrite obstructive).

Elle peut aussi se développer rapidement à bas bruit, donnant un calcul ramifié volumineux (coralliforme), sans autre traduction clinique que des lombalgies. Lorsqu'elle est asymptomatique, le diagnostic peut être fait sur une leucocyturie, hématurie (cristaux hématiforme de whewellite), une bactériurie persistante, voire sur une insuffisance rénale terminale (parfois rein muet) développée à bas bruit en cas de calcul bilatéral ou sur rein unique, surtout chez les enfants. Celui-ci peut alors être confondu avec une tumeur urothéliale, des caillots sanguins, une nécrose papillaire, des calcifications rénales ou des kystes rénaux. L'évolution spontanée des calculs coralliformes se fait vers une destruction progressive du parenchyme rénal, raison pour laquelle leur traitement urgent est recommandé.

6.2. Étude radiologique

Les examens d'imagerie sont indiqués pour affirmer le diagnostic de colique néphrétique ou lors de dépistage fortuit (dilatation de la voie excrétrice supérieure, calcul), pour évaluer la gravité (rein unique, urinome...), et préciser les chances d'expulsion spontanée du calcul (taille, localisation et morphologie).

– **Abdomen sans préparation (ASP)** : Il est très facile à réaliser en urgence. Cependant, selon l'Association française d'urologie (AFU), il est de sensibilité et spécificité médiocres pour mettre en évidence un calcul (respectivement 40 à 58 % et 60 à 77 %) [80]. L'ASP (Figure 10) ne doit donc pas être fait isolément, mais couplé à l'échographie. De plus, il ne renseigne que sur la présence d'un calcul, mais pas sur les complications éventuelles. Ainsi, un calcul est opaque à la radiographie (lorsque l'on peut le décrire à l'ASP), mais peut être radio-transparent dès lors qu'il n'est visible qu'à l'échographie. Les calculs radio-transparents sont vus à l'uro-scanner (Figure 11).



Figure 09 : Calcul coralliforme d'infection (service d'urologie, HCA).

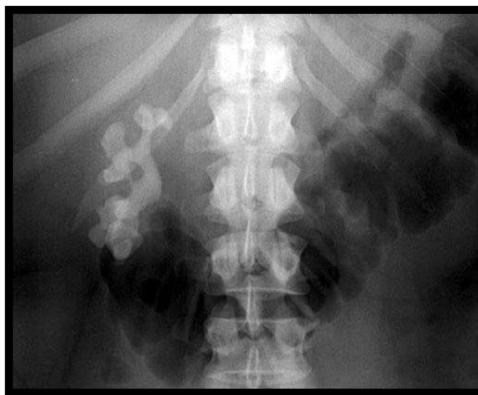


Figure 10 : Calcul d'infection radio-opaque coralliforme.

– **Échographie réno-vésicale** : Il s'agit d'un examen non invasif, peu couteux et rapide, mais opérateur-dépendant. L'échographie des voies excrétrices urinaires est associée en combinaison avec l'ASP et peut être utilisée dans la prise en charge de la colique néphrétique aiguë, parfois obstructive. Elle détecte mieux les calculs situés à la jonction pyélo-urétérale et urétéro-vésicale. Elle doit être réalisée à vessie pleine.

Le calcul apparaît hyperéchogène, avec un cône d'ombre postérieur. Il confirme le diagnostic clinique de de colique néphrétique aiguë (CNA) et la présence de calcul urinaire, en objectivant une dilatation des cavités pyélocalicielles et/ou de l'uretère en amont. Cependant, toute dilatation ne signifie pas obstruction (hypotonie séquellaire d'un obstacle, distension vésicale lors de l'examen), et toute obstruction ne se traduit pas immédiatement par une dilatation qui peut apparaître quelques heures après (20 à 30 % des obstructions brutales sur calcul urétéral ne sont pas objectivées).

– **Scanner sans injection** : Il est préférable. Examen rapide, indépendant du patient et de l'opérateur, il permet des reconstructions en trois dimensions des ramifications du calcul dans les voies urinaires. Les calculs sont visibles au scanner qui possède une très grande sensibilité (96 %) et spécificité (98 %) pour le diagnostic des lithiases urinaires millimétriques. La visualisation directe du calcul et d'autres signes indirects peuvent aider au diagnostic tels que la dilatation des cavités pyélocalicielles, l'infiltration de la graisse péri-rénale ou péri-urétérale, l'épaississement de la paroi urétérale en regard du calcul. Le fait intéressant est que le scanner permet de mesurer la densité Hounsfield (HU) des calculs et d'orienter vers une composition infectieuse ou autres compositions de ce dernier, de prédire le haut risque infectieux et les présomptions d'efficacité thérapeutique de la lithotripsie extracorporelle (LEC). En cas d'injection ou, au mieux, d'un uroscanner, une étude de la sécrétion et de l'excrétion rénale, ainsi qu'une meilleure visualisation de l'anatomie des cavités pyélocalicielles pourront être réalisées.



Figure 11 : Uro-scanner de la lithiase rénale d'infection (pointillé rouge)

L'imagerie interventionnelle est également essentielle avant un traitement urologique invasif afin de préciser au mieux la morphologie des voies urinaires et les caractéristiques du calcul urinaire.

– **Scintigraphie rénale** : Elle est utile pour apprécier les séquelles parenchymateuses de l'infection chronique et de l'obstruction.

En matière de calcul d'infection, l'urographie intraveineuse (UIV) n'a plus sa place dans l'exploration des lithiases urinaires toutes natures confondues.

6.3. Étude biochimique de la lithiase d'infection

L'étude biochimique du calcul (nidus) par méthode chimique quand celui-ci est récupéré, soit dans sa totalité soit sous forme de poudre après fragmentation, est aujourd'hui obsolète et devrait être abandonnée, car elle ne permet pas d'identifier les cristaux infectieux de type carbapatite. La spectrophotométrie infrarouge est plus sensible que la diffraction au rayon X pour détecter les espèces mal cristallisées telles que l'urate d'ammonium, les protéines ou les phosphates amorphes de calcium carbonaté (PAAC).

Les calculs d'infection sont typiquement de morphologie IVb ou IVc selon la classification du laboratoire Cristal, élaborée par Michel Daudon[2.6]. Elle est la seule méthode capable de déterminer le taux de carbonatation de la carbapatite (lithiase d'infection mixte ou hétérogène).

6.4. Étude microbiologique de la lithiase urinaire d'infection

6.4.1. Phase pré-analytique

6.4.1.1. Indications, modalités et acheminement des prélèvements

A- L'examen cyto bactériologique de l'urine : L'infection-colonisation urinaire lors de la lithiase d'infection peut être latente ou patente, nosocomiale ou communautaire (en dehors de l'hôpital) ou parfois se présenter sous forme de PNA obstructif (CNA) dans le cas d'un obstacle organique ou fonctionnel. L'indication de l'ECBU se présente sous différents critères (Tableau 08). [81-83].

Tableau 08 : Indication ECBU dans la lithiase d'infection

Dépistage	Diagnostic
Grossesse ; colonisation ou infection, dépistage à partir des 2 ^e -3 ^e trimestres	Cystite aiguë à risque de complication (lithiase vésicale)
Lithotrisie extra-corporelle (LEC) Procédure endo-urologique : URS, NLPC... Anomalies métaboliques associées : diabète, HTA, hyperparathyroïdie...	Douleur lombaire et fièvre (PNA), prostatite aiguë (lithiase vésicale) Nourrissons : hyperthermie isolée, troubles digestifs : diarrhée, colopathie chronique...

Les principaux délais et conditions d'acheminement de l'ECBU lors du diagnostic biologique de l'infection-colonisation urinaire liée à la lithiase urinaire d'infection en préopératoire ou en postopératoire sont listées dans le tableau 09, ci –après.

Tableau 09 : Délais et condition d'acheminement de l'ECBU

Échantillon		Optimal	Acceptable	Non adapté
ECBU avec milieu transport	Leucocytes et hématies	≤ 8 h à TA	≤ 12 h à TA	> 12h à TA
	Bactérie et levure	≤ 24 h à TA	≤ 24 h à TA	> 24 h à TA
ECBU sans milieu transport	leucocyte et hématies	≤ 2 h à TA ou	≤ 12 h à TA	> 12 h à TA (b)
		≤ 8 h à 05 ± 03 °C	≤ 12 h à 05 ± 03 °C	>12h à 05 ± 03 °C
	Bactérie et levure	≤ 2 h à TA ou	≤ 24 h à 05 ± 03 °C	> 02 h à TA
		≤ 12 h à 05 ± 3 °C		> 24 h à 05 ± 3 °C

TA : Température ambiante.

6.4.1.2. ECBU

L'ECBU peut être conservé à 15-25 °C, température ambiante (TA), dans un délai de deux heures. Lorsque le délai est de 12 heures, l'acheminement s'effectue à température de 03-05 °C (Tableau 09). Le respect de la chaîne du froid est impératif depuis le prélèvement jusqu'à l'arrivée au laboratoire. Si la valeur des leucocytes est inférieure au seuil décisionnel, il convient de prévoir éventuellement un commentaire pour l'interprétation [81-83].

Le recueil des urines standards se fait le plus souvent chez l'adulte coopératif par voie naturelle, selon la technique dite du milieu du jet, selon des règles strictes d'asepsie rigoureuse qui conditionnent la qualité de l'ECBU, dans un récipient stérile. Il est à noter que le mode de prélèvement idéal des urines, qui est discuté actuellement, est la ponction vésicale sus-pubienne (PSP), qui permet d'éviter toute contamination par l'urobiome. Toutefois, elle est trop invasive pour être utilisée en routine et de manière généralisée. Il existe, également, le sondage «aller-retour », mais non dénué de complications.

Pour le sujet, adulte coopératif et enfant avec miction volontaire, la réalisation du prélèvement sera confiée au patient adulte ou au parent de l'enfant avec des renseignements précis, de préférence le matin après lavage soigneux des organes génitaux externes avec une solution antiseptique ou savon doux, et avec un rinçage soigneux à l'eau.

Chez la femme qui présente des pertes, même minimales, le premier jet urinaire sera jeté afin d'éliminer tout ou partie de la flore commensale de l'urètre inférieur ; seul le milieu du jet sera recueilli dans un flacon stérile.

Pour le sujet non coopératif ou incontinent, la meilleure manière et la moins invasive, et qui présente le moindre degré de complication, reste le recueil par collecteur pénien, voire par cathétérisme sus-pubien en cas de rétention d'urine par obstruction.

Pour le petit enfant sans miction volontaire, après nettoyage soigneux de la région périnéale avec du savon doux, un sac plastique collecteur sera fixé au moyen d'un adhésif, ce dernier ne devant pas être laissé en place au-delà de 30 minutes et devant être remplacé à nouveau après avoir recommencé le nettoyage (avec un taux inacceptable de faux positif > 50 %). Il est donc souhaitable de prendre les précautions nécessaires pour l'interprétation des résultats positifs.

6.4.1.3. Cristallurie

Il s'agit de la présence de cristaux dans les urines, phénomène naturel, qui contribue à diminuer la sursaturation des substances présentes en très forte concentration dans le tractus urinaire.

La cristallisation oxalocalcique est la forme de cristallurie la plus fréquente dans l'urine humaine. Cela tient à la très faible solubilité de l'oxalate de calcium (environ 3-9 mmol/L). Pour la whewellite principalement, elle dépend du rapport molaire calcium/oxalate (rCa/Ox). Lorsque celui-ci est inférieur à cinq, cela correspond aux contextes d'hyperoxalurie avec calciurie normale ou basse, entraînant une formation de cristaux de whewellite « hématiforme ». À l'inverse, le rapport molaire supérieur à 14 correspond à des situations d'hypercalciurie avec oxalurie normale ou seulement modérément augmentée. La cristallisation se fait essentiellement sous la forme de wedhellite. Entre ces deux seuils, les phases cristallines sont plus équitablement réparties et peuvent apparaître mélangées au sein d'une même cristallurie.

Cependant, la distinction entre cristallurie « physiologique » et « pathologique » tient à la connaissance des différents critères qui les caractérisent : pH de l'urine, nature des cristaux, faciès cristallin, abondance, agrégation, mais aussi fréquence de la cristallurie appréciée par la répétition de l'examen sur des prélèvements de séries et, bien entendu, selon le contexte clinique (lithiase, néphrocalcinose, altération de la fonction rénale).

La cristallurie permet le dépistage simple et rapide de pathologies lithogènes monogéniques, d'expliquer des IRA d'origine cristalline (médicaments ou molécules métaboliques), d'orienter le clinicien vers les principaux facteurs métaboliques urinaires responsables des maladies lithiasiques et d'apprécier l'efficacité des mesures prophylactiques mises en œuvre pour la prévention des récives. Elle est de loin le meilleur indicateur pronostique de la récive de lithiase, offrant la possibilité au clinicien-biologiste d'intervenir avant la

formation de nouveaux calculs [2.3.4.6.84.85].

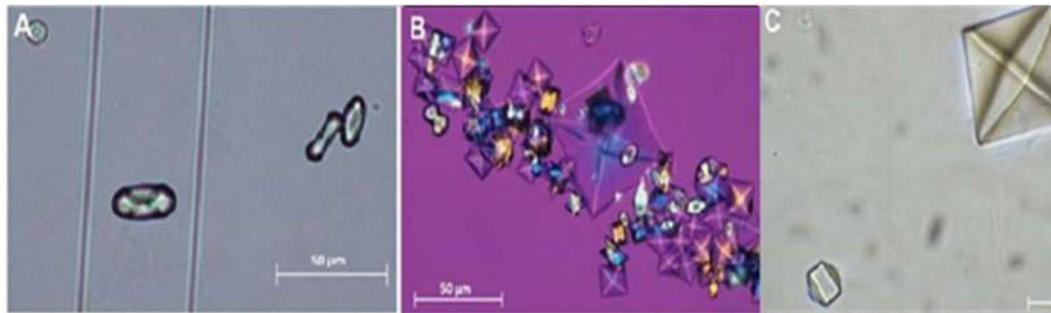


Figure. 12 : Cristallurie calcique à lumière polarisée

- A) Cristaux caractéristiques de whewellite, ovales à centre déprimé et extrémités renflées, vu en lumière blanche. pH : 5–7.
- B) Volumineux agrégat de whewellite et de weddellite octaédrique aspect en «enveloppe carrée» vu en lumière polarisée..pH : 5–7.
- C) Deux faciès différents de la weddellite vus en lumière blanche, bipyramidale, ou octaédrique (en haut à droite), et dodécaédrique (en bas à gauche). Le faciès dodécaédrique résulte de l'épaississement progressif de la face de séparation entre les deux pyramides qui forment le cristal octaédrique de base.

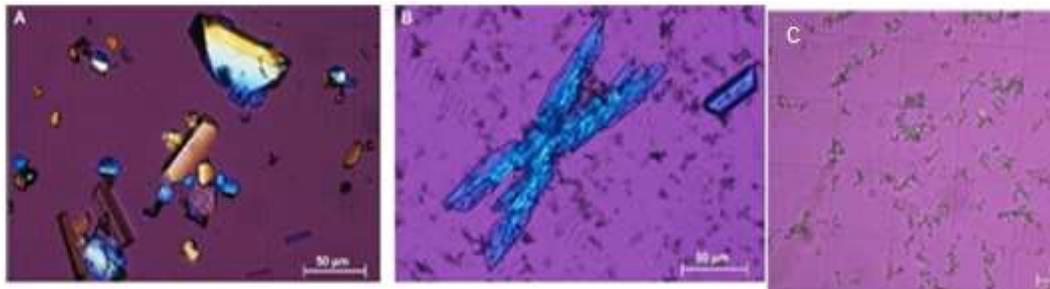


Figure. 13: Cristallurie de Struvite (infectieux).

- A) Cristaux orthorhombiques polarisants de Struvite (phosphateammoniacomagnésien hexahydraté) témoignant d'une infection par des micro-organismes uréasiques. Noter la forme trapézoïdale caractéristique de certains cristaux. pH : 6–7–9.
- B) Volumineuse structure cristalline polarisante monochrome de Struvite en ciseaux dont les branches ont des contours très irréguliers avec des excroissances cristallines principalement orientées vers l'intérieur des branches. Sur la droite, on observe un autre cristal de Struvite, comparable à ceux de - A. noter en arrière-plan la présence de granulations non polarisantes de phosphate amorphe de calcium carbonate (PACC). Cette association est fréquente en raison du pH urinaire élevée induit par l'uréolyse bactérienne responsable de la formation de la Struvite, pH : 8–9.
- c) Granulations d'acide urique amorphe vues en lumière polarisée. Cette espèce est essentiellement urico-dépendante et peut s'observer à des pH alcalins ≥ 6.5 . L'aspect en lumière polarisée permet de faire la différence entre cette espèce et le phosphate amorphe de calcium carbonate qui précipite aussi sous forme de granulations lorsque le pH urinaire ≥ 6.5 (de nature infectieuse en l'occurrence).

Dans l'appareil urinaire, la nucléation des cristaux se produit très probablement sur des métabolites préexistants (nucléation hétérogène). Les cristaux sont habituellement associés à la surface de ces métabolites en particules suspendues dans l'urine (par exemple bactéries, substances organiques, débris cellulaires), s'étendant à l'urothélium ou aux dispositifs médicaux (par exemple uretère, cathéter). On observe également la formation des microcristaux (taille $\leq 20 \mu\text{m}$) chez les non-calculieux, mais ils sont assez petits pour pouvoir s'excréter via le tractus urinaire.

Ainsi, pour qu'un calcul se forme, les cristaux doivent non seulement être formés, mais également se développer et s'agréger pour être maintenus dans l'appareil urinaire.

Selon Daudon, la détermination du score VCG (volume cristallin global) des cristaux de Cystéine permet de détecter très précocement une lithogénèse et de réajuster la prise en charge thérapeutique pour éviter la récurrence clinique de lithiase rénale [2.4.6].

– Méthode d'utilisation de la cristallurie

En pratique courante, la première urine du réveil est sans doute le meilleur prélèvement pour la cristallurie. La conservation du prélèvement ne devrait pas excéder deux heures entre la miction et l'examen microscopique à polarisation des cristaux afin d'éviter la formation in vitro de cristaux pendant la période de conservation. Donc, le choix du prélèvement et la phase pré-analytique sont particulièrement critiques pour la validation des résultats.

6.4.1.4. L'urine pyélique et le calcul urinaire

L'exploration de la lithiase d'infection trouve son indication dans le cas où l'ECBU est négatif avec un gros calcul obstructif de stase (en amont) ou calcul rénal, ou encore calcul pyélocaliciel retrouvé parfois chez l'enfant lors des lithiases vésicales, d'un adénome prostatique complexe, chez le paraplégique (vessie neurogène), en cas de suspicion de tuberculose rénale ou lors de visualisation de pus franc, de rétrécissement pyélique ou de fibrine et de synéchie ; en cas de suspicion d'Anaérobie, de pus cavitaires ou abcès, d'odeur suspecte.

Au bloc opératoire : L'urine pyélique (Figure 15) est prélevée après fragmentation du calcul au laser (Figure 14), ou en amont d'une obstruction ou d'une stase urinaire dans le pyélon (ou pyélo-calicielle).

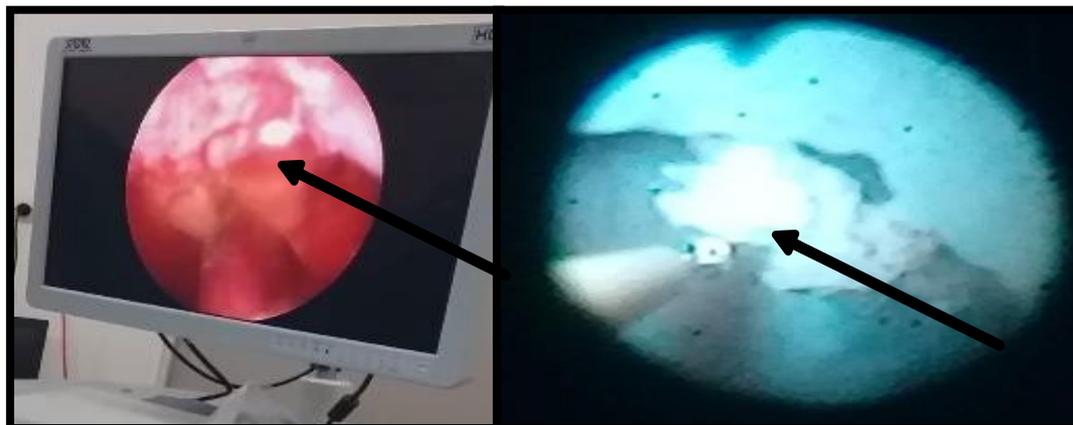


Figure 14 : Fragmentation calcul coralliforme (15 mm) au laser par chirurgie endo-urologique.



Figure 15 : Urine pyélique.



Figure 16 : Calcul d'infection fragmenté friable

Il est à noter, que le calcul urinaire (nidus) peut être récupéré entièrement lors du traitement par néphrostomie (NLPC) ou urétéroscopie (URS) et cela grâce à la sonde ou à une pince spécifique (Dormia).

Délai d'acheminement : Sans dépasser les deux heures de temps, l'urine pyélique est prélevée dans une seringue stérile. Le cas échéant, le transfert de l'urine se fait dans un pot stérile. Par contre, le prélèvement en série pour le calcul doit être placé dans un pot stérile uniquement (sans fixateur).

La traçabilité, dans le respect de la confidentialité, est une des garanties des démarches effectuées par les professionnels médicaux et paramédicaux. Le prélèvement est effectué par le prescripteur, par un biologiste, ou par une personne déléguée (infirmier, technicien, interne), selon la réglementation en vigueur.

Il est à noter que depuis 2015, l'Hôpital central de l'armée a été doté d'un système informatique dénommé le Weblab, permettant la traçabilité et l'enregistrement des prélèvements et des dossiers médicaux des patients.

Cas particuliers des micro-organismes spécifiques :

***Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) :** Dans la forme génito-urinaire chez l'homme, le recueil d'un volume d'urine doit être suffisant le matin, et réalisé trois jours de suite par ponction de l'urine pyélique dans la lithiase d'infection où on retrouve du pus franc, des synéchies, de la fibrine ou rétrécissement pyélocaliciel...

Anaérobies ou bactéries anaérobies strictes (BAS) : Le recueil se fait par ponction de l'urine pyélique avec milieu de transport approprié, en cas de pus franc, de soufre (gaz) ou d'odeur suspecte [81.86].

Exceptionnellement, dans les formes généralisées, associées par exemple à l'endocardite infectieuse (prothèse valvulaire), surtout chez les patients fragilisés, il existe des hémocultures (10 mL dans 2-3 flacons /jour) spécifiques pour ce dernier.

6.4.2. La phase analytique :

Au laboratoire, cette phase correspond à tous les moyens techniques, du conventionnel à l'automatisé et jusqu'au moléculaire, mis en œuvre pour l'exploration étiologique, ainsi que pour la détection des facteurs de virulence et de résistance des agents infectieux associés dans la lithiase d'infection [81.87].

6.4.2.1. Examen cytobactériologique (ECBU) et urine pyélique dans la lithiase d'infection

A. Examen direct

– **Aspect macroscopique :** L'urine normale a une couleur claire d'aspect jaune citrin, tandis que l'urine infectée est souvent trouble, d'odeur nauséabonde et de couleur plus foncée. Parfois, on note la présence de sédiments tantôt blanchâtres (phosphates), tantôt rouge brique (acide urique ou urates).

– **Examen microscopique (Cytologie) :** L'examen microscopique doit rechercher :

- ✓ Une leucocyturie (Polynucléaire Neutrophile /PNN Ou Eléments Cellulaires) ;
- ✓ Une bactériurie ;
- ✓ Une hématurie ;
- ✓ Une cristallurie (phase d'agrégation des cristaux) ;
- ✓ Des cellules épithéliales du vagin (différentes et reconnaissables) ;
- ✓ Autres : levures, spermatozoïdes et cellules rénales.

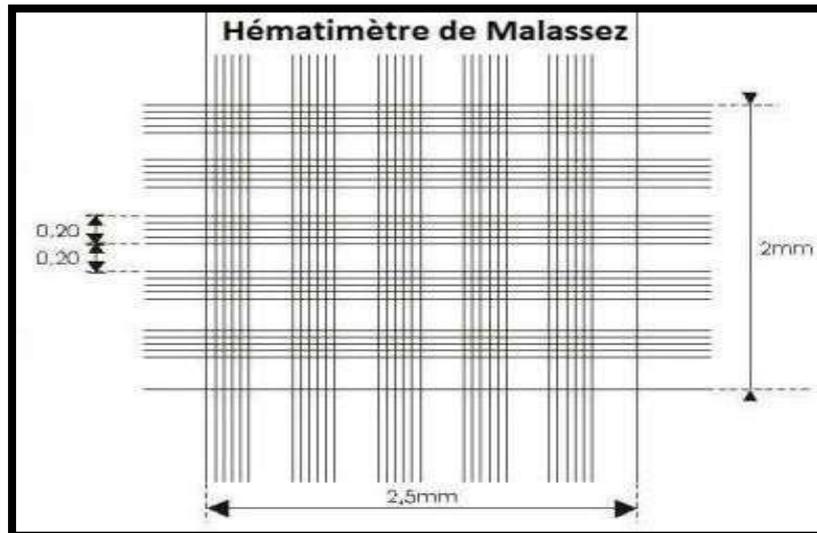


Figure 17 : Présentation de la cellule de Malassez.

En pratique, la numération des leucocytes qualitatifs et semi-quantitatifs s'effectue sur échantillon d'urine, en utilisant un hématimètre ou une cellule calibrée, après avoir homogénéisé les urines par retournement (trois fois de suite) ou par agitation au vortex.

La numération des éléments figurés (dont les cristaux urinaires) se fait dans un hématimètre en verre de Nageotte, permettant la numération dans des volumes respectivement de 50, 40 et 01 mm³.

– **Automates de cytologie urinaire** : Plusieurs automates existent depuis quelques années (Tableau 10). Ils dénombrent les leucocytes, les hématies, les bactéries, les cellules épithéliales, les cristaux et les cylindres, et permettent de répondre aux exigences de l'accréditation grâce aux atouts suivants : rapidité d'exécution (de 70 à 100 échantillons par heure), connexion à l'informatique du laboratoire, avec comme avantages, l'élimination des erreurs de retranscriptions manuelle, une répétabilité et reproductibilité meilleures que celles des méthodes manuelles, l'existence d'échantillons de contrôle, l'enregistrement de la totalité des résultats pour une meilleure traçabilité (Annexe 04).

Cependant, ces automates ne permettent pas de différencier les bactéries mortes des bactéries vivantes. C'est pourquoi il faut toujours dénombrer les micro-organismes urinaires en les cultivant.

Tableau 10 : Principales caractéristiques des automates de cytologie urinaire

Nom des automates	SYSMEX — UF1000 UF	Sedi –MAX	IRIS IQ 200 ELITE
Année de commercialisation	2006	2009	2009
Principe	Cytométrie de flux couplée à une détection fluochrome	Analyse par capture d'image vidéo	Cytométrie de flux couplée à l'analyse par capture d'image vidéo
Cadence théorique (urine/heure)	100	80	70
Volume minimal (mL)	1	2	3
Volume prélevé (mL)	0,8	0,2	1
Sortie des résultats	Quantitatives	Quantitative pour tous les éléments urinaires (seuil cristaux)++++	Quantitative : leucocyte, hématies. Qualitatives pour les autres métabolites urinaires
Images visibles à l'écran	Scattergramme	Image des éléments champs complets	Image des éléments, éléments/images

Sedi-Max et Iris200 ont l'avantage d'être couplés à un microscope qui permet de visualiser les éléments urinaires, de les identifier et de les classer. L'opérateur peut ensuite intervenir et effectuer des modifications directement sur l'écran, éliminer les artéfacts et valider en visualisant comme avec un microscope optique classique tous les éléments urinaires détectés.

Par contre, UF-1000i® ne permet pas un contrôle d'images, mais déclenche des alarmes sollicitant des contrôles microscopiques manuels [88].

– **Double coloration de Gram** : Elle est réalisée sur des urines non centrifugées avec une densité de l'ordre 10^5 UFC/ML. Cependant, il existe un automate de coloration de Gram (RAIL) qui permet de colorer dix lames en même temps.

– **Cristallurie** : Elle consiste à examiner les urines en cellule de Malassez au microscope optique à polarisation. On homogénéise le prélèvement par retournement, puis on prélève l'urine depuis le fond du récipient en remontant vers le milieu afin de récupérer les cristaux et les agrégats les plus volumineux, et on transfère le prélèvement dans la dite cellule de Malassez. Pendant que les cristaux se déposent sur la cellule, on peut mesurer le pH et la densité urinaire. Le pH doit être déterminé avec une précision suffisante (0,1 unité pH), soit au pH-mètre soit, à défaut, avec des papiers pH.

B. Mise en culture de l'ECBU, urine pyélique et calcul urinaire

– **L'ECBU et l'urine pyélique** : Elle est à la fois quantitative et qualitative. Il est à noter que la majorité des bactéries responsables d'infection urinaire ne sont pas exigeantes et sont cultivées sur gélose originaire. Existents différents milieux de culture, en microbiologie médicale, pour l'isolement et l'identification des bactéries uropathogènes. Les milieux plus usuels sont adaptés à la croissance des *entérobactéries* (BGN), uropathogènes responsables des infections urinaires, que ce soit à l'hôpital ou en milieu communautaire.

Ces milieux utilisent la voie de dégradation du lactose pour la différenciation des colonies. Le milieu le plus utilisé en pratique est l'Hektoen, milieu sélectif avec parfois l'ensemencement d'une gélose adaptée aux bactéries à Gram positif telles que gélose au sang, avec ou sans inhibiteur type acide nalidixique et colimycine. Le milieu Lowenstein-Jensen et Columbia est utilisé pour le *Complex Mycobacterium tuberculosis* (tuberculose) et les anaérobies respectivement (Annexe 5).

Ces dernières années, il y a eu l'émergence des milieux chromogènes dont le principe est d'utiliser des substrats synthétiques qui sont des analogues structuraux d'une molécule naturellement dégradée par une enzyme spécifique d'espèces bactériennes ou d'un groupe d'espèces bactériennes. Le résultat de cette attaque enzymatique est un précipité, en colorant du substrat sans diffuser dans la gélose grâce à la propriété chromogénique du substrat présent dans le milieu.

Ces milieux chromogènes permettent la différenciation des espèces bactériennes présentes dans l'urine, de même que la discrimination plus fine des colonies lors de flore polymicrobienne.

Par le dénombrement des bactéries et l'isolement des bactéries en cause, on obtient des colonies bien distinctes les unes des autres.

– **Méthodes d'ensemencement** : La méthode originale de Kass (ancienne) se fait grâce à la dilution en série de 10 à 10. Un volume connu de chaque dilution est étalé sur une boîte de Petri.

La méthode de l'anse calibrée est toutefois la plus utilisée (en pratique), à l'aide d'une anse calibrée à 10 μ l (0,01 ml). Sa lecture se fait selon une méthode standardisée qui permet grâce à un abaque, une conversion de l'aspect de la culture en UFC/ml (unité format colonie par millilitre) et cela, sans dénombrement, ce qui permet une numération de 10^3 à 10^6 UFC/ml, tout en obtenant des colonies pures et isolées [81-83.87].

Néanmoins, il existe des méthodes de lame immergée, où l'on plonge dans l'urine fraîchement émise une lame porteuse de milieux nutritifs, généralement Macconky et CLED. Cette technique chromogène a comme inconvénient de ne pas obtenir des colonies pures, isolées, pour des concentrations de 10^6 bact/ml (Annexe 02).

Pour le diagnostic d'orientation d'infection urinaire, existent des automates pour la détection des bactéries significatives, afin de cribler rapidement les urines et de déterminer les échantillons qui seront alors ensemencés, cela à l'aide de différentes technologies et processus bien codifiés.

Sysmex* 500/1000 notamment, automate de détection, de numération et de criblage, permet de faire la discrimination entre les Bacilles et les Cocci grâce à la coloration de Gram incluse dans la chaîne et de lumière dépolarisée qui fait la distinction entre les globules rouges ou hématies et cristaux de whewellite (C1). Cependant, son principal désavantage est le coût à l'achat, qui n'est rentable que pour des services de biologie médicale ou des laboratoires traitant des centaines d'urines par jour.

Isolement et purification : Après une lecture morphologique, les différentes colonies obtenues sont réisolées sur le même milieu afin d'obtenir des souches pures [81-83.87].

– **Analyse du calcul urinaire** : Selon Nemoy et Stamey's (1989) [50-51], l'analyse du calcul ou de son fragment (nidus) permet d'affirmer le diagnostic de lithiase d'infection. L'analyse en pratique retrouve un aspect macroscopique typique, le plus souvent en « sucre mouillé », lors de la mobilisation ou de la fragmentation au laser et du broyage. Les renseignements épidémiologiques et cliniques sont capitaux et indispensables pour optimiser l'interprétation du résultat : nom, prénom, âge, sexe, siège de la lithiase urinaire, atcd clinique, maladie sous-jacente, état de l'immunité du patient, origine du patient (hospitalisé ou communautaire), antibioprophylaxie et score biologico-clinique (d'ASA ou qSOFA, Annexe 3) [30.89-92].

– **Culture du calcul** : La culture du calcul urinaire s'effectue sous asepsie rigoureuse et sous hotte à flux laminaire de type PSM II comme suit : plusieurs lavages (deux à trois fois) à l'eau physiologique stérile (ou une solution stérile : NaOH à 10 %), broyage et centrifugation (vortexage pendant quinze minutes à 3000 pm), puis enrichissement dans le milieu cœur-cerveille BHIB (ou BGT). La mise en culture est réalisée sur des milieux enrichis (gélose au sang), non enrichies (gélose nutritif), et des milieux spécifiques chromogènes, des milieux Lowenstein-Jensenet, des milieux Columbia pour la tuberculose et les anaérobies. Ils sont utilisés également lors d'ECBU et d'urine pyélique.

C. Identification des micro-organismes

– **Par méthode conventionnelle** à l'aide des tests d'orientation rapide : oxydase, catalase, coagulase, par ensemencement d'une galerie biochimique adaptée, API 20E, système pour l'identification des Entérobactéries et autres bacilles à Gram négatifs non fastidieux, utilisant 20 tests biochimiques standardisés et miniaturisés, ainsi qu'une base de données. Il s'agit d'une galerie qui se présente sous forme de produits desséchés que l'on réhydrate par inoculation de la suspension.

L'identification d'*Escherichia coli* et de *Proteus mirabilis*, par exemple, fait intervenir un ensemble de réactions du métabolisme intermédiaire avec la galerie commerciale API 20E (10S).

Elle peut être faite par le système API (*Analytical profile index*), à partir de la culture pure trouvée. La lecture des galeries API 20E se fait selon les indications du fournisseur. Après codification des réactions en un profil numérique, on se réfère à un catalogue analytique où l'identification est donnée avec un pourcentage et une appréciation.

– **Par méthode automatisée**

À l'heure actuelle, il existe des automates qui effectuent dans un délai de quelques heures (24 h), l'identification et l'antibiogramme des entérobactéries par exemple, respectivement VITEK 2GN et AST N-233 (Figure 18) [93].



Figure 18 : Appareil Vitek2 (HCA.2016).

D. Antibiogramme ou test de sensibilité des bactéries aux antibiotiques

L'antibiogramme est réalisé par la méthode de diffusion en gélose (méthode des disques), qui repose sur la connaissance du phénotype sauvage caractéristique de l'espèce et de différents phénotypes de résistance acquise. Ces dernières sont définies par des caractères de résistance en termes de catégories cliniques (« I » ou « R ») et de diminution significative de la

sensibilité également, ainsi que par des images typiques (synergie ou antagonisme).

***Technique :** À partir d'une culture pure de 18-24 h sur milieu gélosé Mueller-Hinton, une suspension de 5 ml de solution saline (0,9 % NaCl) est préparée en équivalence au standard McFarland 0,5 (108 UFC/ml). À partir de cette suspension bactérienne, une dilution au 1/10 dans l'eau physiologique (0,9 % NaCl) est réalisée et bien homogénéisée, puis ensemencée par écouvillonnage sur des boîtes de Petri gélosées en Mueller-Hinton. Pour l'application des disques d'ATB, les disques d'antibiotiques correspondants sont appliqués à l'aide d'un distributeur ou par une pince en appuyant légèrement, puis incubés pendant 18-24 h (48 h) à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. La lecture est faite par la mesure précise des différents diamètres des zones d'inhibition, en comparant ces résultats aux valeurs critiques figurant dans l'annexe. Les bactéries sont classées dans l'une des catégories suivantes : Sensible, Intermédiaire ou Résistance. La souche *E. coli* ATCC 25922, souche sensible, est utilisée pour le contrôle de qualité des résultats selon CLSI 2020 [93].

La détection des E-BLSE est mise en évidence par la recherche d'une synergie entre l'acide-clavulanique et les céphalosporines de troisième génération selon les techniques suivantes :

— Test de synergie

Il permet la détection de β -lactamases à spectre étendu dans une souche donnée. Ces enzymes peuvent être mises en évidence par la méthode des disques, qui consiste à rechercher une image en « bouchon de champagne » de synergie entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de β -lactamase et les disques de céphalosporines de troisième génération (céfotaxime, ceftazidime et céfepime), et l'aztréonam.

***Technique :** La recherche de β -lactamase à spectre étendu est faite dans les conditions standards de l'antibiogramme, puis en disposant les disques d'ATB : un disque d'Amoxicilline + acide clavulanique (AMC 20/10) et les disques de C3G (CTX 30 μ g, FEP 30 μ g, CAZ 30 μ g) et l'aztréonam (ATM 30 μ g) à une distance de 20 à 30 mm sur les boîtes de Petri (Figures 19 et 20). Incubation pendant 18 heures à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

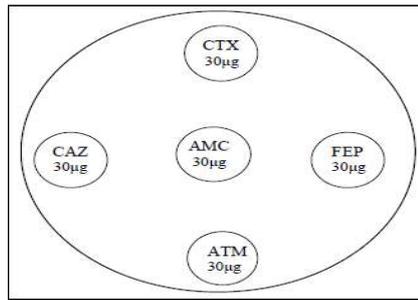


Figure 19 : Position des disques de synergies à la recherche de BLSE
(CTX : Céfotaxime ; AMC : Acide clavulanate ; CAZ : céftazidime ; Fep : Céfépime ;
ATM :Azythromycine).

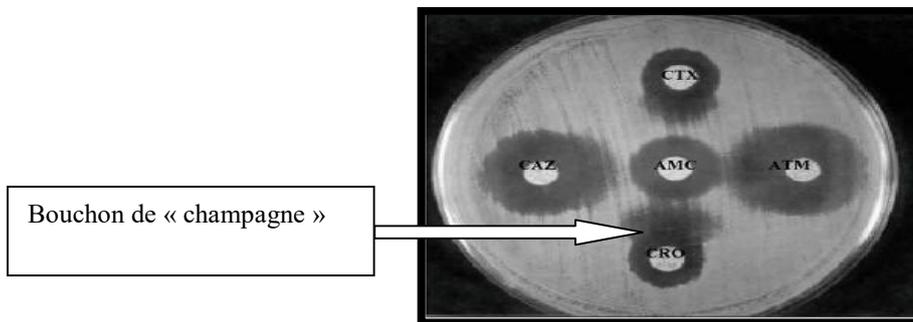


Figure 20 : Test de synergie de *kp* BLSE positive [92].

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

– **Test du double disque** (appelé aussi « test espagnol ») : Ce test consiste à rechercher une augmentation de la zone d'inhibition d'un disque de C3G, précédé par l'application d'un disque contenant l'AMC, comparé à un autre disque portant la même céphalosporine et placé côte à côte sur la gélose de Mueller-Hinton [93].

La procédure se déroule de la même manière que pour la technique d'antibiogramme dans la préparation de l'inoculum et l'ensemencement. Ensuite, sont placés deux disques d'antibiotiques : un disque d'AMC et un disque de CTX (C3G), à une distance de 25 mm selon la figure 20. On laisse diffuser à température ambiante du laboratoire pendant une heure, et on remplace le disque d'AMC par un disque de CTX (C3G). On incube pendant 18 heures à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

Le test du double disque est considéré positif quand le diamètre d'inhibition du disque de céphalosporine de troisième génération appliqué après prédiffusion du disque de l'AMC est supérieur ou égal de 4 à 5 mm par rapport au diamètre d'inhibition du disque de céphalosporine de 3^e génération.

– **Concentration minimale inhibitrice des entérobactéries β -lactamase à spectre étendu :**

Le test permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'un antibiotique, d'un antifongique ou d'un antituberculeux, et de confirmer ou détecter un phénotype de résistance spécifique. Il permet de :

- Détecter de faibles niveaux de résistance ;
- Tester un antibiotique non utilisé en routine ;
- Confirmer un résultat d'antibiogramme ;
- Caractériser les mécanismes de résistance, afin d'aboutir à la prescription la plus pertinente.

Des bandes ETEST[®] BLSE CT/CT sont donc conçues pour confirmer la présence des enzymes inhibitrices de l'acide clavulanique d'ESBL (β -lactamase à spectre étendu) dans les cas de *K. pneumoniae*, d'*Escherichia*, sans oublier les carbapénémases. Le test phénotypique le plus connu est le test de Hodge modifié. La production de carbapénémase est objectivée par une déformation de la zone d'inhibition autour d'un disque d'ertapénème (ETP). Le long d'une strie réalisée avec les souches étudiées et la souche de référence *E. coli* ATCC 25922. Il est important d'inclure un témoin positif (T+, *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705) et négatif (T-, *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706). Ce test est le seul qui permette d'objectiver la production de carbapénémase de type OXA.

Cependant, il est parfois faussement positif pour les souches ayant un défaut d'accumulation des carbapénèmes, associé à la production de céphalosporinases et/ou de BLSE. La réalisation du test de Hodge, modifié en ajoutant de la cloxacilline sur le disque d'ertapénème (dépose 10 μ l d'une solution aqueuse à 75 mg/ml de cloxacilline), permet d'éliminer les faux positifs liés à l'hyperproduction d'une céphalosporinase.

Le test de Hodge (trèfle) modifié est parfois faussement négatif, notamment avec les souches productrices de carbapénémase de type NDM-1. En ce cas, l'ajout de ZnSO₄ (100 μ g/ml) dans le milieu permet d'augmenter très notablement la sensibilité du test. Un test d'inhibition par des inhibiteurs spécifiques des métallo-carbapénémases (EDTA ou acide dipicolinique), comme décrits ci-dessous, est également utile dans ce cas. Les métallo- β -lactamases et l'acide boronique peuvent être des inhibiteurs des carbapénémases KPC).

Il permet d'identifier les souches productrices de métallo- β -lactamases et de KPC, et de les différencier des souches associant imperméabilité et hyperproduction de céphalosporinase. Il ne permet pas la détection des carbapénémase de type OXA, car son algorithme ne permet pas

la distinction avec les souches associant imperméabilité et production de BLSE. Il existe également plusieurs tests commerciaux permettant la détection spécifique des souches produisant des métallo- β -lactamases, basés sur le principe de la synergie entre des carbapénèmes et l'action d'agent chélatant, l'ion Zn^{2+} , responsable de l'activité de ces enzymes.

Il s'agit de tests de type disque combiné, comme pour les BLSE, ou de bandelettes imprégnées permettant la comparaison des CMI en présence et en absence de l'inhibiteur. Les carbapénèmes les plus utilisés sont l'imipénème et l'ertapénème, et l'inhibiteur est le plus souvent l'EDTA. Par ailleurs, il existe un certain nombre de techniques « maison » utilisant ce type de synergie pour détecter la production de ces enzymes.

En outre, il existe des automates d'identification bactérienne qui peuvent tester la sensibilité aux antibiotiques de manière quantitative et orienter le microbiologiste sur les phénotypes de résistance aux antibiotiques, notamment les β -lactamases à spectre étendu et les carbapénémases, à partir d'une culture pure de 16-24 h, grâce à des cassettes lyophilisées, telles que les cassettes AST-233 de l'automate Vitek 2 compact. Celui-ci permet aussi une identification et un antibiogramme direct du prélèvement d'urine lors d'infection monomicrobienne, objectivée à la coloration de Gram dans un délai de 06-10 h [81-83.87.93].

6.4.3. Phase postanalytique

– Interprétation et validation des résultats

Le rôle de la biologie médicale se renforce dans la prestation de conseil, et s'avère particulièrement importante dans le domaine de la microbiologie par le dialogue avec les prescripteurs pour l'optimisation de l'exploration étiologique.

À titre d'exemple, doivent ainsi apparaître clairement l'interprétation :

- ✓ d'un ECBU au regard de son résultat (culture, cytologie) et du contexte clinique ;
- ✓ du mécanisme de résistance aux antibiotiques notifiant clairement la conséquence en matière de prise en charge du patient (et hygiène) porteur de BMR ;
- ✓ et la validation qui doit être harmonisée entre les différents biologistes du laboratoire et les cliniciens ou les chirurgiens prescripteurs ou référents.

La transmission des résultats et des conseils s'effectue au quotidien en communiquant en urgence des résultats définitifs ou partiels (examen direct des urines, examen microscopique sur hémoculture), qui seront à la base d'une décision thérapeutique.

Il convient de mettre en place des registres ou un système informatique mentionnant les données communiquées et les intervenants.

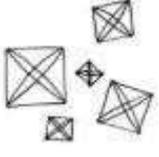
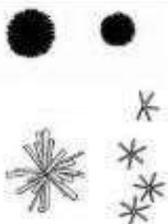
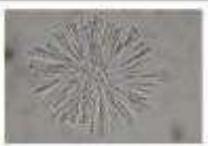
Le microbiologiste doit participer activement au conseil thérapeutique de prise en charge dans le cadre d'une approche pluridisciplinaire.

L'aspect macroscopique des urines (pyélique) trouble signifie probablement une infection urinaire, mais n'est cependant pas spécifique, car 30 % d'authentiques infections urinaires ont un aspect clair.

✓ **Examen direct :** La numération des hématies doit être signalée et dénombrée, car il peut y avoir d'authentiques infections – colonisations urinaires à bactéries lithogènes (comme les tribus des *Proteae*, *Klebsiella pneumoniae* et *Corynebacterium urealyticum*), qui peuvent être associées à une hématurie microscopique, pouvant être confondue avec des cristaux d'oxalate monohydraté de wewhellite.

Dans le cas de l'expertise des cristaux urinaires (Tableaux 11 et 12), les cristaux d'oxalate de calcium, d'acide urique, de phospho-amoniaco-magnésium signent la présence d'une lithiase urinaire d'infection ou mixte, secondaire à une infection urinaire ou colonisation par des bactéries productrices d'uréase (notamment la tribu des *Proteaes*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*), ou de bactéries non connues, productrices d'uréase, comme *E. coli*, pouvant provoquer une alcalinisation des urines (pH > 06) au pH-mètre ou à la bandelette urinaire (BU).

Tableau 11 : Cristaux urinaires dans l'examen direct des urines (lumière optique blanche).

Oxalate de calcium dihydraté (weddellite)	Oxalate de calcium monohydraté (whewellite)	Acide urique	Phosphate de calcium (carapatite)	Phosphates ammoniacaux magnésien ou phosphates triples (struvite)
pH acide	pH acide	pH acide	pH alcalin	pH alcalin
				
				

✓ pH urinaire et densité urinaire

L'utilisation de bandelettes urinaires, méthode simple, fiable, rapide, peu onéreuse, automatisable, permet une mesure immédiate qui doit être associée à la cristallurie pour optimiser l'interprétation dans le diagnostic, la récurrence lithiasique d'infection, et orienter vers d'autres affections associées telles que l'insuffisance rénale par obstruction (calcul), le diabète, etc. **Le pH urinaire** est compris entre 5 et 9. Alcalin signifie : insuffisance rénale chronique, déshydratation, infection-colonisation urinaire liés à une lithiasique d'infection. Diminué ou acide : fièvre ou lithiasique calcique infecté ou infectieuse.

La densité urinaire est chiffrée de 1005 à 1003 :

– Diminuée (< 1003) : diabète insipide, GNA (glomérulonéphrite aiguë), tubulopathie par obstruction... (atteinte des fonctions rénales) ;

– Augmentée (> 1005) : déshydratation, récurrence de lithiasique urinaire, insuffisance cardiaque.

Le tableau 12, englobe la cristallurie retrouvée par lumière polarisée selon les contextes cliniques et épidémiologiques. [1.2.5.6.7.9]

Tableau 12 : Orientation de la cristallurie et sa signification clinique

Nature	Caractéristiques	Anomalies infectieuses-métaboliques
weddellite C1	Présence de 50 % urine réveil ; faciès dodécaédrique des cristaux ; taille des cristaux > 25 µm.	Peu significatifs, sauf chez le lithiasique : hypercalciurie majeure (> 3,8 mmol/l), hyperoxalurie +/-, hypocitraturie. Infection urinaire à micro-organismes non uréalytiques : <i>E. coli</i> , <i>Enterocoque</i> . Risque de récurrence clinique
wewhellite C2	Présence de 50 % urine réveil ; Nombre de cristaux > 200/mm ³ ; faciès des cristaux en navette ou « hématiformes ».	Hypercalciurie majeure (> 3,8 mmol/l), hyperoxalurie massive et primaire. Chez le lithiasique, risque de récurrence clinique, d'altération de la fonction rénale par accumulation de cristaux. Infection urinaire à micro- organisme non uréalytiques : <i>E.coli</i>, <i>Staphylococcus spp.</i>
Bruchite	Présence de 50 % urine réveil ; Nombre de cristaux > 500/mm ³ ; Nucléation hétérogène entre Bruchite et weddellite.	Hypercalciurie, hyperphosphaturie, hyperparathyroïdie à rechercher. Risque de récurrence clinique ; risque majeur de lithiasique calcique.
Orthophosphates calcique (PACC, carbapatite)	Présence de 50 % urine réveil ; Cylindres granulaires.	Infection urinaire à germes non-uréalytique (pH > 6) ; Acidose tubulaire distale ; Chez le lithiasique, risque majeur de récurrence clinique ; Alcalinisation thérapeutique.

Struvite PAM	Présence de 50 % urine réveil	Infection urinaire chronique, à micro-organismes uréalytiques ; Pyélite incrustante à <i>C.urealyticum</i> ; Chez le lithiasique, risque majeur de récurrence clinique.
Urate d'acide d'ammonium	Présence de 50% urine réveil pH > 6.8 pH < 6.8.	Hyperuricurie, hyperammonuirie ; Infection urinaire à micro-organismes uréalytiques ou ammoniogènes ; Hyperuricurie, diarrhée chronique chez le lithiasique ; risque majeur de récurrence clinique.
Acide urique dihydraté	Présence ; Présence de 50 % urine réveil pH > 5 pH < 5.	Chez le lithiasique, risque majeur de récurrence clinique, Selon le pH hyperuricurie ; Infection urinaire à micro-organismes uréalytiques <i>candidas sp.</i> ; Insulino-résistance, diabète de type2
Acide urique amorphe	Présence ; Présence de 50 % urine réveil ; Précipitation abondante.	Pas significatif, hors lithiasique (urine concentrée) ; Infection urinaire à micro-organismes uréalytiques <i>candidas sp.</i> Chez le lithiasique, risque majeur de récurrence clinique, hyperuricurie.

PACC : phosphate amorphe de calcium carbonaté, PAM : phospho-amoniaco-magnesium.

La coloration de Gram dépend de l'état physiologique des bactéries (âge de la colonie, conditions de croissance...). Elle peut être contributive pour l'orientation thérapeutique (en cas de forte leucocyturie lors des urines pyéliques et CNA), et pour adapter les milieux de culture, l'atmosphère et le temps d'incubation pour la recherche de bactérie inhabituelle ou émergente (Gram positif) : *Actinobaculum schaalii*, *Aerococcus urinae* et *Anaerobie*, négative à l'uroculture.

Le résultat est exprimé en hématies et leucocytes par mm³ ou millilitre (unité reconnue internationalement). Il est admis qu'une urine négative contient moins de 10⁴ /ml. Les cellules n'étant pas toutes d'origine vésicale, l'étude du culot urinaire peut identifier les lymphocytes et les polynucléaires (souvent altérées et en amas), des cellules rondes rénales, des cellules en raquette de la couche moyenne et de l'épithélium vésical, de grandes cellules à petits noyaux d'origine vaginale.

En cas de présence de bacille Gram positif à l'examen direct et en absence de culture de 24 h, la recherche d'anaérobiose se pose avec acuité (en fonction du contexte clinique).

Pour les levures, on emploie un milieu Sabouraud ou en milieu chromogène en incubant à atmosphère de 30 °C pendant cinq jours (en collaboration avec le service concerné).

Les milieux chromogènes (milieux d'isolement et d'identification des micro-organismes urinaires) permettent une identification directe d'espèces d'*E.coli*, d'*Enterococcus sp.*

mirabilis. L'identification est plus rapide et permet une éventuelle adaptation de l'antibiothérapie probabiliste, avec une économie substantielle en réactifs et en temps pour le technicien.

Le cas échéant, ce système d'identification peut être pris à défaut, comme pour *Citrobacter freudii* (dépourvue de substrat chromogène, de type b -d -glucosidase qui peuvent être pris à tort pour *E. coli*) (Annexe 5)

Un autre risque, qui n'est pas des moindres, est représenté par la possibilité de confondre un *Enterococcus sp.* et un *Streptococcus sp.* du groupe B, qui peut être responsable d'infection-colonisation urinaire chez la femme enceinte ou le nouveau-né ; dans ce cas de figure, une gélose au sang est souhaitable.

Chez les patients immunodéprimés et/ou âgés, la survenue d'une cystite hémorragique, après une intervention urologique, doit faire suspecter une infection à *Corynebacterium urealyticum* responsable de cystites dites incrustantes. Cette suspicion pourra être confortée par la présence de cristaux de type phosphate ammoniac-magnésiens (PAM) ou autres infectieux, ou un pH urinaire alcalin. Les urines devront êtreensemencées sur gélose au sang et l'incubation sera prolongée de 48 heures au moins.

Cette souche a de plus la particularité d'être multirésistante (possédant une β -lactamase chromosomique). Le *C. urealyticum* est rarement isolé dans les urines, car sa croissance est lente et la culture nécessite plus de 48 heures, alors que les urocultures ne sont habituellement conservées que 24 heures. De plus, les urines sont souvent co-infectées par d'autres micro-organismes, ne permettant pas d'isoler le *C. urealyticum*.

Enfin, la présence de *C. urealyticum* est souvent interprétée par les bactériologistes comme une contamination, et les résultats ne sont pas remis.

En cas de pyélite ou de cystite incrustante, il est donc essentiel de prévenir le laboratoire de bactériologie de la recherche de *C. urealyticum*, et de demander des cultures prolongées, éventuellement sur milieu sélectif. Le germe peut parfois être isolé à partir d'un fragment de calcul ou d'une biopsie de plaque calcifiée.

Par ailleurs, en raison des actualités concernant l'interprétation et l'implication des groupes de bactéries dans le diagnostic des infections urinaires, ceux-ci sont dorénavant classés de 01 à 04, selon le *European Guidelines for urines analysis, 2017* (Tableaux 13,14 et15). *E. coli* reste dans le podium avec des fréquences qui dépendent de l'origine (nosocomiale, liées aux soins ou communautaire).

En revanche, il est à signaler que les bactéries uréalytiques participant à la lithogénèse infectieuse du calcul urinaire, avec des facteurs anatomiques ou iatrogènes spécifiques, tendent à changer de position sur le plan étiopathogénique, cela en se rapprochant de plus en plus du premier groupe. Par exemple, selon les dernières publications, l'espèce *E.coli* (non uréalytique) a été retrouvée chez les patients porteurs de lithiase urinaire grâce à leur protéine membranaire vésiculaire externe (omv) [2.11.32.33].

D'autres cas particuliers méritent d'être signalés, celui de la femme enceinte par exemple : l'isolement de *Streptococcus B* (même valeur diagnostique que son dépistage génital) et les infections à *candidas albicans* et *glabrata* peuvent se rencontrer chez les patientes enceintes porteuses de lithiase urinaire urique ou autres.

Par conséquent, l'interprétation des résultats dépend de la phase tant critiquée, la phase préanalytique (prélèvement, conservation, transport, identification, renseignement clinique). Une interprétation correcte des résultats ECBU obéit aux paramètres suivants :

- le contexte épidémiologique (infection associée aux soins ou communautaire, antécédents, terrain) ;
- les facteurs de risque (cathétérisme urinaire, intervention sur les voies urinaires) ;
- la présence de symptômes urinaires ou de fièvre ;
- un éventuel traitement antibiotique ou antifongique en cours ;
- le niveau de la leucocyturie ;
- la qualité du recueil objectivée par l'absence de cellule épithéliale à l'examen microscopique ;
- le niveau de bactériurie ;
- la nature des micro-organismes isolés ;
- le monomorphisme /polymorphisme de la culture.

En communautaire, la leucocyturie $> 10^4$ /ml, chez les populations non sondées, et l'absence de processus inflammatoire peuvent être associées à une hématurie 10^4 hématies/ml (témoins de microhémorragie). L'absence de leucocyturie a une bonne valeur prédictive négative (80 à 90 %) pour exclure une infection urinaire en dehors de l'hôpital ou en ville.

Des faux négatifs d'une leucocyturie peuvent exister lors d'urine diluée (patient neutropénique, lyse de leucocyte > 24 h avant la technicité), effectuée au tout début de

l'infection. En nosocomiale (liée aux soins), les signes cliniques sont les suivants : hyperthermie $> 38\text{ }^{\circ}\text{C}$, frisson, hypothermie, hypotension inexplicée, impériosité mictionnelle, douleur sus-pubienne.

Chez le sujet âgé, l'infection urinaire se caractérise, selon les critères de Fried, par la présence d'une aggravation du statut mental ou de la dépendance, l'apparition et/ou l'aggravation d'une incontinence sans cause retrouvée à l'ECBU : leucocyturie $> 10^4/\text{ml}$ et bactériurie $> 10^3$ UFC/ml avec au plus deux micro-organismes différents chez les patients sans sondage vésical, ni autre abord de l'arbre urinaire. En cas de bactériurie $> 10^5$ UFC/ml en l'absence de signe évocateur, ou en cas de bactériurie $> 10^3$ UFC/ml et présence de plus de deux micro-organismes différents chez les patients avec sondage vésical ou autre abord de l'arbre urinaire en cours ou dans les jours ultérieurs [81-83].

***Interprétation de la culture positive :** Toute bactériurie supérieure au seuil de détection doit être considérée comme significative avec 10^3 UFC/mL [81-83].

Par exemple, lors d'un urosepsis dû à une infection urinaire compliquée, il faut savoir que le prélèvement modifie le seuil significatif de l'interprétation de la bactériurie. Par exemple, pour les prélèvements d'urines directement dans la vessie, le bassinnet et la pyélostomie (urine pyélique après fragmentation du calcul urinaire), la bactériurie est de 10^2 UFC/ml par urine pyélique, ce qui est considéré comme significatif pour faire un antibiogramme des souches pures retrouvées.

Il est noté que malgré la difficulté d'isolement de la tuberculose urogénitale ($< 1\%$), il est conseillé de joindre à l'exploration un milieu spécifique de Lowenstein-Jensen, car la tuberculose, dans ce cas de figure, est le plus souvent pauci-bacillaire (sensibilité examen direct faible) [14.58-61].

La candidurie trouve sa place chez les patients à risque et en particulier les patients hospitalisés en unité de soins intensifs où la colonisation peut résulter d'une localisation secondaire due à une véritable candidémie ou fongémie, surtout dans les états d'immunodépression profonde ou chez les porteurs de lithiase urique objectivée à l'examen direct cristallurique lors des urines du réveil [29.53.81-83.88].

Tableau 13 : Seuils de bactériurie en fonction du groupe d'uropathogènes

Groupe	Espèces bactériennes	Seuil de significativité	Sexe
01	<i>E. coli</i> , <i>S. saprophyticus</i>	10 ³ UFC /mL	Homme ou femme
02	Entérobactéries autres que <i>E.coli</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>S. aureus</i> (monomicrobiens), <i>Corynébacterium urealyticum</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	10 ³ UFC /mL	Homme
		10 ⁴ UFC/mL	Femme
03	Bactéries à Gram positif (<i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Aerococcus urinae</i> , Staphylocoque à coagulas négative autre que <i>S. Saprophyticus</i> , <i>Enterococcus</i> (en association avec <i>E. coli</i>), Bacilles à Gram négatif (<i>Acinetobacter sp</i> , <i>Sténotrophomonas maltophilia</i> , autres <i>Pseudomonaceae</i>), <i>Candidas sp</i> .	10 ⁵ UFC /mL	Homme ou femme
04	Lactobacilles, <i>Streptococcus</i> Alphahémolytiques, <i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Bifidobacterium sp.</i> , Bacilles diphtérimorphes (sauf <i>Corynébacterium uréalyticum</i> , <i>C</i> , séminale*).	/	/

* : Germes lithogènes

Tableau 14 : Représentation de l'infection urinaire communautaire liée à la lithiase d'infection

Contexte clinique	Signes cliniques	Leucocyturie > 10 ⁴ /ml	Bactériurie avec au plus 02 micro-organismes différents	Commentaires	Antibiogramme	
Communautaire ou associée aux soins chez un patient porteur d'une lithiase ou anomalies anatomiques	+	+	> 10 ³ UFC/mL	Infection urinaire	OUI	
			< 10 ³ UFC/ /mL	Inflammation sans bactériurie Traitement antibiotique en micro-organismes lente ou difficile	NA	
	+	-	> 10 ³ UFC/mL	Patient immunocompétent refaire l'ECBU	Oui si monomicrobien	
				Suspicion infection urinaire débutante chimiothérapie, greffePossible infection urinaire	OUI	
	-	Variable	< 10 ³ UFC/mL	10 ³ UFC/mL	Colonisation	NON
				Absence d'infection-colonisation urinaire	NA	

NA : Non applicable.

Pour les infections communautaires de la femme, une bactériurie limitée à 1 ou 2 espèces > 10³ UFC/mL est significative avec *E. coli* et *S. saprotyticus*. Pour les bactéries du groupe 02, le seuil est à 10⁴ UFC/mL et à 10⁵ UFC/mL .

Pour les micro-organismes du groupe 03, il n'y a plus de distinction de seuil selon qu'il s'agit d'une cystite ou d'une pyélonéphrite aiguë. Une bactérie > 10³ UFC/mL chez l'homme est significative pour les espèces bactériennes des groupes 01 et 02 [81-83.87].

En cas d'échantillon obtenu par une méthode invasive, toute bactériurie supérieure au seuil de détection doit être considérée comme significative : 10² UFC/mL pour 0,01 mL d'urineensemencée, obtenue par pyélostomie, urétérostomie ou cystoscopie et 10¹ UFC/ml pour 0,1 mL d'urineensemencée, obtenue par ponction sus-pubienne.

Tableau 15 : Représentation de l'infection-colonisation urinaire associée à la lithiase d'infection

Contexte	Signe clinique	Bactériurie à 02micro-organismes différents	Commentaires	Antibiogramme
Associées aux soins chez un patient porteur du dispositif endo-urinaire > 48 H	+	> 10 ³ UFC/mL	Infection urinaire	Oui
		< 10 ³ UFC/mL	Traitement antibiotique en cours, recherche micro-organisme à culture lente ou difficile ou étiologie non infectieuse	Non
		> 10 ⁵ UFC/mL	Colonisation ou infection urinaire	OUI
		> 10 ⁴ à < 10 ⁵ UFC/mL	Colonisation probable à contrôler sur un nouveau recueil	NON
		< 10 ⁵ UFC/mL	Absence d'infection urinaire ou de colonisation	NA
En cas de prélèvement d'urine directement par ponction sondage aller-retour de l'adulte urétérostomie (autre que Bricker), pyélostomie cystoscopie et urine pyélique (calcul)	+	> 10 ² UFC/mL (02micro-organismes différents) +++	Infection urinaire	OUI
En cas de prélèvement d'urine directement par ponction sur-pubienne	+1	Pas de seuil défini	Infection urinaire	OUI
Dérivation urétéro-iléale selon briker ou de néo vessies	-		Colonisation	NON
Ponction sus-pubienne dans la vessie ou le bassinot	+	> 10 ⁴ UFC/MI	Infection urinaire	OUI

NA : non appliqué

Il convient de suspecter une IUAS devant une fièvre, une hypothermie < 36 °C, l'altération de l'état général, malaise général, léthargie, hypotension.

Pour les dispositifs endo-urinaires, un seuil de bactériurie à 10³ UFC/mL a été retenu par

l'IDSA. Cependant, devant une bactériurie comprise entre 10^3 et 10^5 UFC/mL, il est fortement souhaitable de contrôler sur un nouveau prélèvement en cas de signes cliniques évocateurs. Dans tous les cas, la clinique prime sur le seuil de bactériurie pour la décision thérapeutique et peut justifier la réalisation d'un antibiogramme (voire deux maximum) sur demande explicite du clinicien. C'est la présence d'un état septique ou de signes cliniques évocateurs qui déclenchent la réalisation de l'antibiogramme. Le prélèvement doit respecter les recommandations du service d'hygiène de l'institution hospitalière. Le prélèvement pour les stomies de type Bricker est réalisé par une sonde courte, sans prélèvement dans la poche.

7. Traitement de la lithiase d'infection

Le but du traitement de la lithiase urinaire d'infection repose sur les éléments suivants :

- suppression totale du calcul sans lésion du parenchyme rénal ;
- éradication stable de l'infection urinaire ;
- recherche des troubles métaboliques associés, notamment l'hyper-oxalurie ou hypocalciurie ;
- correction des anomalies anatomiques favorisant la stase et l'infection-colonisation du tractus urinaire.

Les moyens disponibles pour la prise en charge adéquate sont médico-chirurgicaux, selon l'Association française d'urologie (2018) [80]. Il est important de différencier la prise en charge en urgence de la colique néphrétique aiguë qui peut engager le pronostic vital par des signes d'urosepsis ou de choc septique (bactériémie), nécessitant un bilan plus complet et pluridisciplinaire [94-97].

Indication : en cas de colique néphrétique aiguë, l'objectif est de traiter la douleur par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), en bloquant les cycles oxygénases impliqués dans la cascade inflammatoire. Le ketoprofène (Profenid[®]) 100 mg IV sur 20 min 3 s ×/j est reconnu comme le plus efficace, suivi du paracétamol et, en dernier recours, les morphiniques.

Pour la restriction hydrique ou l'hyperhydratation, aucune étude n'a permis de montrer la supériorité de l'une des attitudes par rapport à l'autre. Les boissons sont laissées libres en fonction de la soif du patient.

Le bon sens recommande cependant la restriction hydrique en cours de phase douloureuse.

✓ **La colique néphrétique aiguë compliquée** : Elle nécessite une hospitalisation en urologie, une mise en condition avec pose de voie veineuse périphérique et rééquilibration hydro-électrolytique. Une prise en charge réanimation peut être nécessaire. Le traitement est alors chirurgical et consiste à drainer les urines du haut appareil urinaire. Le drainage des urines est dans la majorité des cas assuré par une sonde urétérale externe qui est souvent préférée à la sonde JJ en cas d'urines pyéliques purulentes (cavités pyélocalicielles dilatées) associant une C3G avec un aminoside (ceftriaxone 1 à 2 g/24 h IVL en une prise +Gentamycine- GentamicineR 3 mg/kg/24 h IVL en une prise) secondairement adaptée à l'antibiogramme. Le relais per os peut être envisagé à 48 h d'apyrexie, durée totale de 10 à 21 jours.

– **En dehors de l'urgence** : L'expulsion du calcul peut être spontanée. On estime qu'un calcul de 4 mm de l'uretère pelvien a 90 % de chance d'être expulsé spontanément. Au contraire, les calculs de plus de 8 mm ont une chance quasiment nulle d'être évacués naturellement.

7.1. Traitements médicaux

Le traitement médical comprend les mesures diététiques générales. Elles sont applicables à tous les patients atteints de maladie lithiasique urinaire, dont infectieuse : diurèse > 3 000 mL = premier objectif à atteindre et à maintenir au long cours, évalué sur le volume des urines de 24 h ou sur les urines du réveil avec mesure de la densité (objectif < 1015).

Les boissons sont à répartir tout au long de la journée. L'alimentation doit être équilibrée/réajustée : normalisée en calcium (800 mg à 1 g/j), en sel (< 9 g/j), et en protéines animales (< 1,2 g/kg/j). Il convient de limiter les prises excessives d'aliments riches en oxalates (chocolat, fruits secs, épinards, oseille, rhubarbe, thé), limiter les boissons sucrées et sodas (fructose).

Par contre, l'antibiotique est à adapter en fonction de la nature des calculs : calculs phospho-ammoniac-magnésien (PAM) ou struvite pure ou mixte (phosphocalcique), suppression des boissons alcalines, acidification des urines (acide phosphorique ou citron) avec traitement antibiotique adapté à l'épidémiologie microbiologique émanant du calcul infectieux ou infecté.

Le développement des biofilms bactériens comme déjà suscité est associé à l'infection-colonisation urinaire (UTI) et peut mener à des complications urologiques graves, incluant la formation de lithiase d'infection. En outre, la formation des biofilms confère stabilité et

diminue la susceptibilité à l'antibiotique compliquant le traitement. Par conséquent, la gestion des patients avec les lithiases d'infection se focalise sur la réduction du biofilm et l'utilisation des antibiotiques (avant et après fragmentations) pour éliminer les bactéries planctoniques baignant dans le tractus urinaire.

L'éradication stable de l'infection urinaire par l'antibiothérapie n'est possible qu'après l'ablation totale des calculs. L'antibiotique doit être adapté à l'antibiogramme du germe responsable de la lithiase. Tous les moyens doivent donc être mis en œuvre pour identifier le germe : ECBU répétés, culture des urines urétérales ou pyélocalicielles et du calcul.

Traditionnellement, le traitement pharmacologique de l'infection du calcul comporte l'utilisation des antibiotiques administrés en préopératoire. L'approche du traitement est conçue pour réduire le risque général de l'infection lié à la chirurgie et éradiquer le réservoir à bactéries pouvant être résistantes, comme chez la majorité des uropathogènes émergents compliquant la pharmacologie du traitement. Par exemple, la *k. pneumoniae* est résistante à l'ampicille ; la ticarcilline a un fort taux d'acquisition de nouveaux mécanismes de résistance. Le *Proteus vulgaris* est résistant naturellement à certains antibiotiques les plus communs, incluant pénicilline G, quelques céphalosporines, Céfazolines et les *Enterococcus sp.* doués de résistance naturelle aux céphalosporines de troisième génération et au Lingosamide.

À noter que les germes non uréasiques impliqués dans les infections urinaires (*E. coli* notamment) sont capables d'induire la précipitation de cristaux de carbapatite et d'altérer l'urothélium favorisant ainsi l'adhérence des cristaux. Par ailleurs, ces bactéries consomment le citrate induisant ainsi une hypocitraturie qui diminue le pouvoir inhibiteur des urines à l'égard de la croissance et de l'agrégation cristallines [1.2.7.9.12.23.30. 91.98].

Un ECBU à la recherche de germes uréasiques doit être réalisé tous les 15 jours pendant un mois, tous les mois pendant trois mois et tous les trois mois pendant un an.

Le geste urologique doit donc être encadré par une bi-antibiothérapie parentérale à large spectre (céphalosporine de troisième génération et aminoside ou quinolone), débutée deux à quatre jours avant. Le geste est poursuivi jusqu'à disparition de la bactériurie et de la leucocyturie (15 jours minimum). Les antibiotiques prescrits en relais doivent être à bonne diffusion tissulaire (fluoroquinolones, triméthoprim-sulfaméthoxazole) et adaptés à l'antibiogramme.

L'utilisation de l'uréase ou des inhibiteurs est indiquée pour les patients pour qui l'intervention chirurgicale est contre-indiquée ou ceux présentant les infections récurrentes

telles que l'hydroxyurea, la thio-urée, la methylurea, acide l'acetoxyhydroxamique et le phosphotriamide.

Ces dernières années, les efforts se sont concentrés sur la découverte et l'utilisation des agents pharmacologiques qui peuvent empêcher, ou atténuer du moins, la colonisation bactérienne, la formation de biofilm, et la production de facteur de virulence par la perturbation des différentes fonctions bactériennes telles que la sensation de *Quorum sensing*, la motilité d'essaimage et l'attachement bactérien.

Le traitement ortho-moléculaire à base de vitamine C et de magnésium citraté peut être envisagé en compagnie des règles hygiéno-diététiques avec une hyper-hydratation à 3-4 litres/jour pouvant participer à l'équilibre de l'urobiome et du pH urinaire.

7.2. Traitements chirurgicaux

La prise en charge urologique des calculs urinaires d'infection ou d'autre nature se fait par:

✓ **Lithotritie extra- corporelle (LEC)**, une méthode non invasive :

Principe : Un générateur extra-corporel produit des ondes acoustiques. Celles-ci sont focalisées sur le calcul par un système de repérage radiologique afin de le pulvériser.

Indications : en première intention pour le traitement des calculs du rein < 20 mm. Calculs radio-opaques (ils doivent être visibles à l'ASP), de densité < 1000 UH (unité heizfield). Traitement de référence chez l'enfant. Contre-indications : grossesse; infection-colonisation urinaire non traitée ; obstacle en aval du calcul ; tuberculose rénale ; anévrisme de l'artère rénale ou de l'aorte ; troubles de la coagulation non corrigés. Complications : CNA post-LEC par migration des fragments résiduels (20 %) ; hématurie et infections urinaires, voire PNA à risque de complication, notamment en cas de colonisation par une bactérie multi-résistante.

✓ **Urétéroscopie (rigide et souple)** : Il s'agit de l'introduction par voie naturelle de façon rétrograde d'un urétéroscope permettant de visualiser et de travailler au contact du calcul. Extraction du calcul à la pince, fragmentation au laser. Risque de lésions urétérales (perforation, stripping).

Indications : calculs résistants à la LEC (densité > 1 000 UH), ou contre-indication de la LEC ; en concurrence avec la LEC pour les calculs rénaux < 2 cm; les calculs de l'uretère pelvien et le parenchyme rénal. Néphrolithotomie percutanée (NLPC) : ponction percutanée du rein sous contrôle échographique et fluoroscopique (rayons X) (patient en

décubitus ventral ou latéral), puis dilatation progressive du trajet obtenu permettant la mise en place d'une gaine d'accès et l'introduction d'un nephroscope. Puis visualisation, fragmentation et extraction des calculs.

Indications : Traitement de référence pour les calculs de 2 cm, coralliformes ou complexes du rein.

✓ **Mini-néphrolithotomie percutanée (mNLPC)** : Comme alternative pour les petits calculs de 1 à 2 cm, il s'agit d'une bonne action pour une reprise en second lieu, en cas de récurrences, pour obtention des fragments du calcul à analyser. Elle est indiquée en outre pour les lithiases des calices inférieurs et en cas d'anomalie anatomique du tractus urinaire.

✓ **La chirurgie à ciel ouvert** : Elle devient de moins en moins indiquée aujourd'hui (1% des traitements pour les calculs urinaires). Néphrectomie polaire ou totale réalisée pour les calculs avec parenchyme détruit en regard, en association avec des anomalies anatomiques et en cas de taille du calcul trop importante (3 cm).

8. Évolution de la lithiase d'infection

8.1. Bactériémie-urosepsis

La lithiase d'infection peut engager le pronostic vital des patients avec de la bactériémie ou de l'urosepsis pouvant survenir après la fragmentation du calcul urinaire ou lors de la pyélonéphrite obstructive compliquée (CNA) par un calcul résiduel infecté ou infectieux.

L'hémoculture est un moyen de faire le diagnostic de cette bactériémie et des complications infectieuses (germes banals) associées à la lithiase d'infection.

Indication de l'hémoculture : Lors des bactériémies ou fungémie avec fièvre ou frissons (urosepsis/qSOFA) dans la CNA obstructive aiguë ou récidivante, : tableau d'altération de l'état général, trouble de la conscience ou de la vigilance chez le sujet âgé et fièvre et douleur atypique chez l'enfant, lithiase avec abcès rénal fébrile (Anaérobie) et pyélonéphrite emphysémateuse sont associées aux patients fragilisés (immunodéprimés). Selon la Société de réanimation française (SRLF.2017), l'urosepsis postopératoire est dû aux micro-organismes échappant à l'antibioprophylaxie lors de la fragmentation du calcul urinaire [52.80.86.99].

✓ **Modalités de prélèvement** : Les prélèvements d'hémoculture peuvent être multiples ou uniques chez l'adulte (Tableau19) et l'enfant. L'idéal est de prélever avant ou à distance de l'administration d'antibiotique ou d'antifongique (à la vallée). Cependant, il existe des flacons d'hémoculture comportant des résines absorbantes de cations améliorant la détection des

staphylocoques et des entérobactéries (dont les uropathogènes banals, uréalytiques ou non) [4.85-87].

– Hémoculture périphérique chez l'adulte

Doivent impérativement être suivies les règles de prélèvement : porte de la chambre fermée, port d'un masque de type chirurgical, de lunettes de sécurité couvrantes, lavage ou désinfection des mains, gants stériles, désinfection de l'opercule des flacons d'hémoculture et du point de ponction avec un antiseptique ou alcool 70-90 °C. Pendant le prélèvement, contrôler le bon remplissage des flacons (10 mL/flacon), identifier correctement les flacons prélevés (enregistrement et traçabilité via weblab par code-barre++) et les incubés dans l'automate Bact-alert selon la figure 21 ci-après.



Figure 21 : Automate d'incubation pour flacon d'hémocultures.

– Hémocultures périphériques chez l'enfant

Il est généralement difficile d'obtenir le volume de sang suffisant. La concentration bactérienne est plus élevée chez l'enfant que chez l'adulte. Cela permet donc de limiter la quantité de sang à quelques millilitres chez le nouveau-né. Par exemple, chez les enfants de moins de 13 kg, il est possible d'utiliser les flacons pédiatriques. La quantité de sang à introduire dans les flacons pédiatriques est fonction du poids de l'enfant (Annexe 02).

Il est possible de prélever des hémocultures en une seule ponction (4 à 6 flacons), « prélèvement unique » (voir annexe/tableau), en respectant la quantité de sang de 10 ml pour chaque flacon incubé dans l'automate dans les plus brefs délais, sans pré-incubation à 35 °C en dehors de l'automate (faux négatif). [80.86].

Tableau 16 : Caractéristiques des modalités de prélèvement d'hémocultures

	Prélèvements multiples	Prélèvement unique
Nombre de ponctions	2 à 3	1
Nombre total de flacons mis en culture	4 à 6	4 à 6
Sensibilité	Équivalente à nombre de flacons égal, et remplissage égal et de même, les prélèvements souvent espacés dans le temps ou réalisés simultanément	
Taux de contamination	Modéré	Faible (divisé par 2 à 3)
Fréquence de l'hémoculture solitaire (seulement 2 flacons prélevés par épisode infectieux)	Élevée	Faible
Avantage	Inconfort du patient	Confort du patient (antibiothérapie rapide) et risque moindre d'accident d'exposition au sang

Par ailleurs, l'interprétation des résultats retrouvés lors de bactériémie-urosepsis dépend de quelques facteurs particuliers, notamment le délai du rendu des résultats, sachant que le pronostic vital peut être engagé. Le résultat de l'examen microscopique, comme les résultats de l'identification ou de l'antibiogramme doivent être communiqués dès que disponibles aux cliniciens ou médecins en charge du patient, bien entendu après validation technique et biologique des analyses. Une trace écrite de cette communication est alors conservée, en confrontant les données obtenues de l'identification ou l'antibiogramme avec la symptomatologie clinique. En cas de prélèvements positifs multiples montrant des isolats de la même espèce, l'étude de la sensibilité aux anti-infectieux pourra ne pas être répétée sur chaque isolat, selon les tableaux 17 et 18 ci-après.

Tableau.17 : Interprétation des résultats d'hémocultures avec prélèvement multiple

Signification d'un ou plusieurs flacons positifs				
Nature des micro-organismes isolés	Nombre de flacons isolés	Nombre total D'hémocultures réalisées	Renseignements cliniques	Conduites à tenir
Staphylocoque à coagulase négative <i>Cutibacterium (propionibacterium)</i> Acnés Streptocoque alphahémolytique <i>Bacillus sp.</i>	1 ou 2 d'une même paire d'hémoculture	≥ 2	Pas de signes cliniques	Contamination probable
			Service onco-hématologie, réanimation, matériel, infections associées aux soins	Identification et antibiogramme avec la mention « à interpréter en fonction du contexte clinique et de l'antisepsie du prélèvement »
		1	Service de néonatalogie	Identification et antibiogramme
	1	Quel que soit le contexte clinique	Identification et antibiogramme avec la mention, valeur prédictive positive faible, « à interpréter en fonction du contexte clinique et de l'antisepsie du prélèvement ».	
> 2 paires différentes	≥ 02	Quel que soit le contexte clinique	Identification et antibiogramme, sans restriction	
<i>Staphylocoque aureus</i> Streptocoque <i>Bêta-hemolyticus</i> <i>Enterococcus</i> Entérobactéries <i>Pseudomonas Aeruginosa</i> <i>Candidas sp.</i> Anaerobies <i>Neisseria Menigitidis</i> <i>Haemophilus sp.</i> Groupe HACCEK <i>Brucella sp.</i> <i>Pasteurella sp.</i> <i>Campylobacte sp.</i>	> 01	06	Quel que soit le contexte clinique	Identification et antibiogramme, sans restriction

Tableau 18 : Interprétation des résultats d'hémocultures avec prélèvement unique

Signification d'un ou plusieurs flacons positifs				
Nature des micro-organismes isolés ou trouvés	Nombre de flacons isolés	Nombre total d'hémocultures réalisées	Renseignements cliniques	Conduites à tenir
Staphylocoque à coagulase négative <i>Cutibacterium</i> (<i>Propionibacterium</i>) Acnés Streptocoque <i>alpha</i> hémolytique <i>Bacillus sp.</i>	01	4 à 6	Pas de signes cliniques	Contamination probable
			Service onco-hématologie, réanimation, cathéter central, infections associées aux soins	Identification et antibiogramme avec la mention « à interpréter en fonction du contexte clinique et de l'asepsie du prélèvement »
		1 ou 2	Service de néonatalogie	Identification et antibiogramme
		2	Quel que soit le contexte clinique	Identification et antibiogramme avec la mention, valeur prédictive positive faible, « à interpréter en fonction du contexte clinique et de l'antiseptie du prélèvement ».
	2-3	4 à 6	Quel que soit le contexte clinique	Identification sur tous les flacons et antibiogramme sur un flacon (sur deux flacons distincts, en cas de Staphylocoque à coagulase négatif), sans restriction
Staphylocoque <i>aureus</i> Streptocoque Beta-hémolytique <i>Enterococcus</i> Entérobactéries <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Candida sp.</i> <i>Anaerobies</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Haemophilus sp.</i> Groupe HACCEK <i>Brucella sp.</i> <i>Pasteurella sp.</i> <i>Campylobacte sp.</i>	> 03	4 à 6	Quel que soit le contexte clinique	Identification sans restrictions sur plusieurs flacons et antibiogramme sur flacon (sur deux flacons en cas de staphylocoque à coagulase négatif)

L'évolution des calculs d'infection est souvent sournoise. En quelques mois, ils peuvent se ramifier dans l'ensemble des cavités pyélocalicielles et donner un aspect de calcul coralliforme. En l'absence de traitement, l'augmentation du volume des calculs et l'infection chronique du parenchyme rénal peuvent détruire les reins. La lithiase d'infection est la cause la plus fréquente d'insuffisance rénale terminale d'origine lithiasique et représente environ 0,7 % des causes d'insuffisance rénale chez les dialysés [1.2.5.7.9].

8.2. Les complications infectieuses de la lithiase d'infection

Elles peuvent se présenter par la pyélite et la cystite incrustante. La **pyélite incrustante** est une entité individualisée, d'abord dans les greffons rénaux de sujets transplantés, puis dans des reins natifs [1.2.5.7.9].

La littérature rapporte qu'un ECBU positif en préopératoire (j-7 et j-1) ne reflète pas les bactéries responsables du risque infectieux postopératoire, car ces dernières sont enchâssées dans les interstices du calcul urinaire. Par contre, le dit ECBU préopératoire découvre les bactéries planctoniques (libérées dans l'urine). Une étude prospective réalisée au cours des années 2006 à 2009 montre que chez 328 patients soumis à une lithotritie ou une chirurgie per cutanée pour ablation d'un calcul urinaire, 3 % (11/328) ont présenté des complications infectieuses (pyélonéphrite, urosepsis) où l'examen bactériologique du calcul urinaire retrouve les mêmes pathogènes (espèces et profils de résistance) que ceux révélés par l'ECBU des patients réadmis pour la même pathologie, avec 64 % (07/11) *versus* 9 % (1/11) par rapport à l'ECBU préopératoire. [9].

D'après l'urolithiase guidelines de l'EAU (2013) et les résultats des études avec analyse de régression ($p = 0,001$), il a été démontré que l'examen bactériologique positif du calcul était un facteur de risque puissant dans la prévention de la pyélonéphrite et/ou de l'urosepsis postopératoire et l'orientation de l'antibioprophylaxie dans la prise en charge des patients lithiasiques pré ou postopératoire [43.47.57.77.88-91.99-111].

8.3. L'insuffisance rénale aiguë (IRA) :

Elle peut être obstructive, liée aux calculs expliquant 01 à 02 % des causes d'IRA, favorisée par la présence de calculs urétéraux bilatéraux, un rein unique ou la préexistence d'une maladie rénale chronique (MRC). Son pronostic est favorable en cas de levée rapide de l'obstacle, dépendant notamment de l'étendue et de la durée de l'obstacle, ainsi que de la présence associée d'une infection urinaire.

L'incidence et la prévalence de la MRC sont significativement plus élevées chez les patients lithiasiques. Le risque d'avoir un débit de filtration glomérulaire (DFG) inférieur à 60 ml/min/1,73 m² est ainsi de 22 à 42 % plus élevé chez les lithiasiques que dans la population témoin. Un facteur de risque potentiellement aggravant de MRC (maladie rénale chronique) est la prise en charge urologique, notamment en cas de chirurgie ouverte ou de néphrectomie. Cependant, l'émergence des techniques mini-invasives (néphrolithotomie percutanée, lithotripsie extracorporelle et urétéroscopie) a permis de minimiser ce risque. Outre l'hypertension artérielle et le diabète, les mécanismes potentiellement impliqués dans le développement de la MRC sont les épisodes obstructifs, les infectieux répétés, les anomalies du tractus urinaire, le type de calcul (Struvite et maladies lithiasiques héréditaires incluant la cystinurie) ainsi que la prise de traitements néphrotoxiques (antibiothérapie, anti-inflammatoires non stéroïdiens) qui peut également être associée à la maladie rénale chronique [1.2.5.9.28.43].

MATERIELS ET METHODES

1. – Problématiques et justificatifs

1.1. Sur le plan épidémiologique

La lithiase urinaire d'infection peut représenter un problème majeur de santé publique. On note un changement de sa fréquence durant les dernières décennies, aussi bien à notre niveau qu'au niveau mondial [1.2.3.7.9.79].

Les dernières actualisations de la classification épidémiologique de la lithiase urinaire, notamment d'infection, sont attribuables aux modifications des conditions sanitaires, des habitudes alimentaires, du niveau de vie des populations ou à la prévalence des affections qui prédisposent au risque de lithiase (obésité, diabète, syndrome métabolique).

Le rôle intéressant des microorganismes via leur comportement dans le tractus urinaire peut expliquer cette augmentation de la prévalence qui peut se vérifier dans tous les pays, atteignant 15 % en France[1]. Certaines données actuelles nationales et internationales ont été rapportées dans la littérature, allant toutes dans le sens d'une augmentation de la lithiase d'infection par l'activité chirurgicale concernant le traitement des calculs urinaires mixtes (oxalo-calique et phosphocalcique dont la struvite) [2.3.7.9.37.109.112.123].

Cette tendance de croissance s'observe clairement dans l'augmentation rapide du nombre annuel d'interventions qui a atteint un taux de 30 %, relaté dans le bilan d'activités annuelles de l'année 2016 à Alger, dans le service d'urologie de l'hôpital Mohamed Seghir Nekkache.

1.2. Sur le plan diagnostique microbiologique

Nous avons constaté également que l'évolution physiopathologique sournoise de la formation du calcul urinaire d'infection, son diagnostic microbiologique et clinique s'effectuaient au stade terminal des complications organiques ou infectieuses, notamment l'insuffisance rénale terminale ou l'abcès rénal.

Par ailleurs, il semblerait, d'après la littérature, que l'ECBU était souvent négative et qu'il manquait de sensibilité et de spécificité pour détecter les infection-colonisations du calcul urinaire proprement dit. Étant positif à la culture en pré-opératoire, l'ECBU ne reflétait pas les bactéries virulentes enchâssées dans l'interstice ou le noyau de ce dernier. L'ECBU préopératoire ne découvre que les bactéries planctoniques libérées dans l'urine [2.6.7.9.11.19-36.102.105.106.].

La microbiologie médicale analyse en moyenne 50 prélèvements par jour provenant de plusieurs services hospitaliers et extra-hospitaliers. Il y a cependant un manque de données et de sensibilisation sur la détection, la description et l'interprétation des cristaux urinaires dans l'examen direct lors de l'ECBU (avec ou sans lumière polarisée) qui peut être d'un apport considérable dans le dépistage, le diagnostic au stade précoce de la sursaturation urinaire dans le cadre de la maladie lithiasique (et autres) .

Tous cela peut nous orienter sur la nature infectieuse ou non des lithiases urinaires d'infection qui semblent être associées à des anomalies fonctionnelles ou organiques du tractus urinaire et, parfois, selon Domingos (2011) et Alexander (2014), à un désordre métabolique ou cardiovasculaire, notamment l'infarctus du myocarde, l'accident vasculaire cérébral et le diabète sucré chez les sujets d'âge mûr [78.113].

Il apparait ainsi que le seuil de la bactériurie et le nombre d'uropathogènes liés à la lithiase d'infection dans l'ECBU ne sont pas actualisés et ne sont pas documentés [52.81.87].

1.3. Sur le plan du risque infectieux

Les bactériémies en milieu hospitalier du tractus urinaire (calcul infecté ou infectieux) peuvent constituer un problème majeur de santé publique au niveau national et international en s'associant à une morbidité et mortalité non négligeables. L'évolution de ces infections est généralement défavorable en l'absence d'une prise en charge thérapeutique rapide et adéquate. Elle doit être sous surveillance continue et régulière, car le profil des bactéries et le réservoir en cause doivent être actualisés et surveillés, notamment du fait de l'émergence des résistances aux antibiotiques qui devient alarmant et complexe.

Lors des bactériémies de sepsis sévères (6 à 37 %), parfois mortelles, il a été décrit un manque de performance de l'ECBU préopératoire pour le dépistage ou le diagnostic de l'infection-colonisation du calcul urinaire ou de la lithiase d'infection ou infectée.

Des études comparatives entre l'ECBU préopératoire et l'examen bactériologique du calcul dans la prévention ou la prédiction du risque infectieux en postopératoire a objectivé la supériorité de l'examen bactériologique du calcul urinaire (suivi de l'urine pyélique) avec une sensibilité de 74 %, une spécificité de 84 % et une valeur prédictive négative de 98 % [89].[16.105-110].

1.4. Sur le plan de la récurrence clinique

L'examen direct de l'urine se fait par lumière non polarisée. Par conséquent, la sensibilité et la spécificité de détection des cristaux urinaires sont compromises pour être observées au stade initial de sursaturation urinaire et de lithogénèse urinaire réversible avec leur forme parfois spécifique.

Par ailleurs, la véritable écologie bactérienne (ou autres microorganismes), associée au calcul d'infection, sont le maillon faible de la récurrence clinique (50 % des cas), problème récurrent de santé publique de par le monde [1.2.3.4.5.7.9.80.85].

1.5. Sur le plan de la résistance aux antibiotiques

D'après la Haute autorité de santé (2019), la lithiase urinaire d'infection peut être un problème inquiétant de santé publique, car elle peut être considérée comme un facteur de risque (réservoir) d'acquisition et de dissémination de bactéries multi-résistantes, fléau mondial, de bactéries hautement résistantes comme les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) ou les carbapénèmes par leur résistance à l'imipénème ou à l'ertapénème. [11]

De plus, l'évolution rapide de l'épidémiologie des mécanismes moléculaires de résistance aux antibiotiques (B-lactamines, Fluoroquinolones, Aminoglycosides) ne cesse d'inquiéter les acteurs de santé, cela aggravé par l'utilisation fréquente d'antibiothérapies non documentées (en communautaire et/ou à l'hôpital) et parfois non actualisées en chirurgie urologique.

Enfin, nous avons constaté que les uropathogènes multirésistants impliqués dans la lithogénèse, pouvaient changer de morphologie à l'uroculture lors de l'ECBU ou dans la culture pyélique de calcul urinaire. Ils ont tendance à changer d'aspect grâce à la délétion des caractères biochimiques (uréase-indole) probablement du au réarrangement d'ADN par mutation durant la formation du biofilm calculaire connu sous le nom de « *fitness costs* » [2.7.12-37.54.95.118-120].

Ces paramètres peuvent aboutir à l'impasse thérapeutique par l'éclosion de micro-organismes multirésistants, voire totorésistants, jusque-là méconnus, perturbant le microbiote intestinal ou urinaire et pouvant engager le pronostic vital des patients lithiasiques.

Les questions qui ressortent de cette problématique et justifications sont :

- ✓ Quel est le profil cristallurique associé à la lithiase d'infection dans notre échantillon ?
- ✓ Quels sont les agents associés à la lithiase urinaire d'infection pure ou mixte ou d'enrobage et quelles sont leurs implications dans la lithogenèse infectieuse proprement dite ?
- ✓ Quel est l'impact microbiologique de l'urine pyélique et/ou du calcul urinaire dans l'antibiorésistance et dans l'approche thérapeutique de la lithiase d'infection ?
- ✓ Quels sont les micro-organismes émergents, associés de la lithiase d'infection, et leurs profils de résistance aux antibiotiques ?
- ✓ Comment peut-on expliquer l'évolution de ce type d'infection ainsi que la perte de performance de l'ECBU dans la prévention du risque infectieux ?
- ✓ Y a-t-il un intérêt de la cristallurie pour l'orientation de la nature du calcul urinaire d'infection et dans la prévention de la récurrence clinique ?
- ✓ Quelle est la place des nouveaux outils de séquençage génétique dans l'exploration étiopathogénique de la lithiase d'infection ?
- ✓ Quel est l'intérêt du séquençage du génome complet (WGS) dans la lithiase urinaire d'infection ?

Dans ce travail, nous nous proposons de répondre à ces questions.

2. Objectif de l'étude

2.1. Objectif principal

- Évaluer l'apport de la cristallurie et analysé l'impact de l'étude microbiologique (phénotypique et moléculaire) de l'urine pyélique et/ou du calcul urinaire dans la prise en charge de la lithiase urinaire d'infection.

2.2. Objectifs secondaires

- Décrire l'aspect épidémiologique de la lithiase d'infection ;
- Évaluer l'automate de cytologie urinaire urisedMax* dans la discrimination entre les globules rouges et les cristaux urinaires oxalo-calciques de type wewhellite chez les patients avec lithiase d'infection par rapport aux témoins ;
- Études moléculaires des *Klebsiella pneumoniae* et d'*Enterobacter cloacae* résistantes aux β -lactamines par production de β -lactamase à spectre étendu, ainsi qu'aux aminoglycosides et fluoroquinolones retrouvés dans le calcul urinaire d'infection ;
- Évaluer les outils de séquençage génétique, notamment la métagénomique, dans la perspective d'exploration étiopathogénique de la lithiase d'infection ;
- Projet du séquençage du génome complet *Enterobacter hormaechei* pour analyser les facteurs nucléiques ou protéiques impliqués dans les mécanismes émergents de la lithogenèse infectieuse et de l'antibio-résistance.

3. Matériel d'étude :

3.1. Type d'étude

Il s'agit d'une étude prospective, descriptive et analytique phénotypique et génotypique des patients ayant une infection ou colonisation du calcul urinaire sur pyélonéphrite et urosepsis.

La taille de notre échantillon (N = 114) nous a permis une bonne estimation de la fréquence de la lithiase d'infection, de sa récurrence et de ses complications.

3.2. Population

L'étude a porté sur des cristaux urinaires ainsi que sur des souches bactériennes provenant des urines de 114 patients : 73 sujets de sexe masculin (sept garçon) et 41 sujets de sexe féminin (cinq fille), atteints d'infection du calcul urinaire.

Il s'agit de patients âgés de 2 à plus de 60 ans, recrutés pour étude épidémiologique microbiologique du calcul urinaire (ou après fragmentation) et pour cristallurie du réveil (patients >15 ans) à l'hôpital universitaire Mohamed Seghir Nekkache dans les services suivants : Urologie (bloc opératoire), Microbiologie médicale, Anatomopathologie, durant la période allant de juillet 2015 à décembre 2019.

3.3. Critère d'inclusion

Toutes les souches bactériennes isolées ainsi que les cristaux urinaires provenant de patients porteurs de lithiase urinaire d'infection (calcul coralliforme), tous souffrant d'une pyélonéphrite ou d'urosepsis, pris en charge par urétéroscopie et néphrostomie.

3.4. Critère d'exclusion

- La cristallurie chez les enfants de moins de 15 ans ;
- Patients ne respectant pas les modalités de prélèvement et d'aspersion ;
- Les patients fébriles avec bactériémie transitoire.

4. Méthodes

4.1. Recueil des données

Les données des patients ont été recueillies sur deux fiches techniques, l'une pour la cristallurie et l'autre pour l'étude épidémiologique et microbiologique (Annexe 14).

4.2. Déroulement d'étude

Notre étude s'est déroulée en trois étapes : **étape préopératoire, peropératoire et postopératoire.**

Les échantillons urinaires des patients : **urine du réveil (Cristallurie), urine du milieu jet (ECBU), urine pyélique (ECBUP), et calculs urinaires** ou leurs **fragments calculaires (EBC)** ont été analysés et supervisés comme suit :

4.2.1. Étapes préopératoires

A. ECBU préopératoire

A.1. Modalités de prélèvement et d'acheminement : Nous avons recueilli des urines du milieu du jet selon des règles strictes d'asepsie rigoureuse, dans un récipient stérile. L'acheminement au laboratoire s'est fait dans un délai de deux heures sans conservateur, à température ambiante, et l'enregistrement des informations cliniques a été réalisé grâce à l'intranet de l'hôpital et la fiche spécifique.

A.2. Examen macroscopique : L'examen macroscopique a permis d'apprécier la limpidité et de noter la présence d'une éventuelle hématurie.

Les urines sont généralement jaune clair et doivent être limpides. L'émission d'urines troubles suggère une infection urinaire, mais n'est pas spécifique, et peut être liée à la présence de cristaux, de médicaments, etc.

A.3. Examen microscopique

Il consiste en une étude cytologique et une étude bactériologique :

A.3.1. Étude cytologique

La numération des leucocytes, des bactéries, des hématies, des cristaux (phase calculogénèse) et des levures était réalisée par le transfert de l'urine du pot stérile vers l'automate de la cytologie urinaire Sedi-Max*, permettant de cribler les urines en moins d'une demi-heure et de déterminer les échantillons suspects à cultiver (**Annexe 4**).

Le cas échéant, nous avons fait appel à l'état frais en cellule de Malassez (1 mm^3) ou de préférence en cellule de Nageotte (40 mm^3) sur des urines homogénéisées par retournement.

Le résultat est exprimé en hématies et leucocytes par mm^3 ou par ml.

Le seuil de significativité de la leucocyturie est consensuel, fixé à $\geq 10/\text{mm}^3$, soit $\geq 10^4$ /ml (unité internationale).

A.3.2. Cristallurie : Les étapes de la cristallurie , nous avons :

- Recueilli des urines fraîches du matin à jeun, conservées à température ambiante ;
- Homogénéisé le prélèvement par retournement puis prélevé l'urine depuis le fond du récipient en remontant vers le milieu afin de récupérer les cristaux et agrégats les plus volumineux et transféré le prélèvement dans la cellule de Malassez. (1 mm^3) ;
- Identifié les cristaux par leurs caractéristiques morphologiques et leur aspect en lumière polarisée ;
- Compté les cristaux (résultat exprimé en nombre de cristaux/ mm^3) et leur taille moyenne déterminée à l'aide d'un réticule situé dans l'un des oculaires.

A.3.3. pH urinaire et densité urinaire

Méthode simple, fiable, rapide, peu onéreuse, nécessitant de la rigueur, permettant la mesure immédiate du pH urinaire et de la densité urinaire grâce à la bandelette urinaire (BU) labstix.

A.3.4. Coloration de Gram

La coloration de Gram d'une goutte d'urine non centrifugée ou, mieux, du culot de centrifugation, a permis de noter la présence ou non d'une flore bactérienne, son caractère monomorphe ou polymorphe et de préciser l'affinité tinctoriale des éléments bactériens.

Elle a une valeur d'orientation, et est dépendant de l'expérience de l'opérateur.

Le seuil de détection est de $5 \times 10^4/\text{ml}$ (l'absence de bactérie à l'examen direct n'exclut nullement le diagnostic). Il faut préciser que l'examen direct d'une urine non centrifugée ne présente une sensibilité proche de 100 % que pour des concentrations bactériennes $> 10^5$ UFC/ml.

En fonction des microorganismes présents exigeants, cet examen nous a permis également d'orienter le choix des milieux de culture.

A.4. Mise en culture : nous avons utilisé plusieurs milieux

A.4.1. Milieu non chromogène

La majorité des bactéries responsables d'infection urinaire liée au calcul ne sont pas exigeantes et sont cultivées sur géloses ordinaires. Dans certains cas, nous avons utilisé un milieu sélectif (type Hektoen) , un milieu enrichi au sang et milieu spécifique (LJ).

A.4.2. Milieux chromogènes (uri-select)

Le principe du milieu chromogène est d'utiliser des substrats synthétiques qui sont des analogues structuraux d'une molécule naturellement clivée par une enzyme caractéristique d'une espèce bactérienne ou d'un groupe d'espèces bactériennes. Le substrat possède des propriétés chromogéniques et précipite en colorant la colonie sans diffuser dans la gélose.

La plupart des milieux chromogènes utilisent un jeu de différents substrats permettant une très bonne différenciation des colonies et une identification présomptive de la ou des espèces bactériennes présentes dans l'urine.

A.4.3. Ensemencement

L'ensemencement a répondu au double but de dénombrer les bactéries et d'isoler la ou les bactéries en cause en obtenant des colonies bien distinctes les unes des autres.

– **Méthode de l'anse calibrée** (avec ou sans milieu chromogène) : Elle était la méthode utilisée au laboratoire de microbiologie médicale.

La mise en culture a pu s'effectuer sur des milieux chromogènes ou à défaut sur une gélose nutritive ou enrichie :

- ✓ Homogénéisation du prélèvement par agitation ;
- ✓ Ensemencement du milieu qui permet, dans le cas du milieu chromogène, la numération et l'ensemencement. Il est réalisé à l'aide d'une anse calibrée stérile à 10 µl en immergant l'anse dans l'urine en la tenant verticalement. Il est souhaitable de décharger le contenu de cette anse en appuyant la boucle sur le haut de la gélose, tirer de ce point une verticale jusqu'au milieu de la boîte ; sans recharger l'anse, faire des stries perpendiculaires serrées en partant du point de dépôt puis des stries plus larges à partir du milieu de la gélose pour avoir un bon isolement des colonies.
- ✓ L'ensemencement a pu être également fait par 4 ou 5 stries parallèles horizontales ;

✓ Lecture et numération : le compte des germes était réalisé en dénombrant les « unités formant colonies » (UFC) sur la gélose et en comparant la densité des colonies présentes à celle du schéma fourni par le fabricant (pour les milieux chromogènes).

A.4.4. Incubation des urocultures

La majorité des bactéries avaient poussé en 18 à 24 heures, sous CO² en aérobie. Lorsque la culture bactérienne était négative, alors que des bactéries avaient été vues à l'examen direct, nous avons prolongé l'incubation de 24-48 h avec une gélose « chocolat » sous CO² et nous avons pu incuber en anaérobiose une gélose Columbia ou gélose au sang frais enrichie, préparée le jour de l'ensemencement.

A.5. Identification des microorganismes dans l'ECBU

L'identification des bactéries dans ECBU a pu être réalisée en une seule étape, par l'ensemencement sur les milieux chromogènes ou uri-select spécifique ; par méthodes phénotypiques conventionnelles (Api 10S, Api 20 E..) et par outils automatisés (Vitek-2 compact) pour les bactéries banales, exigeantes et anaérobies.

La recherche de tuberculose urinaire était réalisée par coloration de Ziehl-Neelsen et culture sur milieux Lowenstein-Jensen.

A.6. Antibiogramme dans l'ECBU

La sensibilité aux antibiotiques des souches isolées à partir de l'ECBU était réalisée par l'antibiogramme selon le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institut) 2020, pour chaque espèce trouvée à la culture pure et abondante.

4.2.2. Étapes peropératoires

A. Examen cytobactériologique de l'urine pyélique (ECBUP)

A.1. Examen macroscopique : Il a permis d'apprécier l'aspect de l'urine dans le rein.

A.2. Modalités de prélèvements et d'acheminements: L'urine pyélique était considérée comme un prélèvement stérile, recueilli au bloc opératoire par ponction dans la cavité pyélo-calicielle du rein.

L'acheminement d'urine pyélique était effectué rapidement dans l'heure qui est conservée à plus de 4 °C (< 6 h). La seringue de ponction contenant ladite urine pyélique a été enregistrée après obturation pour éviter sa contamination. L'enregistrement des renseignements cliniques était dûment rempli sur les fiches spécifiques (ou Epidata 3.1) ou le DIP.

A.3. Examen direct d'urine pyélique automatisé (urisedMax) : La numération des leucocytes, des bactéries, des hématies, des cristaux (phase calculogénèse) et des levures était réalisée par le transfert de l'urine pyélique de la seringue vers l'automate de la cytologie urinaire Sedi-Max*. L'examen permettait de cribler en moins d'une demi-heure les urines et de déterminer les échantillons suspects à cultiver.

Le cas échéant, nous avons fait appel à l'état frais en cellule de Malassez (1 mm³) ou de préférence en cellule de Nageotte (40 mm³), sur des urines directes de la seringue.

Le résultat était exprimé en nombre d'hématies et de leucocytes par mm³ ou par ml.

Le seuil de significativité de la leucocyturie pathologique est consensuel, fixé à ≥ 10 éléments leucytaire /mm³, soit $\geq 10^4$ PNN /ml (unité internationale). Le seuil de détection des bactéries par l'examen microscopique est élevé : de l'ordre de 10^{4-5} UFC/ml. Un examen direct négatif n'élimine donc pas une IU

A.4. Mise culture : La mise en culture de 10µl d'urine a été faite à l'aide d'une anse stérile sur différents milieux chromogènes, enrichis et non, similaires à l'ECBU, dans l'heure qui a suivi et sous poste de sécurité microbiologique 2 (PSM 2) pour la tuberculose.

A.5. Identification des microorganismes dans l'urine pyélique : L'identification des microorganismes dans l'urine pyélique était réalisée en une seule étape, par l'ensemencement sur les milieux chromogènes ou uri-sélect spécifique par méthodes phénotypiques conventionnelles (Api 10S, Api 20 E..) et par outils automatisés (Vitek-2 compact) pour les bactéries banales, exigeantes et anaérobies.

La recherche de tuberculose urinaire a été réalisée par culture sur milieux Lowenstein-Jensen et par PCR en temps réel quantitative GèneXpert® - Cepheid (**Annexe 12**).

A.6. Antibiogramme dans l'urine pyélique : La sensibilité aux antibiotiques des souches isolées à partir de l'urine pyélique a été réalisé par l'antibiogramme selon le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institut) 2020, pour chaque espèce trouvée à la culture pure et abondante avec seuil ≥ 10 UFC/mL.

B. Examen bactériologique du calcul urinaire (EBC)

B.1. Modalité de prélèvement du calcul urinaire : La récupération du calcul urinaire à été effectuée au niveau du bloc opératoire dans un pot stérile qui est acheminé au laboratoire dans les plus brefs délais (< 01 h) avec enregistrement des renseignements cliniques qui était dûment rempli dans les fiches spécifiques (Epidata 3.1) et le DIP.

B.2. Mise en culture du calcul urinaire

B.2.1. Selon la méthode Stamey

Nous avons procédé à l'étude bactériologique sous asepsie rigoureuse et sous hotte à flux laminaire de type poste de sécurité 02 (PSM 2) comme suit : plusieurs lavages (2 à 3 fois) avec une solution stérile : NAOH à 10 %, broyage et ultracentrifugation (ou vortexage) pendant 15 mn à 3000 rpm.

B.2.2. Enrichissement du calcul urinaire

L'enrichissement avec un milieu spécifique BHIB (ou BGT) été réalisé pendant 24 à 48 h après contrôle de sa stérilité par sa mise en culture.

La mise en culture de la poudre du calcul urinaire a été réalisée sur différents milieux de culture exigeants (GSC), non exigeants (GN), chromogènes (uri-sélect). Les milieux de Lowenstein-Jensen et milieux Sabouraud ont été utilisés pour la culture du complexe *Mycobacterium tuberculosis* et les levures, respectivement.

B.3. Identification des microorganismes du calcul urinaire : L'identification des microorganismes dans le calcul a pu être réalisée en une seule étape, par ensemencement sur les milieux chromogènes ou uri-select spécifiques par méthodes phénotypiques conventionnelles (Api 10S, Api 20 E..) et par outils automatisés (Vitek-2compact) pour les bactéries banales, exigeantes et anaérobies.

La recherche de tuberculose urinaire a été réalisée par culture sur milieux Lowenstein-Jensen.

B.4. Antibiogramme des micro-organismes du calcul urinaire : La sensibilité aux antibiotiques des souches isolées à partir de l'ECBU a été réalisée sur l'antibiogramme selon le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institut) 2020, pour chaque espèce trouvée à la culture pure et abondante avec seuil ≥ 10 UFC/mL.

B.5. Recherche des entérobactéries productrices de β -lactamase à spectre étendu : La recherche de β -lactamase à spectre étendu (BLSE) chez les entérobactéries isolées du calcul urinaire a été effectuée à l'antibiogramme par l'observation d'une image de synergie (bouchon de champagne), entre un disque d'AMC et un disque de C3G, et la recherche du phénotype BLSE a été effectuée en utilisant les antibiotiques indicateurs d'activité BLSE qui sont CTX et CRO (CLSI 2020).

B.6. Tests complémentaires de détection des β -lactamase à spectre étendu

B.6.1. Détection d'enzyme β -lactamase à spectre étendu par CMI E-test ESBL

Le test E-TEST[®] ESBL CT/CTL (céfotaxime/céfotaxime+AMC) a été fait pour confirmer la présence d'enzymes β -lactamase chez les entérobactéries inhibitrices de l'acide clavulanique (AMC) (CLSI 2020).

La CMI de l'ertapénème a été utilisée pour les souches sécrétrices de β -lactamase à spectre étendu. Les antibiotiques utilisés ont été testés sur la souche de référence ATCC 25922 .

– Contrôle de qualité

Les souches bactériennes *E. coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* et ATCC700603 ont été utilisées pour le contrôle de qualité et la confirmation de l'efficacité des bandelettes E-test a fait appel également à l'ATCC *E. COLI* 25922(CLSI 2020).

4.2.3. Étape postopératoire

Elle a comporté les éléments suivants :

- ✓ Le suivi clinique des patients opérés et mis sous antibioprophylaxie (céfacidal 2 g/heure) était selon les critères de qSOFA : fièvre, frisson, fréquence cardiaque et respiratoire, etc. (**Annexe 3**).
- ✓ Une paire d'hémoculture (10 ml/flacon) a été réalisée sur sang veineux incubée rapidement dans l'automate Bact-alert[°] (**Annexe 2**).
- ✓ L'ECBU post-opératoire, la cristallurie (pH urinaire et densité urinaire) étaient réalisés durant le premier mois et durant l'année qui a suivi la prise en charge urologique.

4.2.4. Étude moléculaire de l'antibiorésistance des isolats du calcul urinaire

A. Caractérisation moléculaire des gènes de résistance des β -lactamines, aminoglycosides et fluoroquinolones

L'étude moléculaire a été réalisée selon le protocole de Diancourt (2005) ; Bonnet (2000) ; Hennequin (2012) et la plateforme de macrogen via GLS. Cette étude moléculaire englobait toutes les bactéries BLSE+ détectées par l'étude phénotypique, ainsi que celles résistantes aux fluoroquinolones et aux aminoglycosides isolées de ces calculs urinaires avec ou sans bactériémie ou d'hémoculture positive (voir choc septique). La caractérisation moléculaire de leurs gènes de résistance a été faite par PCR et séquençage, les amorces choisies ont été représentées dans le tableau 19 , ci-après.

Tableau 19 : Amorces utilisées dans la PCR et le séquençage de l'étude moléculaire.

Gènes	Amorces	Séquences	Taille des amplicon (Bp)
<i>bla_{TEM}</i>	TEM-F TEM-R	TTACCAATGCTTAATCA ATAAAATTCTTGAAGAC	867
<i>bla_{SHV}</i>	SHV-F SHV-R	TGGTTATGCGTTATATTCCGCC GCTTAGCGTTGCCAGTGCT	1750
<i>bla_{PER}</i>	PER F PER R	GTAGTATCAGCCCAATCCCC CCAATAAAGGCCGTCCATCA	738
<i>bla_{VEB}</i>	VEB F VEB R	GGAACAACCTTTGACGATTGA CCCTGTTTTATGAGCAACAA	374
<i>bla_{GES}</i>	GES F GES R	GAAAAAGCAGCTCAGATCG CAACAACCCAATCTTTAGGA	597
<i>bla_{CTX-M-13}</i>	M15-F M15-R	GGTTAAAAAATCACTGCGTC TTGGTGACGATTTTAGCCGC	863
<i>bla_{CTX-M-9}</i>	M9-F M9-R	ATGGTGACAAAGAGAGTGC CCCTTCGGCGATGATTCTC	870
<i>acc (3')_{1b}</i>	acc-1b acc-1b	CACCTCCAGCGACTTGTAC GTTAGCCAGCATCACGATCC	346
<i>qnr</i>	qnrB F qnrB F	TGGCGAAAAAATTGAACAGAA GAGCAACGATCGCCTGGTAG	494

F : forward ; R : reverse

A.1. Extraction du support génétique : Les étapes de purification du support génétique des isolats se sont déroulées par extraction plasmidique et chromosomique de l'ADN des bactéries selon les conditions suivantes :

A.1.1. Extraction de l'ADN chromosomique

L'extraction d'ADN chromosomique a été faite à partir de culture bactérienne pure. La souche bactérienne a été cultivée en milieu LB liquide à 30 °C pendant 16 heures sous agitation à 160 rpm. Après culture, les bactéries ont été concentrées par centrifugation et l'ADN chromosomique a été extrait à l'aide du kit « Bio-Rad Aquapure Genomic DNA isolation kit » selon le protocole défini par le fabricant. La concentration en ADN dans les échantillons a été déterminée par spectrophotométrie UV (spectrophotomètre Eppendorf Bio Photometer 6131). Le nombre de copies équivalent dans 1g d'ADN génomique équivaut à $2,1.10^8$ copies de génome.

A.1.2. Extractions de l'ADN plasmidique : L'extraction d'ADN plasmidique a été similaire à l'extraction chromosomique.

– Contrôle qualité

L'eau déminéralisée (témoins négatif) a été testée pour s'assurer de l'absence de contamination croisée durant l'extraction d'ADN.

A.2. PCR qualitative : Toute cette réaction devait d'abord s'assurer de l'absence de molécules inhibitrices dans les extraits d'ADN qui a été estimée par la capacité de l'ADN à être amplifiée par PCR (Bonnet et al., 2000b ; Hennequin et al. 2012). La technique de réaction de polymérisation en chaîne ou PCR permettait d'amplifier en un nombre élevé de copies une séquence par l'ADN polymérase et un mélange des quatre dNTP (dATP, dTTP, dCTP et dGTP). Elle débutait par une étape de dénaturation thermique de l'ADN à amplifier. Des séquences oligonucléotidiques complémentaires ou amorces étaient alors hybridées aux extrémités 3' des deux brins du fragment d'ADN matrice. L'allongement des amorces dans le sens 5'-3' était ensuite assuré par l'ADN Taq polymérase. Les nouvelles molécules d'ADN ainsi formées étaient dénaturées et un nouveau cycle pouvait commencer, la réaction se répétant ainsi jusqu'à plusieurs dizaines de fois.

La détection des gènes codant les β -lactamases BLSE, les aminosides et les fluoroquinolones a été effectuée par PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Les conditions opératoires et les amorces utilisées ont été décrites dans le tableau 19. Le mélange réactionnel de PCR a été composé de 23.75 μ l d'eau distillée stérile, 5 μ l de chaque amorce (diluée au $1/10^6$), 1 μ l de dNTP, 10 μ l de tampon de réaction PCR 5X et 0,25 μ l de Taq ADN polymérase, et 5 μ l d'extrait d'ADN brut (dilué au $1/10^6$). L'ADN a été amplifié dans un volume final de 50 μ l, dans un thermocycleur : soit le Biometra T Personal (Labgene), soit le Primus 96 plus (Biotech).

Pour chaque PCR, il fallait toujours un témoin positif et un témoin négatif (eau distillée).

Les produits de la PCR ont été migrés sur gel d'agarose à 1 % dans une cuve pour électrophorèse pendant 40 min. Après la migration, le gel de bromure d'Ethidium a été soumis à la lumière ultraviolette (U.V.) pour la révélation.

A.3. Séquençage du produit amplifié

Quand la PCR était positive, l'amplicon était purifié et séquencé chez une compagnie allemande de biotechnologie : GATC biotech (GATC Biotech AG, European Custom Sequencing Centre, Gottfried- Hagen-Straße 20), afin d'identifier précisément les groupes de gènes *bla* des β -lactamases, des gènes *aac(6')*-1 des aminoglycosides et des gènes *qnrB* des fluoroquinolones.

Les digestions enzymatiques de l'ensemble des enzymes de restriction utilisées ont été manufacturées par Promega^o et les réactions de digestion ont été réalisées selon les protocoles définis par le fabricant. Lorsque cela était nécessaire, la purification de l'ADN digéré était réalisée avec le kit QIAquick[®] PCR purification kit (QIAGEN).

4.2.5. Typage moléculaire par MLST de *Klebsiella pneumoniae* BLSE positives isolées du calcul urinaire

4.2.5.1. Principe de la technique MLST des *kp* BLSE positives

La MLST (*Multilocus Sequence Type*) : La détermination de la séquence type (ST) et du complexe clonal des souches de *Klebsiella pneumoniae* a été réalisée selon la méthode Deragon *et al.* (1990). La nomenclature des séquences de 7 gènes de « ménage » était assignée selon une base de données en ligne (Institute Pasteur, Paris). Les amorces utilisées pour le schéma MLST de *Klebsiella pneumoniae* étaient des fragments internes de sept gènes de ménages suivants : RpoB (sous-unité bêta de l'ARN polymérase), gapA (glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase), mdh (malate déshydrogénase), pgi (phosphoglucose isomérase), phoE (phosphorine E), et inf (facteur d'initiation de la traduction 2) et tonB (transducteur d'énergie périplasmique).

4.2.5.2. Amplification par PCR

Le protocole utilisé, les amorces et les conditions de PCR ont été effectués selon Diancourt *et al.* (2018).

– Les amorces pour l'amplification par PCR :

RpoB : -Fvic3 : GGCGAAATGGCWGAGAACCA .

-RVic2 : GAGTCTTCGAAGTTGTAACC.

GapA :

-Fgap : A173:TGAAATATGACTCCACTCACGG.

-Rgap : A181:CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGT.

Mdh :

-Fmdh130 : CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG

-Rmdh867 : CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG.

InfB :

-FinfB1: CTCGCTGCTGGACTATATTCG .

-RinfB1: CGCTTTCAGCTCAAGAACTTCET.

TonB :

-FtonB1: CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT.

-RtonB2 : ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG.

PgiF :

-Fpgi1: GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC

-Rpgi1: CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT.

PhoE :

-Fpho E6041 : ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCG.

-Rpho E6042 : TGATCAGAACTGGTAGGTGA.

– Conditions de PCR

L'amplification par PCR a été effectuée à une température d'hybridation de 50 °C pour tous les gènes à l'exception de gapA (60 °C) et tonB (45 °C).

– Cycles de PCR cycle

94°C	2 min	
94°C	20 s	} x 35 cycles
50°C (or 60°C, or 45°C)	30 s	
72°C	30 s	
72°C	5 min	

4.2.5.3. Séquençage des sept gènes de ménages

Pour le séquençage, des amorces de PCR ont été également sollicitées pour le séquençage, à l'exception du gène *infB*, pour lequel l'amorce *infB2F* a été utilisée à la place de l'amorce de PCR vers l'avant, et pour *pgi*, pour lequel les amorces *pgi2F* et *pgi2R* ont été utilisées.

-*infB2F* : ACTAAGGTTGCCTCCGGCGAAGC.

-*pgi2F* : CTGCTGGCGCTGATCGGCAT et

-*pgi2R* : TTATAGCGGTTAATCAGGCCGT .

Taille des produits PCR :

-*gapA* : 662 ;

-*infB* : 462

-*mdh*: 756

-*pgi* : 566 (ou un peu plus)

-*phoE* : 602

-*rpoB* : 1075

-*tonB* : 539

(les modèles alléliques sont présentés dans l'annexe 07).

4.3. Étude de métagénomique directe dans la pyurie pyélique

4.3.1. Principe de métagénomique

– Prétraitement, simulation de données et erreur de correction

Des étapes de prétraitement ont eu lieu entre le séquençage d'échantillon et l'initiation de la phase d'alignement et d'analyse. Cependant, l'étude bioinformatique a été exécutée avec une analyse métagénomique sans prétraitement, afin d'avoir une idée des données quand elles étaient « en désordre ». Ensuite, les étapes de prétraitement étaient appropriées pour l'ensemble des données.

En whole métagénomique, les analyses, les adaptateurs de séquençage étaient nettoyés des lectures, et les données lues étaient converties dans un format pouvant être utilisé par des algorithmes de bioinformatique.

Le nettoyage des lectures avant l'analyse augmentait la probabilité d'une lecture alignée et réduisait la probabilité que des erreurs de séquençage soient confondues avec les variations génomiques mineures snips (SNP/single nucléotide polymorphisme).

En outre, pour l'ensemble de l'analyse du métagénome, la correction des erreurs était utile, car le NGS produisait des millions de lectures et le processus de séquençage générait des erreurs dans la lecture. Les tâches de post-traitement et d'analyse comprenaient l'élimination des lectures non significatives. Il en résultait un tracé de « plus haute résolution » qui pouvait différencier des échantillons, sur la base de fines différences, alors que l'analyse factorielle, produisait alors des facteurs (ou axes principaux) qui étaient des combinaisons linéaires de variables initiales qui continuaient d'être regroupées sur la base de leur indice de similitude afin de pallier la difficulté du bon inventaire taxonomique (OTU) (Annexes 8 et 9).

L'analyse des taxons a été déduite en utilisant la méthode de parcimonie maximale (PM). L'arbre le plus parcimonieux avec une longueur = 5273 a été montré. L'indice de cohérence était 0,236677 (0,235372), l'indice de rétention était 0,584409 (0,584409), et l'indice composite était 0,1338316 (0,137554) pour tous les sites et les sites informatifs sur la parcimonie (entre parenthèses). L'arbre phylogénétique a été obtenu en utilisant l'algorithme *Subtree-Pruning-Regrafting* (SPR) (Nei M., 2000), avec un niveau de recherche 0 dans lequel les arbres initiaux ont été obtenus par addition aléatoire de séquences (dix répétitions).

4.3.2. Premier cas clinique

Le cas clinique a été choisi pour sa pertinence clinique, épidémiologique, et pour l'évaluation de la biologie moléculaire comme outil d'exploration d'agents étiologiques, par technique de séquençage métagénomique du ribosome 16 S V3-V4 PCR 2x300 bp, MiSeq plateforme macrogen, après consentement écrit des parents et l'étroite collaboration avec le médecin traitant (Annexe 15).

4.4. Projet du séquençage du génome complet de l'*Enterobacter cloacae* complex

4.4.1. Principe du séquençage complet du génome utilisé par macrogen

Cette technique de séquençage de troisième génération réalisée chez la plateforme moléculaire de macrogen via GLS (*Gene Life Sciences*) utilise le principe de chimie SBS d'Illumina. C'est une méthode brevetée fondée sur un terminateur réversible qui permet le séquençage parallèle de masse de milliards de fragments d'ADN, détectant des bases uniques à mesure que celles-ci sont incorporées dans des brins d'ADN en formation. Les marqueurs fluorescents des terminateurs sont imagés à mesure que chaque dNTP est ajouté, puis clivé

afin de permettre l'intégration de la base suivante. Les quatre dNTP liés à des terminateurs réversibles étant présents au cours de chaque cycle, la compétition naturelle minimise le biais lié à l'incorporation.

La définition des bases est effectuée directement en fonction des mesures d'intensité du signal au cours de chaque cycle, ce qui réduit considérablement les taux d'erreur brut.

4.4.2. Deuxième cas clinique

Il s'agit du deuxième cas du projet d'exploration génétique du génome complet de l'*Enterobacter cloacae* grâce à la bio-technologie d'Illumina SBS miseq compact (via GLS/macrogen) à partir de la culture pure et abondante ($\geq 10^3$ UFC/mL) de calcul d'infection à bactérie urealytique afin d'explorer les facteurs de résistance aux antibiotiques ou de virulence ou autres de la dite *Enterobacter cloacae complex* pouvant être associés dans l'évolution complexe et sournoise de cette patiente.

4.5. Outils statistiques et collaborations scientifiques

4.5.1. Analyse statistique

Le calcul de l'échantillon a suivi : ϵ = écart réduit = 1.96 %, la fréquence des urosepsis ou bactériémies chez les patients opérés pour lithiase d'infection, $q = 1-p$ et i = précision = 2-5 %. Le risque d'erreur α consenti (généralement $\alpha = 5$ %).

L'analyse statistique des variables quantitatives était présentée par leur moyenne avec écart type ou par leur médiane.

Les variables qualitatives étaient présentées par leurs fréquences ou leurs nombres.

Les tests de comparaison paramétrique ou éventuellement non paramétrique seront utilisés dans les résultats pour deux ou plusieurs variables. Les seuils de signification statistique étaient $p = 0.05$ et $\alpha = 95\%$.

Test de khi-deux, test exact de Fisher et LLR pour l'analyse d'évaluation des outils : ECBU, ECBUP et ECB dans la détection des microorganismes et la prévention du risque infectieux lors de la lithiase d'infection.

4.5.2. Collaboration scientifique

La collaboration du personnel de l'Hôpital central de l'armée comprenait les microbiologistes, urologues, pédiatres, néphrologues, radiologues, anatomopathologistes, réanimateurs, informaticiens, épidémiologistes et les techniciens-ingénieurs de la maintenance –réalisation qui a contribué à l'étude.

4.6. Outils bio-informatiques

4.6.1. Génotypage MLST

Pour le génotypage moléculaire par technique MLST, nous avons utilisé le logiciel informatique d'analyse ML.

Pour les gènes détectés, la comparaison c'est déroulée dans la base de données GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

ST : START2 (analyse de type de séquence et tests recombinants 2), cette base de données contient principalement des données de définition de profils et de séquences d'allèles pour les schémas MLST, hébergées sur PubMLST.org.

Le site utilise la plateforme BIGSdb (Bacterial Isolate Genome Sequence Database). De plus amples détails sur BIGSdb peuvent être trouvés dans Jolley et Maiden (2010), BMC Bioinformatic 11:595 (Annexe 8).

Les nouvelles séquences étaient soumises dans le logiciel START 2, l'algorithme BLAST de BIGSdb identifiait des variantes de séquences déjà connues ou marquait une variante inconnue pour la vérification du conservateur. Après vérification par un conservateur, un nouveau numéro d'allèle était attribué.

4.6.2. La métagénomique

Elle comprenait quatre prétraitements algorithmes : CleanPrimer, Slice Genome, PCR clean et SampleSize. Elle comprenait un seul algorithme de simulation de données métagénomiques, simulateR.

Pour la correction des erreurs, la plateforme de bio-technologie moléculaire macrogen comprenait quatre choix: eMER, CORAL, ECHO et RACER. eMER utilisait une couverture kmer processus pour corriger les erreurs dans les données du séquençage nouvelle génération (NGS).

4.6.3. Séquençage du génome complet (WGS)

Les données biologiques du séquençage du génome complet étaient converties en données brutes pour l'analyse bioinformatique par plusieurs programmes utilisés dans l'analyse : FastQC,<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects>.

Fast QC,<http://www.usadellab.org/cms> et <http://qb.cshl.edu/génomescop> (Annexe 10).

5. Limites de l'étude

– Biais de recrutement dû à une défaillance technique du microscope à polarisation et au manque de pince à panille (uro-pédiatrique) et de sonde laser pour l'extraction et la fragmentation du calcul urinaire.

En effet, tous les paramètres ont été étudiés à l'exception :

- du test du double disque, qui a été remplacé par la bandelette CMI E-test BLSE ;
- du support génétique de la résistance aux antibiotiques pour cause d'épuisement de réactifs ;
- du typage génétique PFGE, qui n'a pas été réalisé car il a été remplacé par la MLST qui ne faisait pas partie du protocole originel.

RESULTATS

Parmi les 4200 patients pris en charge à l'hôpital universitaire Mohamed Seghir Nekkache (HCA) pour lithiase urinaire toutes formes confondues, la fréquence de la lithiase urinaire d'infection mixte été de 3% (114 cas).

I. Analyse de la population

1. Répartition selon l'âge

La tranche d'âge 42 à 60 ans était la plus importante à 45% suivie de celle de plus de 60ans avec 28 %

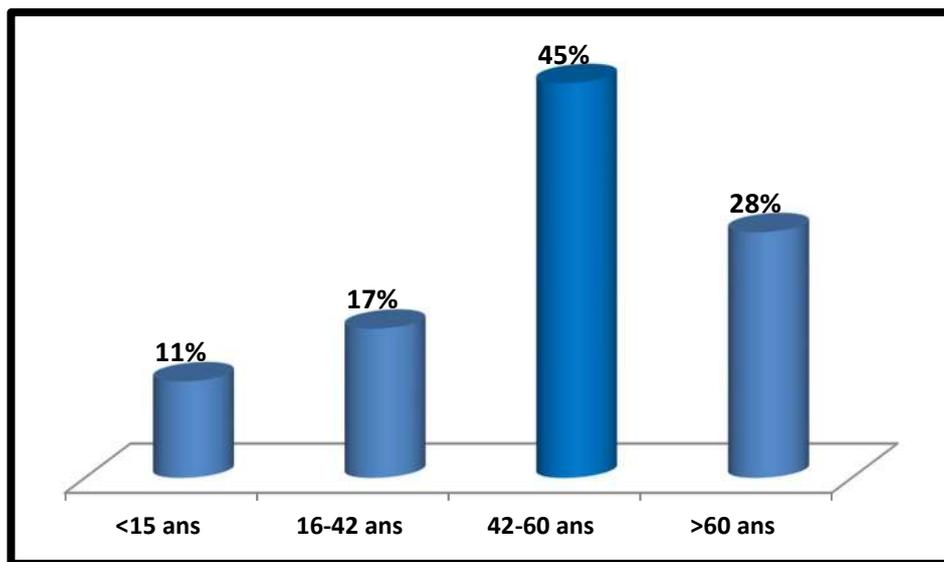


Figure 22 : Fréquences par tranche d'âge.

2. Répartition selon le sexe

La fréquence des hommes était prépondérante avec 64 % avec un sex ratio de 1.7 pour les hommes.

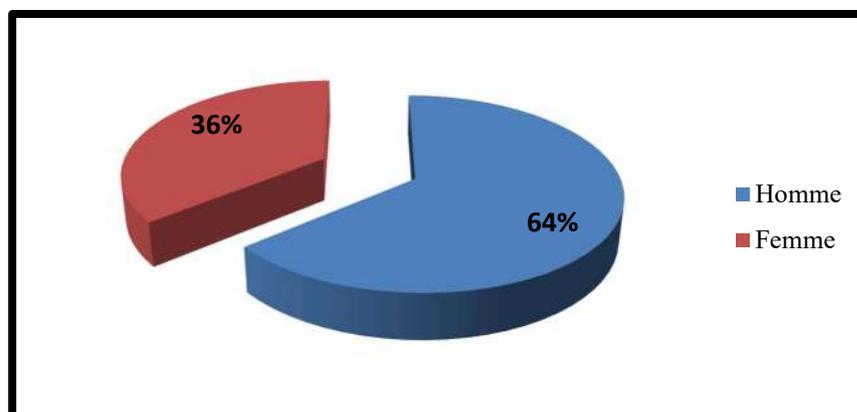
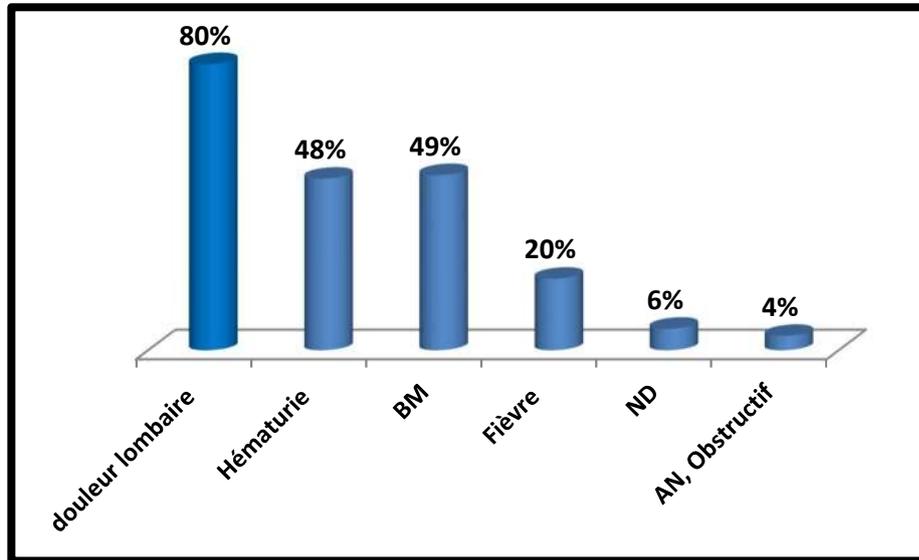


Figure 23 : Fréquence selon le sexe.

3. Manifestations cliniques

La douleur lombaire a été notée avec une fréquence de 80%, suivie de l'hématurie macroscopique (48%) et de brûlures mictionnelles (39%)

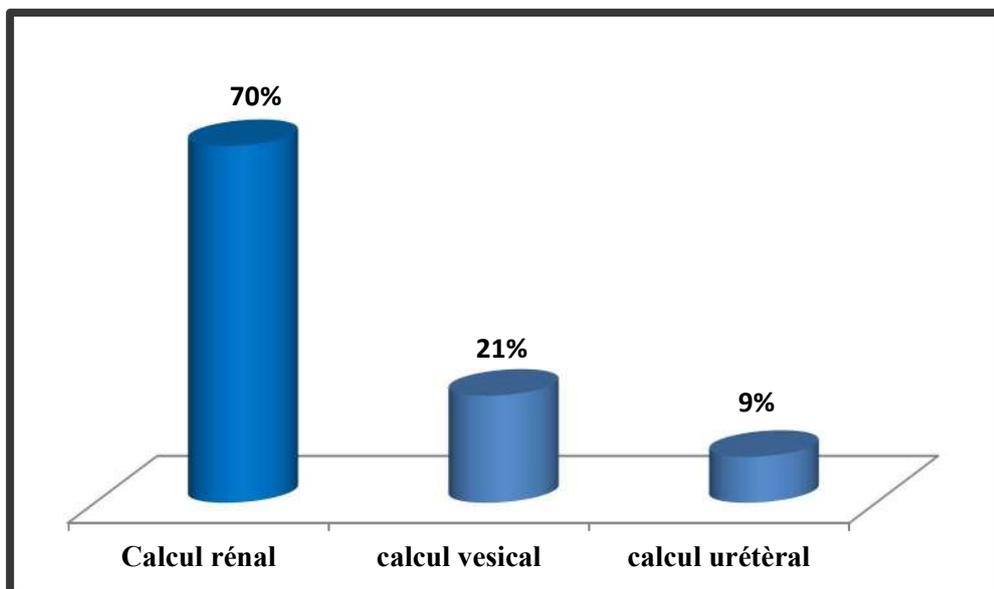


(An obstf: anurie obstructive, ND : non déterminé). BM : brûlure mictionnelles

Figure 24 : Répartition des signes cliniques.

4. Répartition en fonction du siège

La localisation rénale était la plus fréquente avec 70 % suivi de la vésical à 28%.



(Calcul rénal et pyélocaliciel =calculs rénaux 70%)

Figure25 : Fréquence selon le siège du calcul.

5. Répartition en fonction de la taille du calcul

La taille la plus importante a été constatée au niveau rein avec une moyenne de 15mm.

Tableau 20 : Taille des calculs urinaires selon le siège

Siege du calcul	Taille moyenne(mm)
Calcul rénal	>15
Calcul pyelocaliciel	<15
calcul urétéral	>10
calcul vésical	<10

(Calcul rénal et pyélocaliciel =calculs rénaux 70%)

6. Répartition de l'ECBU antérieur

Parmi les 90 patients avec notion d'infection urinaire dans leurs antécédents, la proportion d'ECBU positif était de 60.3%.

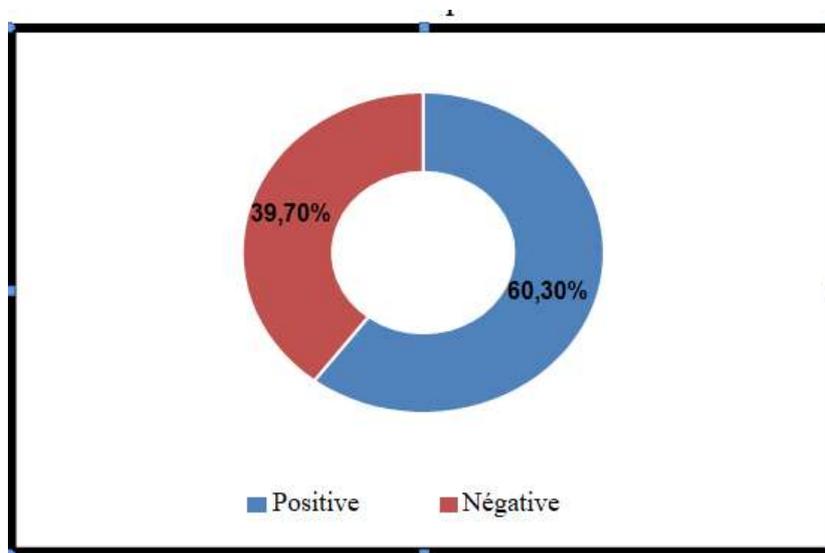


Figure 26 : Fréquence de l'ECBU antérieur.

7. Répartition d'ECBU antérieur par tranche d'âge

La fréquence la plus importante était remarquée dans la tranche d'âge de 42-60ans avec 37 % suivi de celle de plus de 60ans avec 28% de cas.

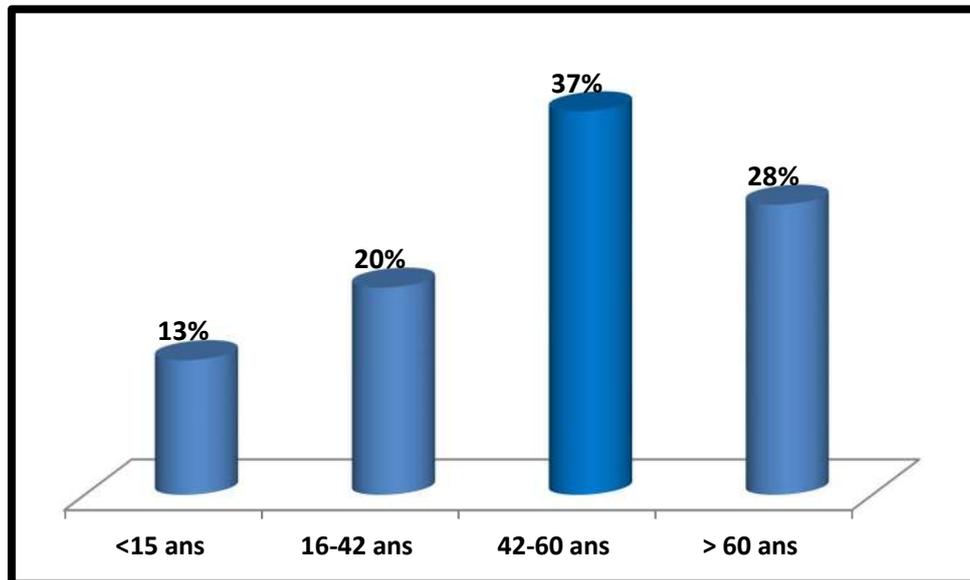


Figure 27 : Fréquence d'ECBU antérieur(ECBUA) par tranche d'âge

8. Répartition d'ECBU antérieur selon le sexe

Le sexe féminin était prépondérant avec 62 % des cas.

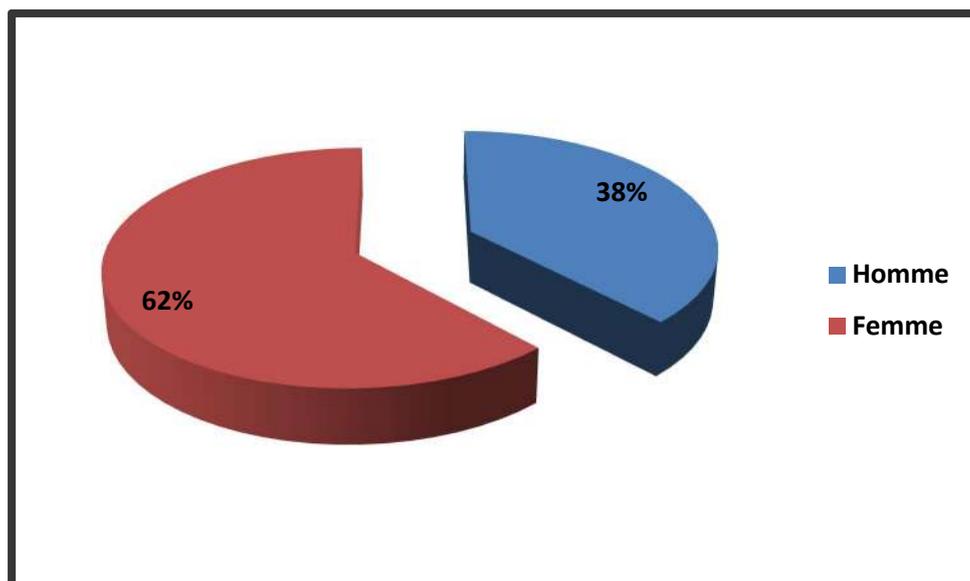


Figure 28 : Fréquence d'ECBU antérieur selon le sexe.

II. Analyse des tests d'explorations

1. Tests pré-opératoire

1.1. Répartition des ECBU

Nous avons observé que **90%** (103/114) des ECBU préopératoire étaient négatifs.

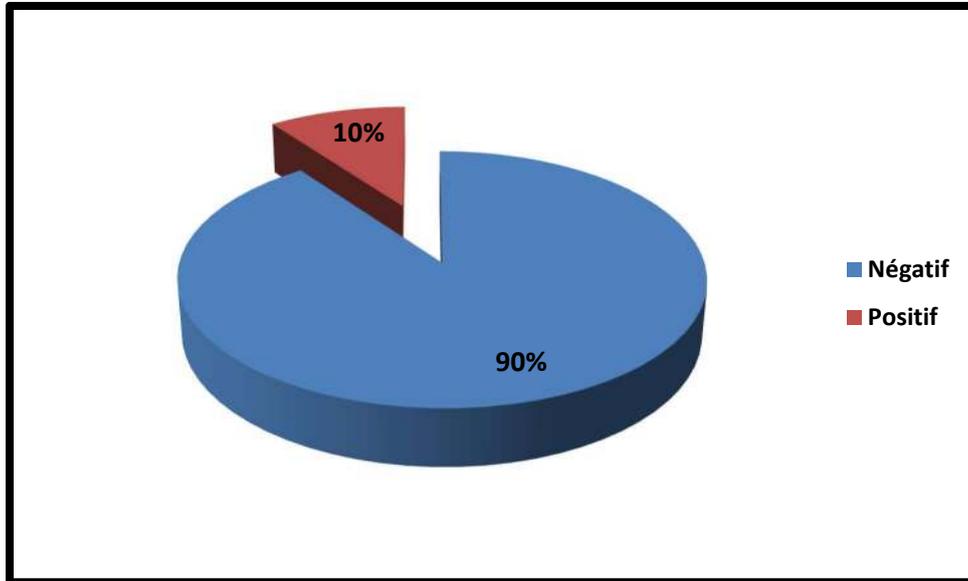


Figure 29 : Fréquence des ECBU

1.2. Fréquence de la cristallurie chez les lithiasiques

La fréquence de la cristallurie positive était de 39 % (44/114).

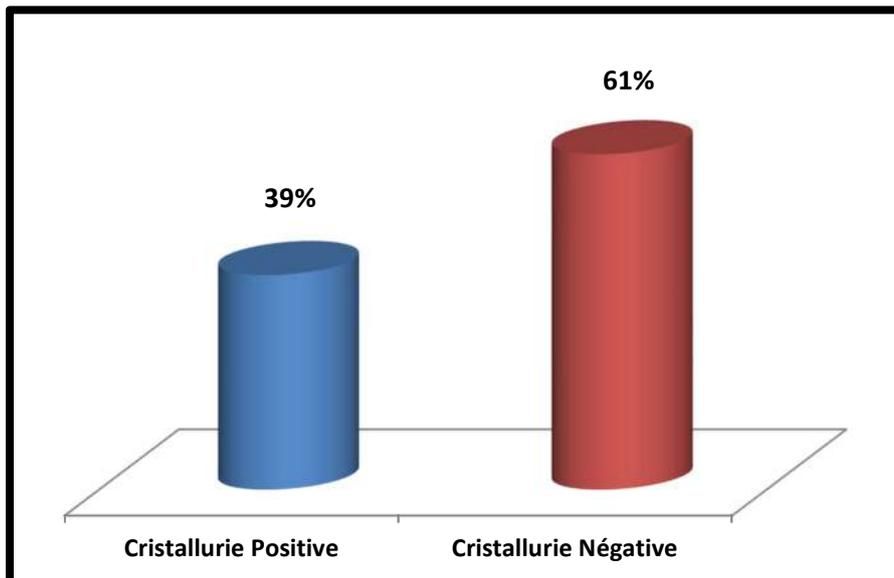


Figure 30 : Fréquence de la cristallurie positive ou négative.

1.3. Fréquence de la cristallurie chez les témoins

La fréquence de la cristallurie négative était de 63 % chez les témoins.

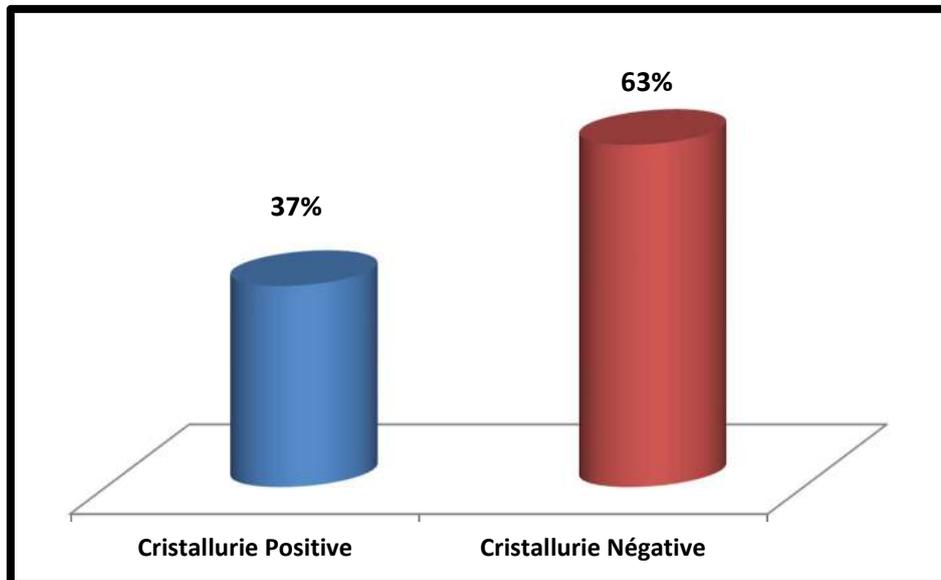


Figure 31 : Fréquence de la cristallurie chez les témoins.

1.4. Fréquence de la cristallurie positive et négative

La cristallurie positive chez les lithiasiques étaient de 39% versus 37 % chez les témoins.

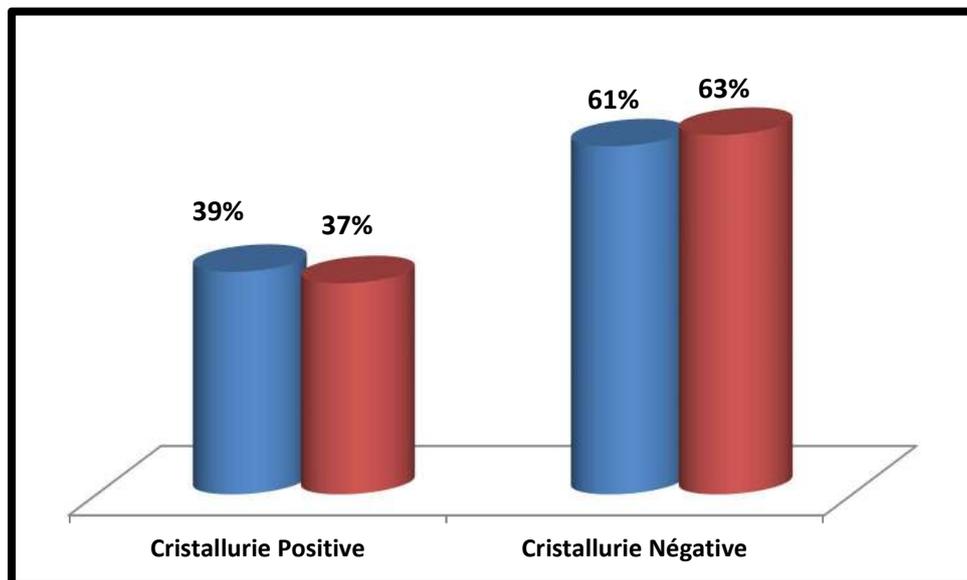


Figure 32 : Fréquence de la cristallurie positive et négative

1.5.Répartition de la cristallurie positive par tranche d'âge et sexe

La tranche d'âge 42-60 ans est la plus importante avec 63% de cas.

La présence de la cristallurie est plus importante chez les femmes avec 66%.

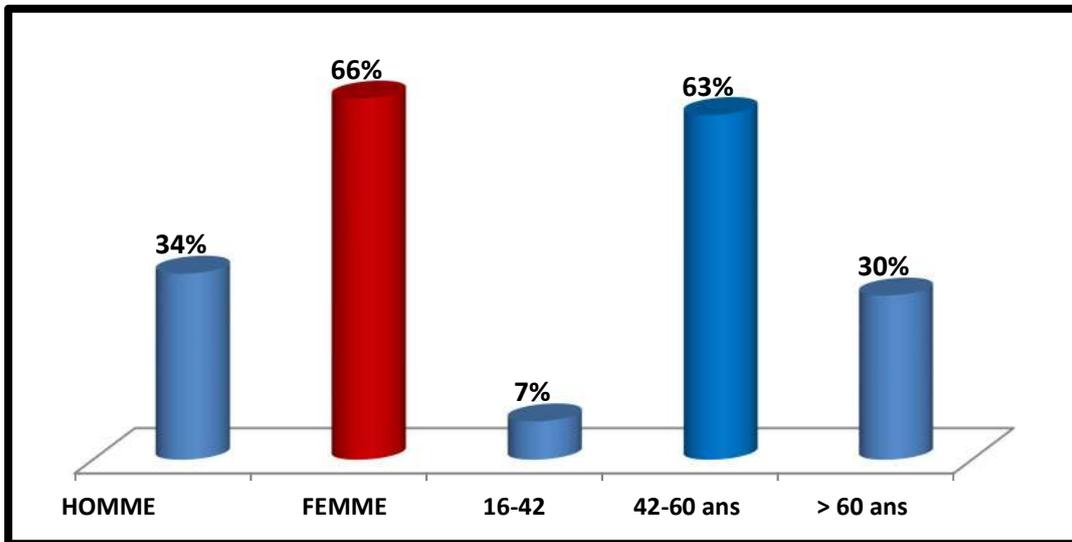


Figure 33 : Fréquence de la cristallurie positive par tranche d'âge et sexe.

1.6.Répartition de la cristallurie négative par tranche d'âge et sexe

La tranche d'âge de plus 60 ans était la plus importante avec 53%.

La proportion de la cristallurie négative remarqué chez les femmes était de 58%.

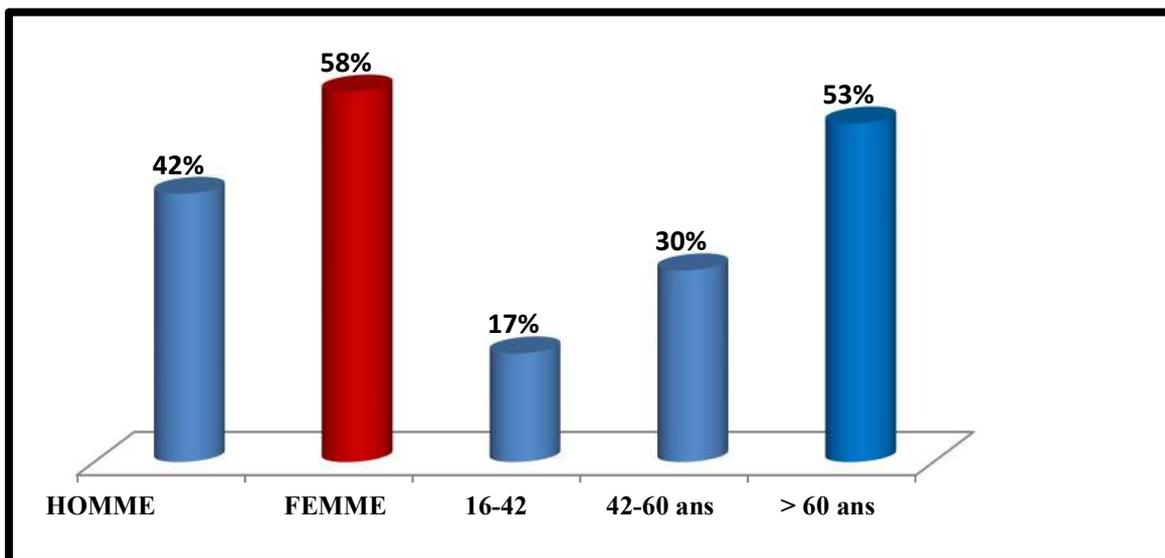


Figure 34 : Fréquence de la cristallurie par tranche d'âge et sexe

1.7. Répartition de la cristallurie selon la tranche d'âge et le sexe

La tranche d'âge de 42-60 ans était de 63% à cristallurie positive suivie de celle de plus de 60 ans avec 53 % d'absence de la cristallurie

Nous avons eu 58 % de cristallurie positive chez les hommes contre 66% de lacristallurie négative chez les femmes.

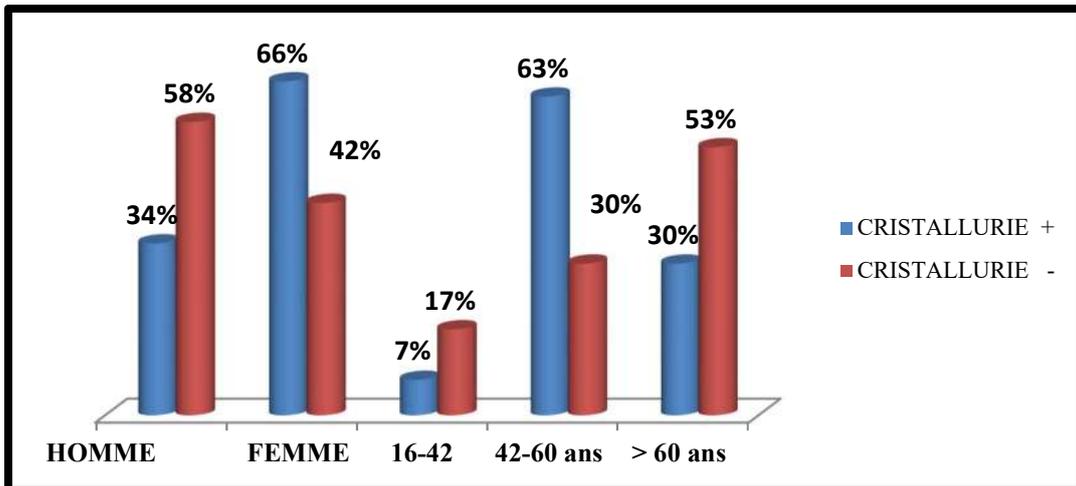


Figure. 35: Fréquence de la cristallurie positive ou négatif par tranche d'âge et sexe

1.8. Profils de la cristallurie chez les lithiasiques

Parmi, les 38.5% (44/114) patients qui ont pu être explorés par lumière polarisée. La cristallurie était représenté en majorité par les cristaux oxalocalciques à 40% , dont 25% de wewhellite (C1), et de cristaux de Struvite, suivis de 23% de cristaux de phosphocalciques (PACC),

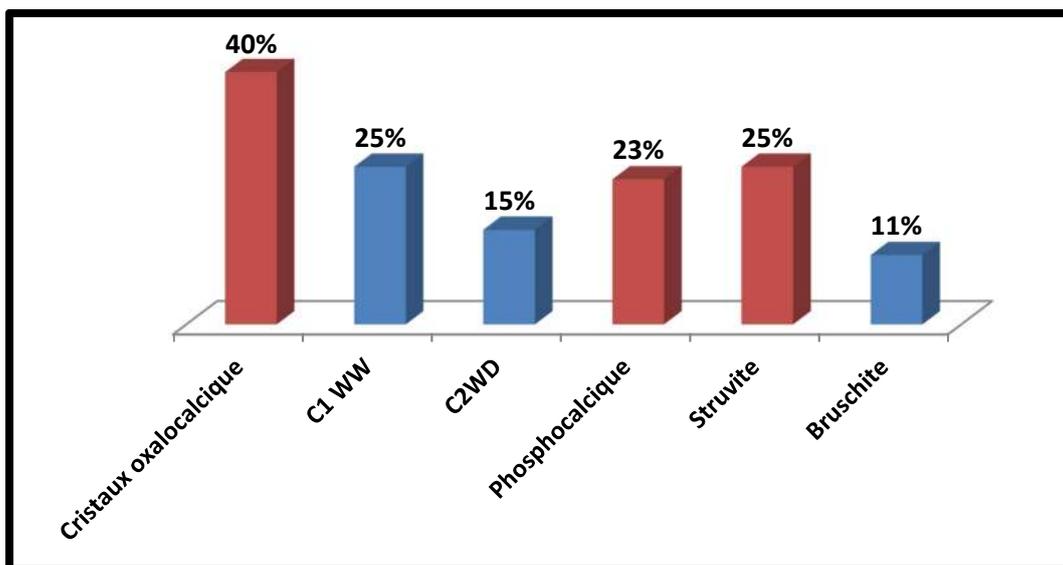
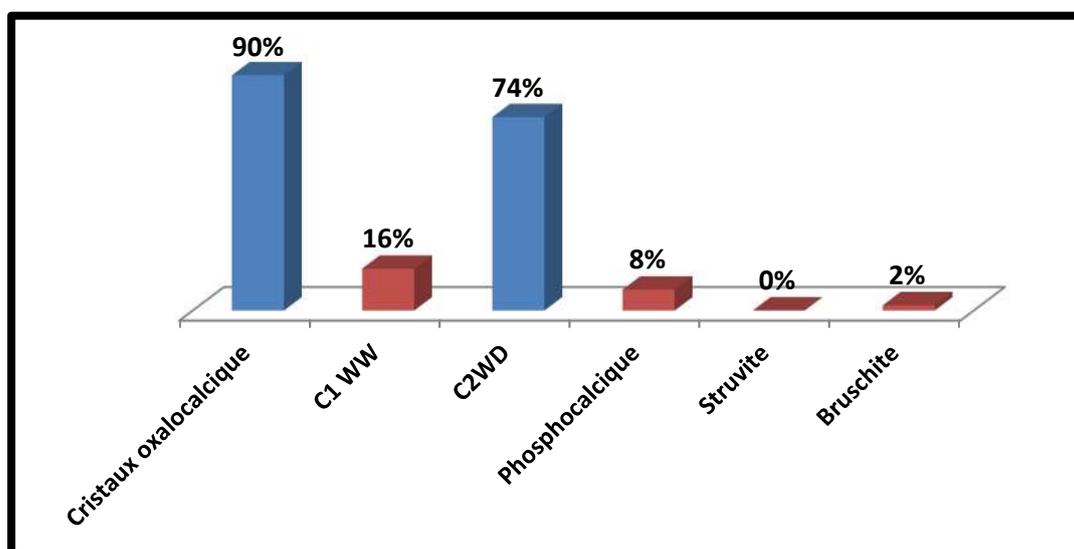


Figure 36 : Profils de la cristallurie chez les lithiasique.

1.9. Profils de la cristallurie chez les témoins

La cristallurie chez les témoins sans lithiase urinaire (57) est de type oxalocalcique à 74 % de wedhellite, suivi de 16% de wewehllite (C1) et de phosphocalcique (PACC) à 08%.



Cristaux oxalocalcique = C1+C2

Figure 37 : Profils de la cristallurie chez les témoins.

1.10. Profils de la cristallurie chez les lithiasiques et les témoins

Le profil le plus important chez les lithiasiques est attribué aux cristaux d'oxalocalcique à 40% dont 25% de cristaux de whewellite (C1) suivi de 25% de cristaux de Struvite. Les témoins ont eu des cristaux majoritaires de wedhellite (C2) à 74% et 0% de cristaux de Struvite (PAM).

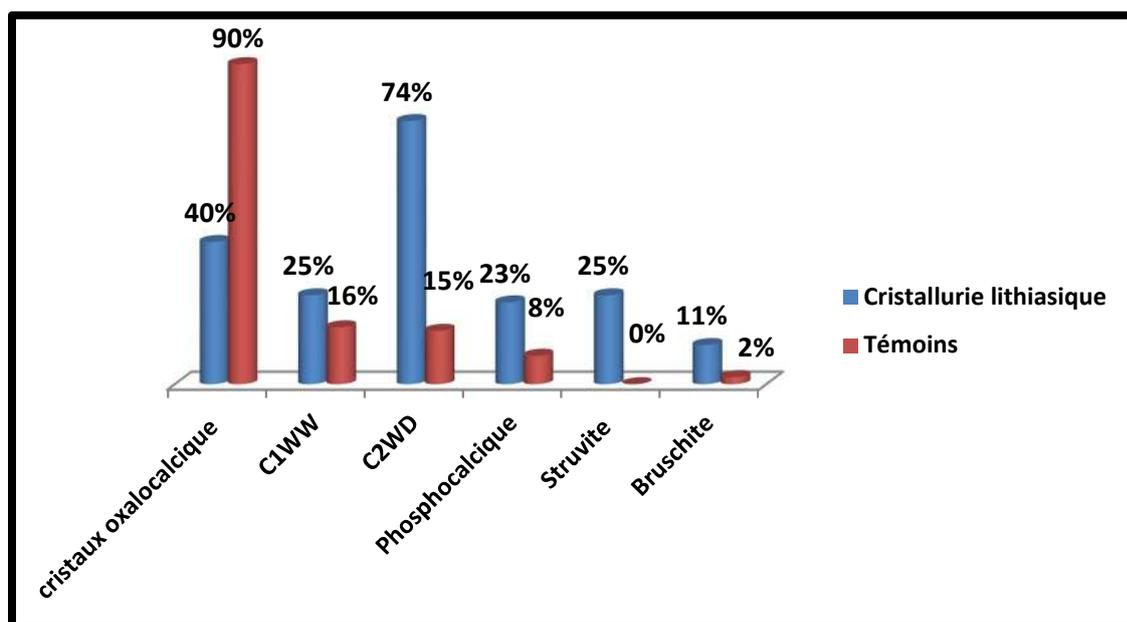


Figure 38 : Profils de la cristallurie chez les lithiasiques et les témoins.

1.11. pH urinaire.

Le pH urinaire est dans la fourchette de 6.5-8 chez les lithiasiques.

Tableau 21 : pH urinaire chez les lithiasiques et les témoins

	Patients lithiasiques	Témoins
%	39 %	37%
La moyenne du pH urinaire	6.5-8	6.5-7

1.12. Automate de cytologie urinaire urisedMax

Parmi, les 10% (11/114) ECBU positive, le nombre d'hématies était de 90%, suivi de leucocyturie à 36% et de cristaux d'oxalocalciques à 72%.

Les cristaux de Struvite étaient de 45 %. La culture de l'urine (uroculture) était négative dans 90 % des cas.

Tableau 22 : Nombre d'éléments cytologiques par Uri-sedMax °.

E.DIRECT N=114	Leucocyte	Hématies	CRTX oxalocalcique	CRT Struvite	C.épithéliale
N	04	10	08	05	08

CRTX: cristaux urinaire, (annexe3).

III. Analyse des tests per-opérateurs

Les outils utilisés dans l'exploration étiologique de la lithiase d'infection mixte sont tributaires de la technique chirurgicale : 56 cas positifs (33 Femme et 23 Homme) par urétroscopie et 67 cas positifs (38 Femme et 29 Homme) par néphrostomie percutanée.

Tableau 23 : Le nombre de tests peropérateurs en positif ou négatif

Tests /nombres	ECBUP (N)	EBC (N)
Positif	56	67
Négatif	47	36
Total	103	103

N : nombre. ECBUP : Examen cyto bactériologique urine pyélique, EBC : Examen bactériologique du calcul urinaire.

1. Répartition de l'examen cyto bactériologique de l'urine pyélique ECBUP

La fréquence en positive attribuée à l'ECBUP est de 54 %.

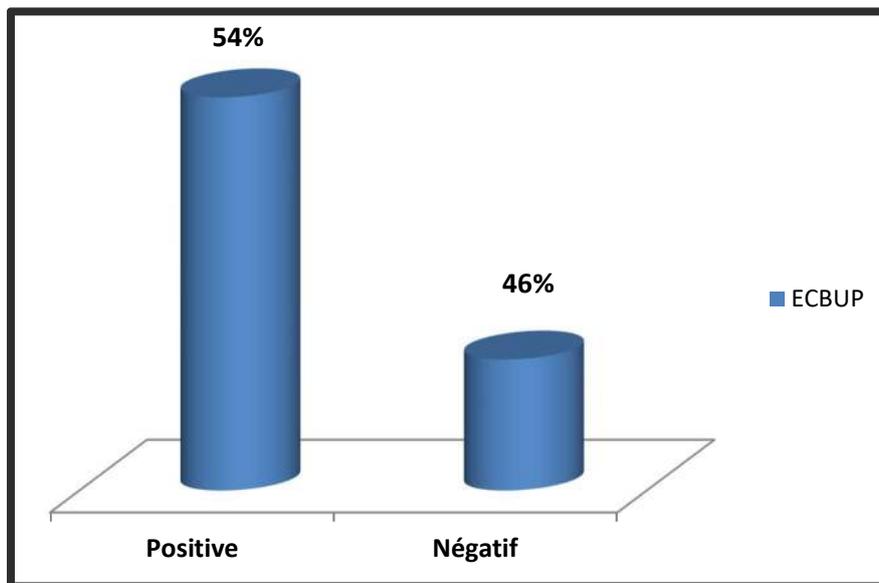


Figure 39 : Fréquence de l'ECBUP en positif ou négatif.

2- Répartition de l'étude bactériologique du calcul urinaire (EBC)

La fréquence en positive de la culture du calcul est de 56 %.

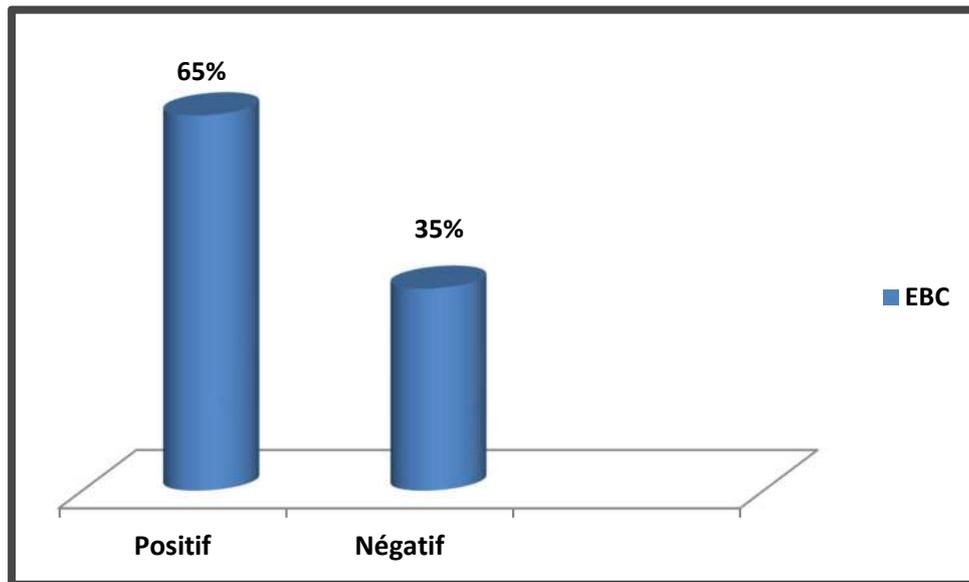


Figure 40 : Fréquence des tests ECBUP ET EBC négatifs.

3. Répartition des tests ECBUP et EBC en positifs et négatifs

La culture du calcul est de 65 % contre 54 % de ECBUP (urine pyélique).

Par-contre, l'urine pyélique est négative avec 46%

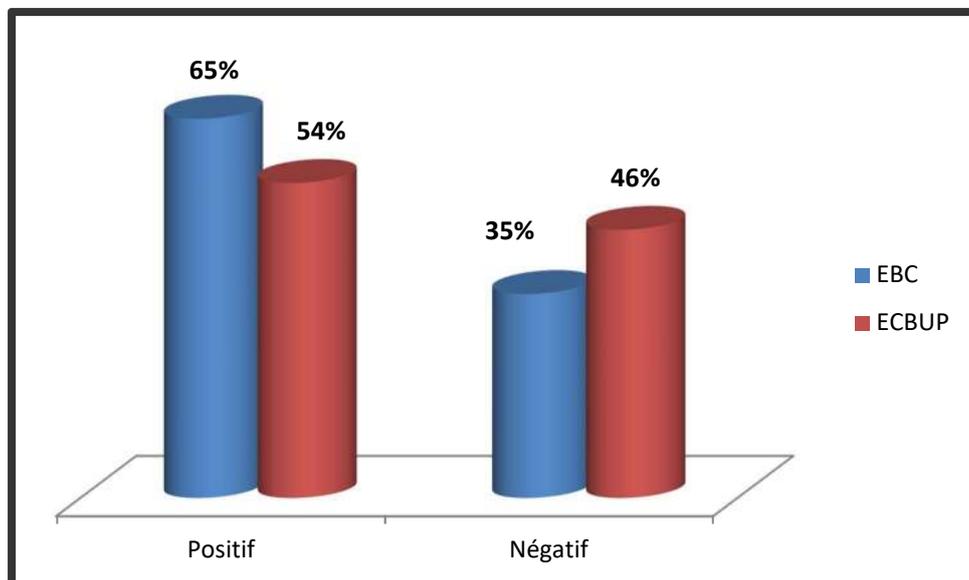


Figure 41 : Fréquence des tests ECBUP et EBC

4. Répartition de l'urine pyélique (ECBUP) par tranche d'âge

La fréquence de tranche d'âge de 42-60 ans était la plus importante avec 65 % des cas avec une répartition équitable entre les tranches d'âge 16-42 et supérieure à 60 ans.

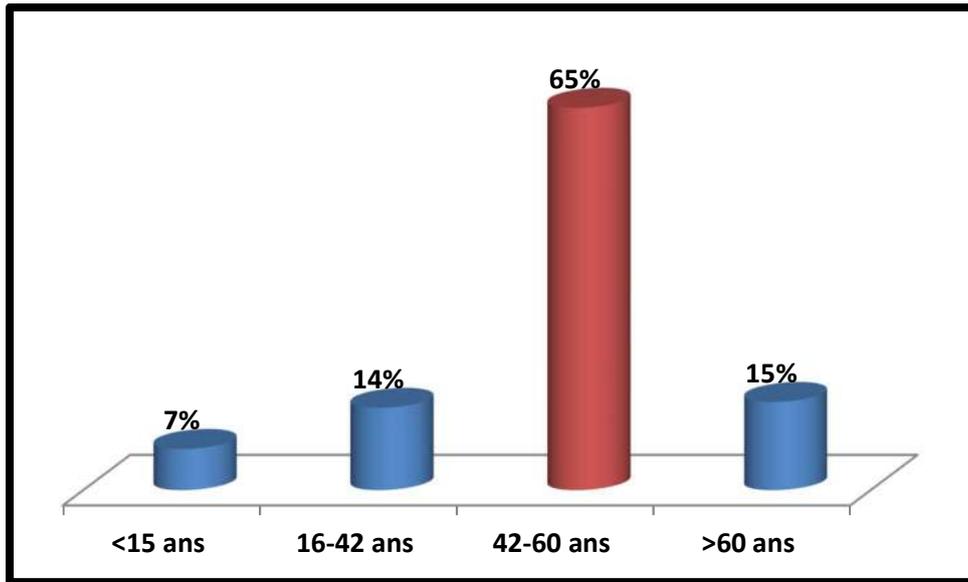


Figure 42 : Fréquence des tests ECBUP par tranche d'âge.

5. Répartition de l'urine pyélique (ECBUP) selon le sexe

La proportion de l'urine pyélique ECBUP était plus importante chez les femmes avec 59 %, avec un sex ratio de 0.7 pour les hommes.

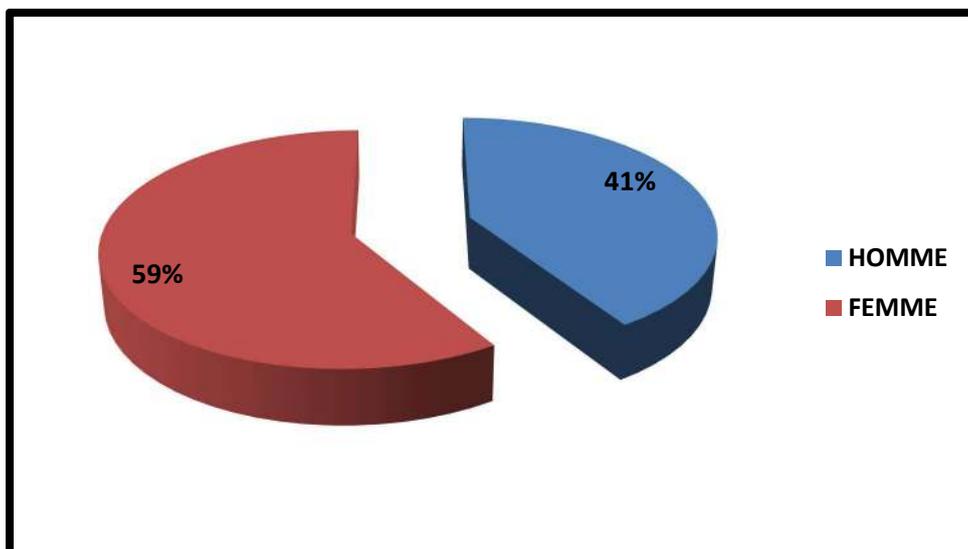


Figure 43 : Fréquence des tests ECBUP selon le sexe.

6. Répartition de la culture du calcul urinaire (EBC) par tranche d'âge

La tranche d'âge de 42-60 ans est de 60 % suivie de celle de 16-42 ans à 30 %.

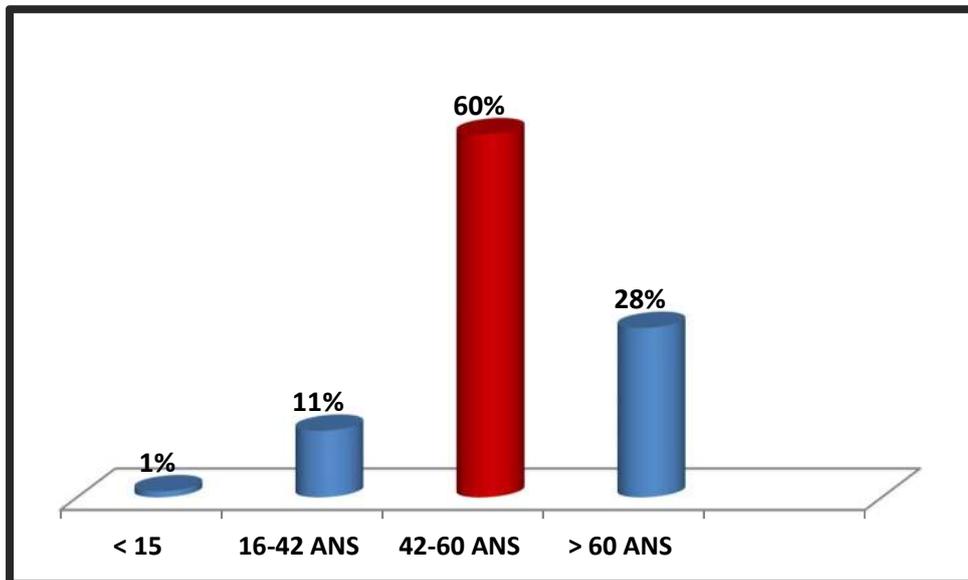


Figure 44 : Fréquence de la culture du calcul EBC par tranche d'âge.

7. Répartition de la culture du calcul urinaire (EBC) selon le sexe

La proportion de la culture urinaire EBC était la plus significative avec 67% chez les femmes. ($P < 0.05$)

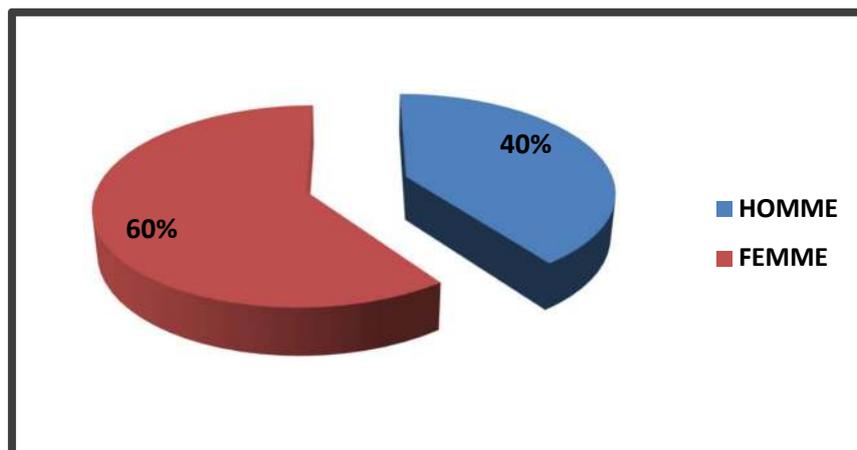


Figure 45 : Fréquence de la culture du calcul (EBC) selon le sexe

8. Répartition de l'urine pyélique et de la culture du calcul par tranche d'âge et de sexe

La proportion de la culture du calcul (EBC) et de l'urine pyélique (ECBUP) était plus significative chez les femmes avec 60% vs 59%, ($P < 0.9$).

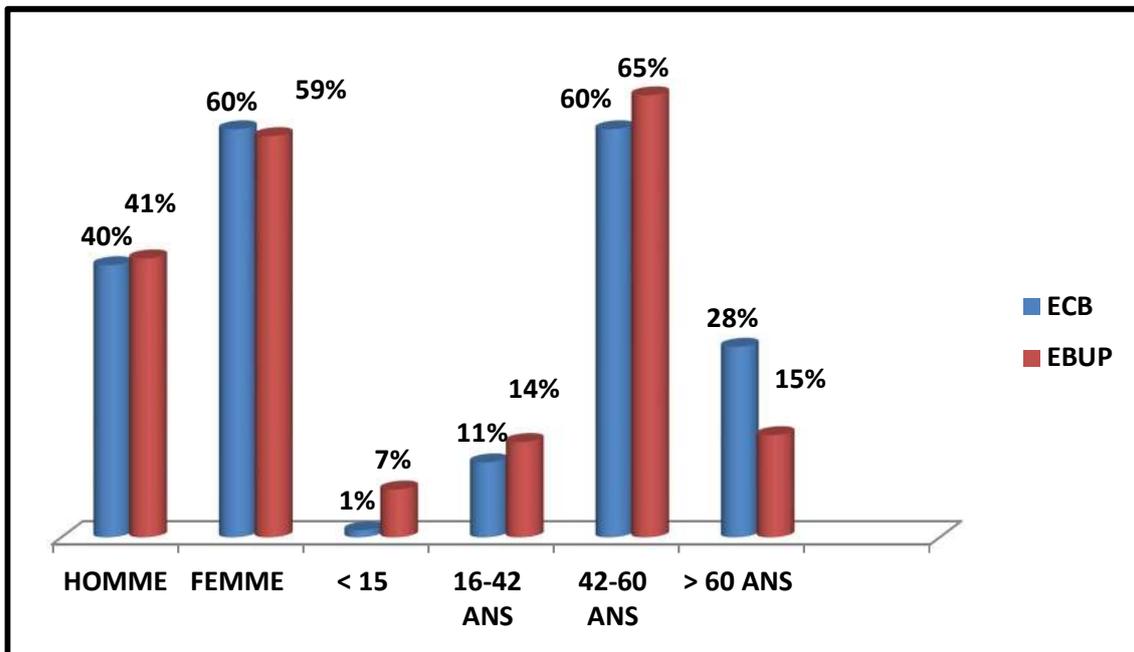


Figure 46 : Fréquence des ECBUP ET EBC par tranche d'âge et de sexe

IV. Étude microbiologique de la lithiase d'infection

1. Répartition par famille de germes dans l'ECBU positif pré-opératoire

Le nombre de germes par famille était de 05 souches d'entérobactéries, 03 souches pour les cocci à Gram positif suivi de 02 souches pour les BGN non fermentaires et une levure.

Tableau 24 : Répartition par famille des microorganismes dans l'ECBU.

Entérobactéries	Cocci à Gram positifs	BGN non fermentaires	Levures
05	03	02	01

2. Répartitions par espèces bactériennes dans ECBU préopératoire

Le nombre d'espèces détectées par l'ECBU pré-opératoire été de 11 cas (10%) représentés par 03 *E.coli* suivi de 02 *Pseudomonas.sp* et de deux *Staphylococcus aureus*, après un *Proteus mirabilis*, une *klebsiella pneumoniae* , un *Enterococcus sp* et un *Candidas albicans* .

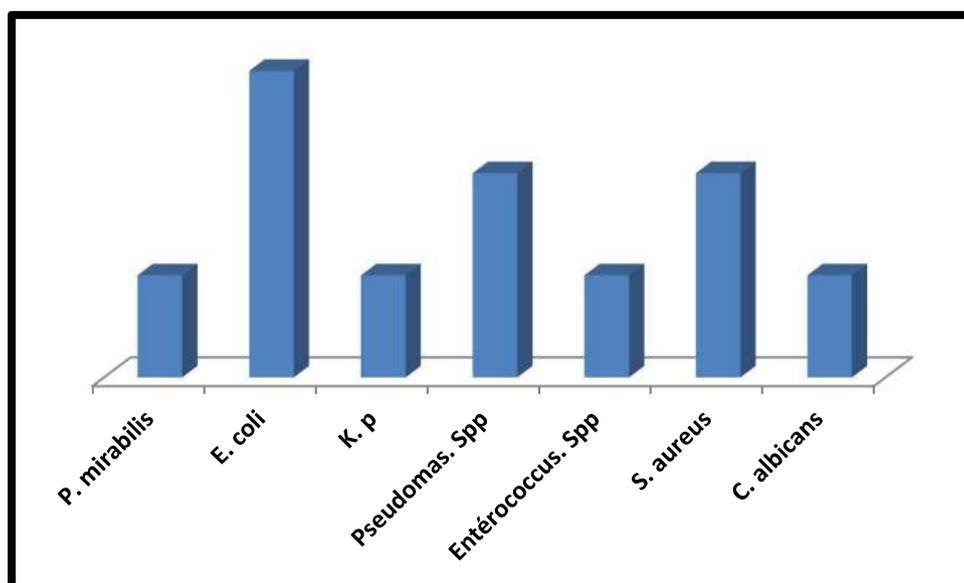


Figure 47 : Nombre d'espèce dans l'ECBU positif.

3. Répartition de l'examen direct dans l'urine pyélique par urised-Max*

Parmi les 49% (56) d'urine pyélique ECBUP analysées à l'examen direct ; le taux d'hématies était de 70 %, suivi de 20% de leucocytes et de 10% de bactéries.

Tableau. 25 : Fréquence des éléments urinaire dans l'urine pyélique

Urine pyélique	Eléments leucocytaire	Hématurie	Bactériurie
Examen microscopique	20 %	70 %	10%

4. Répartitions par groupe dans la culture d'urine pyélique

La fréquence par familles des germes retrouvés à l'ECBUP (urine pyélique) était de 54 % d'entérobactéries et de 25% cocci à Gram positif .

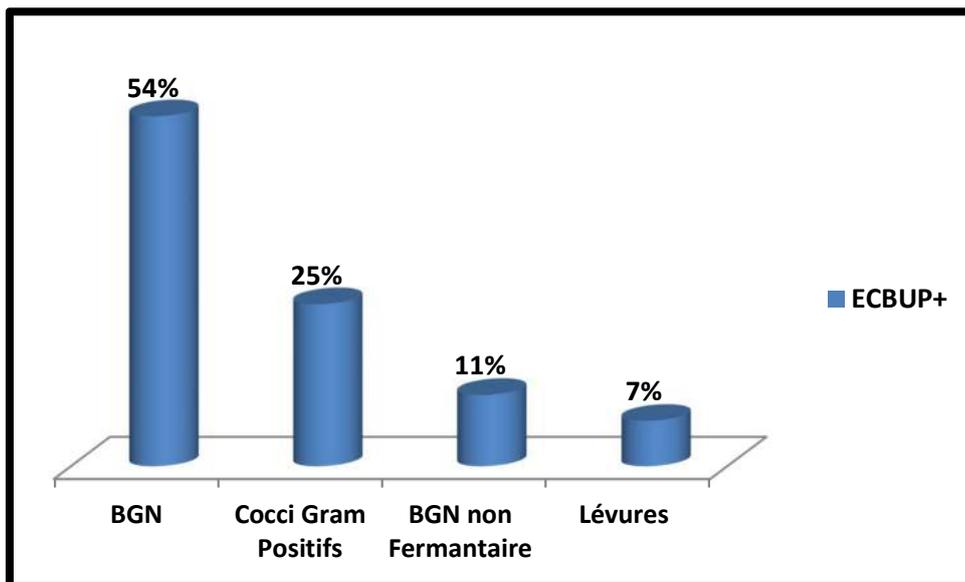


Figure 48 : Fréquence des germes par famille dans l'ECBUP.

5. Répartitions par groupe dans la culture du calcul EBC

Les familles des germes retrouvés à l'ECBUP (urine pyélique) étaient des entérobactéries avec 40 %, suivis des cocci Gram positif à 39% des cas.

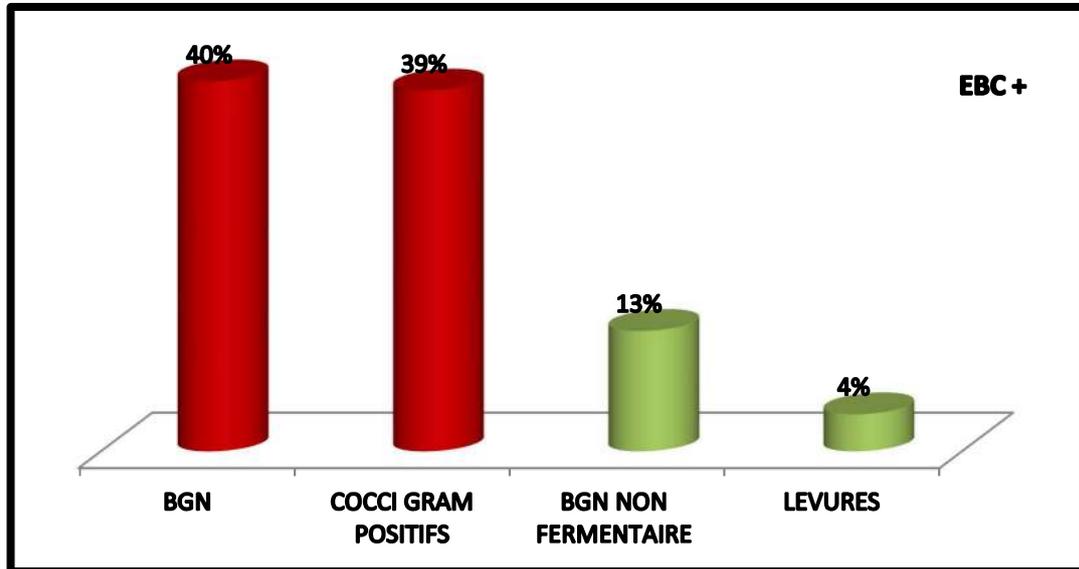


Figure 49 : Proportion des germes par famille dans la culture du calcul.

6. Répartitions par famille dans l'urine pyélique ECBUP et la culture du calcul EBC

La répartition par famille des germes retrouvés à l'ECBUP (urine pyélique) retrouve les entérobactéries avec 54 % vs 40% EBC suivie des cocci Gram positif avec 39% et 25% des cas et de *Pseudomonas sp* à 11 % vs 13%.

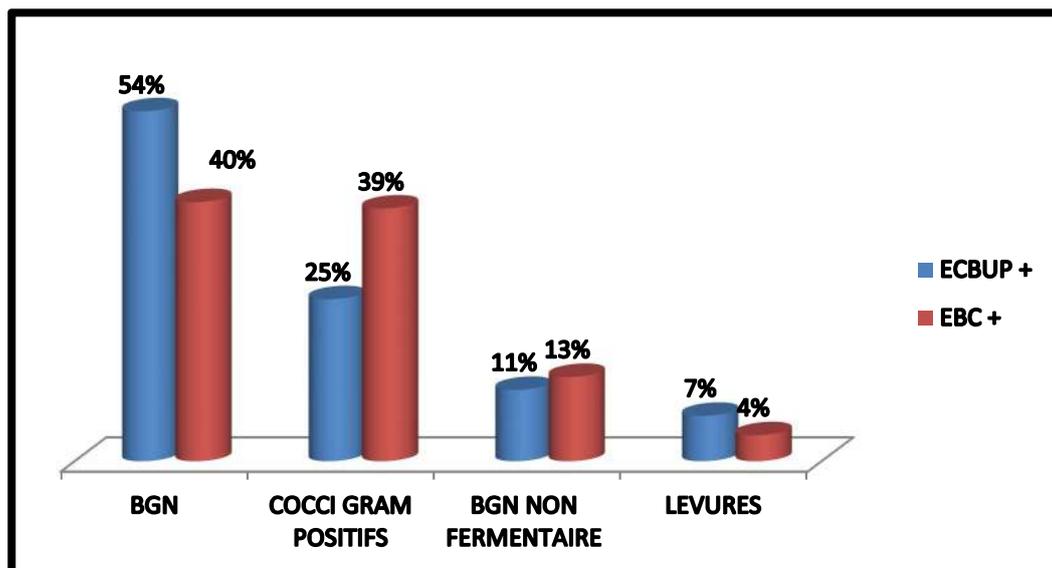


Figure 50 : Fréquence par famille dans l'ECBUP et EBC.

7. Répartition de l'examen direct dans l'urine pyélique par urised-Max

L'hématurie était importante et remarquée chez les BGN: *Proteus mirabilis*, *E. faecalis*, *E. cloacae* suivi de *Staphylococcus aureus* et de *Pseudomonas sp* avec 80 % de cas . La bactériurie était de 40% chez *S. aureus* et *Pseudomonas sp*

Tableau 26 : Fréquence des éléments microscopiques.

Espèces dans urine pyelique	Eléments microscopique %			
	%	PN	HEMATIES	BACTERIES
<i>P.mirabilis</i>	21%	10%	80%	10%
<i>E. faecalis</i>	11%	20%	80%	ND
<i>Pseudomonas sp</i>	11%	60%	40%	20%
<i>K.pneumoniae/ E.coli</i>	9 %	40%	60%	ND
<i>S.aureus</i>	9%	20%	60%	20%
<i>E.cloacae</i>	5%	20%	60%	20%
<i>S. coagulase négatif</i>	4%	ND	ND	ND
<i>Streptococcus pp</i>	4%	ND	ND	ND
<i>C.albicans</i>	5%	ND	ND	ND
<i>C.glabrata</i>	2%	ND	ND	ND
<i>C.parapsilosis</i>	2%	ND	ND	ND

ND : non déterminé.

8. Répartition des espèces retrouvées dans la culture d'urine pyélique (ECBUP)

La proportion d'espèces retrouvées dans la culture de l'urine pyélique était représentée par *Proteus mirabilis* avec un taux de 22% suivie de *Pseudomonas.sp* et *Enterococcus.sp* à 11% puis de *Staphylococcus aureus* et *k.pneumoniae* à 9%.

L'espèce *E.coli* a été constatée avec un taux de 09 % pour les deux tests, suivie d'*Enterobacter cloacae complex* (ECC) à 05%.

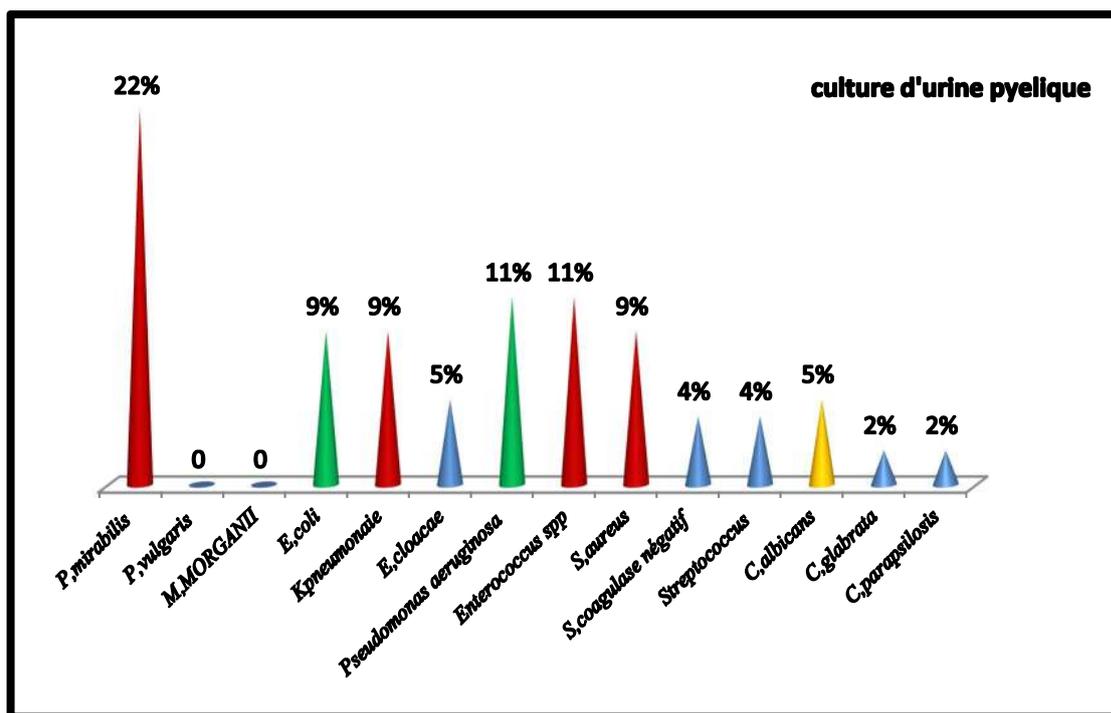


Figure 51 : Fréquences des espèces retrouvées dans l'ECBUP

9. Répartition des espèces retrouvées dans la culture du calcul (EBC)

La proportion d'espèces trouvées dans la culture du calcul dans la lithiase était représentée par *Proteus mirabilis* avec un taux de 21%, suivi de *Staphylococcus aureus* à 15% et *Staphylococcus à coagulase négative* 13% puis de *Pseudomonas. sp* à 12%, et de *k pneumoniae* à 11%. L'espèce *E. coli* a été constatée avec un taux de 09%, suivi d'*Enterobacter cloacae complex* (ECC) 05%.

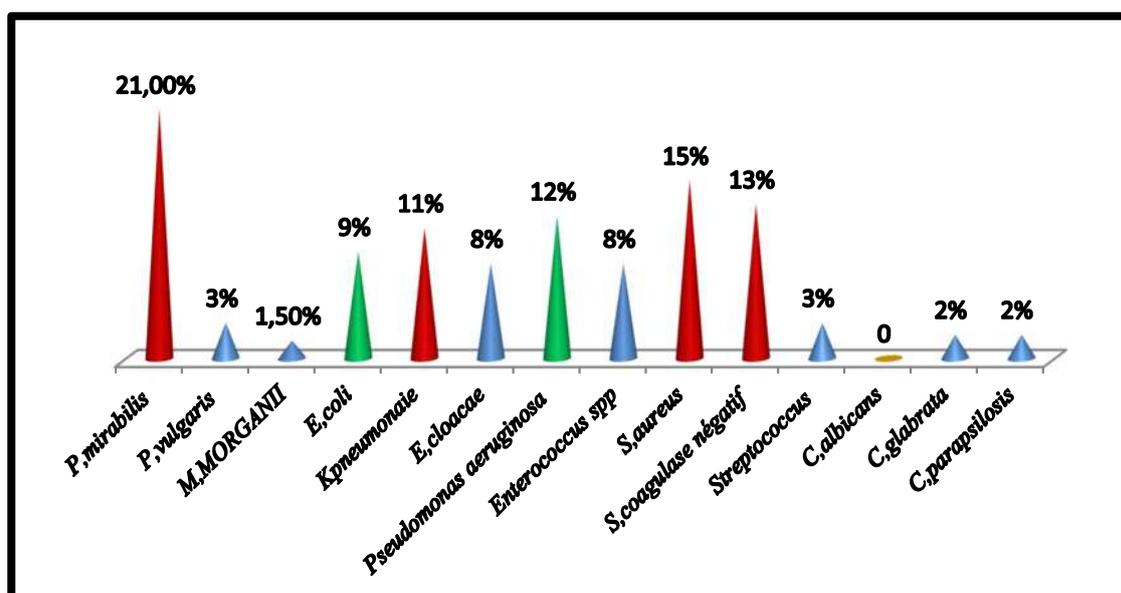


Figure 52 : Fréquences des espèces retrouvées dans le calcul urinaire.

10. Répartition par espèces dans l'urine pyélique et le calcul

La proportion d'espèces trouvées par ECBUP et EBC était représentée par *Proteus mirabilis* avec un taux de 26% vs 13.50%, suivi de *Staphylococcus aureus* à 9% vs 15% puis de *Pseudomonas. sp* à 11%, 12%, et de *k pneumoniae* à 09% vs 11% .

L'espèce *E.coli* a été constatée avec un taux de 09%, suivi d'*Enterobacter cloacae complex* (ECC) à 08% vs 05%. Pour les deux tests respectivement.

Par ailleurs, les espèces *P.vulgaris* et *M. morganii* ont été trouvées seulement dans la culture du calcul urinaire avec des taux de 03% et 02% .

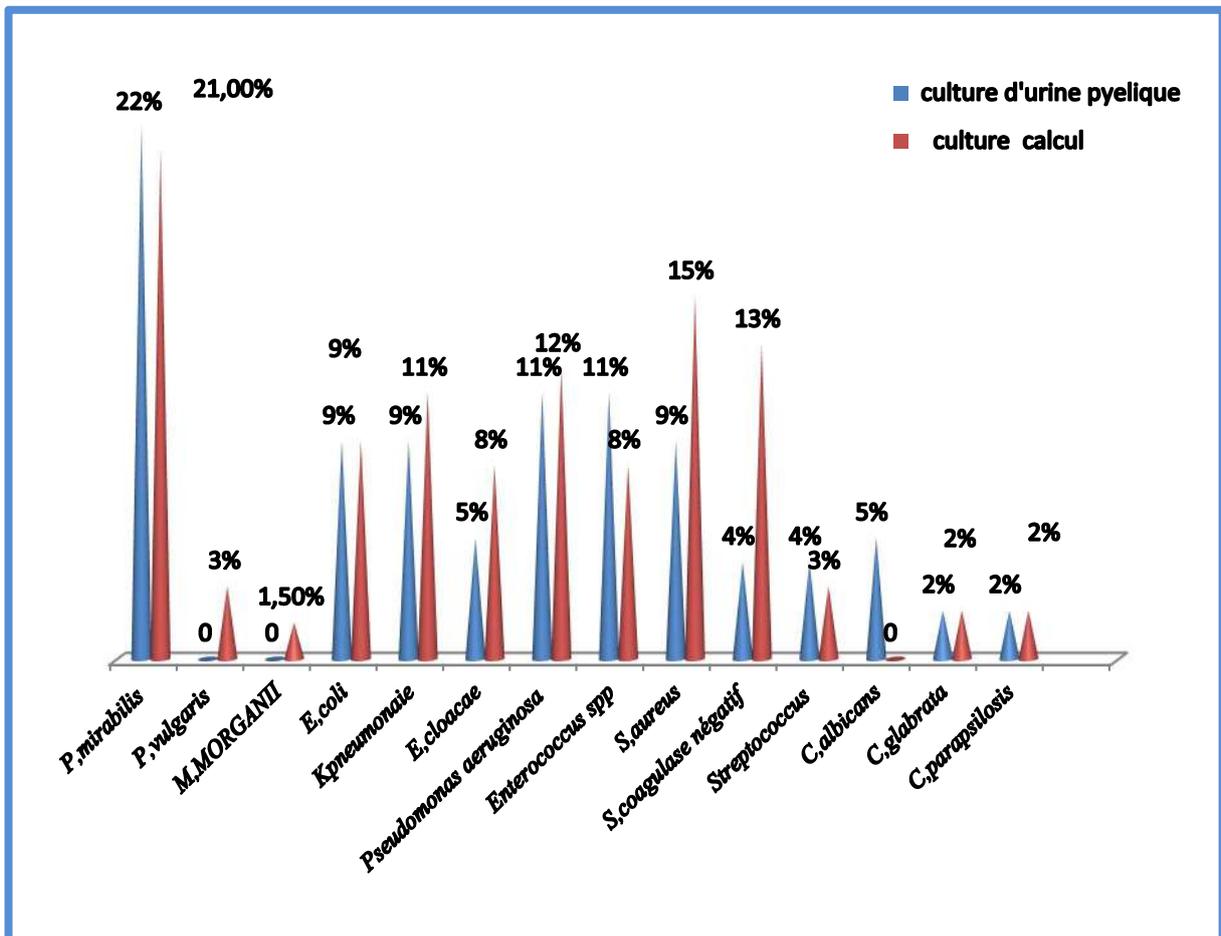


Figure 53 : Fréquences des espèces retrouvées dans l'urine pyélique et le calcul urinaire.

V. Antibio-résistance et lithiase d'infection

1. Résistances aux antibiotiques dans l'ECBU préopératoire

1.1. Entérobactéries et *Pseudomonas*

Une importante résistance aux β -lactamines était constatée chez *E.coli* (33 % de céfotaxime et clavulanate), suivie de 100 % de résistance à la ciprofloxacine chez *K pneumoniae* vs 33 % chez *E.coli* .Le *Pseudomonas* avait 100 % de résistance au céfatzidime et au clavulanate.

Tableau 27 : Fréquence des résistances dans ECBU.

Antibiotiques Bactéries	AMP	TIC	PIP	CZ	CTX CAZ	AMC TCC	FOX	IMP ERT	AK	GM HN	CIP	SXT	FOS
	<i>E. coli</i>	100%	100%	100%	60%	33% -	33%	33%	0	0	33%	33%	33%
<i>K. pneumoniae</i>	100%	100%	100%	100%	0	0	0	0	0	0	100%	100%	0
<i>Pseudomonas .spp</i>	-	100%	100%	-	- 100%	- 100%	-	0	0	0	0	100%	NT

AMP : amoxicilline, TIC : ticarcilline, PIP : pipéracilline , AMC :amoxicilline-clavulanate, CZ : céfazoline , FOX : céfoxitine, IMP /ERT / imipeneme/ ertapeneme ,

AK : amykacine , GM HN :gentamycine haut niveau de charge de disque antibiotique , CIP : ciprofloxacines , SXT : sulfaméthoxazole-triméthoprimine et Fos : fosfomycine.

1.2. Cocci à Gram positif

Il a été remarqué que 100% de *Staphylococcus aureus* avait une résistance à la céfoxitine à la kanamycine et au ciprofloxacine.

L'Enterococcus faecalis a été objectivé avec 100% de résistance au céfotaxime (céphalosporine III génération), à la clindamycine et au sulfaméthoxazole-triméthoprimine (Sxt/Bactrim).

2. Résistances aux antibiotiques dans l'urine pyélique

2.1. Entérobactéries et Pseudomonas

Une importante résistance aux β -lactamines était constatée chez *E.coli* avec 60 % de céphalosporine II génération (CZ) suivi de *kpneumoniae* à 40 % .

Puis, il a été noté une résistance à la ciprofloxacine de 60% vs 20 % chez *E coli* et *Kp*, respectivement.

Le *Pseudomonas* avait 100 % de résistance au céfatazidime et au clavulanate.

Tableau 28 : Fréquence des résistances dans l'urine pyélique, ECBUP.

Antioiotiques Bactérie	AMP	TIC	PIP	CZ	CTX CAZ	AMC TCC	FO X	IMP ERT	AK	Gm HN	C I P	SXT	FOS
<i>P. mirabilis</i>	40%	40%	40%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	NT	0%
<i>K.pneumoniae</i>	100%	100%	100%	40%	0%	20%	0%	0%	0%	0%	20%	60 %	0%
<i>E. coli</i>	100%	100%	100%	60%	0%	20%/	0%	0%	0%	0%	60%	80 %	0%
<i>ECC</i>	100%	0%	0%	100%	0%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	100 %	NT
<i>M.morganii</i>	100%	0%	0%	100%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	50%	NT	NT
<i>Pseudomonas.sp</i>	-	75%	75%	-	- 75%	- 0%	-	25% -	0%	0%	50%	NT	NT

AMP : amoxicilline, TIC : ticarcilline, PIP : pipéracilline , AMC :amoxicilline-clavulanate, CZ : céfazoline , FOX : céfoxitine, IMP /ERT / imipénème/ ertapénème , AK : amykacine , Gm HN :gentamycine haut niveau de charge de disque antibiotique , CIP : ciprofloxacines , SXT : sulfaméthoxazole-triméthoprimine et Fos : fosfomycine.

2.2. Cocci à Gram positif

L'Entérocooccus faecalis, a été observé avec 100 % de résistance au céfotaxime et à la clindamycine.

L'Enterobacter cloacae avait également 100% de résistance aux amoxicilline, au clavulanate, au cefazoline et au céfotaxime.

Pour les *Staphylococcus aureus* (2/5), 40 % été résistant à toutes les β -lactamines et aux ciprofloxacines.

3. Résistances aux antibiotiques dans le calcul urinaire

3.1. Entérobactéries et Pseudomonas

Une importante résistance aux β -lactamines de type céphazoline était constatée chez *E.coli* à 60 % vs 40% chez *k.pneumoniae*

Puis, il a été noté une résistance à la ciprofloxacine de 50% chez *E coli* vs 25% chez *K.pneumoniae*, Le *Pseudomonas.sp* avait 50% de résistance à la céftazidime et 25% à l'amikacine.

Tableau 29 : Fréquence des résistances à la culture du calcul , EBC

Antioiotiques Bactéries	AMP	TIC	PIP	CZ	CXT CAZ	AMC TCC	FOX	IMP ERT	AK	CIP	SXT	FO S
	<i>P.mirabilis</i>	33%	33%	33%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0	NT
<i>P.vulgaris</i>	100%	0%	0%	100%	0%	0%	/	0%	0%	0%	NT	NT
<i>E. coli</i>	100%	100%	100%	50%	0%	0%	0%	0%	0%	50%	NT	0%
<i>Kp</i>	100%	100%	100%	33%	25%	25%	0%	0%	0%	25%	25%	NT
<i>ECC°</i>	100%	20%	20%	100%	20%	100%	100%	0%	100%	20%	20%	0
<i>M .mograni</i>	100%	0%	0%	100%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	NT	NT
<i>Pseudomonas.sp</i>	-	50%	50%	-	50%	50%	/	25%	/	/	NT	/

AMP : amoxicilline, TIC : ticarcilline, PIP : pipéracilline , AMC :amoxicilline-clavulanate, CZ : céfazoline , FOX : céfoxitine, IMP /ERT / imipénème/ ertapénème , AK : amykacine , GM HN :gentamycine haut niveau de charge de disque antibiotique , CIP : ciprofloxacines , SXT : sulfaméthoxazole-triméthoprim et Fos : fosfomycine.

3.2. Cocci à Gram positifs

100 % de résistances au céfotaxime et à la clindamycine à été observée pour *L'Entérocooccus faecalis*. Il en est de même pour l'*Enterobacter cloacae* pour l'amoxicilline , clavulanate , cefazoline et céfotaxime .

Pour les *Staphylococcus aureus* (2/5), 40 % étaient résistants à toutes les β -lactamines et aux ciprofloxacines. En ce qui concerne l'*E.faecalis*, 100% de résistance au céfotaxime et à la Clindamycine .Les levures (*C. glabrata*) étaient naturellement résistantes à l'imidazole et au fluconazole.

4. Résistance aux antibiotiques des entérobactéries par β lactamase à spectre étendu

4.1. Résistance par β -lactamase à spectre étendu et culture du calcul urinaire

Parmi, les entérobactéries retrouvées, la fréquence la plus importante était de 7.5% (05/67) des souches résistantes aux céfotaxime (C3G) dont 40% (2/5) *E.cloacae complex* (2-4) et de 30 % (1/5) de *k.pneumoniae* (1-3-6).

Tableau 30 : Profils des résistances aux antibiotiques des entérobactéries BLSE positive (05/114).

Antibiotiques	<i>Kp (1)</i>	<i>E.cloacae-</i> (2)	<i>Kp(3)</i>	<i>E. cloacae (4)</i>	<i>Kp (6)</i>
AMP/TIC/PIP	R	R	R	R	R
Clavulanate AMC	R	R	R	R	S
Céfazoline	R	R	R	R	R
Céfoxitine	S	R	S	R	S
Céfotaxime	R	R	R	R	R
ERT. (CMI<0.2 μ g/MI)	S	S	S	S	S
Acide nalidixique	R	R	R	R	R
Ciprofloxacine	S	R	R	R	S
Amikacine	S	S	S	S	S
Gentamycine	S	S	S	S	R
Fosomycine	S	NT	S	S	NT
Piperacilline –Tazobactem (CMI 50 < 04 μ g/mL)	S	-	S	-	NT
sulfaméthoxazole-triméthoprime (Batrim)	R	R	R	R	R
Colistine	S	S	S	S	S

R : résistant, S : sensible, NT : non testé, ERT : ertapénème (Carbapénème).

AMP : amoxicilline, TIC : ticarcilline, PIP : piperacilline , AMC : amoxicilline-clavulanate,

CZ : céfazoline, FOX : céfoxitine, IMP /ERT / imipénème/ ertapénème , AK : amykacine , GM HN :gentamycine haut niveau de charge de disque antibiotique , CIP : ciprofloxacines , SXT: sulfaméthoxazole-triméthoprime et Fos : fosfomycine.

4.2. Résistance aux Céfotaxime par β -lactamase à spectre étendu

4.2.1. Image de synergie

Des images de synergies de type BLSE + ont été vue à l'antibiogramme (Céfotaxime et clavulanate ou amoxicilline- acide calvulanique, selon CLSI 2020), pour l'ensemble des souches *K.pneumoniae* (3/5) et pour une souche d'*E. cloacae complex*(Figure 54) selon le tableau 30 sus-cité.

Par-contre, une seule souche d'*E. cloacae complex* a été résistante au céfotaxime (< 06mm).

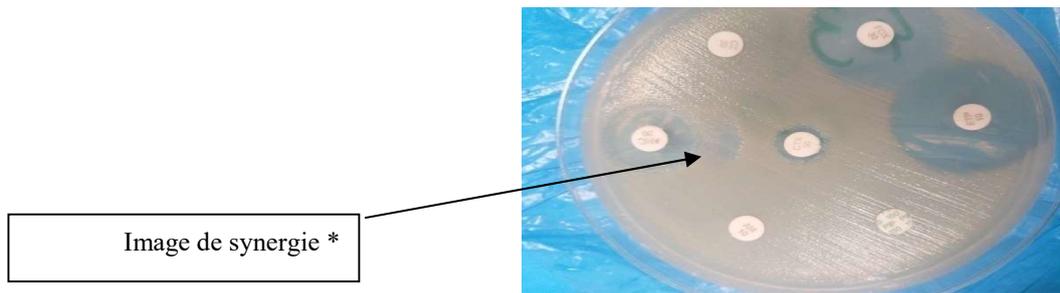


Figure 54 : *K.p(3)* BLSE + image de « bouchon champagne* » (flèche)

4.2.2. CMI E-test° de β -lactamase à spectre étendu

L'enzyme β -lactamase à spectre étendu (BLSE) a été détecté chez tous les isolats de type *K. pneumoniae* (3/3) et d'*E. cloacae complex* par Bandelette CMI E-test par l'image de synergie spécifique (CT : céfotaxime ; CTL : céfotaxime / clavulanate) et ceci, d'après la figure 55-56.

Une seule souche d'*E. cloacae complex* (ECC) été revenue sans image de synergie, (figure 60).

Les E-Test CMI ertapénème des souches BLSE + ont été tous négatifs chez la majorité des Isolats bactériens (5/114) de la culture du calcul urinaire, d'après la figure 58-59.



Figure 55 : *K.p* (1-3-6) BLSE +

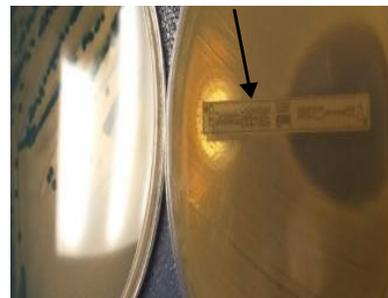


Figure 56 : *E.CC* BLSE +



Figure 57 : *kp* urease positive

4.2.3. Résistance par carbapénèmase et la culture du calcul urinaire

Aucune résistance associée aux carbapénèmase (CMI ertapénème sensibles < 0.2 µg /ml) n'a été trouvée dans la culture du calcul urinaire.



Figure 58 : *K.p* sensible à l'ertapénème.



Figure 59 : *E.CC* sensible à l'ertapénème.

4.2.4. Résistance au fluoroquinolones et la culture du calcul urinaire

Une importante résistance aux fluoroquinolones de 20% (1/5) a été constatée chez *K.pneumoniae* (3) et de 100 % (2/5) chez *E. cloacae complex* (2-4), d'après le tableau 29 ci-dessus.

4.2.5. Autres résistances

– Autre bacilles Gram négatif

Le *P.vulgaris*^o avec un phénotype de résistance (pénicillinase) de haut niveau, résistant à l'amoxicilline, au céfazoline (C1G) et une sensibilité intermédiaire au céfotaxime (15mm) a été associé à un choc septique chez une femme d'âge mûr (61 ans) avec un calcul rénal droit coralliforme (taille 19 mm), mentionné dans le tableau 36 ci-dessous.

– Anaérobie

Un *Bacteriodes fragilis* a été détecté chez une fillette par séquençage direct de l'urine pyélique via la métagénomique avec une résistance naturelle au céfotaxime et métronidazole, d'origine chromosomique

VI. Aspect microbiologique des tests de diagnostic dans la lithiase d'infection

Il y a une tendance vers une variabilité des micro-organismes identifiés selon les tests de diagnostics pour ; les souches *k.pneumoniae* ; *E.coli* et *Pseudomonas sp* étaient retrouvées dans l'ECBU, ECBUP et EBC .Par-contre la différence était notée pour les souches *Proteus spp*, *E.cloacae complex* et *M.morganii*.

Par ailleurs, la détection des souches multi-résistantes EBLSE était plus intéressante par la culture du calcul (EBC) que par l'EBUP et ECBU.

Tableau 31 : Aperçu de similitude et de différence des microorganismes

Les tests phénotypiques	Similitude	Différence
ECBU / ECBUP	<i>E .coli, kp et Pseudomonas sp</i>	<i>M .morganii , Staphylocoques spp et E .cloacae</i>
ECBU / EBC		
ECBUP /EBC	<i>P.mirabilis , kp , et E CC</i>	<i>P.vulgaris ,M .morganii Case , (ECC, Kp) BLSE+ et Candidas spp</i>

Case : cephalosporinase hyperproduite ; EBSLE +: *kp* BLSE + ,

ECC :*Enterobacter cloacae complex* BLSE+ .

VII. Répartition cristallurie et culture du calcul urinaire

Parmi les 56 % EBC positives (calcul infecté mixte), 39 % des cristalluries étaient positives et corrélées à l'aspect microbiologique, 27% des *Proteus spp* ,18% de *Staphylococcus spp* et 18% *Pseudomonas spp* avaient des cristaux de Struvite et phosphocalcique (PACC) accompagnés de cristaux oxalocalcique (C1).

Par-contre, 14% *E.coli* ,18% *Enterococcus spp* ,11% *Enterobacter cloacae* ont eux des cristaux oxalocalciques (C1-C2) et des phosphocalciques associés aux cristaux de Brushite.

Tableau 32 : Calcul d'infection et cristallurie.

Microorganismes	Fréq. cristallurie %	Cristaux	pH
<i>Proteus .spp /M.morganii</i>	27	Struvite –PACC-C1	7-8
<i>Staphylocoque spp</i>	23	Struvite-PACC-C1	7
<i>Enterococcus spp</i>	18	PACC-C1-C2-bruschite	6.5-7
<i>Pseudomonas sp</i>	18	C2-C1 –PACC	6.5-7
<i>Kp</i>	16	Struvite -PACC-C1	7
<i>E.coli</i>	14	PACC-C2-C1-bruschite	6.5-7
<i>E.cloacae complex (ECC)</i>	11	Struvite-PACC-C1	7
<i>Candidas. Spp</i>	7	AU0-C1-C2	5

Struvite : phosphoamoniacomagnesium, C1 : wedhellite, C2 : wewhellite, PACC : phosphocalcique carbonaté , AU0 :acide urique amorphe.

VIII. Complications post-opératoire associées à la lithiase d'infection

1. Le risque infectieux

1.1. Urosepsis

Nous avons obtenu 11/114 sujets positifs soit 10% d'urosepsis avec 89 % de négativité, et un taux de mortalité de 0.9 %.

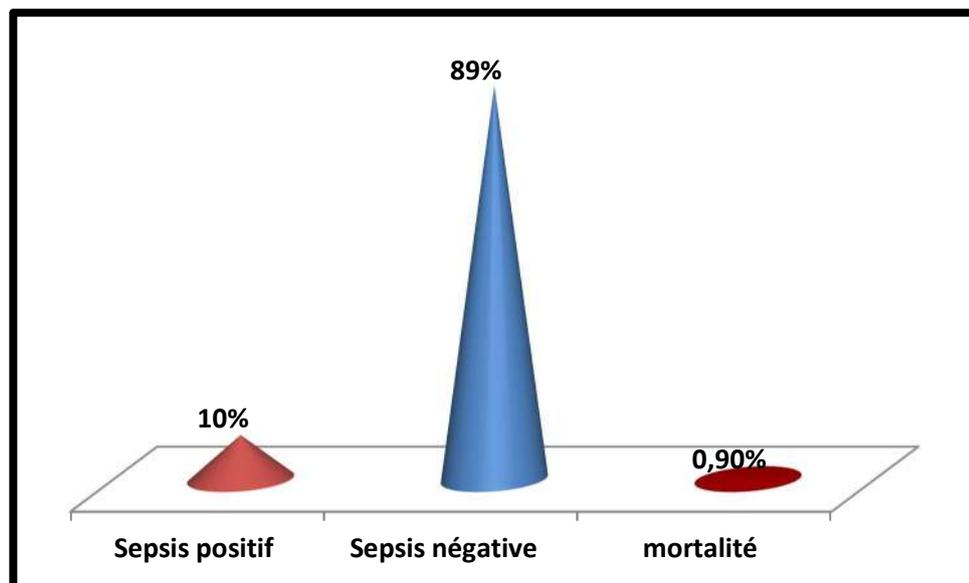


Figure 60 : Fréquence d'urosepsis

1.2. Répartition des Hémocultures

La fréquence la plus élevée des hémocultures était de 50% négatives suivie de 32% contaminées.

Tableau 33 : Fréquence des hémocultures.

	Négatifs	Souillées	Positivess
Hémoculture (F1F2)	50%	32%	18 % (2/11)

F1F2 : paire d'hémoculture .

1.3. Répartition des tests dans le risque infectieux post opératoire

a-Tests positifs et urosepsis postopératoire

Le taux important d'urosepsis post opératoire était retrouvés lorsque la culture du calcul et l'urine pyélique étaient positifs (90%).

Tableau 34 : Fréquence de l'urosepsis sévère en fonction des tests.

Outils	urosepsis +	Score du qSOFA.
ECBU positifs	01/11 (09 %)	02
(ECBUP et EBC) positifs	10/11 (90%)	03

q SOFA: Score Sepsis-related Organ Failure Assessment. (annexe 03)

b- Sensibilité, spécificité des outils dans la prédiction d'urosepsis sévère

La sensibilité et la spécificité constatée était de 90 % (10/11) et de 74 % (28/103) dans la culture du calcul et de l'urine pyélique.

Tableau 35 : Répartition de l'urosepsis détectés par ECBUP et EBC.

ECBUP/EBC	Urosepsis positif	Urosepsis négatif	Total
Positifs	10	28	38
Négatifs	1	75	76
Total (nombre)	11	103	114

($\text{Khi}^2 = 18 > 3.84, p < 0.001, \text{ddl} = 01$). ECBUP : examen cyto bactériologique d'urine pyélique .EBC : culture du calcul

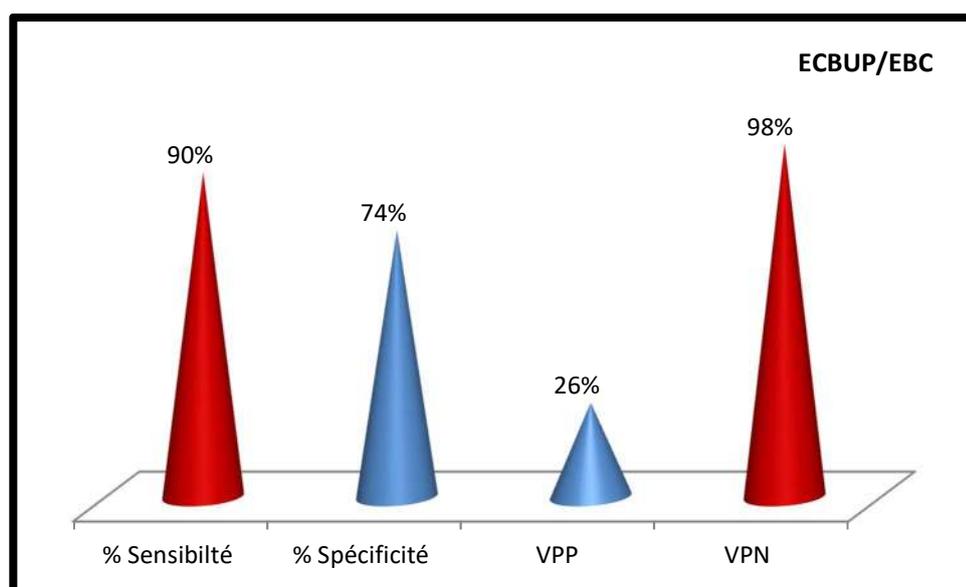


Figure 61 : Taux de sensibilité, spécificité, VPP et VPN.

(VPP : valeur prédictive positive. VPN : valeur prédictive négative)

1.4. Analyse épidémiologique des complications infectieuses

Les caractéristiques épidémiologiques des patients ont été enregistrées dans urosepsis (qSOFA \geq 2) à hémoculture négative, secondaires à sept urétéroscopies (URS) et à quatre néphrostomies (NLPC).

Les souches *E. coli* (BLSE plus) et *Entérobactérie cloacae complex* (ECC) ont été isolées chez la même patiente. L'*E. coli* a été trouvée par ECBU préopératoire lors de pyélonéphrite compliquée et l'ECC après enrichissement et mise culture du calcul.

Une patiente âgée de 67 ans, avec un choc septique non documenté, avait une culture de l'urine pyélique positive à *Candidas glabrata*, hypertendue et diabétique insulino-dépendante avec un ECBU antérieur négatif à l'uroculture (246 elts/ml avec absence de bactériurie à la culture).

Par ailleurs, un patient décéda, à 75 ans avec plusieurs facteurs de risque, notamment : diabète type 2, HTA, longue durée d'hospitalisation (plus de 30 jours), plusieurs cures d'antibiotiques (vancomycine, gentamycine, imipénème) et d'antifongiques (*Candidas*) inadéquats.

La culture était positive à l'hémoculture et à l'urine pyélique (ECBU négative) avec un *Candidas parapsilosis* (Tableau 36).

Tableau 36 : Caractéristiques des patients avec chocs septiques ou urosepsis .

Espèce/ patients	âge	Sexe	Topologie de la lithiase	Score qSOFA	Taille des calculs	TDM HZ	Type de tests	phénotype de résistances	aspect de l'urée	pH urinaire BU
<i>KP(3)</i>	56	H	Rénale pyélocaliciel-les obstructif gauche	2	18 mm	1480	ECBU	BLSE + Ciprofloxacine	ROSE	07
Kp (1)	43	F	Rénal droite + Pyelique	2	16mm	1370	EBC	BLSE +	ROSE	07
<i>E. Faecalis</i>	48	F	Rénale gauche	3	< ND	ND	ECBUP F1F2: +	Céfotaxim Clindamycine- Erythromy-cine	ROSE	6.5-7
<i>M.morganii</i>	05	Fille	Rénale bilatérale Anomalie métabolique	2	13mm	860	EBC	AmpicillinCéfazoline Augmentin	ROSE FRANC	07-08
<i>Proteus vulgaris</i> °	61	F	rénale droite	3	15	940	EBC	Ampicilline Céfazoline	ROSE FRANC	07-08
<i>E.cloacae complex</i>	56	F	Rénale bilatéral pyélocalicie-lles anomalie anatomique	2	16mm	1380	EBC	Ampicilline- Cefazoline Augmentin cefoxitine	ROSE FRANC	6.5-7
<i>Staphylococcu s aureus</i>	49	F	Lithiase renale et pyecalicielle sup ghe	03	20	960	ECB	B-lactamines Ciproofloxacine	ROSE FRANC	07-08
<i>Enterococcus faecalis</i>	45	F	Lithiase pyelique et calicielle inférieure droit	02	ND	ND	ECBUP	Cefotaxime Clindamycine erythromycine	ROSE PALE	6.5-07
<i>Pseudomonas sp</i>	52	H	Renale ghe Lithiase pyelique droite	ND	15	1120	ECBUP	(Sensible a tous)	Rose pale	6.5-07
<i>C. parapsilosis</i>	75	H	rénale droite + Diabète /HTA + Sonde jj	03	18mm	ND	ECBUP F1F2 : +	résistance : concidase + casposfungine	ND	5.5-6

ND : non déterminé, F: Femme, H: Homme, TDM : uro-scanner/HZ : unité de mesure. BU : bandelette réactif / labestix, F1F2 + : d'hémoculture positive

IX. Récidive de la lithiase d'infection

1. Cristallurie de récidence

Parmi les 32 cas de cristallurie disponible et suivis dans notre série, nous avons eu 34 % (11/32) de cristallurie positive de récidence vs 66% de négative objectivées par la lumière polarisée sur cellules de Malassez associée au pH urinaire par bandelette réactive (BU).

La majorité a été objectivée chez le sexe féminin (9/11) vs (02/11) chez les hommes, tous appartenant à la même tranche d'âge de 42-60ans.

Tableau 37 : Cristallurie de récidence dans la lithiase d'infection

Patients	PH (BU)	DT	GB	GR	Cellule épithéliale	Bactérie	Culture d'urine	C1	C2	Struvite	Bruschite	PACC	AUD
1	>7	>1050	/	+++	+	++	<i>K.p/E.colt</i>	++ +	+	++	-	++	-
2	<6	>1050	56	++	+	-	<i>Levure</i>	-	++	-	-	++	++
3	>7	>1050	89	++	+	+	<i>P.Vulgaris</i>	++	+	+	-	+	-
4	>7	>1050	45	++	/	+	<i>S. aureus</i>	++	+	+	-	-	-
5	6-6.5	>1030	/	+++	/	-	<i>E.coli</i>	++ +	+	-	+	+	-
6	6	>1050	120	++	/	-	/	++ +	+	-	+	++	++
7	>7	>1050	/	+++	+	+	<i>ECC</i>	++ +	+++	++	-	++	-
8	ND	>1050	/	+++	+	++	<i>S. aureus</i>	+++	+	++	-	++	-
9	>6	>1030	160	++	+	-	<i>Pseudomonas. sp</i>	++	+	++	-	++	+++
10	ND	/	/	+++	+	+	<i>P.mirabilis</i>	++	+	+	-	+	-
11	>7	>1050	39	-	/	-	<i>AC</i>	++	+	+	+	-	-
Témoin	6.5-7	1030	<10 ⁴ /ml	-	-	-	-	+	++	-	-	+	-

DT : de

nsité urinaire, C1 : cristaux wedhellite, C2: cristaux whewellite et AUD : cristaux acide urique, GB : leucocyte, GR : hématies.

AC : absence de culture. +++ > 10 cristaux /champs et > 10 µm . ++: 0-10 cristaux et > 10 µm . +: 1-2 cristaux /champs et > 10 µm .

- : absence de cristaux, ND : non déterminé.

X. Caractérisation moléculaire des résistances aux antibiotiques

1. Réaction de PCR et support génétique des β -lactamines, aminoglycosides et fluoroquinolones (*bla*_{CTX-M}, *aac* (3')-I et *qnrB*)

1.1. Résultats de la détection des gènes chromosomiques

Les gènes le plus souvent rencontrés dans le chromosome étaient ceux responsables de la résistance aux β -lactamines. Les 03 *kp* (1-3-6) ont hébergé trois gènes (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} et *bla*_{CTX-M15}), mais le gène de résistance aux fluoroquinolones de type *qnrB*1, n'est présent que chez la souche *kp*3. les deux *Enterobacter cloacae* (*ECC*2 ,*ECC* 4) ont eu un gène de résistance aux β -lactamines (*bla*_{TEM}) et un gène de résistance de type *qnr* B1 pour les fluoroquinolones. Par contre aucun gène de résistance aux bêtalactamines de type *CTX-M* 09 et de type *aac*(3')-1 aminoglycoside n'a été détecté .

Tableau 38 : Illustration des gènes chromosomiques de résistance aux antibiotiques.

Souche / Gènes	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	<i>bla</i> _{CTX-M-13}	<i>qnrB</i> 1	<i>acc</i> (3)-1
<i>Kp</i> (1)	+	+	-	+	-	-
<i>ECC</i> (2)	+	-	-	-	+	-
<i>KP</i> (3)	+	+	-	+	+	-
<i>ECC</i> (4)	+	-	-	-	+	-
<i>Kp</i> (3)	+	+	-	+	-	-

1.2. Résultats de la détection des gènes plasmidiques

Les souches *kp* (1-3-6) n'ont pas possédé de gènes plasmidiques de résistance de type (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} et *bla*_{CTX-M15}) pour les β -lactamines et aucun gène *qnrB*1 pour les fluoroquinolones.

En plus, aucun gène de résistances aux bêtalactamines de type *bla*_{CTX-M9} et de type *acc* (3')-I d'aminoglycosides n'a été détecté. Par ailleurs l'*Enterobacter cloacae* (*ECC*2) à hébergé les gènes *bla*_{TEM} et *qnrB*1 codant pour la résistance aux bêtalactamines et aux fluoroquinolones.

Tableau 39 : Illustration des gènes plasmidiques de résistance aux antibiotiques.

Souche / Gènes	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	<i>bla</i> _{CTX-M-13}	<i>qnrB1</i>	<i>aac(3')-I</i>
<i>Kp</i> (1)	-	-	-	-	-	-
<i>EC</i> (2)	+	-	-	-	+	-
<i>Kp</i> (3)	-	-	-	-	-	-
<i>ECC</i> (4)	-	-	-	-	-	-
<i>Kp</i> (6)	+	+	-	+	-	-

Gènes de résistance *bla*_{TEM}

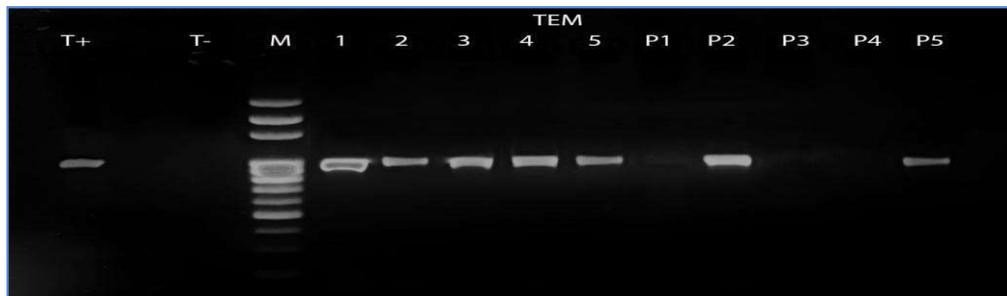


Figure 62 : Gel des produits amplifiés par PCR Tem après électrophorèse sur gel d'agarose (1,5%)

T+ : *Pseudomonas aeruginosa* transposon Tn3 bla(tem-1A) DNA for penicillinase TEM-1; T- : eau distillée ; P : ADN plasmidique ; M : marqueur de taille (100-1000-3000pb)
 - 1=*kp*(1), 2=*ECC* , 3=*kp*(3) , 4=*ECC* et 5=*kp*(6)-

- Gène de résistance *bla*_{SHV}

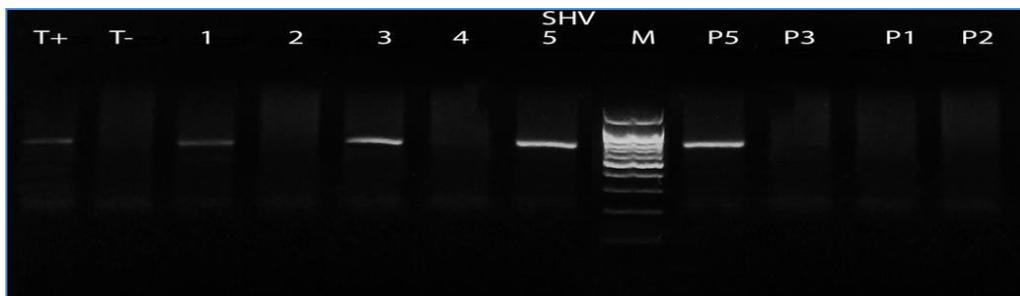


Figure 63 : Gel des produits amplifiés par PCR SHV après électrophorèse sur gel d'agarose (1,5%)

T+ : *K.pneumoniae* bla_{SHV}-1 DNA; T- : eau distillée ; P : ADN plasmidique ; M : marqueur de taille (100-1000-3000pb)

- Gène de résistance bêtalactamase *CTX-M-3*

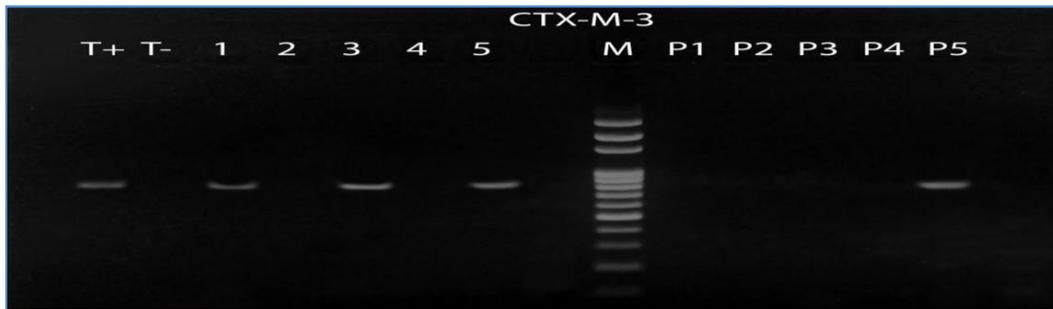


Figure 64 : Gel des produits amplifiés par PCR *CTX-M-3* après électrophorèse sur gel d'agarose (1,5%)

T+ : *E.coli bla_(CTX-M-1+)*, T- : eau distillée, P : ADN plasmidique, M : marqueur de taille (100-1000-300pb).

- Gène de résistance *CTX-M-9*

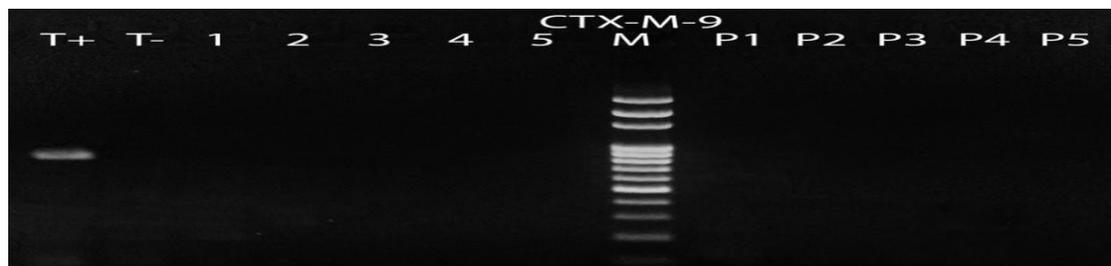


Figure 65 : Gel des produits amplifiés par PCR *CTX-M-9* après électrophorèse sur gel d'agarose (1,5%)

T+ : *Escherichia coli* plasmid pOZ173 β -lactamase *CTX-M-9a* (*bla_{CTX-M-9a}*), T- : eau distillée, P : ADN plasmidique, M : marqueur de taille (100-1000-3000pb)

- Gène de résistance des aminoglycosides *aac* (3')-I

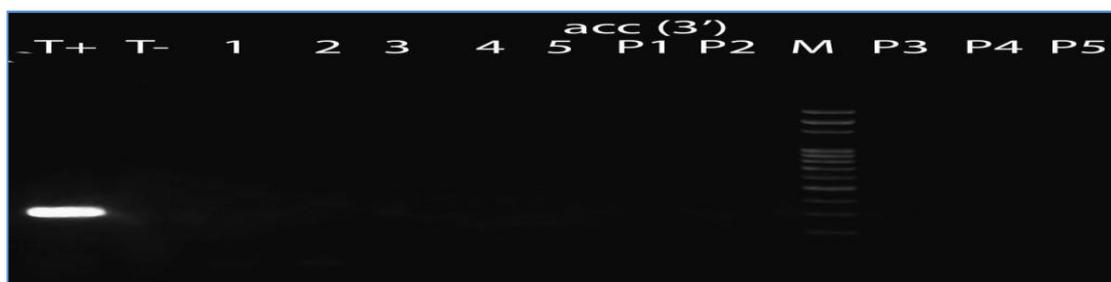


Figure 66 : gel des produits amplifiés par *aac*(3')-I après électrophorèse sur gel d'agarose(1,5%)

T+ : *aacC2 aac*(3')-II [*Klebsiella pneumoniae*], T- : eau distillée, P : ADN plasmidique, M : marqueur de taille (100-1000-3000pb)

- Gène de fluoroquinolones *qnr-B1*

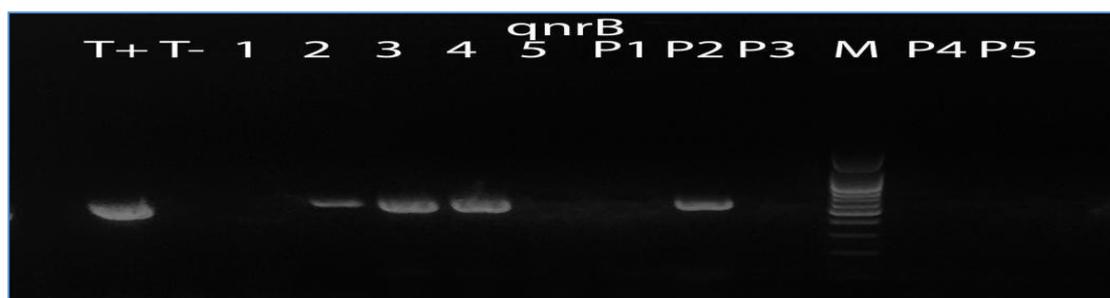


Figure 67 : gel des produits amplifiés par PCR *qnrB1* après électrophorèse sur gel d'agarose (1,5%)

T+ : *Klebsiella pneumoniae* plasmid pNDM-MAR - *qnrB1*+, T- : eau distillée, P : ADN plasmidique, M : marqueur de taille (100-1000-3000pb).

1.3. Étude du séquençage des gènes d'entérobactéries BLSE (positive)

L'analyse des séquences des gènes de BLSE a montrés que tous les gènes TEM détectés chez les souches d'*Enterobacter cloacae*, *k.pneumoniae* appartiennent au variant TEM-1, alors que le variant SHV-1, n'a été retrouvé que chez les *K pneumoniae* seulement. Les gènes *bla*_{CTX-M} détectés chez les *K. pneumoniae* isolées du calcul urinaire étaient des CTX-M-15. L'analyse des séquences des gènes de résistance aux quinolones à révélé que : sur les 5 gènes *qnr-B* détectés chez les souches isolées du calcul urinaire, 03 ont été des variants *qnr-B1*, dont deux *Enterobacte cloacae complex* et une seule *kp* (n=3).

L'analyse des séquences des gènes de résistance aux aminoglycosides acc (3')-I a indiqué que toutes les souches étaient négatives sans exception.

Tableau 40 : Résultats phénotypiques et génotypiques de l'antibiorésistance

Isolats clinique	Résistance aux β-lactamines	Gènes de BLSE+	Resistance aux Quinolones	Gènes des Quinolones
<i>Kp</i> (01)	AMP-AMC- CRO-CTX	<i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{SHV} <i>bla</i> _{CTX-M-15}	NA	ND
<i>EC</i> (02)	AMP-AMC-CZ FOX	<i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{SHV}	CIP-NA	<i>qnr-B-1</i>
<i>KP</i> (03)	AMP-CRO- AMC-CTX-	<i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{SHV} <i>bla</i> _{CTX-M15}	CIP-NA	<i>qnr-B-1</i>
<i>EC</i> (04)	AMP-AMC-CZ FOX	<i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{SHV}	CIP-NA	<i>qnr-B-1</i>
<i>Kp</i> (06)	AMP-CZ-CTX	<i>Bla</i> _{-TEM} <i>bla</i> _{-SHV} <i>bla</i> _{-CTX-15}	NA	ND

FOX : céfoxitine (CIIG) , CZ :cefazoline(CIG) , CTX : céfotaxime (CIIG) , NA :acide nalidixique , CIP :ciprofloxacine
ND : non déterminé

XI. Génomotypage par MLST des souches *K. pneumoniae* BLSE positive

Le génotypage des 03 souches *kp* isolées à l'hôpital à partir des lithiases d'infections (colonisés ou infectés) basé sur l'analyse de 7 *house keeping* gènes (*dnaA*, *fusA*, *gyrB*, *leuS*, *pyrG*, *rplB*, *rpoB*) a démontré la distribution des souches dans 02 séquences de type différents, dont 02 nouvelles ST 405, et une seule ST 29.

Tableau 41 : Séquences types des souches *Klebsiella pneumoniae* BLSE positive

Bactéries BLSE +	ST	gapA	infB	Mdh	Pgi	rpoB	phoE	tonB
<i>Kp-1</i>	405	2	1	2	3	4	10	110
<i>kp -3</i>	405	2	1	2	3	4	10	110
<i>kp -6</i>	29	2	3	2	2	4	6	4

1. Phylogénies des *k. pneumoniae* (1-3-6)

L'arbre phylogénétique a été généré à l'aide d'un logiciel informatique MEGA 06 (Tamura et al., 2013) avec l'algorithme bootstrap de probabilité maximale et le modèle Tamura Nei basé sur des séquences concaténées de locus pour retrouver les clusters.

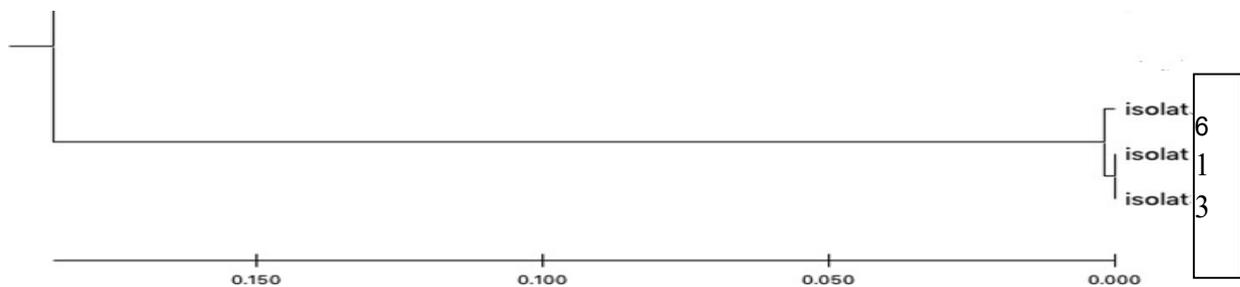


Figure 68 : Phylogénie entre les *k.pneumoniae* BLSE + (1-3-6)

XII. Résultat de la métagénomique directe dans la pyurie pyélique

Il s'agit d'une fillette âgée de 5 ans admise pour choc septique sur lithiase rénale d'infection à *E. coli* BLSE+ sensible à l'imipénème et à l'amikacine à l'antibiogramme. Des antécédents d'anomalies cérébrales en prénatal qui ont nécessité plusieurs cures de Claforan, 2 g/jour pendant 21 jours pour la mère.

La patiente a été prise en charge pour ces calculs rénaux gauches par urétéroscopie souple sous antibioprofylaxie après négativation de son ECBU. Vu le rétrécissement, la calcification urétérale et la fibrine qui ont été objectivés par le chirurgien urologue, il a été décidé la mise en culture des calculs en aérobie sur milieu chromogène, milieu enrichi en sang, et milieu de Loweinstein-Jensen (pour la recherche de *Mycobacterium tuberculosis*) après lavage à l'eau distillée stérile,

Le broyage et l'enrichissement ont été réalisés sous hotte PSM2 selon la méthode de Stamey.

Cependant, malgré la bonne prise en charge biologique, clinique et chirurgicale, l'évolution de la patiente s'est soldé par de multiples abcès rénaux gauches et une insuffisance rénale aiguë à 180 micromoles/l de créatinine.

Les principaux micro-organismes retrouvés dans la pyurie pyélique (**Figure 70**) étaient désignés par les classes *Gammaproteobacteria*, *Alpha Proteobacteria*, *Actinebacteria* et *Bacillus*. Les classes d'anaérobies détectées ont été : les fusobactérium à 0,07 %, *Clostridia* à 1,04 % et les *Bacteroidia* à 1,17%. Pour les aérobies et aéro- anaérobies facultatifs (AAF) nous avons retrouvé des Entérobactéries à 60,68 %, puis des Lactobacillales à 13,28 %, des *Micrococacae* à 8,68 %, des Actinomycetales à 4,12 %, des Pseudomonadales à 2,80 %, des Bacillales à 2,44 % et des corynebactériales à 1,94 %, et autres.

Les principales espèces correspondantes sont résumées dans le tableau 42 ci-dessous, telles qu'elles ont été présentées après analyse bioinformatique par la plateforme de macrogen (GLS).

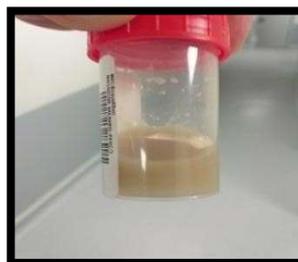


Figure 69 : Aspect macroscopique de la pyurie pyélique.

Tableau 42 : Principales espèces détectées par la métagénomique.

Family	Genus	Species	Score
__Morganellaceae	__Morganella	__Morganella morganii	1
__Microbacteriaceae	__Curtobacterium	__Curtobacterium flaccumfaciens	1
__Morganellaceae	__Proteus	__Proteus mirabilis	1
__Streptococcaceae	__Streptococcus	__Streptococcus intermedius	1
__Actinomycetaceae	__Schaalia	__Schaalia odontolytica	1
__Enterobacteriaceae	__Escherichia	__Escherichia fergusonii	1
__Oscillatoriaceae	__Aerosakkonema	__Aerosakkonema uniforme	1
__	__Gemella	__Gemella morbillorum	1
__Ruminococcaceae	__Faecalibacterium	__Faecalibacterium prausnitzii	1
__Corynebacteriaceae	__Corynebacterium	__Corynebacterium tuberculostearicum	1
__Veillonellaceae	__Veillonella	__Veillonella parvula	1
__Corynebacteriaceae	__Corynebacterium	__Corynebacterium amycolatum	1
__Moraxellaceae	__Acinetobacter	__Acinetobacter johnsonii	1
__	__	__	1
__Morganellaceae	__Providencia	__Providencia thailandensis	1
__Methylobacteriaceae	__Methylobacterium	__Methylobacterium phyllostachyos	1
__Moraxellaceae	__Moraxella	__Moraxella osloensis	1
__Corynebacteriaceae	__Corynebacterium	__Corynebacterium pyruviciproducens	1
__Moraxellaceae	__Acinetobacter	__Acinetobacter variabilis	1
__Enterobacteriaceae	__Enterobacter	__Enterobacter cloacae	1
__Bacteroidaceae	__Bacteroides	__Bacteroides acidifaciens	1
__Peptoniphilaceae	__Peptoniphilus	__Peptoniphilus grossensis	1
__Lachnospiraceae	__Lachnoclostridium	__[Clostridium] scindens	1
__Bacillaceae	__Bacillus	__Bacillus wiedmannii	1
__Enterobacteriaceae	__Escherichia	__Escherichia marmotae	1
__Prevotellaceae	__Prevotella	__Prevotella timonensis	1
__Staphylococcaceae	__Staphylococcus	__Staphylococcus epidermidis	1
__Streptococcaceae	__Streptococcus	__Streptococcus gordonii	1
__Bacteroidaceae	__Bacteroides	__Bacteroides fragilis	1
__Pseudomonadaceae	__Pseudomonas	__Pseudomonas glareae	1
__Sinobacteraceae	__Nevskia	__Nevskia persephonica	1
__Xanthomonadaceae	__Stenotrophomonas	__[Pseudomonas] hibiscicola	1
__Prevotellaceae	__Prevotella	__Prevotella oris	1
__Peptostreptococcaceae	__Peptostreptococcus	__Peptostreptococcus stomatis	1
__Enterococcaceae	__Enterococcus	__Enterococcus lactis	1
__Sphingomonadaceae	__Sphingomonas	__Sphingomonas olei	1
__Micrococcaceae	__Rothia	__Rothia mucilaginoso	1
__Fusobacteriaceae	__Fusobacterium	__Fusobacterium nucleatum	1
__Yersiniaceae	__Serratia	__Serratia liquefaciens	1
__Geminococcaceae	__Arboricoccus	__Arboricoccus pini	1

1. Représentation phylogénétique des espèces bactériennes par la métagénomique

Les espèces bactériennes présentes dans la pyurie pyélique détectées par la métagénomique 16Sr DNA sont représentées par un code spécifique dans la figure 70, ci-dessous.

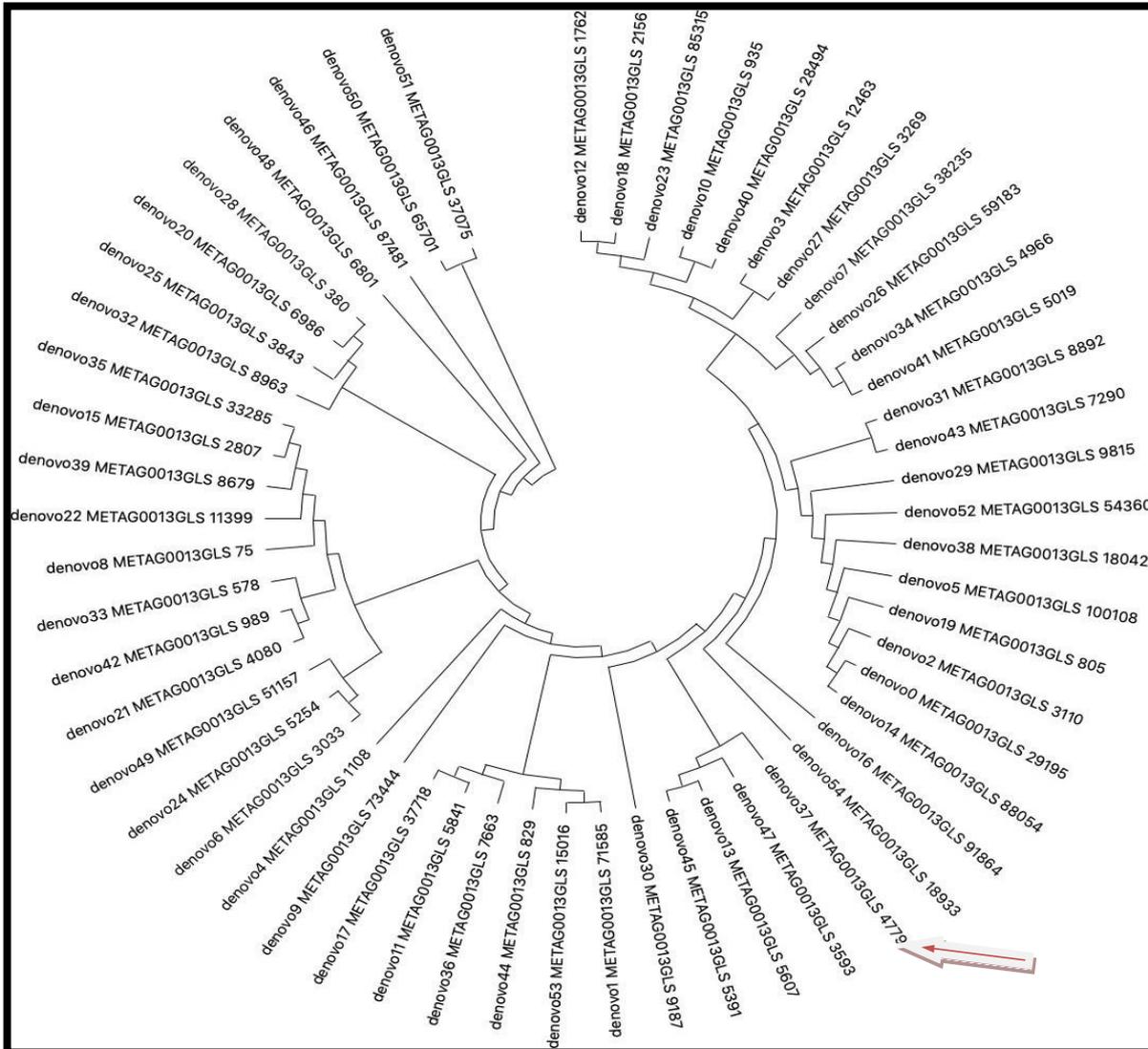


Figure 70 : Arbre phylogénétique des espèces bactériennes

Cette analyse a impliqué 55 séquences de nucléotides. Il y avait un total de 467 positions dans l'ensemble de données finales. Des analyses évolutives ont été menées dans MEGA X. (Kumar et al, 2018)

La métagénomique a détecté des micro-organismes de type anaérobie ou autres microorganismes porteurs de facteurs de virulence et pouvant être multi-résistants aux β -lactamines, fluoroquinolones et aminoglycosides d'origine génétique ou acquise, telles que *Bacteriodes fragilis* et *Fusobacterium nucleatum* qui sont présentés, dans le tableau 43, ci-après .

Tableau 43 : Apport de la métagénomique directe dans la pyurie pyélique.

Micro-organismes	ECBU	EBC	Métagénomique de la pyurie
<i>Enterobacteriaceae (M. morgani)</i>	négatif	positif	positif
<i>Fusobacteriaceae (Fusobacterium nucleatum)++++</i> <i>Rhizobiales Rhodospirillales Sphingomonadales</i> <i>Burkholderiales Alteromonadales Corynebacteriales</i> <i>Micrococcales</i> <i>Propionibacteriales</i> <i>Bacteroidaceae (Fragilis, acidifacien) +++++</i> <i>Oscillatoriales Bacillales Lactobacillales Nevskiales</i> <i>Pseudomonadales +++++ Xanthomonadales</i>	Non détecté		Détecté

EBC : culture du calcul, pyurie : urine pyélique infectée.

XIII. Résultats préliminaires du projet de séquençage du génome complet de l'*Enterobacter hormaechei* (WGS)

Il s'agit du deuxième cas du projet d'exploration génétique chez une patiente âgée de 58 ans avec plusieurs facteurs de risque dont l'âge, les anomalies anatomiques de l'uretère gauche, les multiples interventions endo-urologiques, sonde double jj' et le non-respect des règles d'hygiène de vie (baisse de la diurèse et l'automédication). Les antécédents d'adénome thyroïdien occasionnant une hyper-parathyroïdie à 250 ut/l avec une hyper-calciurie à 9,5 micromol/24 h, et une hypocitraturie 1500 micromol /24 h.

La patiente avait présenté des infections ou colonisations urinaires à répétition à *E. coli* BLSE + et la découverte d'une souche *Enterobacterie cloacae complex* dans la culture du calcul avec un phénotype de résistance de type céphalosporinases hyperproduite.

Le séquençage du génome complet (WGS) d'*Enterobacter cloacae complex* isolé à partir de la culture pure et abondante ($> = 10^3$ UFC/mL) de calcul d'infection révèle une nouvelle espèce d'*Enterobacter hormaechei*.

L'interprétation de l'assemblage de son génome via cette étude génomique préliminaire jusque-là jamais entreprise est en cours d'analyse vu la complexité et la richesse des données obtenues.

L'assemblage a généré des séquences de l'échantillon WGS002-GLS. L'analyse de cet échantillon a été effectuée avec succès. La figure 71 montre le débit des données brutes. La figure 72 montre le pourcentage Q30 (% de bases avec une qualité supérieure au score phred 30) de chaque donnée brute de l'échantillon.



Figure 71 : Débit de données du génome brutes.

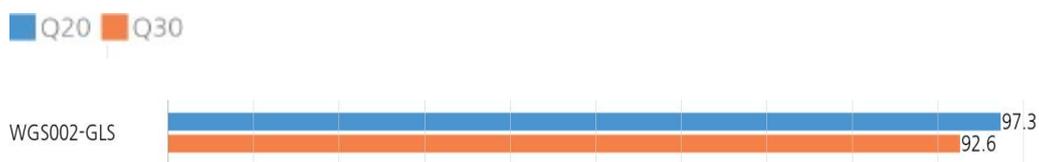


Figure 72 : Scores Q20 / Q30 de données brutes (WGS).

Le nombre de gènes trouvés dans l'analyse du génome complet de l'*Enterobacter hormaechei* était de **4956**, le nombre de codes génétiques de **4867**, le nombre gène tRNA de **78** et le gène rRNA de **10**.

Une fois le génome complet ou l'ébauche du génome assemblée, les emplacements des gènes protéiques de la nouvelle espèce d'*Enterobacter hormaechei* ont été prédits et leurs fonctions ont été annotées. Le logiciel informatique type Prokka a été utilisé pour prédire la localisation des gènes. Le BLAST (Outil NCBI de recherche d'alignement) a été utilisé pour connaître la fonction et l'identification des séquences assemblées contre la base de données de séquences de nucléotides et de protéines.

Les résultats génétiques préliminaires constater sont :

- des enzymes uréalytiques alpha, beta, gamma et autres ;
- des protéines de virulences : protéine **MarA**, prophage intégrase IntA et endonuclease provenant de l'analyse bio-informatique (annotation) du génome de l'*E. hormaechei* ;
- des variants ou gènes inconnus sont remarqués et codent également pour des protéines hypothétiques non répertoriées dans la base de données de la plateforme de macrogen. Tout cela est représenté dans le tableau 44 ci-après.

Tableau. 44 : Résultat préliminaire du projet séquençage du génome complet (WGS) d'*Enterobacter hormaechei*.

Gènes de résistances	Codes génétiques CD	Résistance aux antibiotiques
<i>bla-TEM</i>	ND	β-lactamine
β-lactamase <i>CTX-MI</i>	ND	β-lactamine
β-lactamase	ND	β-lactamine
ADN gyrase A°	00187	Fluoroquinolones
ADN gyrase B°	00075	Fluoroquinolones
Prophage intégrase IntA / Ints/IntA	00801	ND
ISL3 family transposase ISS _{ma11} °	04783	ND
Multiple antibiotic resistance protein MarA	ND	ND
Glutathione transferase FosA°	07244	Fosfomycines
Endonuclease 8	08965°	ND
Endonuclease III	00056°	ND
Endonuclease -1	ND	ND
Endonuclease 4	00019°	ND
Hypothétiques	00093	ND
Urease subunit beta	<u>COG0832</u>	Urea amidohydrolase subunit Beta
Urease subunit gamma	<u>COG0831</u>	Urea amidohydrolase subunit gamma
Urease subunit alpha	<u>COG0804</u>	Urea amidohydrolase subunit alpha
Urease accessory	<u>COG2371</u>	enzyme active site formation

ND : non déterminé. Hypothétiques : non trouvé dans la base de donnée. Cd : code génétique (annexe 10)

DISCUSSION

Dans notre discussion, nous tenterons de dégager la particularité du profil épidémiologique des patients avec lithiase d'infection pris en charge à l'hôpital Mohamed Seghir, par rapport aux différentes études déjà réalisées. La prévalence de la lithiase d'infection dans notre étude est recensée avec une proportion de 3 % des cas (114), se rapprochant d'autres études avec des fréquences de 2,48 %, 1.5 % (n = 37804), 6 %, 3,9 %, 3,8 % et 05 % [1.2.7.9.92.93.109-113].

1. Étude épidémiologique de la lithiase d'infection

L'incidence de la lithiase d'infection et son profil épidémiologique varient selon les pays. Elle est estimée à 1 pour 10 000 enfants par an en Europe, et à 1 pour 30 000 enfants par an en France [1]. Par contre, en Afrique et en Asie, la situation de la lithiase d'infection semble être endémique et mal explorée [2.5.6.9.47.59].

D'Elmzabri Zineb, au Maroc en 2014, sur une période de 5 ans, de 2009 à 2013, avait colligé 29 cas de lithiase, soit une moyenne de 5,8 cas par an, ce qui se rapproche de notre série avec 2 cas annuellement en moyenne [121].

Les résultats que nous avons trouvés montrent qu'il y avait une différence significative dans la fréquence des lithiases d'infection positives observées en fonction de la tranche d'âge des patients ($p < 0.01$). Les lithiasiques de la tranche d'âge 42-60 ans ont atteint une fréquence de 42 % (51), suivis par les sujets de tranche d'âge > 60 ans avec 28 % (32). Chez les enfants et les jeunes adultes, la fréquence est de 11 % (12) et de 17 % (19).

L'âge moyen de nos patients est de 50 ans avec des extrêmes allant de 2 à 75ans. Deux séries décrivent une moyenne d'âge proche de la nôtre, l'une rapportée en 2016 par Fukuhara qui décrit une moyenne d'âge de 49,8 ans, l'autre série a été évoquée en 2014 par Perez Castro qui rapporte une moyenne d'âge de 48,8 ans. Par contre, d'autres auteurs, comme Djelloul et Ouattara au Mali, ont retrouvé respectivement dans leurs travaux, une moyenne d'âge différente de 40,7 ans et de 34 ans [47.125.128].

Par ailleurs, la fréquence de la lithiase d'infection chez les enfants de la tranche d'âge de 2 à 15 ans est de 0,2 % (12/4200). Dans notre étude, ce taux est beaucoup plus bas par rapport à une étude faite au Soudan qui trouve un taux de 15 % (12/80) chez les enfants [48].

Ainsi, il est noté que la proportion des calculs d'origine infectieuse est maximale, de 50 %, chez le jeune enfant (< 5 ans) de la même tranche d'âge. Nous remarquons que le profil

épidémiologique des lithiases infectieuses, dans notre étude concerne, préférentiellement, la tranche d'âge mûre des 42-60 ans. Il est différent du profil européen. Cela serait dû au recrutement tardif des patients et à la physiopathologie latente du développement de la lithiase d'infection, avec une sémiologie parfois atypique, notamment des douleurs digestives accompagnées parfois d'anomalies anatomiques ou métaboliques sournoises (diabète) [1.2.7.9.37].

Dans notre série, nous remarquons plus d'hommes que de femmes avec un sex ratio de 1,7 pour les hommes. Dans les différentes études, il existe une concordance dans la prédominance masculine concernant la lithiase d'infection. Leur sex ratio est de 2,6 et 2,1 pour les hommes. Cela peut être expliqué par le fait qu'il y a plus d'hommes que de femmes recrutés dans l'Hôpital Mohamed Seghir Nekkache (en milieu militaire).

Nous remarquons également que la proportion dans l'antériorité de l'ECBU positive associée à la lithiase urinaire d'infection mixte était majoritaire chez les femmes par rapport aux hommes avec des taux de 60,3 % vs 39,7 % respectivement, suivie par 11 % chez les enfants [18.75.116].

Il apparaît dans des études similaires que le sexe féminin est quatre fois plus touché avec 12 % de cas de calculs contenant de la Struvite, cela dû probablement à la physiopathologie, à l'anatomie et aux troubles hormonaux qui favorisent cette tendance féminine de la colonisation-infection urinaire parfois mal documentée ou mal prise en charge [50.124.125].

Les principaux signes cliniques liés à la lithiase d'infection sont représentés par la douleur (colique néphrétique ou pas) à raison d'un taux de 80 %, maître symptôme chez nos patients, alors que les troubles mictionnels et l'hématurie macroscopique ont été moins souvent révélateurs (lésions engendrées dans l'urothélium par la migration du calcul réticulé oxalo-calcique et phosphatique). La fièvre accompagnant ou précédant les brûlures mictionnelles est discrète, surtout chez les femmes. Cela rejoint les taux observés pour la douleur, de 95 % et 90 % des cas dans la littérature [127.128.129].

Les troubles mictionnels sont représentés par un taux de 38 % dans notre série, se rapprochant également des taux de 52,77 % et 77,4 % observés dans d'autres études [128.129]. Cela pourrait être expliqué par la réaction inflammatoire et les lésions occasionnées par les phénomènes de la colonisation-infection et la sécrétion des protéines pro-inflammatoires comme il a été décrit dans la formation du biofilm calculaire.

Nous avons remarqué que la proportion des calculs rénaux (et pyélocaliciels 28 %) dans la lithiase d'infection selon le siège était de 42 % , suivie de près par le calcul urétral à 21 % et 9 % de lithiase vésicale.

Notre série se rapproche de celle de Daudon avec 16 % de sièges pyélocaliciels. Cependant, les calculs d'infection vésicale analysés sont loin des 55 % trouvés dans l'étude de Daudon et les autres séries [1.2.9.121.128.129].

Cela peut être expliqué par les techniques urologiques modernes et la formation continue des opérateurs. Depuis quelques années, l'urétéroscopie connaît un essor important parce qu'il s'agit d'une technique peu invasive qui n'altère pas le parenchyme rénal. L'urétéroscopie peut être souple et permet d'accéder par les voies naturelles jusqu'aux cavités rénales et d'y traiter les calculs in situ. De même, la mini-néphrostomie ou l'assistance robotisée a permis la prise en charge de petits calculs (1cm) dans des localisations complexes (dans le parenchyme rénal) [71.95.96.114].

Toutes ces techniques ont conduit à un diagnostic et un traitement plus rapides qu'auparavant , réduisant sensiblement la fréquence des calculs volumineux en diminuant les effets secondaires de type hémorragique ou des lésions urothéliales qui sont souvent le nid de greffes de micro-organismes parfois multi-résistants (EBLSE) [1.2.7.43.126].

Nous avons noté chez quelques patients des facteurs de risque associés à la lithiase d'infection constatés dans notre série, tels que le sexe féminin, l'infection-colonisation urinaire (hématurie microscopique), l'âge avancé, les anomalies anatomiques des voies urinaires (pyélocalicielles ou rénales) et la stase urinaire secondaire à l'obstruction.

Les anomalies métaboliques associées ont également été observées, telles que :

hyperparathyroïdie atypique, hyper calciurie, hyper-oxalurie, diabète mal équilibré, antibiothérapie intempestive non documentée céfotaxime et ciprofloxacines au long court, antifongiques non documentés, cathéter à double jj de longue durée et observation de plaque de Randall au bloc opératoire lors de l'utéroscopie (selon le Pr.R.Benrabah) [47].

2. Cristallurie par automates de cytologie urinaire dans la lithiase d'infection

90 % (103/114) des lithiasiques analysés par l'automate de cytologie urinaire Sédi-Max révèlent 10 % (11/114) de positivité et 90 % (103/114) de négativité avec dix hématies, suivies de cas quatre leucocytes, puis huit cristaux urinaires oxalo-calciques , et cinq phosphos-amoniaco-magnesium (Struvite) .

Il est à noter que l'automate de cytologie urinaire possède une caméra de capture d'image à lumière blanche qui permet la détection, la numération et la visualisation par l'opérateur des éléments retrouvés dans l'urine selon un seuil calibré de 10 µl .

Les cristaux urinaires sont classés dans une base de données de l'appareil selon leurs formes géométriques bien codifiées. Les cristaux urinaires peuvent être détectés uniquement aux stades d'agglomération cristalline aux stades ultimes de la formation du calcul urinaire d'infection.

Par-contre, la lumière polarisée permet la détection précoce de cristallurie au stade de sursaturation urinaire, avec plusieurs types pouvant signaler la présence de cristaux urinaires en excès liés à la lithiase urinaire d'infection et autres affections pouvant s'associer, telles que métaboliques (diabète et HTA) ou génétiques (cystinurie) [1.2.3.4.5.7.9].

D'après Daudon, un seul cristau urinaire de struvite en fonction du contexte clinico-épidémiologique peut être très significatif et peut témoigner de la présence d'une lithogénèse infectieuse (formation de cristallurie) ou d'une détérioration rénale en cas de cristaux de whewellite (hématiforme/C2) chronique pouvant s'associer aux lithiases phosphocalciques, aux rejets du greffon rénale et d'autres anomalies métaboliques, telles que la cystinurie qui peut être d'origine génétique [1.2.3.5.7.9].

De plus, parmi les 10/11 (90 %) d'hématies irrégulières détectées par l'automate de cytologie urinaire chez les patients lithiasiques, nous avons trouvé 08/11 (80 %) des cristaux oxalocalciques de type whewellite lors de la comparaison avec la lumière polarisée faite sur cellules de Malassez associées à un pH urinaire compris entre 6,5 et 7.

Une étude faite en Algérie par SEBAHI en 2017 [3], a montré que la corrélation entre la présence de sang dans l'urine et la cristallurie était significativement augmentée dans les urines présentant une hématurie allant jusqu'à 81,08 % chez les lithiasiques et 21,88 % chez les témoins [3]. Chez les lithiasiques dont les urines présentent une hématurie positive, l'espèce cristalline la plus fréquemment rencontrée était la whewellite (C1), avec une fréquence de 37,84 %, suivie par l'acide urique dihydraté, avec une fréquence de 21,62 % et la bruschite à 16,22 %, contre 15 % pour la weddellite. [1.2.6.9].

Cela concorde avec les résultats d'une étude sur les calculs d'infection montrant que 48 % des calculs observés dans l'Ouest algérien étaient majoritaires en whewellite [130].

3. Cristallurie par lumière polarisée

Nous n'avons eu que 44 cas de cristallurie du réveil en préopératoire par lumière polarisée, car elle doit répondre aux conditions optimum de recueil du prélèvement et, le cas échéant, au caractère de la prise en charge de l'urgence, telle qu'une pyélonéphrite aiguë obstructive.

Cependant, la cristallurie positive objectivée est de 39 % (44/114) de cas chez les patients lithiasiques, par rapport aux 61 % chez les témoins (non lithiasiques). La proportion la plus élevée a été chiffrée à 61 % d'absence de cristallurie observée chez les patients non lithiasiques (témoins). Ce résultat ressemble à celui constaté dans d'autres études, dans l'Ouest algérien où les taux varient entre 60 et 70 % de lithiase calcique idiopathique [1.3.5.6.130.131].

La proportion de la cristallurie positive chez les femmes est de 58 %. Les hommes enregistrent une proportion de 42 % de positivité. Le risque relatif est égal à 1.3. La proportion des femmes pouvant développer une cristallurie positive est de 1,3 fois supérieure à la proportion des hommes ayant une cristallurie positive (IC = 95 %).

La cristallurie à la lumière polarisée a montré la proportion la plus élevée par les cristaux oxalo-calciques purs avec 40 %, suivie de 23% de cristaux phosphocalciques. Les cristaux de Struvite et bruschite étaient de 25 % et de onze %. Chez les malades témoins, la cristallurie de Struvite était absente. Par contre, la cristallurie était positive à 74 % de wedhellite et à deux % de Bruschite, comme il a été rapporté par différents auteurs. Leur p-value était égal à 0,0004998 (largement plus petite que 5 %). Donc, il y avait une différence significative entre les patients lithiasiques et les témoins [1.2.3.5.9.69.88.90.91].

Le pH urinaire de la cristallurie positive par lumière polarisée s'est avéré fortement alcalin pour les cristaux des Struvite, PACC et calcique-whewellite (C1) car souvent associés aux germes uréalytiques *Proteus spp.*, *M.morganii*, *Enterobacter cloacae* dus à la sécrétion de l'enzyme uréase participant à l'élévation de l'ammoniac urinaire engendrant des lésions urothéliales favorisant la réaction inflammatoire promotrice de la greffe de germes parfois virulents et à l'initiation de la physiopathologie du calcul urinaire d'infection.

Le pH urinaire de la cristallurie à Bruschite, calcique-wedhellite (C2) est retrouvé (6,5-7), légèrement alcalin. Il est associé aux bactéries non uréalytiques connues dans leur patrimoine génétique ou métabolique, telles qu'*E. coli* et *Enterococcus spp.* Cela serait possible grâce à l'acquisition d'une uréase optionnelle véhiculée par des éléments génétiques mobiles ou autres, tels que des plasmides codant pour la synthèse de cette protéine enzymatique de

manière optionnelle pour la formation du calcul urinaire métabolique ou calcique secondairement infecté ou colonisé par ces derniers.

De plus, selon Amimanan et Sadowski, la formation intracellulaire de cristaux de calcium a été objectivée chez ces bactéries uréalytiques et non uréalytiques, qui pourraient fonctionner comme une matrice pour la formation de lithiase d'infection parfois récurrente [33.74].

4. Impact de l'étude microbiologique de l'urine pyélique et/ou du calcul urinaire

Nous avons constaté que le taux de positivité attribué à l'EBC et ECBUP était de 65 % vs 54 %, plus important chez la femme que chez l'homme, et que 7 % seulement d'enfants avaient bénéficié d'analyse de leur urine pyélique.

Pour les enfants, nous avons remarqué que la majorité des prises en charge de la lithiase d'infection étaient réalisées par technique d'urétéroscopie souple avec fragmentation totale au laser, ce qui pourrait expliquer le faible taux de l'analyse du calcul (1 %), ainsi que le biais de recrutement durant notre période d'étude.

Nous avons objectivé qu'il n'y avait pas de différence significative dans la répartition des microorganismes par les tests ECBU, ECBUP et EBC, lorsque l'ECBU était positif (p -value = 0,9) car, en cas de bactéries planctoniques (non enchâssées dans le calcul urinaire), l'ECBU vésical peut être positif. Cependant, nous avons trouvé que la p -value entre les tests ECBUP et ECB était estimée à 0,2895. Il n'y avait donc pas de différence significative observée dans la détection des BGN entre les ces deux derniers tests. Néanmoins, la proportion des positifs détectés pour l'ensemble des microorganismes virulents, voire multi-résistants (EBLSE), par le test EBC (culture du calcul) était 1,562 fois celle du test ECBUP ($\theta_2 = 1,562$).

La proportion des *Cocci* à Gram positif détectés par EBC était 1,86 fois celle détectée par ECBUP. Pour les *BGN* non fermentaires, les proportions détectées par EBC étaient de 1,67 fois celle détectée par ECBUP. Pour les levures, les proportions détectées par EBC étaient chiffrées à 1,33 fois celle détectée par ECBUP.

Une tendance se dessine vers une variabilité des micro-organismes identifiés selon les tests de diagnostic, car les espèces multi-résistantes (EBLSEplus) détectées par la culture du calcul urinaire semblent être plus intéressantes. Cela a été constaté par plusieurs auteurs et par la probabilité de formation de « biofilm-calculaire » participant à leur dissémination et à la greffe des micro-organismes transitant dans (ou colonisant) le tractus urinaire avec un échange d'informations génétiques [1.2.15.19.34.35.56].

Cette évaluation statistique est confortée par plusieurs travaux d'auteurs et de séries décrites dans la littérature académique indexée de comparaison et d'analyse multi-variées [1.2.9.7.12-36.64.65.70.132.133].

Tous attestent que l'ECBU seul est insuffisant pour l'identification ou la détection exhaustive des micro-organismes virulents impliqués dans l'infection ou la colonisation du calcul urinaire et de ses conséquences parfois morbides, avec 10 % de chocs septiques pouvant engager le pronostic vital.

5. Aspect microbiologique de la lithiase d'infection

Les entérobactéries restent sur le podium des bactéries associées ou impliquées dans la lithiase d'infection mixte. Cependant, nous avons constaté que les micro-organismes à Gram positif avaient tendance à prendre de l'élan. Cela a été observé également dans d'autres séries [2.7.9.22-24.30.89-92].

Nous avons remarqué que la plus forte proportion d'espèces retrouvées dans notre série via ECBUP vs EBC était représentée par le *P. mirabilis*, suivi par le *Pseudomonas sp.* Cela peut être expliqué par leur capacité à survivre et à envahir le tractus urinaire par leur « *swarming* » ou leur mobilité, grâce aux facteurs de virulence, notamment les *fimbriae* et les *pilis*, tout en échappant à la compétence du système immunitaire des patients lithiasiques.

Cela a été noté dans plusieurs séries, telles celles de Mc Cartney A-C. (1985); N. Noël (2013); Romanova (2015); Prywer J. (2016); J.-E. Paoness (2016), Dirk Lange (2019) et autres [7.9.15.19.24.92].

La place des *cocci* Gram positif (15 % du *Staphylococcus spp.* et 08 % d'*Enterococcus sp.*) à la culture du calcul semble être non négligeable et a tendance à se rapprocher des bacilles à Gram négatif, car ce sont des germes ubiquitaires pouvant coloniser le tractus urinaire de manière sournoise après un sondage urinaire de longue durée.

Cela peut être expliqué également par le fait que ces micro-organismes ubiquistes, peuvent coloniser le tractus urinaire et possèdent une uréase chromosomique et des possibilités de développer des biofilms-calculaires très résistants aux antibiotiques.

Probablement, les principaux progrès appliqués dans les techniques de traitement mini-invasifs ou d'exploration endo-urologique (mini-néphrostomie, utérocopie souple) peuvent être un facteur encourageant l'opérateur à envahir le tractus urinaire de manière répétée et, de ce fait, à coloniser l'urothélium par la flore cutanée, le plus souvent par le *Staphylococcus*

spp. et l'*Enterococcus spp.*, ou par l'environnement du patient, par les *Pseudomonas spp.*, *k. pneumoniae* et *Enterobacter spp.*

Par ailleurs, l'émergence de souche *E. coli*, semble non significative par rapport aux autres espèces, mais a été étudiée par de nombreux auteurs tels que Daudon (2012), Maier (2015), Amimanan (2017), Dirk Lange (2019) et d'autres encore, qui attestent qu'elle possède des facteurs de pathogénicité : uréase optionnelle ou OMVs et EF-Tu capables d'induire la cristallisation de la struvite ou bien de l'oxalocalcique pouvant être à l'origine de la résistances aux antibiotiques [2.7.25.33].

Par ailleurs, nous avons constaté, lors de la fragmentation du calcul urinaire et lors du broyage des calculs urinaires infectés par des germes uréalytiques à pH urinaire alcalin, que *Proteus spp.*, *Morganella morganii* et *Staphylococcus spp* retrouvés étaient associés le plus souvent à une porosité accrue. Cela peut s'expliquer par la présence de composants organiques de type protéique issus des bactéries LPS ou de l'urothélium ou encore de la filtration glomérulaire. Les fragments multiples qui en résultent sont de différentes tailles, pouvant libérer des bactéries virulentes dans les voies urinaires, en augmentant ainsi le risque de réinfection, potentialisée par les fragments résiduels et, par conséquent, augmentant la récurrence et le risque infectieux.

En outre, certaines cultures de calculs calciques ont été positives à *E. coli* et à *Enterococcus sp.* (Dirk Lange, 2019) [7], pouvant s'expliquer par la formation du calcul d'infection mixte qui semble suivre le concept bien décrit de minéralisation induite biologiquement (BIM), faisant référence aux précipitations non intentionnelles et incontrôlées des cristaux induits par les processus métaboliques (LPS) microbiens .

Selon Daudon (2018), des empreintes bactériennes dans les calculs à base de calcium ont également été documentées, un nombre élevé d'empreintes bactériennes dans les calculs de carbapatite (47 % avec des taux de carbonatation > 20 %) [1], alors qu'aucune empreinte de ce type n'a été trouvée dans les calculs d'infection. Dans le cas de calcul mixte (par exemple, struvite et carbapatite), des empreintes bactériennes ont été observées avec des cristaux de carbapatite, plutôt que de gros cristaux de struvite. Carpentier *et al.* [134] ont suggéré que la présence de bactéries via ces empreintes indiquait des infections du tractus urinaire antérieur ou actuel (à la fois hydrolysant l'urée et non hydrolysant l'urée bactéries), associées à la formation de lithiase phosphocalcique, comme observé dans notre corrélation entre le profil de la cristallurie de PACC (phosphocalcique) et les germes associés dans le tableau 31 [1.2.7.9].

Par ailleurs, notre série n'a rapporté aucun cas de tuberculose urinaire (ni bacilloscopie, ni culture sur LJ). Cela est dû peut-être à l'absence de performance des outils classiques d'exploration décrits, la tuberculose urinaire (UTB) étant pauci-bacillaire. Néanmoins, les derniers chiffres rapportés par le service de microbiologie de l'HCA (2018) témoignent de ce que la tuberculose uro-génitale, toutes formes confondues, était estimée à 08 % (32 % de tuberculoses extra-pulmonaires).

De plus, chez des patients à forte présomption de tuberculose urinaire (synéchies, rétrécissement et fibrine), les urines pyéliquies (10/56) étaient négatives dans la majorité des cas recherchés, malgré l'utilisation de la PCR en temps réel : gène-expert (validé par l'OMS en 2017) et la métagénomique directe de la pyurie pyélique (cas clinique 1).

Pour les anaérobies associés à la lithiase d'infection, nous n'avons pas trouvé de cas positifs à la culture malgré l'enrichissement. Cela peut être dû au non-respect des modalités rigoureuses de prélèvement pour leur survie : toxicité liée à l'oxygène. Cependant, durant notre recherche, nous avons eu un manque de données concernant leur implication dans la promotion de façon directe ou indirecte du calcul d'infection par méthodes classiques ou autres. Hormis lors d'une exploration de la pyurie pyélique de la fillette par la métagénomique, nous avons détecté une bactérie anaérobie de type *Bacteriodes fragilis* productrice (chromosomique) de β -lactamase à spectre étendu, pouvant expliquer l'évolution péjorative de l'état de son rein (cas clinique 1) [135.136].

La présence de *Candida.spp* rapportée à 12 % dans la culture du calcul, mérite un commentaire. Ces patients ont reçu des cures de longue durée d'antibiotiques avant qu'ils ne consultent et, parmi ce groupe de patients à haut risque pour les infections-colonisations à *Candidas spp*, nous avons eu un patient avec un sepsis sévère à culture du calcul positive *C. parasilosis*. Il en va de même pour sa résistance aux antifongiques (imidazolé) et aux facteurs de virulence, notamment la formation de « *fungus ball* » qui permet l'échappement aux défenses de l'hôte et la dissémination dans le torrent circulatoire [1.2.7.9.29].

6. Résistance aux antibiotiques

Selon Logan L.-K. (2019) [137], la pandémie de la résistance des entérobactéries demeure l'une des menaces significatives de santé publique de notre temps.

Les entérobactéries uropathogènes sont associées à une morbidité et à une mortalité significative chez les individus infectés, et un nombre croissant de rapports décrivent le microbiote (flore) intestinal, et donc le microbiote urinaire, comme source probable de micro-organismes hébergeant des entérobactéries à spectre étendu (EBLSE) ou des carbapénémases (ex, *bla*_{KPC-CTXM}), contribuant aux principaux problèmes croissants de santé publique, notamment les complications infectieuses qui peuvent être liées à la greffe de ces derniers dans un calcul urinaire [2.9.107.110].

La contrainte principale est le port de gènes de *bla* (β -lactamase), souvent cause additionnelle de résistance aux antibiotiques résidant sur les éléments génétiques mobiles, par exemple plasmides et transposons, capables de diffusion rapide et sournoise. Les entérobactéries *E.coli* ou *kp* ou *Enterobacter cloacae* hébergeant CTX-M-15 (CTX-M-13) sont le plus souvent rapportées. Ces bactéries productrices de BLSE constituent une préoccupation majeure en milieu hospitalier en raison de leur diffusion épidémique et de leur multirésistance aux antibiotiques.

En effet, les E-BLSE sont retrouvées chez une vaste proportion de bacilles à Gram négatif [119.120].

Dans notre étude phénotypique et génotypique, des isolats bactériens ont été retrouvés dans un gîte infectieux profond et ont généré des entérobactéries productrices de β -lactamase à spectre étendu BLSE, confirmées génétiquement et estimées à cinq souches, soit 7,5 % (5/67) dans un calcul infectieux.

Les trois souches cliniques (2 *Enterobacter cloacae complex* et une *k. pneumoniae*) avaient des résistances aux fluoroquinolones, mais aucune d'elles n'était résistante au carbapénème (ertapénème) ou aux aminoglycosides (amikacine et gentamycine).

Les gènes de résistance de type TEM-1, TEM-2 et SHV-1 à large spectre codés par des plasmides ont émergé et diffusé chez les entérobactéries. Depuis les années 1970, ils ont contribué au mécanisme le plus courant de résistance acquise aux aminopénicillines chez les espèces d'entérobactéries telles que *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* et *Salmonella enterica*.

Pour le gène *bla*_{SHV-1} détecté chez les souches de *K. pneumoniae* (1-3-6) et *Enterobacter cloacae*, cela signifie que tous les isolats possédaient des pénicillinases hyper-produites dans leurs chromosomes. Cela est en adéquation avec leurs antibiogrammes respectifs [93].

Par la suite, nous avons décrit chez les *K. pneumoniae* la présence de gènes BLSE de type *bla*_{CTX-M15} résistants aux β -lactamines, ce qui concorde avec les résultats de leurs antibiogrammes (tableau 29), notamment avec les céphalosporines de troisième génération. Ce gène de résistance aux β -lactamines a déjà été décrit en Algérie et en France dans des études précédentes (Barguigua et al., 2013 ; Nedjai et al., 2012). Il a été également décrit au Mexique et en Espagne (Oteo et al., 2013) [138-140].

La diffusion du gène CTX-M15 a été décrite par les auteurs comme étant la conséquence d'une grande dissémination d'un même plasmide ou de plasmides reliés qui possèdent ce même support génétique, le CTX-M15, identifié pour la première fois chez un clone épidémique d'*E. coli* est actuellement le gène de BLSE le plus répandu au monde [140.141].

Nos données sont également concordantes avec les résultats d'autres auteurs qui suggèrent que les isolats de *K. pneumoniae* productrices de CTX-M sont génétiquement hétérogènes. L'émergence et la propagation polyclonale de *K. pneumoniae* productrices de CTX-M se sont probablement produites parmi des isolats d'origine génétique variée.

Dans les souches cliniques, les gènes codants pour CTX-M sont généralement localisés sur des plasmides dont la taille varie de 7 kb à 160 kb [143.144].

La transmission des gènes CTX-M chez les entérobactéries est médiée par des plasmides ou par plusieurs éléments génétiques mobiles déjà décrits dans la littérature. Étant donné la prédominance des génotypes CTX-M15 parmi les isolats génétiquement hétérogènes de *K. pneumoniae* BLSE, notre étude a objectivé également le transfert d'éléments génétiques porteurs de *bla*_{CTX-M15} via le plasmide (P5) révélé dans le gel (Figure 65). Plusieurs auteurs ont décrit ces variants de gène BLSE du type CTX-M qui étaient déjà caractérisés de par le monde, tels que *bla*_{CTX-M1} en France (Biendo et al., 2008) et en Algérie (Nedjai et al., 2012) [140.145].

Cela a été également vu dans notre série chez *Enterobacter cloacae* complex, lors du projet de séquençage complet de son génome. Cependant, nous n'avons pas détecté de gène *bla*_{CTX-M15} lors de sa PCR, comme rapporté dans une étude algérienne chez des souches d'*Enterobacter* spp. (Khennouchi .2016) [146].

Par ailleurs, il semblerait qu'on puisse avoir une propagation polyclonale du groupe CTX-M-1 chez *Enterobacter cloacae*, pouvant présenter des taux de résistance significativement plus élevés à la ciprofloxacine et à la piperacilline-tazobactam (Titelman E. et al., 2011), non décrit dans notre série [143].

La résistance aux fluoroquinolones de type qnrB-1 a été détectée chez *K. pneumoniae* et *E. cloacae complex* infectant le calcul urinaire ayant le même profil de résistance aux antibiotiques à l'antibiogramme et à l'étude moléculaire (PCR et séquençages). Cela a été préalablement détecté chez des souches de *Klebsiella pneumoniae* en France et en Algérie. [139.142]

La coexistence de β -lactamases CTX-M et de TEM-1 et du type SHV-1 dans nos isolats peut également avoir contribué à la résistance aux ciprofloxacines via les plasmides porteurs de gènes PMQR (*Plasmid mediated quinolone resistances*) codant pour ces dernières. Ces résultats ont des implications cliniques pour la sélection d'un traitement antibiotique ou d'un contrôle de la bactériémie pouvant mettre en jeu le pronostic vital des patients. Ces gènes qnrB sont identifiés sur des plasmides d'une taille de 2,7 à 340 kilobases (kb) et de groupes d'incompatibilité très différents fournissant la résistance de bas niveau aux fluoroquinolones [152].

Il semblerait qu'ils appartiennent à la famille des pentapeptides répètes (PRP), constitué de plus de mille protéines aux fonctions naturelles bien souvent inconnues et en tandems de cinq acides aminés, répétés de façon semi-conservative (Ser, Thr, Ala ou Val). Les gènes qnrB détectés sont parfois associés à un autre type de transposase ou PMQR et à des gènes chromosomiques de bactéries marines. L'expression induite de ces gènes qnrB mène à une augmentation de la résistance aux ciprofloxacines par mutation et l'abus de fluoroquinolones a pu être transmis à nos isolats d'entérobactéries β -lactamase à spectre étendu étudiés sur des calculs urinaires infectés. Donc, si l'utilisation des fluoroquinolones doit être réduite, les gènes qui ont subi une mutation pourraient être réparés après plusieurs générations, puis le taux des bactéries fluoroquinolones résistantes pourrait être réduit et contrôlé [153.154].

7. Typage moléculaire par *Multilocus sequence typing* (MLST)

Parmi les espèces retrouvées majoritairement, nous avons eu certes un nombre non significatif de *K. pneumoniae* appartenant au même clone ST, mais nous avons pu apprécier de manière globale le lien de clonalité qui existe chez nos souches cliniques d'entérobactéries isolées du calcul urinaire d'infection. L'analyse MLST a montré que les principaux types de séquences

(ST) identifiés parmi les isolats de *Kp* BLSE+5 (3/5), dans notre série, étaient des ST405 (n = 2) et une nouvelle ST 29 (n = 1) ajoutées à la database d'MLST de *K. pneumoniae*.

Les deux autres ST identifiées dans notre étude (ST405) ont été décrites en Europe et en Amérique du Sud dans des souches d'origine humaine. De plus, une souche clinique *K. pneumoniae* ST405 a été détectée en Algérie (Hôpital militaire d'Oran) avec une carbapénémase. Cependant, Machuca *et al.*, en 2016, ont publié le premier rapport d'une *K. pneumoniae* ST405 sans héberger de carbapénémase, ce qui s'accorde avec nos souches cliniques isolées dans le « biofilm calculaire infectieux » [155.156].

En ce qui concerne le résultat de typage moléculaire par MLST du type ST29 de notre souche *K. pneumoniae* (6) BLSE +, nous avons constaté qu'il a été trouvé dans une étude précédente (Yang et Zhang, 2008), chez des souches de *k. pneumoniae* étudiées au Japon. Par ailleurs, en France, Laure Surgersa, en 2019, a objectivé leur association dans la formation in vitro de biofilm infectieux. Donc, il se pourrait que ce facteur de virulence participe à ladite formation de calcul infectieux et la dissémination de ladite résistance aux antibiotiques ou aux mesures de prévention de leurs récurrences cliniques, problèmes récurrents de santé publique [157.158].

Par ailleurs, les souches *K. pneumoniae* ST29 et ST405 ont clustérisé ensemble l'arbre phylogénique. Ce qui signifie que la même souche de *kp* a circulé dans les services d'urologie, du bloc opératoire et des urgences de l'Hôpital Mohamed Seghir Nekkache.

La transmission pourrait avoir été manuportée par le personnel ou par un cystoscope contaminé, utilisé pour placer des cathéters doubles J, particulièrement dans les unités d'urologie.

Le probable portage de *k. pneumoniae* BLSE+ (et de carbapénémase) dans le microbiote intestinal est une possibilité due aux traitements non documentés et intempestifs pris ultérieurement en ville ou en communautaire engendrant leur sélection silencieuse [139.142.151].

8. Étude de la métagénomique

Le séquençage du génome d'échantillons urinaires dans le cadre de l'infection, sa complémentarité avec la culture de l'urine, l'identification des espèces automatisées et les propriétés de l'une ou l'autre approche ne sont d'une manière générale pas bien étudiés.

Pour évaluer cet aspect, nous avons utilisé des techniques de séquençage de l'ADNr16S de la métagénomique, qui offre une résolution accrue, permettant une taxonomie plus spécifique et étendue à la base de données disponibles en matière d'urobiome.

La classification fonctionnelle des séquences, ainsi que la découverte de nouveaux gènes et génomes bactériens, est explorée dans le but d'avoir un plus grand potentiel d'identification et d'implication des souches dans le processus infectieux.

Des articles récents soulignent l'existence de sous-populations (sous-espèces) dans la majorité des procaryotes urinaires abondants. Ils permettent une meilleure compréhension fonctionnelle et écologique du microbiome urinaire humain associé à la lithiase urinaire [62.63.154].

Cette dimension n'est pas appréhendée par le séquençage de l'ADNr 16S. L'étude identifie de manière convaincante un nombre élevé de lectures de séquences d'uropathogènes conventionnels, mais propose aussi de nouvelles espèces bactériennes associées aux caractéristiques d'infection. Elle remet en question les seuils utilisés pour définir l'infection : généralement 10^5 unités forment une colonie (UFC) en culture des urines.

La nature quantitative de l'approche de la métagénomique (NGS) peut identifier de nouveaux uropathogènes en quantités plus faibles dans des échantillons présentant des signes d'infection.

Elle a la capacité d'identifier des bactéries difficiles à cultiver, tel un organisme pathogène possible, par exemple *Alloscardovia* et *Actinotignum sp. A. schaalii* pouvant être une cause sous-estimée d'infections urinaires en raison de sa croissance fastidieuse et sa difficulté liées à son identification par les méthodes phénotypiques [21.23.31].

Les micro-organismes retrouvés dans le tableau de la figure 71 tels que *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteriodes fragilis*, *Acinetobacter variabilis*, *Pseudomonas glareae* et autres, dans notre exploration par cette métagénomique, dénotent la variabilité du microbiome urinaire en bactéries fastidieuses et surtout émergentes qui peuvent être impliquées dans la promotion ou les complications de la lithiase urinaire d'infection .

Des études prospectives, analytiques et surtout des cas témoins seraient très intéressants pour faire la comparaison entre les agents infectieux détectés par cet outil de séquençage et les cultures négatives, en corrélatant bien entendu les résultats au contexte clinique et épidémiologique des patients.

Dans notre expérience d'exploration de l'évolution péjorative chez la fillette, il est apparu que l'hypothèse la plus plausible était celle d'anaérobies impliqués dans cette défaillance rénale, notamment le *Bacteriodes fragilis* du fait de ses nombreux facteurs de virulence, de résistance chromosomique (β -talactamase à spectre étendu) et d'autres phénomènes décrits dans l'abcédation parenchymateuse [135.136].

9. Projet du séquençage du génome complet

L'évolution de telles bactéries multi-résistantes aux antibiotiques constatée dans notre série et dans d'autres études peut expliquer l'impasse thérapeutique. Pour mieux contrôler les infections et combattre les épidémies, l'analyse du génome complet de la bactérie est primordiale, car la présence de certains gènes déjà connus pour leur intérêt médical explique soit une résistance, soit un caractère de virulence.

Par exemple, l'*Enterobacter hormaechei* est une nouvelle espèce identifiée à l'Hôpital Mohamed Seghir Nekkache dans un calcul urinaire. Il s'agit d'un micro-organisme isolé chez une patiente qui a fait plusieurs épisodes de récurrence clinique de lithiase urinaire d'infection avec chocs septiques et résistance inductible à la céfoxitine, due probablement à la pivmécillinam (séléxid).

De plus, il fait partie des espèces les plus fréquemment retrouvées parmi les souches d'origine clinique responsables d'infections et d'épidémies hospitalières, particulièrement dans les unités des soins intensifs [145-146].

En définitive, l'émergence des protéines telles que l'Endonuclease détectée lors du séquençage du génome complet de l'*Enterobacter haermachii* semble être associée aux mécanismes de virulence ou de résistance enchâssés dans le biofilm-calculaire.

Cela explique notre démarche destinée à comprendre la complexité de ces facteurs de virulence d'origine protéique pouvant s'associer à de nouveaux mécanismes de résistance aux antibiotiques et à la promotion de la lithiase urinaire d'infection [154.160-166].

10. Évolution de la lithiase d'infection

Selon Dirk Lange (2019), les voies génito-urinaires représentent à elles seules 20 à 30 % des chocs septiques. Le choc septique par pyélonéphrite obstructive due à la lithiase urinaire d'infection est le plus fréquent avec une incidence de 43 % des cas [7].

Cela est heureusement loin des 10 % de chocs septiques objectivés dans notre série.

Cependant, notre étude a fait ressortir que dans la majorité des cas, l'ECBU vésical avait été négatif à 90 %. Il existe une différence significative entre la prédiction du choc septique postopératoire (24-48 h) par les résultats du test EBC (culture du calcul) et celui retrouvé à l'ECBU (p. value = 0.04541).

En ce qui concerne la prédiction du choc septique par la combinaison des tests de la culture de l'urine pyélique (ECBUP) et de la culture du calcul (EBC) par rapport au test de l'ECBU, il y avait une différence significative ($p < 0,001$) concernant l'analyse du calcul urinaire pour la prédiction du choc septique ou l'urosepsis, l'orientation thérapeutique et la surveillance du patient après prise en charge endo-urologique (urétéroscopie et néphrostomie).

Cela signe la **sensibilité de 90 %**, la **spécificité de 74 %** et la **valeur prédictive négative à 98 %** du test **peropératoire** qui peut être très significatif pour détecter (ou exclure) une colonisation ou une infection du calcul urinaire. Il y a un risque d'éclosion ou de dissémination de ces germes véhiculés dans le torrent circulatoire pouvant se greffer sur des tissus nobles tels que les valves cardiaques ou ailleurs, de manière latente et à bas bruit [2.7.16.39.41.42.89.102.105.167-171].

11. Récidive

Dans notre expérience de suivi des patients par la cristallurie associée au pH urinaire, nous avons eu 34 % de cas de cristallurie positive (11/32) chez les femmes de la tranche d'âge 42-60 ans, avec une notion d'infection-colonisation urinaire documentée. Cela se rapproche des 50 % (n = 265) de cristallurie positive décrits par Daudon chez des patients étudiés à l'Hôpital Tenon en France. Daudon rapporte que les sujets récidivants sont significativement différents des sujets non récidivants sur le plan de la taille et du nombre des cristaux objectivés.

Cette observation a été notée dans notre série où la taille des cristaux de Struvite, de weddellite et de whewellite parfois groupés en amas, dépassait les 10 micromètres de diamètre. De plus, il peut y avoir d'autres éléments, tels que le phénomène émergent des plaques de Randall que nous avons observé au bloc opératoire chez une patiente porteuse de lithiase d'infection récurrente à *Enterobacter hormaechei* dû à un processus **mixte** infectieux à notation phosphocalcique (Calcique + Struvite) [2.5.6.7.9.84.85].

CONCLUSION

La lithiase d'infection est le plus souvent due à l'un des micro-organismes porteurs d'uréase. La formation du calcul d'infection est un complexe multifactoriel conduit par la chimie de l'urine, le micro-environnement d'urine (urobiome), et la présence des substances bactériennes (LPS, pili...) favorisant la formation d'agrégation cristalline.

La fréquence de la lithiase d'infection retrouvée était de 3 % dont 0,28 % d'enfants (< 15 ans).

La tranche d'âge 42-60 ans était la plus représentée chez la femme avec une fréquence de 42 %.

La taille des calculs urinaires infectés ou colonisés et analysés était en une moyenne de 2 cm.

L'ECBU antérieurement positif était prédominant chez les femmes (60,3 %) vs 39,7 % chez les hommes.

Le sexe féminin était fréquent dans les antécédants d'infection-colonisation urinaire. En revanche, dans les infections-colonisations du calcul urinaire, l'homme prédominait.

Pour les signes cliniques liés à la lithiase d'infection, les principaux signes fonctionnels étaient représentés par la douleur (colique néphrétique ou pas), maître symptôme chez nos patients, alors que les brûlures mictionnelles et l'hématurie macroscopique ont été plutôt révélatrices.

Nous avons constaté lors de notre étude (prospective, descriptive et analytique) que seulement 10 % d'ECBU préopératoires étaient positifs. Ce taux est augmenté par les outils per-opératoires de l'examen cytobactériologique de l'urine pyélique (ECBUP) et de la culture du calcul (EBC) en positive, respectivement à 54 % et 65 %.

La cristallurie a été bénéfique dans l'orientation de la nature du calcul et dans la récurrence clinique.

Parmi les 10/11 (90 %) d'hématies irrégulières détectées par l'automate de cytologie urinaire, 08/11 (80 %) étaient des cristaux d'oxalocalciques « hématiformes » de type whewellite lors de l'analyse avec de la lumière polarisée faite sur cellule de Malassez.

La cristallurie en association avec le pH urinaire peut être également un outil pour contrôler l'efficacité du traitement médical ou chirurgical, car 65 % de cristallurie était négative en corrélation avec une absence de récurrence clinique, contre 34 % de cristallurie positive.

Le pH urinaire était alcalin avec une cristallurie de Struvite, de PACC et de whewellite. Néanmoins, il était entre 6,5 et 7 avec de véritables lithiases urinaires infectées à culture positive avec une cristallurie phosphocalcique.

Un seul des cristaux urinaires de Struvite peut être très significatif et peut témoigner de la présence d'une infection-colonisation urinaire associée à un calcul d'infection pure (*nidus*) ou bien parfois d'une détériorisation rénale en cas de cristaux de whewellite (hématiforme) chronique.

Par contre, une cristallurie oxalocalcique ou phosphocalcique mixte peut signifier une lithiase infectieuse d'enrobage ou surinfectée.

La lithiase d'infection a tendance à changer de visage pour la lithiase calcique mixte colonisée par des bactéries uropathogènes, et ce grâce aux perturbations chimiques de l'urine en association avec l'agrégation de cristaux transitant ou produits dans le tractus urinaire. Il s'ensuit par conséquent un risque de formation d'un biofilm calculaire infectieux.

Les entérobactéries uréalytiques dominent dans la culture du calcul (*P. mirabilis*) suivies de près par les *Cocci* à Gram positif (*Staphylococcus sp.*), puis Baccille non fermentaire (*Pseudomonas spp.*).

La *k. pneumoniae* et l'*Enterobacter coloaecae complex* (*Enterobacter hormaechi*) ont émergées via leur résistome et leur virulome .

Nous avons remarqué des tendances pour les bactéries associées à la lithiase d'infection non connues jusqu'ici, notamment les bactéries non uréalytiques *E. coli* et *Enterococcus sp.*, qui ont été détectées grâce à la complémentarité de la culture du calcul et/ou de l'urine pyélique en per-opératoire.

Par ailleurs, grâce aux outils de biologie moléculaire, notamment la métagénomique, d'autres micro-organismes ont pu émerger, tels que *Bacteroides fragilis*, *Acinetobacter variabilis*, *Fusobacterium spp.*

Le calcul infectieux peut être un réservoir de micro-organismes virulents ou pathogènes (bactérie, levure, anaérobies...) multi-résistants ou hautement résistants. Nous avons eu 7,5 %, soit cinq bactéries BLSE positive à partir du calcul urinaire. L'exploration phénotypique et surtout moléculaire des germes retrouvés dans le calcul (ou ses fragments) nous a permis de suivre l'évolution sournoise de la résistance aux antibiotiques des gènes CTX-M-15 des β -lactamase à spectre étendu (BLSE) et des *qnr B-1* des fluoroquinolones détectées chez *K.*

pneumoniae (ST405/ST29) et l'*Enterobacter cloacae complex* à l'hôpital Mohamed Seghir Nekkache.

Le génotypage des *kps* isolées à l'hôpital Mohamed Seghir Nekkache à partir de la culture du calcul urinaire par MLST a démontré la distribution des souches dans deux séquences type différentes, dont deux ST 405 et une nouvelle ST 29 phylogénétiquement très proches.

Par ailleurs, si le taux d'urosepsis à 10 % (11/114) retrouvé dans notre étude chez les patients opérés pour lithiase d'infection mixte n'est pas important, il est alarmant par le fait que des *Klebsiella pneumoniae* et des *Enterobacter cloacae complex* sont porteuses de β -lactamase à spectre étendu (BLSE+), ainsi que par la présence de *Pseudomonas spp* avec plusieurs facteurs (slime) de virulence et de résistance naturelle aux β -lactamines (céphalosporines I, II et III génération), et également d'*Entérocooccus spp* résistant naturellement à la céphalosporine de troisième génération, sans oublier les levures notamment le *Candida glabrata* avec sa résistance et sa virulence particulière.

Tous ces microorganismes qui se sont greffés sur ledit calcul urinaire ont pu être à l'origine des complications infectieuses post-chirurgicales avec un taux de mortalité de 0,9 % à l'hôpital universitaire Mohamed Seghir Nekkache.

RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES

Compte tenu des résultats de cette étude, et dans la perspective d'une surveillance épidémiomoléculaire, exploratoire et thérapeutique optimale de l'infection-colonisation du calcul urinaire dans notre pays, nous proposons les démarches suivantes :

- La garantie par les prescripteurs de la qualité et la traçabilité des renseignements cliniques et épidémiologiques par leur informatisation ou numérisation ;
- La biosécurité des malades par le respect des précautions d'hygiène, notamment des prélèvements invasifs : urine pyélique et analyse du calcul urinaire par exemple ;
- Des audits dans le bloc ou les services assurés par les médecins/pharmaciens-biologistes sur les différentes étapes de la phase pré-analytique afin de sensibiliser toutes les personnes concernées par les prélèvements pour assurer le minimum de risque de contamination et de transmission croisée de toutes sortes d'agents infectieux, notamment à transmission aérienne et/ou manuportés ;
- Un certain nombre de règles générales pour les différentes étapes de la phase pré-analytique afin d'assurer la qualité optimale de l'échantillon biologique et d'éviter certaines erreurs préjudiciables à la validation du résultat ;
- Une quantité totale de sang mise en culture dans l'hémoculture de 10 ml par flacon car il existe une relation directe entre le volume total de sang cultivé et le rendement de la technique ;
- L'abandon de la pratique d'hémoculture solitaire, c'est-à-dire un flacon par épisode clinique, en raison du fort taux de négativité de l'examen, constituerait de ce fait un indicateur de qualité de soins en milieu hospitalier (comme signalé par Rémic, 2019) ;
- Selon les dernières recommandations des sociétés savantes de microbiologie médicale, des prélèvements uniques d'hémoculture à envisager en prise unique avec un maximum de sang cultivé, soit trois flacons d'hémoculture (10 ml de sang par flacon), afin de pallier la contamination du prélèvement et du patient par des micro-organismes opportunistes ;
- La sensibilisation des acteurs de santé sur les modalités, l'acheminement et l'accueil des prélèvements de la ponction pyélique et/ ou du calcul urinaire.

- Des mesures consolidées par les experts de la santé pour la formation académique, la disponibilité de la cristallurie (lors de l'ECBU), la veille sur le signalement et l'interprétation des profils de cristallurie dans les laboratoires de biologie médicale en ville et surtout à l'hôpital ;
- L'évaluation des automates de cytologie urinaire déjà très perforants dans l'orientation et la détection des cristaux urinaires par leur dotation en lumière polarisée permettant d'augmenter la sensibilité et la spécificité du diagnostic, la surveillance du risque infectieux (nature du calcul) et de la récurrence clinique et d'autres champs d'actions (le rejet de greffe rénale) ;
- La multiplication de l'ECBU en cas de négativité et, par contre, la culture des urines pyéliquies ou du calcul urinaire en fonction de la technique chirurgicale (lors de l'utéroscopie on utilise l'examen bactériologique des urines pyéliquies et, en cas de néphrostomie percutanée, on récupère et on cultive les fragments ou la totalité du calcul) ;
- Dans le cadre de la sensibilisation du personnel de santé dans le choix de l'antibiotique pertinent, la préconisation d'une réduction de l'utilisation systématique d'antibiotique à large spectre ;
- L'orientation de l'antibioprophylaxie selon l'éco-microbiologie locale ou locorégionale, car elle permet la prévention des complications infectieuses pouvant engager le pronostic vital des patients et leur microbiote intestinal (éclosion du Clostridioides difficile) ou urinaire ;
- La consolidation par les laboratoires de microbiologie médicale et les acteurs de l'hôpital, notamment les chirurgiens urologues, de leurs collaborations via l'instauration d'un comité de lithiase urinaire ou d'une plateforme numérique de concertation, tout en suivant les récentes recommandations en matière d'évolution épidémiologique physiopathologie et thérapeutique de la lithiase urinaire d'infection et autres formes ;
- Étant donné la situation alarmante de l'évolution des mécanismes de résistance, la documentation et la surveillance de l'antibiothérapie par des tests de sensibilité aux antibiotiques, notamment la concentration minimale inhibitrice (CMI), le dosage sérique des antibiotiques et la surveillance épidémiologique-moléculaire permettant de maîtriser cette dissémination sournoise au coût non négligeable ;
- La disponibilité, la formation académique et le développement du diagnostic moléculaire quantitatif par la métagénomique, intéressants pour établir une base de

données de la nouvelle taxonomie des uropathogènes émergents ou difficiles à mettre en évidence par méthode traditionnelle, dans le but d'étiqueter les étiologies infectieuses chez les patients avec lithiase urinaire d'allure calcique ou métabolique et autres (cancer prostatique) ;

- Le séquençage du génome complet qui devrait trouver sa place malgré le coût non négligeable de sa bioinformatique, afin de faire la caractérisation moléculaire des nouveaux facteurs de virulence (Endonuclease, Ampg...) ou de suivre l'évolution temporo-spatiale des mécanismes de résistance aux antibiotiques (ISL3 *family transposase*) enfouis dans les gènes de ces uropathogènes émergents (*Enterobacter hormaechi*) qui pourraient s'associer à la lithiase d'infection et ouvrir ainsi de nouvelles pistes de recherche pour son diagnostic, son traitement (phagothérapie et peptides antimicrobiens) et sa prévention ;
- La mise au point à échelle nationale ou internationale d'un guide pour l'antibioprophylaxie en chirurgie urologique, le traitement curatif et le suivi de la récurrence de lithiase urinaire d'infection ou infectée selon notre étude, de la façon suivante :
- L'utilisation d'antibiotiques selon antibiogramme ou CMI en pré-opératoire et/ou en post-opératoire, tout en veillant au signalement ou suivi biologique des plaques de Randall ou des anomalies anatomiques et de l'élimination des résidus de fragments calculaire « *stone free* », sources de récurrence clinique et de sepsis sévère (bactériémie). Cette stratégie est réalisée contre les Bactéries BLSE positive objectivée chez les BGN notamment, les *K. pneumoniae*, les *E. cloacae complex* et *E. coli*, en se basant sur les antibiotiques à bonne diffusion urinaire et demi-vie prolongée : l'ertapénème (si ≥ 80 kg : 1g x 2), en association avec l'amikacine ou la gentamicines, la céftolozane-tazobactam et la céftazidime-avibactam.

Les bactéries à Gram négatif non fermentaire de type *Pseudomonas spp.* peut être traitées par la ceftazidime, la pipéracilline-tazobactame, le méropénème, la colistine et le céfidérol, mais en aucun cas par **l'ertapénème**.

Le traitement contre le *Staphylococcus spp.* méticillino résistant (MRSA), notamment à la pénicilline, à l'oxacilline, au céfoxitine, au céfotaxime, au fluoroquinolone et au sulfaméthoxazole-co-trimoxazole fait appel à la vancomycine ou au linézolide.

L'*Enterococcus spp.*, tout en restant naturellement résistant au céfotaxime ainsi qu'au lincosamide et au streptogramine, peut être sensible à la pénicilline ou à la vancomycine.

Les levures de type *C. parapsilosis* sont sensibles au fluconazole, mais les *C. glabrata* peuvent être sensibles seulement si on augmente (à dose dépendante) les doses d'après leur CMI.

- Dans la perspective de prévention de la réinfection ou de la promotion de calcul urinaire d'infection par des traitements ortho-moléculaires à base de vitamine C et de magnésium citaté, les règles hygiéno-diététiques peuvent accompagner, avec une hyperhydratation à 3-4 litres/jour afin de participer à l'équilibre du microbiote urinaire et du pH urinaire.
- Enfin, étant donné cette transition épidémiologique de la lithiase urinaire toutes natures confondues et surtout celle de la lithiase d'infection, une étude pilote, multicentrique nationale ou internationale devrait voir le jour en passant par la méthode de spectrophotomètre infrarouge de Fournier, en association avec le séquençage génétique des microorganismes issus du calcul urinaire ou de l'urine pyélique, afin d'explorer les empreintes moléculaires de agents infectieux associées dans la promotion, la récurrence et le risque morbide de la lithiase urinaire d'infection. Il serait également intéressant d'ajouter dans l'étude le scanner à double énergie pour évaluer son potentiel dans l'identification, l'analyse de la composition du calcul avant sa fragmentation, afin de fournir simultanément des informations sur la structure et la morphologie infectieuse de ce dernier.

VIII. BIBLIOGRAPHIE

- [01] Daudon M. Épidémiologie de la lithiase urinaire. Paris (France) : Elsevier Masson ; 2018.
- [02] Daudon M, Traxer O. Lithiase urinaire. Paris (France) : Médecine-Sciences-Lavoisier ; 2012. 672 p.
- [03] Sbahi K. Etude des paramètres physicochimiques et biologiques de la lithiase urinaire et corrélation cristallurie - infection urinaire [Doctorat en Biologie]. Mostaganem (Algérie) : Université de Mostaganem-Abdelhamid Ibn Badis ; 2012.
- [4] Daudon M. Cristallurie. EMC-Néphrologie. 2013;10-04.
- [5] Zersi S. Identification d'un type particuliers de cristallurie chez le diabétiques. Alger (Algérie) : Congrès nationale de biochimie et de génétiques médicale. 2016.
- [6] Daudon M. Cristallurie. Revue Françaises des Laboratoires. 2013;(455).
- [7] Lange. D , Scotland KB. The Role of Bacteria in Urology. 2ème ed. London (UK) : Springer ; 2019.
- [08] Zerizer Y. Expérience d'urétéroscopie chez l'enfant à l'hôpital de Batna, journées médicaux-chirurgical de Bechar ; 2018.
- [09] Noël N, Rieu P. Lithiase urinaire d'infection. EMC-Urologie. 2013;V06-02:18-104-C-10.
- [10] Miller WA, Oakeson KF. Microbial Community Transplant Results in Increased and Long-Term Oxalate Degradation. Microbial Ecology. 2016:1–9.
- [11] Haute autorité de santé. Infection urinaire chez la femme [En ligne]. 2016. Disponible sur : www.has-santé.fr.
- [12] Barr-Beare E. The Interaction between Enterobacteriaceae and calcium oxalate deposits. PLOS ONE. 2015;10:e0139575.
- [13] Sohshang H. Biochemical and bacteriological study of urinarycalculi. J. Commun. Dis. 2000;32:216–221.
- [14] Romanowski K, Clark EG. Tuberculosis and chronic kidney disease: an emerging global syndemic. Kidney Int. 2016;90(1):34-40.
- [15] Prywer J. Bacterially induced formation of infection urinary stones : recent development and future challenges. Curr. Med. Chem. 2017;24:292-311.
- [16] Eswara JR, Ahmed Sharif-Tabrizi et al. Positive stone culture is associated with a higher rate of sepsis after endo-urological procedures. Urolithiasis. 2013;41:411-4.
- [17] Golechha S. Bacteriology and chemical composition of renal calculi accompanying urinary tract infection. Indian J. Urol. 2001;17:111–117.
- [18] Alaya A. Etude de la composition des calculs urinaire en fonction de l'âge dans population du centre tunisien. Progrès en Urologie. 2012;22(15):938-944.

- [19] Mc Cartney AC, Lewi JE. The bacteriology of the urine and renal calculi. *Urol. Res.* 1985;12:107–109.
- [20] Thompson RB, Stamey TA. Bacteriology of infected stones. *Urology.* 1973;2:627-33.
- [21] Zampini A. Defining Dysbiosis in Patients with Urolithiasis. *Scientific reports.* 2019;9:5425.
- [22] Schwaderer LA. The association between bacteria and urinary stones. *Ann Transl Med.* 2017;5(2):32
- [23] Mansi M, Goldfarb DS. The role of the microbiome in kidney stone formation. *International Journal of Surgery.* 2016;36:607e-612.
- [24] Romanova YM. Microbial communities on kidney stones. *Mol. Genet. Microbiol.* 2015;30:78–84.
- [25] Maier A. Bacteriological evaluation of the non-struvite nephrolithiasis and its association with urinary tract infections. *Rev. Rom. Med. Lab.* 2015;23:457–467.
- [26] McLean R. *Proteus mirabilis* biofilm protection against struvite crystal dissolution and its implications in struvite urolithiasis. *J. Urol.* 1991;146:1138–1142.
- [27] Fowler JE. Bacteriology of branched renal calculi and accompanying urinary tract infection. *Journal of Urology.* 1984;131:213-215.
- [28] Rieu P. L'infestation d'infection. *Annales d'Urologie.* 2005;39(1):16-25.
- [29] O'Kane D. *Candida dubliniensis* encrustation of an obstructing upper renal tract calculus. *BMJ Case Rep.* 2013
- [30] Bianca T. Bacteriology study of stone culture. *Acta Médica Transilvanica.* 2013.
- [31] Moustafa A. Microbial metagenome of urinary tract infection [En ligne]. Disponible sur : www.nature.com/scientific. 2018.
- [32] Chutipongtanate S. Bacteria can promote calcium oxalate crystal growth and aggregation. *Journal of biological inorganic chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry.* 2013;18(3):299–308.
- [33] Amimanan P. Elongation factor Tu on *Escherichia coli* isolated from urine of kidney stone patients promotes calcium oxalate crystal
- [34] Schultz LN, Connolly J. *Struvite Stone Formation by Ureolytic Biofilm Infections.* London (UK) : Springer International Publishing ; 2016.
- [35] Flannigan RK. Evaluating factors that dictate struvite stone composition: a multi-institutional clinical experience from the EDGE Research Consortium. *Can. Urol. Assoc. J.* 2018;12:131–136.
- [36] Kanlayal R. Flagellum Is Responsible for Promoting Effects of Viable *Escherichia coli* on Calcium Oxalate Crystallization, Crystal Growth, and Crystal Aggregation. *Front.Microbiol.* 2019.

- [37] Alelign T, Petros B. Kidney stone disease : An update on current concepts. *Advance in Urology*. 2018.
- [38] Stamatelou K. Time trends in reported prevalence of kidney stones in the United States: 1976–1994. *Kidney international*. 2003;63(5):1817-1823.
- [39] Kim MJ, Kim JW. Bacterial sepsis after extra corporeal shock-wave lithotripsy. *Urolithiasis*. 2013;41:95-97.
- [40] Copcoal MJ, Webb DR, Kellet MJ. The complication of extracorporeal shock wave lithotripsy management and prevention. *Br j urol*. 1986;58:587-580.
- [41] Eswara JR, Sharif-Tabrizi A. Positive stone culture is associated with a higher rate of sepsis after endo-urolological procédures. *Urolithiasis*. 2013;41:411–414.
- [42] Eswara JR, Sharif-Tabrizi A et al. Positive stone culture is associated with a higher rate of sepsis after endo-urolological procédures. *Urolithiasis*. 2013;41:411-4.
- [43] De Coninck V. Complications of ureteroscopy: a complete overview. *World Journal of Urology*. 2019:1-20.
- [44] Henry N, Sèbe P. Anatomie des reins et des voies excrétrices supérieurs.
- [45] Anatomie du résidanat. 3ème ed. 2012.
- [46] Daudon M. Randall’s plaques. Dans Rao PN, Preminger GM, Kavanagh JP, (eds). *Urinary tract stone disease*. London (UK) : Springer ; 2011. p103-12.
- [47] R. BENRABAH. Analysis of urinary stones by infrared spectrophotometry in patients nephrolithiasis in the center of Algiers. SIU 2015,
- [48] El Lekhlifi Z, Souilmi FZ. Epidemiological characteristics of childhood urolithiasis in Morocco. *African journal of Urology*. 2016;22:92-95
- [49] Bouslama S. Détermination de la composition de 359 calculs du haut appareil collectés dans la région. Est-algérien. *Progrès en Urologie*. 2015.
- [50] El Habbani R. Epidemiologie study on urinary stones in the region of Fez and the risk of recurrence. *Progres in urology*. 2016;26(5):287-294.
- [51] Sekkoum K. Lithiase urinaire du Sud Ouest Algérien. A propos de la composition des calculs en zone semi-aride. Catégorie parente: AST *Annales des Sciences et Technologie* ; 2012.
- [52] Pilly E. *Maladies infectieuses et tropicales*. 25ème éd. Paris (France) : Alinéa Plus ; 2018.
- [53] Tiouit D. Infection urinaire dans l’Algérois [Thèse de doctorat]. 2009
- [54] Torzewska A. In vitro studies of epithelium –associated crystallization caused by uropathogens during urinary calculi development. *Microbial pathogenesis*. 2014;71:25-31.
- [55] Golechha S. Bacteriology and chemical composition of renal calculi accompanying urinary tract infection. *Indian J. Urol*. 2001;17:111–117.

- [56] Kore AT. Bacteriological profile of urine in patients with urinaire calculi. Department of microbiology, MGM Medical College and Hospital, Sector 18 Kamothe, Navi Mumbai-401506 ; 2013.
- [57] Margel D. Clinical implication of routine stone culture in percutaneous nephrolithotomy prospective study. 2004
- [58] Coulibaly M. Etude de la tuberculose uro-génitale dans le service de Néphrologie et d'Hémodialyse du CHU du Point G. À propos de 30 cas. 10M489. 2010.
- [59] Pang Y. Test GeneXpert MTB / RIF dans le diagnostic de la tuberculose urinaire à partir d'échantillons d'urine. Scientific Reports. 2017;7(6181).
- [60] Benatta M, Belkacem M. La tuberculose urogénitale difficultés diagnostiques dans un service de chirurgie urologique. À propos de 35 cas. 2006.
- [61] Hirota Y. The first case report of emphysematous pyelonephritis and bacteremia due to *Ligella urethralis* from stone culture. International journal of medical Microbiology. 2017;307:151-153.
- [62] Voroshilova TM. Metagenomic analysis of samples in cystitis. Urologia. 2016 Feb;(1):29-31.
- [63] Janes VA, Matamoros S, Willemse N, Visser CE, de Wever B et al. Metagenomic sequencing to replace semi-quantitative urine culture for detection of urinary tract infections: a proof of concept. BioRxiv. 2017.
- [64] Schulsinger DA. Kidney stone Disease : Say no to Stones. 2015.
- [65] Hugosson J. Chronic urinary tract infection and renal stones. Scandinavian journal of urology and nephrology. 1989;23(1):61–6.
- [66] Courbebaisse M. Vitamin D in Acute and Chronic. Rejection of Transplanted kidney. London (UK) : Springer ; 2016.
- [67] Bruyerea F, Traxerb O. Infection et lithiase urinaire. Progrès en urologie. 2008;18:1015-1020.
- [68] Yang D. Biofilm-forming *Klebsiella pneumoniae* strains have greater likelihood of producing extended-spectrum beta-lactamases. J. Hosp. Infect. 2008;68(4):369–371.
- [69] Surgersa L. Biofilm formation by ESBL-producing strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. International Journal of Medical Microbiology. 2019;309:13–18
- [70] Thomen P. Bacterial biofilm under flow: first a physical struggle to stay, then a matter of breathing. PLOS ONE. 2017;12:e0175197.
- [71] Oberlin TD. Contemporary Surgical Trends in the Management of Upper Tract Calculi. The journal of Urology. 2015;193(03):880-884.
- [72] Espinosa-Ortiz EJ. Current insights into the mechanisms and management of infection stones. Nature reviews | Urolog. 2019.

- [73] Li X, Ellis ML. Response of germ-free mice to colonization with *O. formigenes* and altered Schaedler flora. *Appl Environ Microbiol.* 2016;82:6952–60.
- [74] Sadowski R. Morphology of struvite crystals as an evidence of bacterially mediated growth. *Cryst Res Technol.* 2014;49:478-489.
- [75] Hedges S. Comparison of urine and serum concentrations of interleukin-6 in women with acute pyelonephritis or asymptomatic bacteriuria. *Journal of Infectious Diseases.* 1992;166(3):653-65.
- [76] Abate N. The metabolic syndrome and uric acid nephrolithiasis: novel features of renal manifestation of insulin resistance. *Kidney international.* 2004;65(2):386-392.
- [77] Kadlec AO, Greco K. Metabolic syndrome and urinary stone composition: what factors matter most? *Urology.* 2012;80:805–10.
- [78] Domingos F, Serra A. Nephrolithiasis is associated with an increased prevalence of cardiovascular disease. *Nephrologi Dial transplant.* 2011;26:864-8.
- [79] Espinosa-Ortiz EJ. Current insights into the mechanisms and management of infection stones. *Nature reviews | Urolog.* 2019.
- [80] Recommandation du comité de Lithiase urinaire de l'association Française d'urologie pour la prise en charge des calculs urinaire. AFU. 2020
- [81] Référentiel en microbiologie médicale (RÉMIC). Société Françaises de Microbiologie. 2018
- [82] Djennane F. ECBU. Technique Microbiologique. Alger (Algérie) : Institut Pasteur d'Algérie ; 2009.
- [83] Brisset JM. Examen cytobactériologique des urines. *Rev Prat.* 1975;24(19):1689-1697.
- [84] Laudat A. Comment pallier l'absence de contrôle interne de qualité pour l'analyse de la cristallurie ? *Ann Biol Clin.* 2018;76(3):345-51.
- [85] Caudarella R. Cristallurie urinaire : Un problème à débattre. *Acta urologica belgica,* 1986;54(1):49-56.
- [86] Michon AL, Dubreuil L, Marchandi H. Bactéries anaérobies : généralités EMC.2013
- [87] Denis F. Techniques usuelles Bactériologie médicale. Paris (France) : Elsevier ; 2016.
- [88] Twizeyimana E. Automates et uroculture: la cytologie urinaire. *Revue Francophone des Laboratoires.* 2016(482):25-33.
- [89] Monga M. Stone and pelvic urine culture and sensitivity are better than bladder urine as predictors of urosepsis following percutaneous nephrolithotomy: a prospective clinical study. *The journal of urology.* 2005
- [90] Bratell S, Brorson JE. Bacteriology of operated renal stones. *Eur Urol.* 1990;17:58-61
- [91] Dajani AM, Shahbi A. Composition of infected stones. *Urology.* 1983;21:351-353.

- [92] Paonessa JE. Preoperative Bladder Urine Culture as a Predictor of Intraoperative Stone Culture Results: Clinical Implications and Relationship to Stone Composition The Journal of Urology. 2016.
- [93] Clinical and Laboratory Standards Institute: CLSI Guideline. M100 | Normes de performance pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens, 30e édition. 2020
- [94] Carona F. Practice guidelines for the management of adult community-acquired urinary tract infections. Médecine et maladies infectieuses. 2018;48:327–358.
- [95] Doizi S. Evolution of Urolithiasis Treatment Over 30 Years in French Academic Institution. Prog Urol. Jul 2015.
- [96] Ming-Chak L. Evolution of stone management in Australia. Bju international. 2011;108(8b):E164-E309.
- [97] Naidal K. La prise en charge de la lithiase urétérale au service d’Urologie du CHU Hassan II de Fès (A propos de 62 cas). 2017.
- [98] Tavichakortrakool R. Extensive characterizations of bacteria isolated from catheterized urine and stone matrices in patients with nephrolithiasis. Nephrol. Dial. Transplant. 2012;27:4125–4130.
- [99] SFLF. Recommandation internationales sur la prise en charge do sepsis et du choc septique : du neuf. 2016.
- [100] Lojanapiwat B, Kitirattrakarn P. Role of preoperative and intra-operative factors in mediating infection complication following percutaneous nephrolithotomy. UrolInt. 2011;86:448–452.
- [101] Gerloni R, Mucc L. Management of sepsis: from evidence to clinical practice. Italian Journal of Medicine. 2016;10:308-328.
- [102] EsvaraJairam R, Sharif-Tabrizi A, Sacco D. Positive stone culture is associated with a higher rate of sepsis after endourological procedures. Urolithiasis. 2013;41:411–414.
- [103] Koras O, Bozkurt IH. Risk factors for post operative infectious complications following percutaneous nephrolithotomy: a prospective clinical study. Urolithiasis. 2014.
- [104] Stephan MM, Lutz T. Complications in percutaneous nephrolithotomy. EurUrol. 2015;51:899–906.
- [105] Mariappan P, Tolley DA. Endoscopic stone surgery: minimizing the risk of post-operative sepsis. Curr Opin Urol. 2005;15:101–105.
- [106] Mariappan P, Loong CW. Midstream urine culture and sensitivity test is a poor predictor of infected urine proximal to the obstructing ureteral stone or infected stones: a prospective clinical study. J Urol. 2004;171:2142–2145.
- [107] Nishant P. Multidrug Resistant Bacteriuria Before PercutaneouNephrolithotomy Predicts for Postoperative Infectious Complications. J of endourology. 2015;15.

- [108] Korets R, Graversen JA, Kates M, et al. Post-percutaneous nephrolithotomy systemic inflammatory response: a prospective analysis of preoperative urine, renal pelvic urine and stone cultures. *J Urol.* 2011;186:1899–1903.
- [109] De Miguel-Elizaga I, Martínez-Ruiz A. Kidney stones in a Mediterranean population from the south of Spain. *Clin Chem Lab Med.* 2011;50:545–8.
- [110] Novikov A, Nazarov T. Epidemiology of stone disease in the Russian federation and post-Soviet era. Dans: Talati JJ, Tiselius HG, Albala DM, Ye Z (eds). *Urolithiasis: basic science and clinical practice.* London (UK) : Springer Verlag; 2012. p. 97–105.
- [111] Rodgers A. Epidemiology: South Africa and sub-Saharan Africa. Dans : Rodgers A. *Urolithiasis: basic science and clinical practice.* London (UK) : Springer-Verlag; 2012. p. 67–71
- [112] Lopez R. History epidemiology and regional diversities of urolithiasis. *Pediatric Nephrology.* 2010;25:49-59
- [113] Alexander RT, Hemmelgarn BR. Kidney stone and cardiovascular events :Acohort study. *Clin J Amsociete Nephrologie.* 2014;9:506-12.
- [114] Dembele Z. Epidémiologie et traitement de la lithiase urinaire dans le service d’urologie de l’hôpital du Point G.keneya.net. Bamako ; 2005.
- [115] Fukuhara H. Clinical relevance of seasonal changes in the prevalence of ureterolithiasis in the diagnosis of renal colic. 2016;44(6):529–537.
- [116] Knoll T, Schubert AB. Urolithiasis through the ages: data on more than 200 000 urinary stone analyses. *J Urol.* 2011;185:1304–11.
- [117] Durante-Mangoniand E. Management of carbapenem resistant Enterobacteriaceae Infections. *Clin Microbiol infection.* 2019.
- [118] Melnyk AH. The fitness costs of antibiotic resistance mutation. *Evol Appl.* 2015;8(3):273–283.
- [119] Rossolini GM. Mechanisms of Antibacterial Resistance. *Infectious Disease.* 2017;2: 1181-1196.e
- [120] Réseau algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques nombres et pourcentages des entérobactéries productrices de BLSE par spécialité clinique. Algérie. 2014.
- [121] El. Mzabri Z. La lithiase urinaire chez l’enfant. Expérience de l’hôpital de Rabat. 2014
- [122] Delepaul F. Ureterscopy for ureteral calculi, 379 cases. *Progres en urologie.* 1997.
- [123] El Lekhlifi Z, Souilmi FZ. Epidemiological characteristics of childhood urolithiasis in Morocco. *African journal of Urology.* 2016;22:92-95.
- [124] Marickar A. Female stone disease: the changing trend. Symposium Paper. *Urol. Res .* 2009;37:337-340.

- [125] Djelloul Z, Daudon M. Lithiase urinaire dans l'Ouest algérien : étude de la composition de 1354 calculs urinaires en relation avec leur localisation anatomique, l'âge et le sexe
- [126] Perez Castro E. On behalf of the croes Ureteroscopy Global Study Group. Differences in Ureteroscopic Stone Treatment and Outcomes for Distal, Mid-, Proximal, or Multiple Ureteral Locations: The Clinical Research Office of the Endourological Society Ureteroscopy Global Study. *European urology*. 2014;66:102–109.
- [127] Niang AKL. Ureteroscopie Retrograde Experience de l'Hôpital General Grand Yoff de Dakar. *African Journal of urology*. 2016;22(2):110-114.
- [128] Ouattara ZI. Étude de 72 cas de lithiase du haut appareil urinaire au service d'urologie de l'hôpital du point "g". *Mali médical* 2004 t xix n° 1.
- [129] Coulibaly M. Étude des lithiases du haut appareil urinaire dans le service d'urologie du chu du point « g » à propos de 53 cas [Thèse]. 2006.
- [130] Harrache D. Analyse des calculs urinaires de l'adulte dans l'Ouest Algérien par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier. *L'euro-biologiste*, 1997;31(228):69-74.
- [131] Bader CA. Methodological aspects of spontaneous crystalluria studies in calcium stone formers. *Scanning microscopy*. 1994;8(2):215-232.
- [132] Marketos SG. Hippocratic medicine and nephrology. *American journal of nephrology*. 1994;14(4-6):264-269.
- [133] Petrov VI. Changes in the structure of pathogens of calculous pyelonephritis complicated with diabetes mellitus type ii, in the hospital urology of the city of Volgograd. *Urologiia*. 2016 Aug;(4):58-62.
- [134] Carpentier X, Daudon M. Relationships between carbonation rate of carbapatite and morphologic characteristics of calcium phosphate stones and etiology. *Urology*. 2009;73:968-75.
- [135] Bando K, Muto Y. Biochemical properties and purification of metallo-B-lactamase from *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1991;35(2):371-372.
- [136] Michon AL, Dubreuil L, Marchandi H. Bactéries anaérobies : généralités EMC.
- [137] Logan LK. A Multi-Centered Case-Control Study of Factors associated with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing Enterobacteriaceae infections in children and young adult. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2019;38(5):490-495.
- [138] Oteo J, Orden B. CTX-M-15 producing urinary *E. coli* 025 b-ST131 phylogroupe Bé has acquired resistance to Fosfomycin. *J Antimicrob chemother*. 2009;64:712-717.
- [139] Barguigua A, El Otmani F. Prevalence and genotypic analysis of plasmid-mediated β -lactamases among urinary *Klebsiella pneumoniae* isolates in Moroccan community. *J. Antibiot*. 2013;66:11-6.

- [140] Nedjai M. Prevalence and characterization of extended spectrum β -lactamases in Klebsiella-Enterobacter-Serratia group bacteria, in Algeria. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2012;42(1):20-2.
- [141] Saïdani M. Emergence of carbapenem-resistant OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Tunisia. *Journal of medical microbiology*. 2012;61(12).
- [142] Belbel Z. Evaluation de la résistance aux antibiotiques des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées dans les hôpitaux d'Annaba. *Microbiologie appliquée*. 2014.
- [143] Titelman E. Antimicrobial susceptibility to parenteral and oral agents in a largely polyclonal collection of CTXM14 and CTXM15 producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Journal pathology of microbiology and immunology*. 2011;119(12).
- [144] Bonnet R. A Novel CTX-M β -Lactamase (CTX-M-8) in Cefotaxime-Resistant Enterobacteriaceae Isolated in Brazil. *American society of microbiology*. January 2000
- [145] Biendo M. Successive emergence of extended-spectrum β -Lactamase-producing and Carbapenemase-producing *Enterobacter aerogenes* Isolates in a University Hospital. *American society of microbiology* ; 2008.
- [146] Khennouchi NH. Evaluation de l'antibiorésistance du genre *Enterobacters spp* aux antibiotiques. *Microbiologie Appliquée*. 2016.
- [147] Guerin F, Isnard C. Complex Regulation Pathways of AmpC-Mediated beta-Lactam Resistance in *Enterobacter cloacae* Complex. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2015;59:7753-7761.
- [148] Mohammedi E. Bactériémie à *Enterobacter cloacae* , émergence d'une résistance aux antibiotiques après antibioprofylaxie. *Annales françaises d'anesthésie et de réanimation*. 2002;19(7):563.
- [149] Guérin F. Infections caused by *Enterobacter cloacae* complex: Antibiotic resistance and treatment. *Journal des Anti-infectieux*. 2015;17(3):79-89.
- [150] Regli D. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Front. Microbiol*. 2015.
- [151] Messai Y, Iabadene H. Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). *Pathologie Biologie*, 2008;56(5):319-325.
- [152] Muylaert A. Résistances aux fluoroquinolones : la situation actuelle. *Ann. Méd. Vét.*
- [153] Zeng YQ. Dissemination of the rmtB gene carried on IncF and IncN plasmids among Enterobacteriaceae in a pig farm and its environment. *J.Antimicrob.Chemother*. 2015;66:2475-2479.
- [154] Ruan F. Antibiotic resistome profile based on metagenomics in raw surface drinking water source and the influence of environmental factor: A case study in Huaihe River Basin, China *Environmental Pollution*. 2019;248:438-44.

- [155] Aggoune N. Wide spread of OX-48 producing Enterobacteriaceae in Algerian hospital à four years study. *J infection dev ctres*. 2018.
- [156] Machuca J. Caractérisation d'une épidémie due à *Klebsiella pneumoniae* producteur de CTX-M-15 dépourvu du blaOXA-48gene appartenant au clone ST405 dans une unité néonatale du sud de l'Espagne. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71:2353.
- [157] Yang D. Biofilm-forming *Klebsiella pneumoniae* strains have greater likelihood of producing extended-spectrum beta-lactamases. *J. Hosp. Infect*. 2008;68(4):369–371.
- [158] Surgersa L. Biofilm formation by ESBL-producing strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Medical Microbiology*. 2019;309:13–18
- [159] Ruan F. Antibiotic resistome profile based on metagenomics in raw surface drinking water source and the influence of environmental factor: A case study in Huaihe River Basin, China *Environmental Pollution*. 2019;248:438-44.
- [160] Brown MK. Defining the Clinical Significance of *Alloscardovia omnincolens* in the Urinary Tract. *J Clin Microbiol*. 2016;54: 1552–1556.
- [161] Rani A. A diverse virome in kidney transplant patients contains multiple viral subtypes with distinct polymorphisms. *Scientific reports*. 2016;6: 33327.
- [162] Gottschick C. The urinary microbiota of men and women and its changes in women during bacterial vaginosis and antibiotic treatment. *Microbiome*. 2017;5:99.
- [163] Hasman H. Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. *J Clin Microbiol*. 2014;52:139–146,
- [164] Johnson G. Characterization of the ϕ CTX-like *Pseudomonas aeruginosa* phage Dobby isolated from the kidney stone microbiota. *Access Microbiology*. 2019;1.
- [165] Martin U, Dumas P. Chemistry using synchrotron-based Fourier-transform infrared microspectroscopy. *Trends in Analytical Chemistry*. 2010;29:453-463.
- [166] Sharma PR. Nucleases of bacterial pathogens as virulence factors, therapeutic targets and diagnostic markers. *International Journal of Medical Microbiology*. 2019; 309(8): 151354.
- [167] Kim MJ, Kim JW. Bacterial sepsis after extra corporeal shock-wave lithotripsy. *Urolithiasis*. 2013; 41:95-97.
- [168] Copcoal MJ, Webb DR, Kellet MJ. The complication of extracorporeal shock wave lithotripsy management and prevention. *Br j urol*. 1986;58:587-580.
- [169] Eswara JR, Sharif-Tabrizi A. Positive stone culture is associated with a higher rate of sepsis after endo-urological procédures. *Urolithiasis*. 2013;41:411–414.
- [170] Eswara JR, Sharif-Tabrizi A et al. Positive stone culture is associated with a higher rate of sepsis after endo-urological procédures. *Urolithiasis*. 2013;41:411-4.
- [171] Fiatte P. Lithiase urinaires ; 2019.

ANNEXE

Annexe 01

La cristallurie et la lumière polarisée

-Définition des cristaux urinaires : les cristaux urinaires : ils se composent de substances amorphes, les substances cristallines. Les cristaux ont des formes géométriques définies tandis que les substances amorphes n'en ont pas. Il y a 230 formes géométriques possibles dans l'urine qui se regroupent en 32 classes. Ces 32 classes se regroupent en 6 systèmes cristallins. Une espèce minérale est un solide inorganique de composition chimique donnée, se rencontrant sous deux états physique : -l'état amorphe et l'état cristallin, l'état solide amorphe est caractérisé par un arrangement désordonné des atomes. -l'état solide cristallin est caractérisé par un arrangement ordonné des atomes ; qui se répète indéfiniment et périodiquement dans les trois directions de l'espace et dessine ainsi un réseau structural tridimensionnel ou réseau cristallin, se présentant sous différentes formes géométriques ou mailles élémentaires pour remplir un espace sans laisser de vide comme suit : cubique, quadratique, hexagonale, rhomboédrique, orthorhombique ...ect

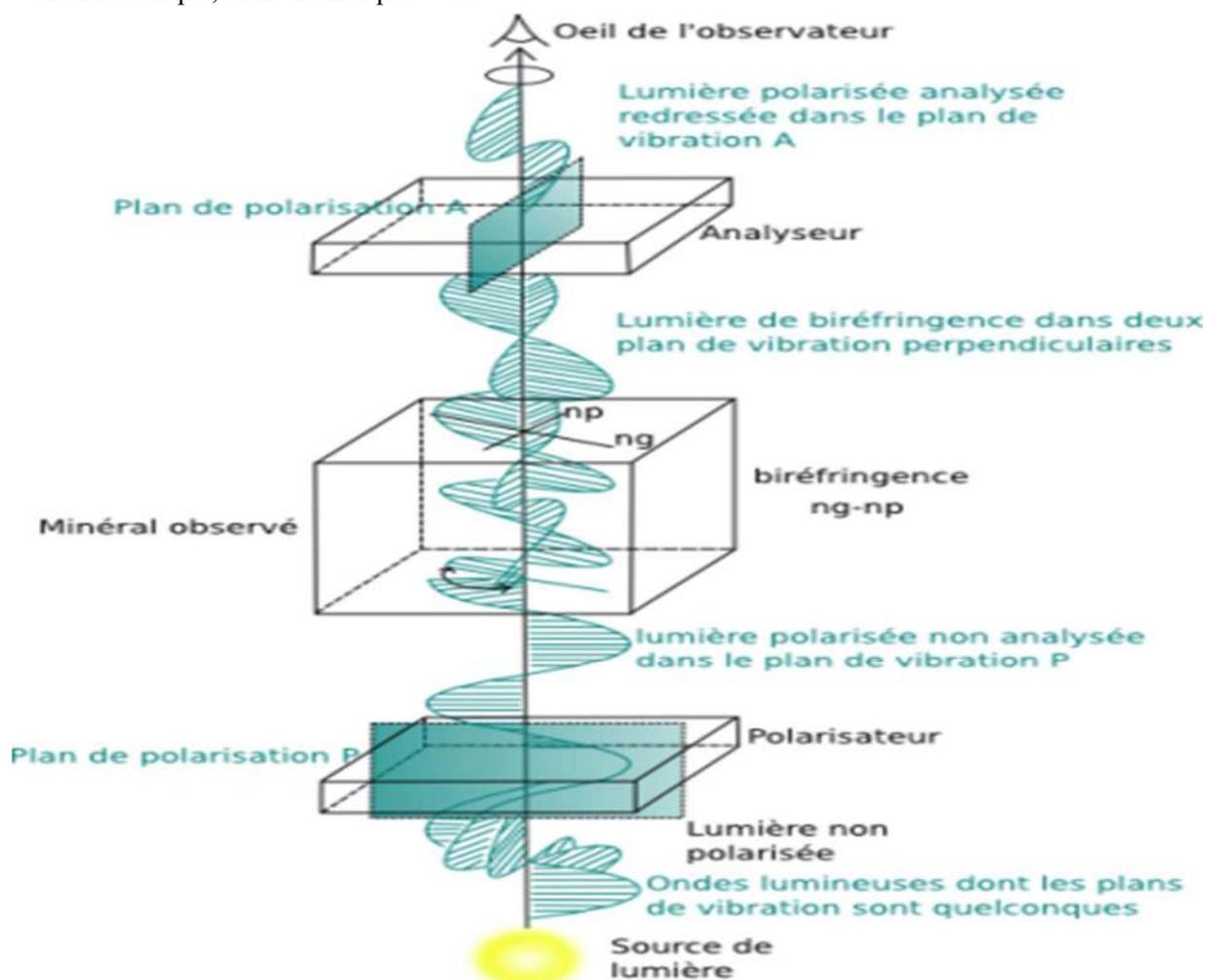


Figure 01 : Mécanisme de la lumière polarisée.

Le microscope à polarisation : le microscope à polarisation est spécialement adapté aux études pétrographiques. Ils diffèrent du microscope ordinaire par l'adjonction de deux dispositifs de polarisation ou nicols, **Le polariseur** ; interpose entre la source lumineuse et le minéral. **L'analyseur** ; situe entre l'objectif et l'oculaire. Il est escamotable, la lumière sortie du polariseur vibre dans le plan de celui-ci .et donc. Il ne laisse passer que les vibrations qui sont contenue dans son plan .la lumière polarisé est un rayon issue d'une source ponctuelle, présente une symétrie de révolution : le vecteur d'amplitude de la vibration électromagnétique vibre à chaque instant dans toutes les direction ; perpendiculaire à l'axe de propagation du rayon lumineux.ces dispositifs optique spéciaux permettent d'obtenir une lumière polarise, c'est-à-dire, une lumière dont le vecteur amplitude ne vibre plus que dans une seule direction.

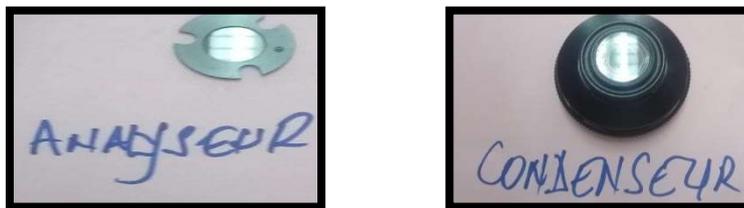
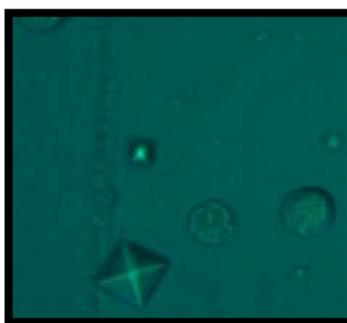


Figure 02 (photos1) : Le microscope optique à polarisation avec analyseur et polariseur.

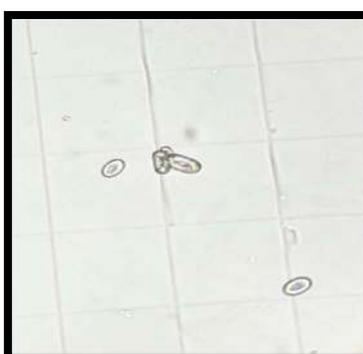


Photos 02 : Microscope à polarisation (service d'anatomopathologie .HCA.2016).

Photos de cristallurie par lumière polarisé:



Cristallurie de wedhellite C1



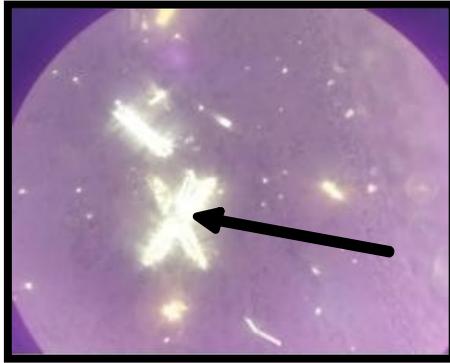
Cristallurie « hématiforme » de whewellite .C2 (lumière blanche)



Cristallurie phosphocacique carbonate PACC



Cristallurie de Bruschite.



Cristallurie de Struvite « Cruciforme » ($> 10\mu\text{m}$)



Photos 5 : Mortier pour l'analyse du calcul

Annexe 02

Les bactériémies-urosepsis-Hémoculture dans la lithiase d'infection

Lors des complications dues à la lithiase d'infection les tableaux 1-2, ci-après ; dénotes les modalités et les critères d'inclusion des patients suspect de sepsis ou de choc septique revisités grâce aux dernières actualisations scientifiques.

Modalité des prélèvements pour hémoculture

A pratiquer devant toute fièvre d'origine indéterminée, surtout si elle est accompagnée de signes cliniques évocateurs d'infection.

Prélever avant ou à distance de l'administration d'antibiotique ou d'antifongique.

Hémocultures périphériques chez l'adulte :

Suivre impérativement les règles de prélèvement:

- ✓ Porte de la chambre fermée ;
- ✓ Port d'un masque de type chirurgical ;
- ✓ Port de lunettes de sécurité couvrantes ;
- ✓ Lavage ou désinfection des mains ;
- ✓ Port de gants non stériles ;
- ✓ Désinfection de l'opercule des flacons d'hémoculture et du point de ponction avec un produit approprié ;
- ✓ Ne plus palper la veine après cette étape ;
- ✓ Pendant le prélèvement, contrôler le bon remplissage des flacons ;
- ✓ Identifier correctement les flacons ;
- ✓ Utiliser de préférence des antiseptiques alcooliques.

En cas de prélèvements sanguins associés, les flacons d'hémoculture sont prélevés en premiers.

Le paramètre le plus influent sur la sensibilité de l'examen est la **quantité totale de sang** mise en culture lors d'un épisode clinique plus que le nombre de flacons.

Il existe une relation directe entre le volume total de sang cultivé et le rendement de la technique. Un volume insuffisant peut induire des faux-négatifs.

Chez l'adulte, le volume minimum est de 20 ml de sang soit 10 ml par flacon. Le volume optimal par 24h est de 40 à 60 ml, soit 4 à 6 flacons correctement remplis.

Limiter le nombre d'hémocultures à 3 par épisode clinique et par tranche de 24h.

Eviter les «hémocultures solitaires», 1'hémoculture (2 flacons) prélevée sur 24h.

Il est possible de prélever les hémocultures

- En 2 ou 3 ponctions = «prélèvement multiple»
- En 1 seule ponction (4 à 6 flacons) = «prélèvement unique».

Les deux stratégies de prélèvement présentent la même sensibilité à nombre de flacons égal.

Cependant, il est préférable de privilégier la méthode par «prélèvement unique», qui permet de:

- Réduire le taux de contamination ;
- Réduire la fréquence d'hémoculture solitaire
- instaurer une antibiothérapie plus rapidement.

Si les Quatre flacons sont bien remplis (> 8ml / flacon), il n'est pas nécessaire de prélever la 3^{ème} paire. A l'inverse, en cas de volumes inférieurs, la 3^{ème} paire permet d'obtenir un volume total conforme et de garantir une certaine sensibilité de l'examen.

Hémocultures périphériques chez l'enfant

Chez l'enfant, il est généralement difficile d'obtenir le volume de sang suffisant.

La concentration bactérienne est plus élevée chez l'enfant que chez l'adulte, cela permet donc de limiter la quantité de sang à quelques millilitres chez le nouveau né. La concentration bactérienne diminue avec l'âge, il faut donc augmenter le volume de sang avec l'âge. Chez les enfants de moins de 13 kg, il est possible d'utiliser les flacons pédiatriques.

La quantité de sang à introduire dans les flacons pédiatriques est fonction du poids de l'enfant, d'après le tableau 01 ci-après. [9-25]

Tableau 1 : Les modalités de prélèvement lors de la bactériémie chez l'enfant.

Poids de l'enfant	Nombre de flacons d'hémoculture /24H	Quantité de sang à introduire
moins d'1 kg	01	0,5 à 2 ml
1,1 et 2 kg	01	1,5 à 4,5 ml
2,1 et 12,7 kg	01	3 à 6 ml
12,8 et 36,3 kg	04	5 à 7 ml
Au delà de 36,3 kg	06	10 ml

Annexe 03

Anciennes et nouvelles définition du Sepsis et du choc septique, la nouvelle définition aboutit à l'abandon de la notion de syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS), à la disparition de la catégorie Sepsis sévère et à la modification des critères cliniques définissant le sepsis et le choc septique. [9-25]

Tableau 2 : Les nouveaux critères actualisés SOFA du choc septiques.

	Sepsis		Sepsis sévère	Choc septique	remarques
Anciennes définitions (1992)	Définition	SRIS+infection	Sepsis sévère associée à une hypotension malgré un remplissage vasculaire adéquat et/ou nécessitant l'administration d'amine vasopressives	Sepsis sévère associée à une hypotension malgré le remplissage vasculaire adéquat et/ou nécessitant l'administration d'amines vasopressives	Sensibilité mais insuffisamment spécifique (trop de patient considéré à tort en Sepsis)
	Critère Clinique biologiques	Critère parmi Fièvre ou hypothermie tachycardie Tachypné ou leucopénie ou hyperleucocytose et foyer (réservoir) infectieux	hyperlactatémie hypotension avant remplissage insuffisance rénale aiguë, altération de la conscience coagulopathie SDRA	Critère de sepsis sévères+ hypotension persistante malgré un remplissage adéquat	
Nouvelles définitions (2016)	Définition	Dysfonction d'organe mettant en jeu le pronostic vital due à une réponse inappropriée (dysrégulée) de l'hôte à infection		Sepsis avec défaillance circulatoire ou cellulaire ou métabolique	Meilleure spécificité possible au détriment de la sensibilité notamment à l'urgence
	Critère clinique biologiques	qSOFA > 2 (hors réanimations) Au moins 2 critères : - parmi fréquence respiratoire > 22/min. - Altération de la conscience - Pression systolique < 100 mm Hg SOFA > 2	-	Sepsis hypotension persistante malgré remplissage vasculaire adéquat nécessitant l'utilisation d'amines vasopressives Lactates sériques > 02 mmol/L	
		(réanimation Associées à une mortalité intra-hospitalière de 10 %		associées à une mortalité intra-hospitalière de 40%	

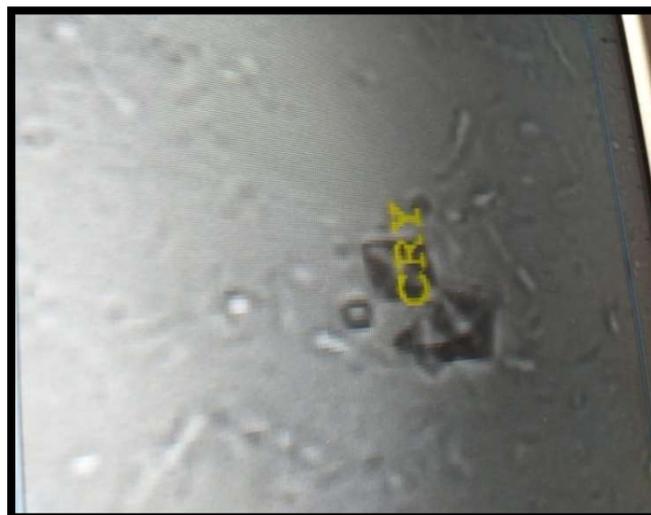
SRIS : Syndrome de réponse inflammatoire systémique .SCORE SOFA : sepsis relate organe
faillure Assessment . SCORE qSOFA quick SOFA est le calcul du score SOFA , inclut les
items suivant (0 à 4 points par item) trouble de la fonction respiratoire (Pao₂/fio₂)
Thrombopénie (numération plaquettaire) , trouble de la fonction hépatique (bilirubine),
hypotension , troubles de la conscience (score de Glasgow) , trouble de la fonction rénale (
créatinine ou diurèse)

Annexe 04

Le principe de l'automate de cytologie urinaire Sedi-Max* :

Le Sedi-MAX[®] est un analyseur entièrement automatisé de cytologie urinaire basé sur l'analyse morphologique des particules après capture par un système vidéo .Il effectue une mesure microscopique de l'échantillon d'urine centrifugée dans une cuvette à usage unique. Il peut traiter 80 échantillons par heure. On place dans l'automate les tubes contenant les urines des patients. Ce dernier les homogénéise avant l'analyse. L'automate aspire ensuite 200 µL d'urine, les transfère dans la cuvette où ils sont centrifugés, ce qui permet de sédimenter les éléments. La caméra intégrée dans l'automate photographie la cuvette en plusieurs endroits (jusqu'à 20 images par échantillon) à travers un microscope. Les images s'affichent à l'écran : ce sont exactement celles observées avec les microscopes traditionnels, avec la possibilité de zoomer (grossissement jusqu'à 250x, zoom optique 20x) sur des particules individuelles.

Le SediMAX identifie et quantifie 15 particules :Hématies (RBC) ; Leucocytes (WBC) ; Cellules Épithéliales (EPI) et cellules rondes (NEC) ; Cylindres Hyalins (HYA) ; Cylindres Pathologiques (PAT) ; Levures (YEA) ; Bactéries (BAC) ; Cristaux (CRY) ; CaOx monohydraté , C1(CaOxm) ; CaOx dihydraté ,C2 (CaOxd) ; cristaux de phosphate triple (TRI) ; Acide urique (URI) ; Mucus(MUC), et Spermatozoïdes(SPRM). Après l'analyse, l'écran affiche les résultats. Le technicien a alors la possibilité de les valider ou bien de les modifier. Des contrôles internes de qualité (niveau bas et niveau élevé) sont passés avant et après chaque série patients. L'appareil vérifie que les hématies et les leucocytes se trouvent dans l'intervalle de concentration fixé.



Photos : Cristaux d'oxalocalcique agglomère

Annexe 05

Les milieux chromogènes (uri-select):

Le principe du milieu chromogène est d'utiliser des substrats synthétiques qui sont des analogues structuraux d'une molécule naturellement clivée par une enzyme caractéristique d'une espèce bactérienne ou d'un groupe d'espèces bactériennes. Le substrat clivé acquiert des propriétés chromogéniques et précipite en colorant la colonie sans diffuser dans la gélose. La plupart des milieux chromogènes utilisent un jeu de différents substrats permettant une très bonne différenciation des colonies et une identification présomptive de ou des espèces bactériennes présentes dans l'urine, d'après le tableau 03 ci-après on trouve les enzymes détectées et l'aspect des colonies suivants les différents milieux commercialisés.

Tableau 3 : Les enzymes détectées dans uriselect lors ECBU.

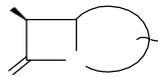
Enzyme détectée Réaction chromogénique et milieu commercialisé	Espèces ou groupe d'espèces bactériennes			
	<i>E.coli</i>	Groupe Klebsiella, <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Citrobacter</i>	Groupe: Proteus* <i>Morganii</i> , <i>Providencia</i>	<i>Enterococcus</i>
β-D-glucuronidase (1) → colonie rose	+	-	-	-
β-D-galactosidase (2) → colonie rose	+	+	-	-
β-D-glucosidases (3) → colonie bleue	-	+	-	+
Tryptophane déaminase (4) → pigmentation beige de la gélose	-	-	+	-
Uriselect 4 Enzymes 2+3+4	Rose	violé	beige	Bleu
CHROMagar Orientation^R Enzymes 2+3+4	Rose	violé	beige	Bleu
CPS ID 3^R Enzymes 1+3+4	Rose	Bleu	beige	Bleu
Chromogenic UTI medium^R Enzymes 2+3+4	Rose	violé	beige	Bleu

Le milieu chromogène est très sensible au rayon UV (rayon du soleil).

Annexe 06

Structure des β -talactamines :

R-HN



N

O

Cycle β -lactame



N

O

COOH

Pénicilline
s

Pénicilline

G

Ampicillin

e

Oxacilline

Ticarcilline

Pipéracillin

e



N

O

2

2
COOH

Céphalosporines

plusieurs générations

C1G- Aztréo

Céfalotine

C2G-

céfamandole

C3G-

céfotaxime

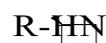
C4G-

céfépime

C5G-

ceftobiprole

OH



R1

N

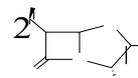
O

N

R

O

R



O

COOH

Carbapénèmes

Imipénème Méropénème

Ertapénème Doripénème

Monobactames

azetroname

Figure 03 : Structures et classification des β -talactamines

LES MECANISMES DE RESISTANCE DES B-LACTAMINES

- 1- Inactivation de l'antibiotique : β -lactamases +++
- 2- Imperméabilité / efflux
- 3- Implication directe des cibles des β -lactamines
rare chez les bactéries Gram négatif

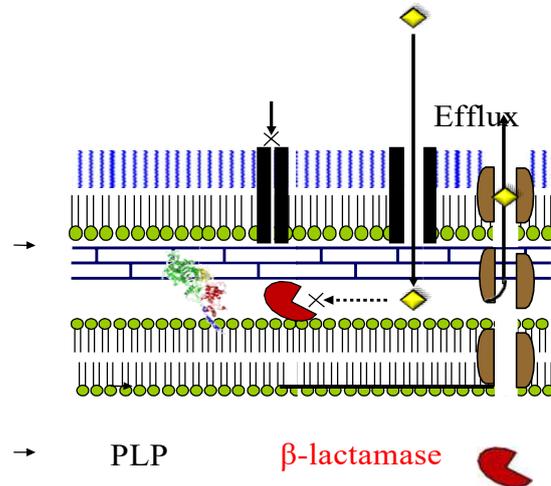
β -lactamine

Modification des porines

Membrane externe

Peptidoglycane

Espace périplasmique



Membrane cytoplasmique

Figure 04: Principaux mécanismes de résistances au β - lactamine.

Tableau 4 : principaux mécanismes de résistances des Entérobactéries. [107]

Organisme	Phénotype de résistance	Mécanisme de résistance	Action <i>in vitro</i> de l'antibiotique
Enterobacteriaceae (<i>E. cloacae</i> complex , <i>K. pneumoniae</i>)	Pénicilline, céphalosporine Mono-bactame	E.BLSE	carbapénème. Clavulanate (inhibiteur des β -lactamase) Céftolazone-tazobactame
	Carbapénèmes et autres β -lactamines	Carbapénémase classe A : serine β - lactamases : kPC et pénicillinases MBL : KPC, NDM et classe D :Oxacillinase OX48	Aminoside polymixine E (colistine) Tigécycline- méro-pénème- vabobactam (active KPC) Céftazidime -avibactam (active classe A et D – β - lactamases, non active, MBL et NDM) Parfois combinaison de deux , trois antibiotiques
	Résistance à toute la famille bétalactamines, inclus les carbapénème et fluoroquinolones	β -lactamases Ampc, pompe efflux, et mutation porine mutation gyr A et par C plasmide , gène qnr	/

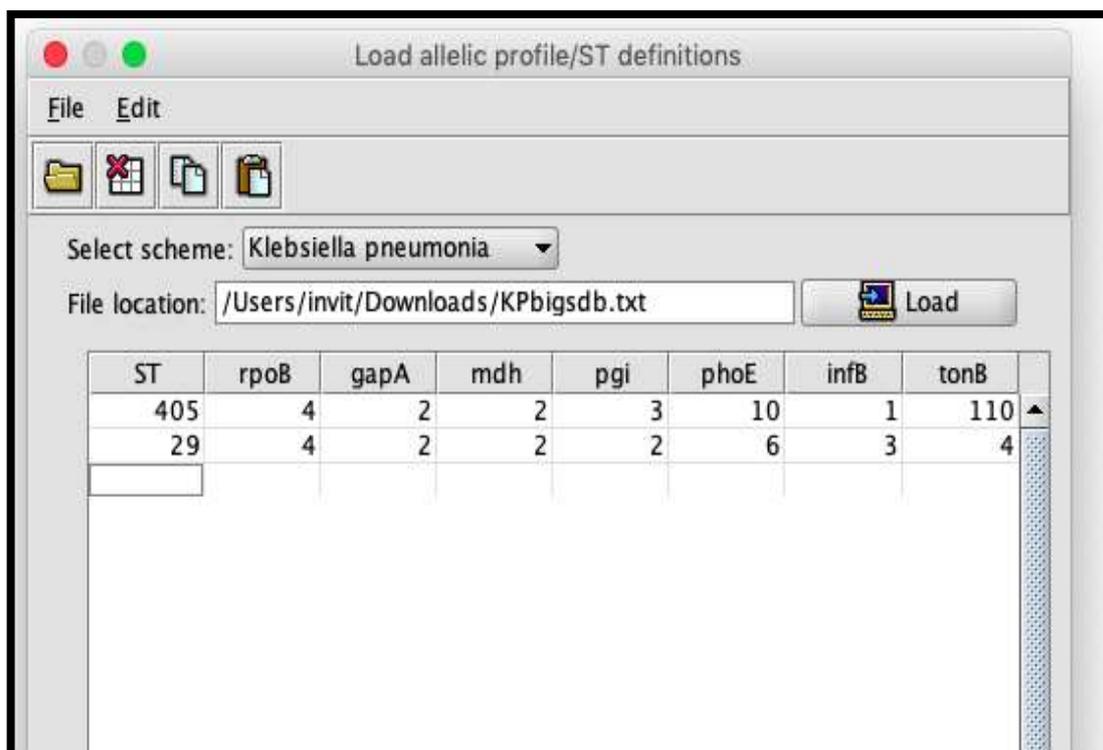
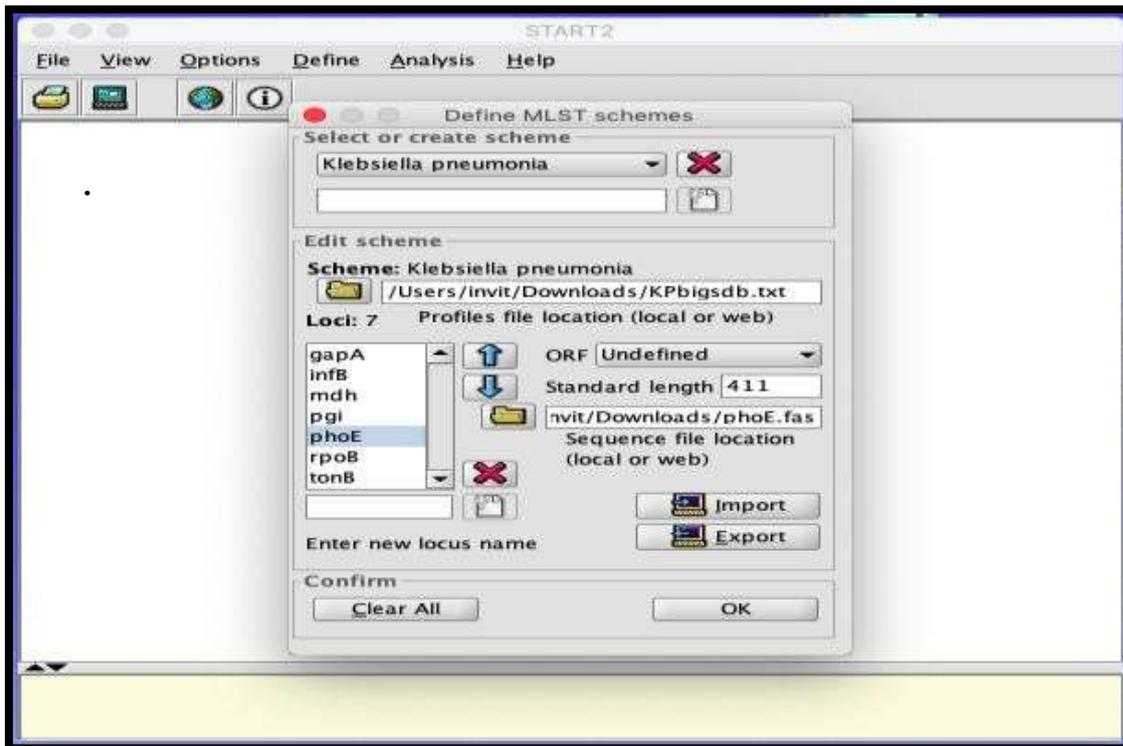


Figure. 06: Exemple d'utilisation du logiciel START2 via GLS .
 (Written by Keith Jolley Copyright © 2005-2009, University of Oxford.)

Annexe 08

La métagénomique

Principe de l'arbre phylogénétique de la métagénomique

L'analyse de parcimonie maximale des taxons a été déduite en utilisant la méthode de parcimonie maximale. L'arbre le plus parcimonieux avec une longueur = 5273 est montré.

L'indice de cohérence est 0,236677 (0,235372), l'indice de rétention est 0,584409 (0,584409), et l'indice composite est 0,1338316 (0,137554) pour tous les sites et les sites informatifs sur la parcimonie (entre parenthèses). L'arbre MP a été obtenu en utilisant l'algorithme *Subtree-Pruning-Regrafting* (SPR) (Nei M. et al., 2000) avec un niveau de recherche 0 dans lequel les arbres initiaux ont été obtenus par addition aléatoire de séquences (10 répétitions). Cette analyse a impliqué 55 séquences de nucléotides.

Il y avait un total de 467 positions dans l'ensemble de données final. Des analyses évolutives ont été menées dans MEGA X (Kumar S et al., 2018).

Les principales étapes de la métagénomique

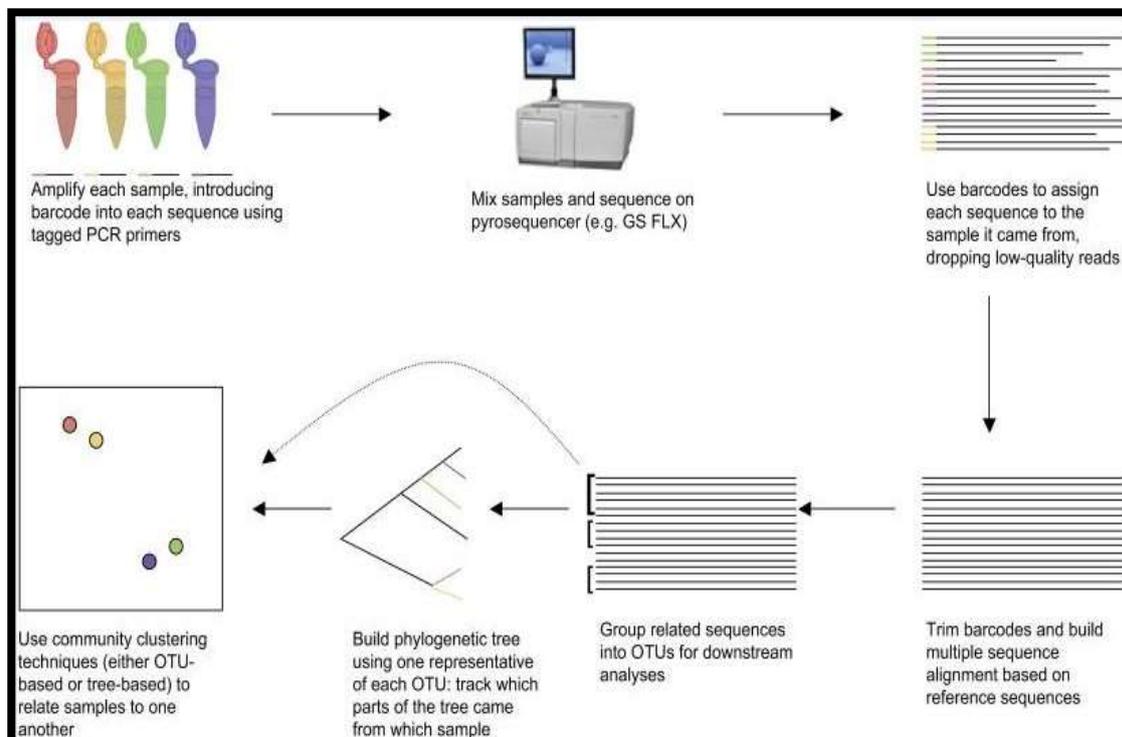


Figure 07 : Principe général de la métagénomique

Trois types d'organismes ne peuvent pas être capturés par le séquençage de l'ARNr 16s : les eucaryotes, certains *archaea*, et quelques eubactéries très nouvelles et uniques. Alors qu'on pense souvent aux eucaryotes comme à des organismes plus grands, une grande diversité de protistes, y compris d'importants organismes comme *Giardia ambia* et *Entamoeba histolytica* sont des micro-organismes eucaryotes qui peuvent être présents dans les échantillons environnementaux ou de microbiome(urobiome). Pour les capturer, la sous-unité de l'ARN ribosomal eucaryote 18S doit être séquencée. Le séquençage des 16S, 18S ou de toute autre région spécifique (séquençage ciblé) est beaucoup plus simple que le séquençage du métagénome entier (décrit ci-dessous), car l'amplification se fait simplement par PCR sur la base de la région hypervariable ou d'autres régions choisies pour l'analyse. Le NGS est toujours utilisé pour le séquençage, mais la seule région séquencée sera la région ciblée amplifiée à partir du gène de l'ARN ribosomal.

Prétraitement, simulation de données et erreur de correction

Des étapes de prétraitement ont lieu entre le séquençage de votre environnement ou échantillon de microbiome et avant de commencer la phase d'alignement et d'analyse (en réalité, cependant, la plupart des bioinformaticiens exécuteraient une analyse métagénomique sans prétraitement, afin d'avoir une idée de ce à quoi les données ressemblent quand elles sont « en désordre ». Ensuite, ils peuvent décider des étapes de prétraitement appropriées pour l'ensemble des données). En *whole metagenomics*, les analyses, les adaptateurs de séquençage doivent être nettoyés des lectures, et les données lues doivent être converties dans un format pouvant être utilisé par des algorithmes bioinformatiques. Le nettoyage des lectures avant l'analyse augmente la probabilité qu'une lecture s'aligne et réduit la probabilité que des erreurs de séquençage soient confondues avec des SNP. En outre, pour l'ensemble de l'analyse du métagénome, la correction des erreurs est utile, car le NGS produit des millions de lectures et le processus de séquençage génère des erreurs dans ces lectures. La section T-BioInfo Metagenomics/Microbiome comprend quatre prétraitements d'algorithmes : CleanPrimer, Slice Genome, PCR clean et SampleSize. Il comprend un seul algorithme de simulation de données métagénomiques, simulateR. Pour la correction des erreurs, la plateforme comprend quatre choix : eMER, CORAL, ECHO et RACER. eMER utilise une couverture kmerprocessus pour corriger les erreurs dans les données NGS. Environ 75 % de toutes les erreurs de séquençage peuvent être corrigées grâce à ces algorithmes pour les utiliser dans les propres projets de recherche car ils peuvent aider à améliorer la qualité des données.

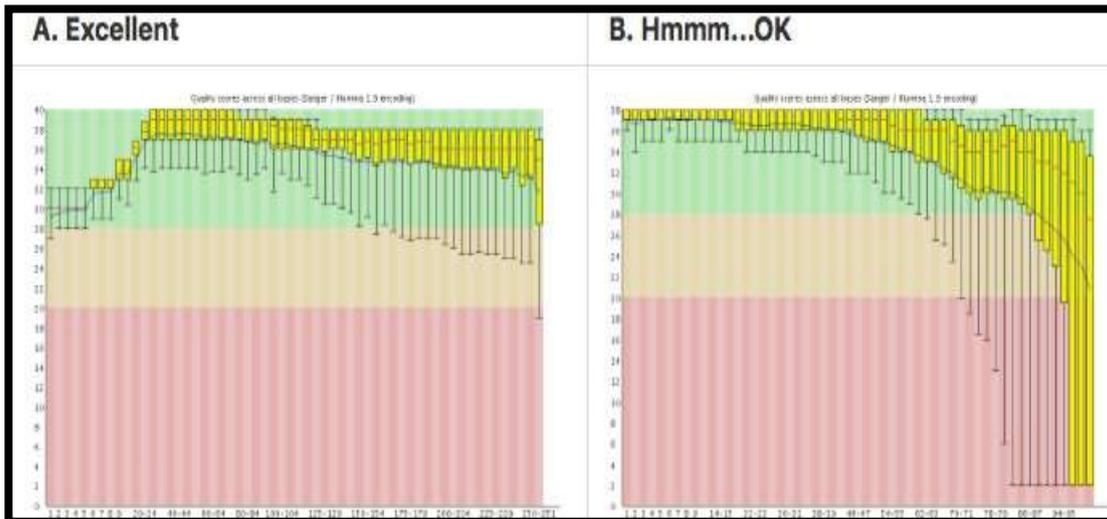


Figure 08 : Contrôle de la métagénomique.

Nous avons ici les rapports de qualité de base FastQC pour deux jeux de données : A et B. Le jeu de données A lectures longues (250 pb) est un profil de très bonne qualité, sans aucune qualité inférieure à un score phred de 30 (précision de 99,9 %). L'ensemble de données B est mauvais, avec des extrémités plongeant en dessous d'un score phred de 20 (99 % précis). Le B lit, qui comprend une moyenne d'un appel de base incorrect pour 100 bases, peut nécessiter un ajustement par d'autres moyens.

Mappage a une base de données de référence : les données 16S. La première étape de calcul principale d'un ADN 16S est la base d'analyse métagénomique qui consiste à mettre en correspondance les données de séquence avec une base de données de référence de procaryotes. Une bonne base de données, à cet effet, est un Green genes, une base de données complète développée à l'origine par les Lawrence Berkeley Labs et maintenant administrée par un consortium international d'institutions universitaires et gouvernementales. La métagénomique/microbiome réseau de pipelines comprend quatre options d'algorithme pour la cartographie :

– SeqAlignGPU, Bowtie2Align, BWAAAlign et StarAlign. Génération de la table d'abondance : La plateforme T-BioInfo utilise un seul algorithme propriétaire pour la création de l'abondance table, PosCount. PosCount crée une table, appelée United Table, qui reflète le nombre des lectures qui correspondent à la base de données et à quelles espèces ils correspondent. Autres algorithmes : un certain nombre d'autres algorithmes peuvent être choisis comme options dans le pipeline de métagénomique réseau. Il s'agit notamment d'algorithmes

de *biclustering* et de *clustering*. Ces algorithmes peuvent être utiles pour les nouveaux génomes – au lieu d'utiliser une base de données de référence, les séquences sont regroupées en OTU sur la base de la similitude, sans égard pour les génomes précédemment annotés.

Post-traitement et analyse : Les tâches de post-traitement et d'analyse comprennent l'élimination des lectures non significatives, la quantile normalisation, la correction des effets par lots, l'analyse des composants principaux, les coordonnées principales. L'analyse et les résultats d'analyse de l'exploration de données. Nous allons passer en revue tous ces éléments, sauf l'effet de lot correction lors de notre projet pratique. De plus, l'analyse des coordonnées principales (PCoA), qui est également appelée analyse multidimensionnelle classique, mise à l'échelle Torgerson ou mise à l'échelle Torgerson-Gower, commence par une matrice de similarité ou matrice de dissimilarité (également appelée matrice de distance) et est attribué, pour chaque élément, un emplacement dans un espace de faible dimension, par exemple sous forme de graphique 3D. PCoA est similaire à PCA, mais il considère les dissemblances spécifiquement, tandis que l'ACP se concentre sur les similitudes.

Aussi, alors que PCA ne considère qu'une seule métrique, PCoA peut en considérer plusieurs, souvent plus sophistiquées, métriques. Il en résulte un tracé de « plus haute résolution » qui peut différencier des échantillons, sur la base de fines différences, que l'ACP continuerait de regrouper sur la base de similitudes.

Pour ces raisons, PCoA peut souvent différencier les clusters que PCA ne peut pas détecter, et il est donc particulièrement utile en métagénomique.

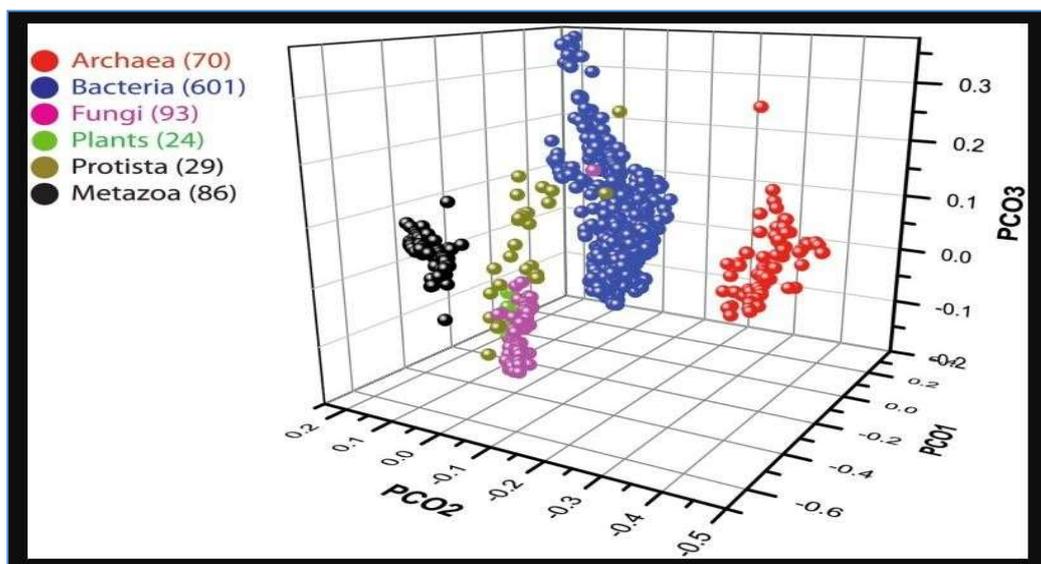


Figure 09 : Représentation graphique des taxons dans la métagénomique

Annexe 09

Les espèces retrouvées à la métagénomique dans la pyurie pyélique

Tableau5 : Représentation des espèces bactériennes après analyse bioinformatique.

Denovo	Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	METAG 0013GLS
4	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Actinomycetaceae	Schaalia	Schaalia odontolytica	2 311
11	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	Corynebacterium	Corynebacterium amycolatum	402
17	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	Corynebacterium	Corynebacterium pyruviciproducens	271
9	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	Corynebacterium	Corynebacterium tuberculostearicum	417
1	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	Curtobacterium	Curtobacterium flaccumfaciens	4 931
53	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	Micrococcus	Micrococcus luteus	6
36	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	Rothia	Rothia mucilaginosus	26
44	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Propionibacteriales	Propionibacteriaceae	Cutibacterium	Cutibacterium acnes	28
20	Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides	Bacteroides acidifaciens	186
28	Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides	Bacteroides fragilis	95
32	Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	Prevotella oris	43
25	Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	Prevotella timonensis	332
	Bacteria	Cyanobacteria		Oscillatoriales	Oscillatoriaceae	Aerosakkonema	Aerosakkonema funiforme	457
7	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales		Gemella	Gemella morbillorum	936
23	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus wiedmannii	98
54	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus	Paenibacillus mobilis	3
26	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	Staphylococcus	Staphylococcus epidermidis	330
41	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Aerococcaceae	Abiotrophia	Abiotrophia defectiva	16
34	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	Enterococcus	Enterococcus lactis	47
27	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus	Streptococcus gordonii	161
3	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus	Streptococcus intermedius	7 219
22	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Lachnoclostridium	[Clostridium] scindens	129
33	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Peptostreptococcus	Peptostreptococcus stomatis	61

8	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Faecalibacterium	Faecalibacterium prausnitzii	382
48	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Ruminococcus	Ruminococcus bromii	13
40	Bacteria	Firmicutes	Negativicutes	Veillonellales	Veillonellaceae	Dialister	Dialister propionicifaciens	44
10	Bacteria	Firmicutes	Negativicutes	Veillonellales	Veillonellaceae	Veillonella	Veillonella parvula	571
42	Bacteria	Firmicutes	Tissierellia	Tissierellales	Peptoniphilaceae	Finegoldia	Finegoldia magna	46
21	Bacteria	Firmicutes	Tissierellia	Tissierellales	Peptoniphilaceae	Peptoniphilus	Peptoniphilus grossensis	99
37	Bacteria	Fusobacteria	Fusobacteriia	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium	Fusobacterium nucleatum	42
15	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylobacteriaceae	Methylobacterium	Methylobacterium phyllostachyos	160
39	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Geminicoccaceae	Arboricoccus	Arboricoccus pini	25
35	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas	Sphingomonas olei	55
43	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Comamonas	Comamonas aquatica	21
52	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Shewanellaceae	Shewanella	Shewanella seohaensis	3
19	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	Enterobacter	Enterobacter cloacae	426
5	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	Escherichia	Escherichia fergusonii	1 511
24	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	Escherichia	Escherichia marmotae	120
0	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Morganellaceae	Morganella	Morganella morganii	26 503
2	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Morganellaceae	Proteus	Proteus mirabilis	5 084
14	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Morganellaceae	Providencia	Providencia thailandensis	278
38	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Yersiniaceae	Serratia	Serratia liquefaciens	84
30	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Nevskiales	Sinobacteraceae	Nevskia	Nevskia persephonica	96
12	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	Acinetobacter johnsonii	924
18	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	Acinetobacter variabilis	194
16	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Moraxella	Moraxella osloensis	298
29	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas glareae	156
31	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	[Pseudomonas] hibiscicola	202
							Other	201

R! Le vide dans la figure représente des taxons non trouvé dans la base de données.

Annexe 10

Projet du séquençage du génome complet :

Le principe général du séquençage du génome complet (ou WGS) se résume comme suit : Préparation témoin (Préparation témoin), pour la construction de bibliothèque, DNA/RNA est extrait à partir d'un échantillon. Après exécution du contrôle de qualité (QC), l'échantillon passé est procédé à la construction de bibliothèque.

La construction de la bibliothèque de séquençages est préparée par la fragmentation aléatoire de l'échantillon d'ADN ou de cDNA, suivie par ligature de l'adapteur 5' et 3'.

Le séquençage pour la génération de faisceau : la bibliothèque est chargée dans une cellule de débitmètre où des fragments sont capturés sur une surface (pelouse) abritant les oligonucléotides complémentaires aux adaptateurs de bibliothèque. Chaque fragment est alors amplifié dans des faisceaux distincts et clonaux par l'amplification de pont.

Quand la génération de faisceau est complète, les calibres sont prêts pour le séquençage par technologie d'Illumina SBS miseq qui utilise une méthode terminateur basée réversible de propriété industrielle qui détecte de simples bases comme ils sont incorporés aux rives de calibre d'ADN. En tant que technique réversibles-terminateurs-bondissant, les d'NTPs sont présents pendant chaque cycle de séquençage, réduit au minimum la polarisation d'incorporation et réduit considérablement des taux d'erreur crus comparés à d'autres technologies. Le résultat du séquençage est précis de base-par-base qui élimine presque entièrement des erreurs ordre-contexte-spécifiques, de même qu'en dedans des régions répétées et d'ordre homopolymère.

Les données biologiques du séquençage sont converties en données brutes par l'analyse bioinformatique par plusieurs programmes utilisés dans l'analyse :

FastQ <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastq>.

<http://www.usadellab.org/cms> et [//qb.cshl.edu/genomescope](http://qb.cshl.edu/genomescope).



Figure 10 : Principe général du séquençage du génome complet (WGS).

Les étapes du séquençage du génome complet (plateforme Macrogen)

Le flux de travail simplifié du système MiSeq permet un temps de traitement rapide qui convient à un système de séquençage de nouvelle génération. Les bibliothèques (database) peuvent être préparées avec la trousse de préparation de bibliothèques Nextera. La durée de séquençage de 5,5 heures comprend le temps nécessaire à la génération d'amplifiats, au séquençage et à la définition des bases dont la qualité est notée, ainsi qu'une imagerie à double surface utilisée pour l'analyse de 2×25 paires de bases sur le système MiSeq, à l'aide du logiciel de commande MiSeq.

Contrôle qualité du séquençage du génome complet

Le tracé de qualité par séquence de base généré par FastQC a été utilisé pour vérifier la qualité des données produites. Ce graphique montre la qualité moyenne à chaque cycle. L'axe des abscisses et l'axe des ordonnées sont respectivement le nombre de cycles, et le score de qualité de phred en couleur. Score de phred à 20 signifie une précision de 99 % et les lectures avec un score de qualité supérieur à 20 sont généralement acceptées comme lectures de bonne qualité.

Ligne jaune : Intervalle interquartile (25-75 %) du score phred à chaque cycle. **Ligne rouge :** médiane du score phred à chaque cycle. **Ligne bleue :** moyenne du score phred à chaque cycle. **Fond vert :** bonne qualité. **Fond orange :** qualité acceptable. **Fond rouge :** mauvaise qualité.



Figure. 11 : Contrôle qualité ou assurance qualité du séquençage du génome complet

Voici un exemple de la présentation des résultats de l'enzyme urease dans le tableau 6 annotation fourini apres analyse bioinformatique par la plateforme moléculaire de macrogen.

Tableau 06 :annotation du séquençage du génome complet d' *Enterobacter haermachii*

Urease accessory protein UreD	399742.Ent638_3463	COG0829	Required for maturation of urease via the functional incorporation of the urease nickel metallocenter (By similarity)
Urease subunit gamma	399742.Ent638_3464	COG0831	Urea amidohydrolase subunit gamma
Urease subunit beta	399742.Ent638_3465	COG0832	Urea amidohydrolase subunit beta
Urease subunit alpha	640513.Entas_3738	COG0804	Urea amidohydrolase subunit alpha
Urease accessory protein UreE	469595.CSAG_02867	COG2371	enzyme active site formation
hypothetical protein	76869.PputGB1_2933	ENOG4111WID	(urease) accessory protein
Urease accessory protein UreF	399742.Ent638_3468	COG0830	Required for maturation of urease via the functional incorporation of the urease nickel metallocenter (By similarity)
Urease accessory protein UreG	500640.CIT292_10863	COG0378	Facilitates the functional incorporation of the urease nickel metallocenter. This process requires GTP hydrolysis, probably effectuated by UreG (By similarity)

Annexe 11

Principales étapes de l'ECBU DANS LA CRISTALLURIE

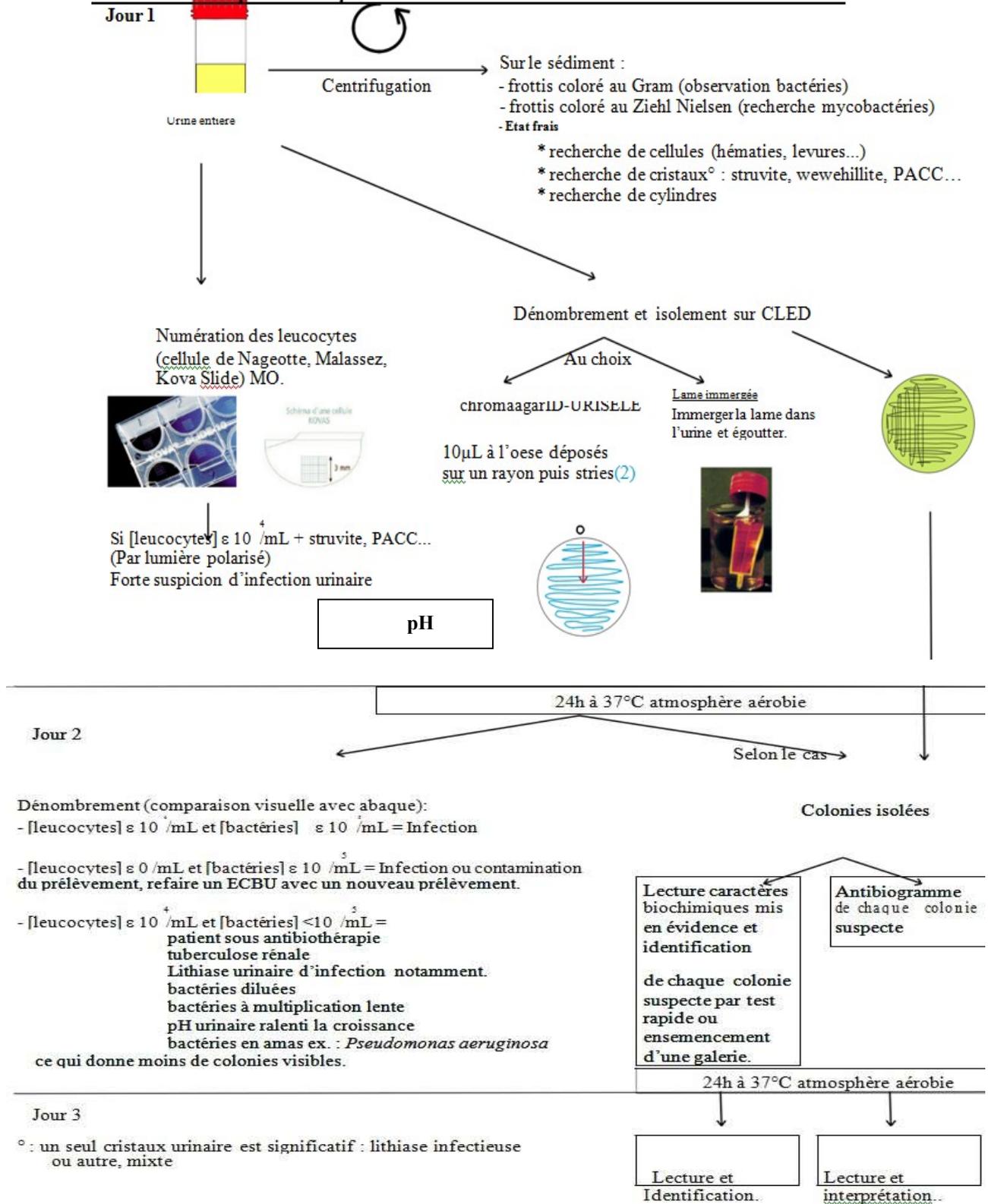


Schéma. 01 : Logigramme de l'ECBU (ECBUP) et de la cristallurie dans l'exploration de l'infection-colonisation urinaire liées à la lithiase d'infection

Annexe 12

Le système Xpert MTB/RIF est une application spécifique pour la tuberculose, dans les expectorations, urine avec un test donnant les résultats en deux heures. L'analyse comporte trois étapes manuelles : l'addition du réactif à l'échantillon pour inactiver les bacilles, le transfert de 2 ml dans la cartouche et le chargement de la cartouche dans l'appareil pour le test. Toutes les étapes ultérieures sont automatisées. Le test peut être fait directement sur un échantillon clinique d'expectorations ou sur un pellet concentré et décontaminé. La méthode est décrite ci-dessous,



Figure (photos)12 : PCR temp réel Gène-expert® (HCA.2016)

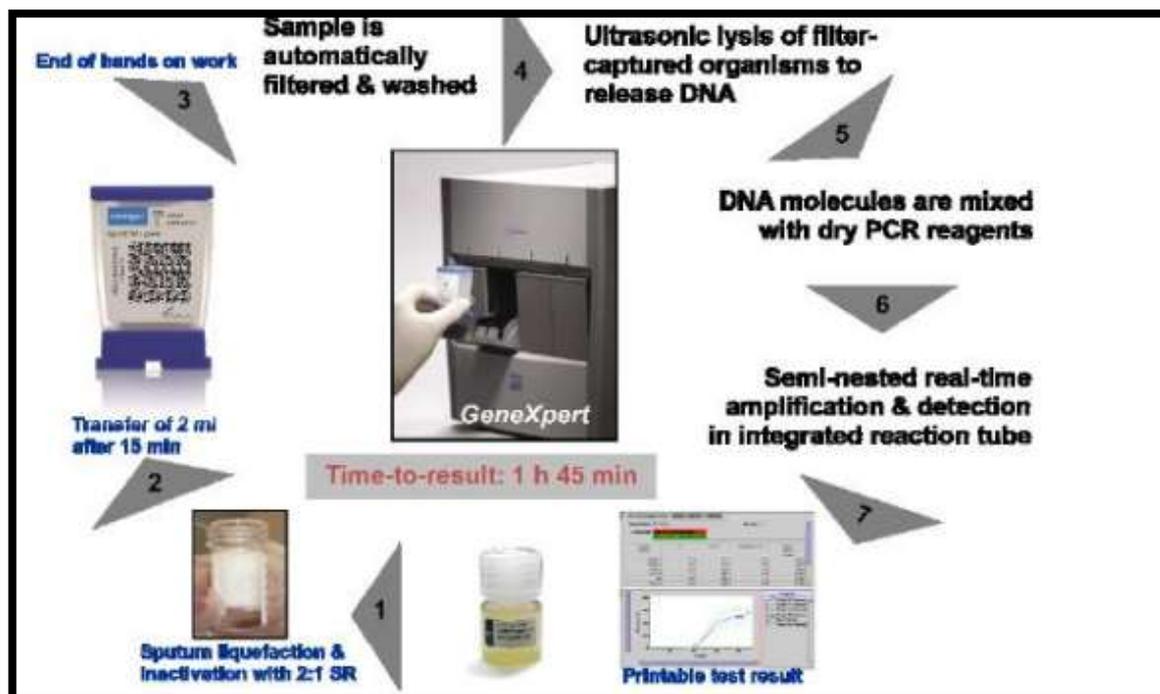


Figure 13 : PCR tuberculose urinaire par test Gène-Xpert UTB.

Inactivation de l'urine avec le réactif dans un rapport de 2/12. Transfert de 2 ml après 15 minutes ; 3. Fin des manipulations. Filtration et rinçage automatiques de l'échantillon ; 4. Concentration des bacilles et élimination des inhibiteurs Lyse par ultrasons des micro-organismes capturés sur le filtre pour libérer l'ADN ; 5. Mélange des molécules d'ADN avec les réactifs lyophilisés pour la PCR ; 6. Amplification semi-nichée en temps réel et détection dans le tube à essai intégré ; 7. Résultats du test imprimables. Délai d'obtention des résultats : 1 h 45.

Principe :

Il se fonde sur une PCR semi-nichée en temps réel amplifiant le gène cible *rpoB*. Les balises moléculaires utilisant de nouveaux fluorophores et des inhibiteurs sont employées pour détecter l'hybridation de chacune des cinq régions ciblées amplifiées du gène. *Bacillus globigii*, un micro-organisme sporogène du sol est utilisé comme témoin pour l'ensemble du processus, servant de contrôle de la qualité pour le piégeage des bactéries, la lyse bactérienne, l'extraction de l'ADN, l'amplification et la détection de la sonde. Le test Xpert MTB/RIF a été conçu pour être robuste et facile d'emploi. Les cartouches et le réactif doivent être conservés à 2-28 °C suivant les recommandations du fabricant. Les cartouches sont préchargées avec tous les réactifs nécessaires pour le traitement de l'échantillon, l'extraction de l'ADN, l'amplification et la détection au laser de l'amplicon ciblé fixé sur les balises moléculaires. La température ambiante maximale pour le fonctionnement de l'instrument GeneXpert est actuellement limitée à 30°C. Le test a été conçu pour que son utilisation soit sûre dans les laboratoires de microscopie qui ne disposent pas en général d'enceintes de sécurité biologique.

Le réactif pour le traitement de l'échantillon est un mycobactéricide qui tue rapidement *M. tuberculosis* au cours du processus de liquéfaction, et des études ont confirmé **qu'aucune aérosolisation des mycobactéries ne se produisait pendant le fonctionnement de l'appareil** (webographie.2019).

Annexe 13

FICHE DE SUIVI DE PRELEVEMENT
CRISTALLURIE

Dr. BERRAHAL / 0671 830979

Service de microbiologie médicale et Anatomopathologie.

HCA

NUMERO DE FICHE :.....

Mme/Melle/Mr :.....Prénom :.....

Date de naissance :.....

Adresse :

n° tél. :

Prescripteur :.....

-Prenez-vous actuellement des **antibiotiques** ? OUI NON

Nom de l'antibiotique :

Prenez-vous actuellement d'autres **médicaments** ? OUI NON

Nom du ou des médicament(s) :

-Etes-vous atteint d'une **anomalie du tractus urinaire ou du rein** ? OUI NON

Nom de l'anomalie si vous la connaissez :

-Cette analyse est réalisée car vous avez déjà « fait » des **calculs urinaires** : OUI NON

Si oui, «Faites»-vous fréquemment des calculs urinaires ? OUI NON préciser combien par an :.....

-Faites»-vous fréquemment des **infections urinaires** ? OUI NON

Si oui, préciser combien par an :.....

-Vous avez une **maladie rénale** ou non **prédisposant à l'apparition de calcul urinaire** ? OUI NON

Nom de la maladie:

MODALITES DU RECUEIL

premières urines du réveil , deuxièmes urines du matin , autre modalité, préciser :...

Intérêt : La cristallurie est un examen direct de l'urine lors d'ECBU qui, permet d'apprécier le risque potentiel de lithiase urinaire pouvant être secondaire à une infections urinaire compliquées liées à germes urealytique ou non ou de suivi de la récurrence de calculs urinaires.

Préconisations pour le prélèvement :

Remarque : pour réaliser cet examen dans les conditions optimales, il faut recueillir les premières urines **du matin**

- Se laver les mains

-Respecter les consignes suivantes :

1-ouvrir le flacon

2-commencer à uriner dans les toilettes (cela contribue à laver la partie inférieure de l'urètre)

3-stopper le jet

4-recueillir le milieu du jet dans le flacon stérile

5-finir d'uriner dans les toilettes.

6-refermer le flacon soigneusement et hermétiquement

IMPORTANT

-Identifier le flacon en inscrivant votre nom, prénom, date de naissance ainsi que la date et l'heure du recueil sur l'étiquette collée ou autres (sparadrap...) sur le flacon.

-Couvrir Le Flacon : avec du papier aluminium ou autres.

-Remplir Complètement La Fiche De Renseignement.

-Apporter le flacon au laboratoire rapidement (\leq 02 heure) à une température supérieure à 20°C.

Le flacon ne doit pas être conservé au réfrigérateur.

Annexe 14

Fiches - dossier de malades pris en charge pour lithiase urinaire d'infection. (2015-2016)

I. DATE D'ADMISSION

II. IDENTITE

Nom et prénom :..... N° fiche :.....

Sexe:..... N° dossier :.....

Age:..... N° tel :.....

Profession :..... Région ou wilaya :

II. Habitudes alimentaires

III. ATCDS personnels

Oui

Non

Diabète :

HTA :

Tuberculose :

Co-sanguinite

Chirurgie urologique :

Si oui laquelle :.....

Autre chirurgie

Si oui laquelle :.....

Pathologie lithiasique dans la famille :

Infection urinaire à répétition :

IV. MOTIF D'HOSPITALISATION :.....

V. VOIE D'HOSPITALISATION

Urgences :

Consultation

VI. DIAGNOSTIC

Circonstances de découverte :

Découverte fortuite : Oui Non

Lombalgies : Oui Non

Crise (s) de colique néphrétique : Oui Non

Pollakiurie : Oui Non

Brulures mictionnelles : Oui Non

Hématuries : Oui Non

Sabliurie / émission de calcul : Oui Non

Fièvre : Oui Non

Complications : Non , si oui , les quels :

Délai de consultation :.....

Examen clinique :.....

Examen général :

-Etat général : Score ASA : 1 2 3 4 5

Conjonctives : NC LDC DC

Fièvre : Oui Non

Examen urologique : Oui Non

Sensibilité des fosses lombaires : Oui Non

Contact lombaire : Oui Non

Signe de Girondo : Oui Non

Autre : Non , Si Oui , les quels : ...

Diagnostic radiologique :

ASP : Oui Non

Siege : Gauche Droit Bilatéral

Complexe : Oui Non

Radio-opaque oui non ; Radio-transparent oui non

Autres localisation : Non , Si Oui les quels :

UIV : Oui Non

Rein intact : oui non , Rein muet : Oui non

Amincissement du parenchyme rénal : oui non

Autres : si oui , les quels :

L'échographie :

Retentissement en amont : Oui non

Dilatation des cavités pyélocalicielles : Oui non

Amincissement du parenchyme rénal : Oui non

Malformation rénale : Oui non

La tomodensitométrie (TDM) : ...Oui........ non......

Autres :

. Bilan biologique :

NFS :

Date	GR	Hb	HCT	CCMH	VGM	GB	Neut	Ly	Eo	Pq
-										
-										

BHE :

Date	Urée	Créat	Glyc	Na	K	Cl	Ca	Bicar	Prot
-									
-									

Bilan d'hémostase :

Date	TP	TCA	TS	Fibrinogène

Bilan de la Microbiologie médicale.

-PH urinaire : -acide : oui et PH = , non ,

-Alcalin oui e PH = , non

-Densité urinaire : oui non

et DT =

-Cristallurie : Ctx oxalate de calcium dihydrate wedhelite : oui non

Ctx d oxalate de calcium monohydrate wewehilite : oui non

Ctx de burchite : oui non

Ctx de phospho-amoniaco-magnesium (Struvite) : oui non

Ctx d'acide urique (amorphe et /ou dihydraté) : oui non

Ctx de cystine : oui non

Et autres :

-ECBU PRE-OPERATOIRE

- Stérile : oui non , - Infecté : oui non

-Ex.direct (urised Max) :...

-Culture : positive négatif

-Colonisée : oui non

-Ecologie bactérienne (si colonise ou infecté) :

-Test de sensibilités aux Antibiotiques (Antibiogramme)

- BLSE :

-CARBAPENEMASE :

-MRSA :

-ECB de l'urine pyelique après fragmentation

- Stérile : oui non , - Infecté : oui non

-Ex.direct (urised Max) :...

-Culture : positive négatif

-Ecologie bactérienne (si infecté) :

- urease positive urease négative

-Famille :

-Genre et espèce

-Test de sensibilités aux Antibiotiques (Antibiogramme)

-Antibiotique sensible (DCI) :

-Antibiotique résistant (DCI) :

-BLSE :

-CARBAPENEMASE :

-MRSA

-EB du calcul urinaire(Stamey méthodes)

- Stérile : oui non , - Infecté : oui non

-Culture : positive négatif

-Ecologie bactérienne (si infecté) :

- urease positive urease négative

-Famille :

-Genre et espèce

-Test de sensibilités aux Antibiotiques (Antibiogramme)

-Antibiotique sensible (DCI) :

-Antibiotique résistant (DCI)

-BLSE :

-CARBAPENEMASE :

-MRSA

ECBU post opératoire (24H)

-Stérile : oui non , - Infecté : oui non

-Ex.direct (urised Max) :...

-Culture : positive négatif

-Ecologie bactérienne (si infecté) :

- urease positive urease négative

-Famille :

- Genre et espèce
- Test de sensibilités aux Antibiotiques (Antibiogramme)
- Antibiotique sensible (DCI) :
- Antibiotique résistant (DCI) :
- BLSE :
- CARBAPENEMASE :
- MRSA :

VII. TECHNIQUES CHIRURGICALES

Date opératoire :.....

Type d'intervention :

Lithotripsie extra corporelle LEC :

L'urétéroscopie souple ou rigide

Néphrolithotomie percutanée

Mise en place d'une sonde JJ :

Durée :mois

Suites post-opératoires :

Immédiates et précoces : Oui Non

Simple :

Hémorragiques :

Per-opératoires :

Post-opératoires :

Thrombo-emboliques :

Infections urinaires :

Germe :.....

Sensibilité :.....

Fièvre post-op isolée :

Hémoculture : positif , négatif , contaminé , ND

Nombre de falcon :.....

Sepsis (Bactériémie) / Sepsis sévère/ choc septique :

Lithiase résiduelle (AUSP) :

Décès : précoce : tardive

Date de sortie :.....

Durée du séjour hospitalier :.....

VIII- MODALITE DU SUIVI

Examen clinique :.....

Bilan d'imagerie :.....

Bilan biologique :

Le suivi de la récurrence de la lithiase rénale par cristallurie (associées au pH et densité urinaire)

Suivi N°1 à 30 jours : Date :

Clinique :

Radio :

Cristallurie + ECBU (résultats : date des prélèvements)

Conseils donnés oui non

Statut à J30: /_ / récurrence /_ / absence de récurrence

Suivi n°2 à 60 jours : Date :

Clinique :

Radio :

Cristallurie + ECBU (résultats : date des prélèvements)

Conseils donnés oui non

Statut à J30: /_ / récurrence /_ / absence de récurrence

Suivi n° 3 à une année: Date :

Clinique :

Radio :

Cristallurie + ECBU (résultats : date des prélèvements)

Conseils donnés oui non

Statut à J30: /_ / récurrence /_ / absence de récurrence

Annexe 15

Consentement pour la métagenomique directe de la pyurie pyélique.

Nom :
Prénom :
Date de naissance :
Sexe :
N° :
Imagerie, Pharm, Administration
20190013560 A-HCA

EXAMEN DES CARACTERISTIQUES GENETIQUES A DES FI

IDENTIFICATION NOM : PRENOM : DATE DE NAISSANCE :	IDENTITE DU TITULAIRE DE L'AUTORITE PARENTALE SI MINEUR OU DU TUTEUR NOM : PRENOM :
---	--

CONSENTEMENT

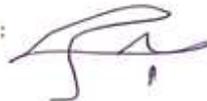
Je soussigné(e), susnommé(e), reconnais avoir été informé(e) par le Docteur sur l'examen des caractéristique génétiques suivant :

Sequençage génétique direct à partir de urée.

Cet examen sera réalisé à partir du prélèvement qui m'a été effectué du prélèvement qui a été effectué sur mon enfant mineur

Je donne mon consentement pour ce prélèvement.

Seul le médecin prescripteur ici désigné est habilité à me communiquer les résultats. Ces derniers ne seront transmis à aucun membre de ma famille. Si cette transmission apparaissait essentielle, elle n'interviendrait qu'avec mon accord.

Fait à :HCA..... Le : ..31/07/2019.. Signature : 

ATTESTATION

Je soussigné (e) Docteur atteste avoir reçu ce jour Monsieur avoir reçu son consentement et l'avoir informé(e) sur :

- les caractéristiques de la maladie recherchée,
- les résultats susceptibles d'être obtenus,
- les modalités de communication des résultats.

Fait à :HCA Le : 31/07/2019..... Signature et cachet



Dr. Z. ALBRED Z. ALB
Résidente en pédiatrie

Annexe 16

Attestation de participation à la PCR, séquençage et génotypage (bioinformatique) via START 2 de type MLST chez la start-up de biotechnologie Gène life science (GLS).



GENE LIFE SCIENCES
RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT EN BIOTECHNOLOGIE
Prestation Séquençage et Bioinformatique

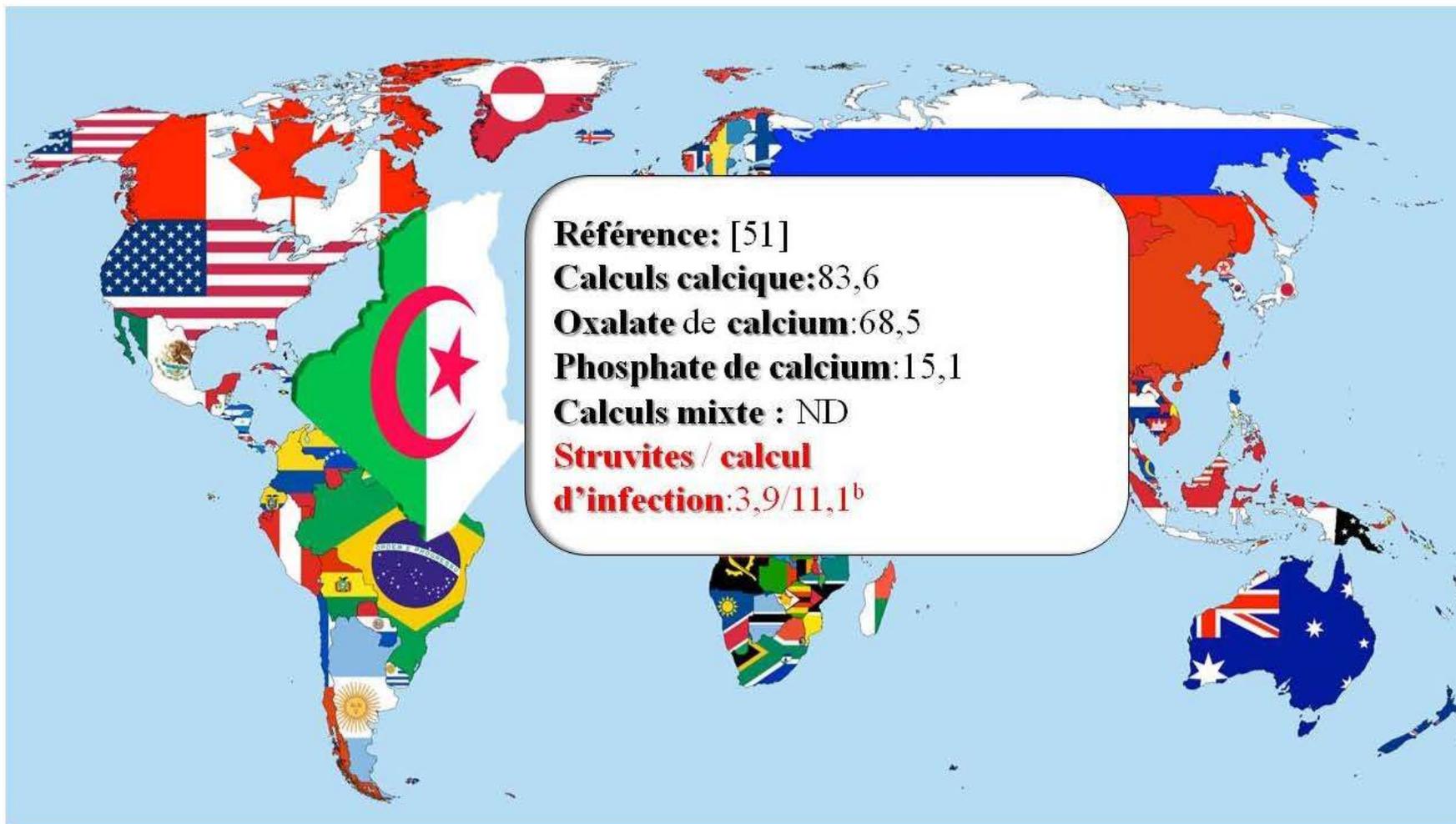
Attestation de Participation

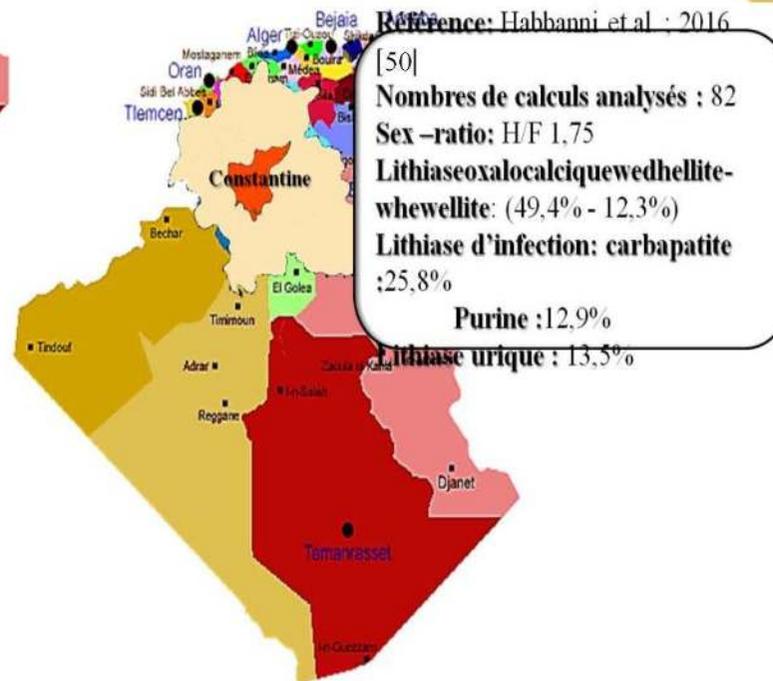
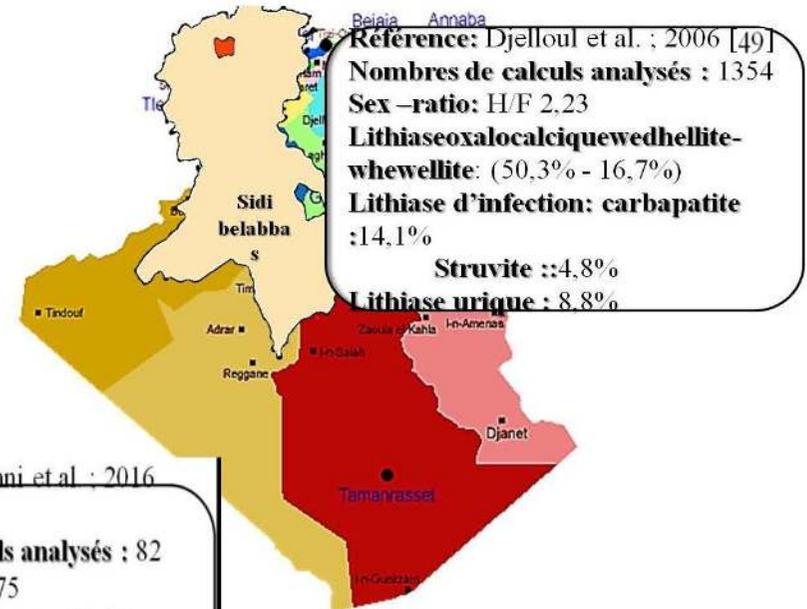
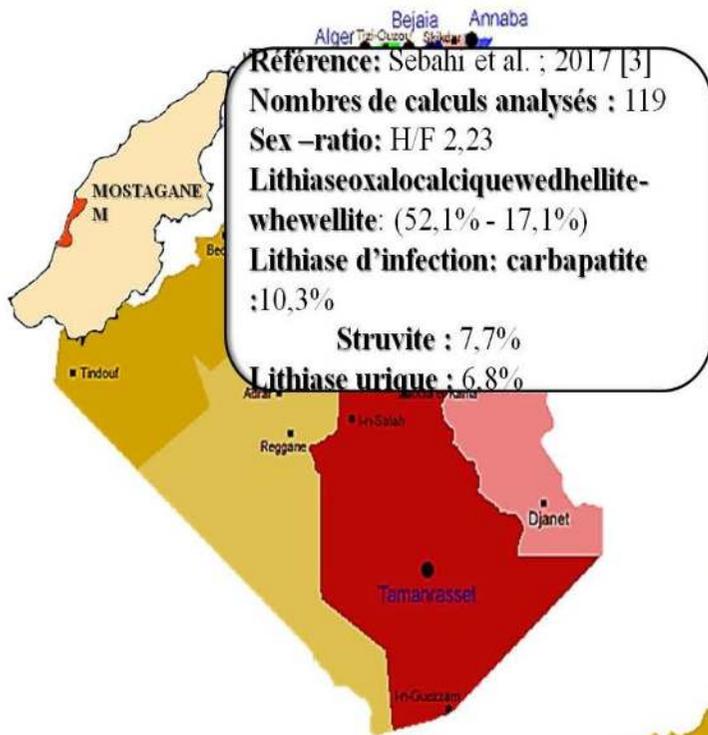
La Start-Up en Biotechnologie « Gene Life Sciences » atteste que *Dr Berrahal Mounir* (ID : 220) a participé à la préparation PCR et séquençage ainsi que la bio-informatique de type MLST des souches bactériennes pour sa thèse de Doctorat en Médecine.

RESPONSABLE SCIENTIFIQUE
DR DRICAMINE EL-MOKHTAR
GENE LIFE SCIENCES

Gene Life Sciences
Recherche et Développement en Biotechnologie
11 Bd Abdou Salam, Algiers, Algérie
R.C.N : 22700-0024409 B 18

A
A





Annexe 18

Aspect endoscopique de la lithiase urinaire en Algérie.HCA

Calcul de Struvite

