



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine 1  
Faculté des Sciences de la Nature et de la  
Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie Et Ecologie Végétale

قسم : بيولوجيا و إيكولوجيا النبات

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master**

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Ecologie et Environnement**

**Spécialité : Ecologie fondamentale et appliquée**

**Intitulé :**

---

**Isolement et identification d'entérobactéries productrices  
de BLSE chez les volailles et leur environnement  
dans la région de Constantine**

---

Présenté et soutenu par : IKHLEF Assia

Le : 12/07/2021

**Jury d'évaluation :**

Président du jury :	KARA Karima	MCA	UFMC 1
Rapporteur :	AFRI-MEHENNAOUI Fatima-Zohra	Professeur	UFMC 1
Co-encadreur :	RAHAB Hamza	MRB	C.R.Bt
Examineur :	TOUATI Laid	MCA	UFMC 1

*Année universitaire  
2020 - 2021*





الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine 1  
Faculté des Sciences de la Nature et de la  
Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie Et Ecologie Végétale

قسم : بيولوجيا و إيكولوجيا النبات

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master**

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Ecologie et Environnement**

**Spécialité : Ecologie fondamentale et appliquée**

**Intitulé :**

---

**Isolement et identification d'entérobactéries productrices  
de BLSE chez les volailles et leur environnement  
dans la région de Constantine**

---

Présenté et soutenu par : IKHLEF Assia

Le : 12/07/2021

**Jury d'évaluation :**

Président du jury :	KARA Karima	MCA	UFMC 1
Rapporteur :	AFRI-MEHENNAOUI Fatima-Zohra	Professeur	UFMC 1
Co-encadreur :	RAHAB Hamza	MRB	C.R.Bt
Examineur :	TOUATI Laid	MCA	UFMC 1

*Année universitaire  
2020 - 2021*



## **REMERCIEMENTS**

Avant tout, je remercie Dieu le tout puissant de nous m'accorder la foi, le courage, la santé et les moyens de conception de ce modeste travail  
Je tiens à gratifier les membres de jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à ma recherche en acceptant d'examiner mon travail.

J'adresse des remerciements particuliers à mon encadreur Madame «**AFRI-MEHENNAOUI FATIMA-ZOHRA**» qui m'a dirigée au cours de cet ambitieux travail.

Je tiens aussi à témoigner toute ma reconnaissance à docteur «**HAMZA RAHAB**» pour son aide dans la réalisation de ce mémoire, Son esprit critique et ces judicieux conseils ont grandement facilité la réalisation de cette étude.

Un grand remerciement à Mme. **KARA KARIMA**, MCA à l'Université Frères Mentouri Constantine 1 qui a accepté de nous honorer de présider le jury de ce mémoire. Qu'elle trouve ici l'expression de notre reconnaissance.

Mes vifs remerciements vont également à Mr. **TOUATI LAID**, MCA à l'Université Frères Mentouri Constantine 1 pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

A mes enseignants de la spécialité écologie fondamentale et appliquée de la filière écologie et environnement de l'Université frère Mentouri de Constantine.

A mon très cher mari **FAYÇAL MERDACI** : ses sacrifices, son soutien moral et matériel m'ont permis de réussir mes études.

A ma très chère amie **MEGHEZZI ASMA** qui m'a toujours soutenu, qui a été toujours là pour moi.





## ***Dédicace***

Je dédie le fruit de ce travail à la mémoire de ceux qui m'ont donné la vie, celle qui m'a donné étoile de naissance, à qui je ne rendrais jamais assez !

Maman BOUDRAA ZOULEIKHA, que DIEU te garde dans son paradis

Et

Celui qui représente l'exemple du sacrifice, du dévouement et de l'honnêteté, qui a fait de moi ce que je suis aujourd'hui ! PAPA BACHIR ,que DIEU te garde te garde dans son paradis.

A ma très chère sœur « RADIA », mes frères « REDOUENE ;MED LAMINE ,MED TAIB et IMED EDDINE », et à ma petite et grande famille " IKHLEF " et ma petite et grande belle famille « MERDACI »qui ont toujours cru en moi.

A ma plus belle histoire d'amour des que je pose mon regard sur vous ; je sais pourquoi j'existe mes enfants MED MOUNDIR SEIF ELISLEM,MERIEM

EL BATOUL et ABD EL MOUHAYMINE .

A mes très chers neveux MOUHAMED YAKINE , SAMI BACHIR , et ma trop belle nièce AZIADE NERMINE Que Dieu tout puissant vous donne longue vie, beaucoup de santé et vous préserve du mal.

A tous mes amies SAMAH , LAMIA, AMEL , ASMA,ASMA , Hiba et ROKIA pour leur présence, leur compréhension et leur bonne humeur de tous les jours.

Et à celui et ceux qui me sont très chers et qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail.

***ASSIA***



## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Sites des prélèvements réalisés dans le cadre de l'étude .....	14
<b>Tableau 2:</b> Liste des antibiotiques utilisés pour tester le profil de sensibilité des germes.....	20
<b>Tableau 3:</b> Récapitulatif des souches isolées sur milieu sélectif d'entérobactéries additionné d'antibiotiques .....	25
<b>Tableau 4:</b> Résultats de l'identification présumptive des souches isolées sur Chrom agar ....	26
<b>Tableau 5:</b> Résultats de l'identification biochimique des souches isolées par galerie API.....	27
<b>Tableau 6:</b> Résultat du profil de l'antibiogramme de la souche de référence ATCC 25922...	28
<b>Tableau 7:</b> Résultats de l'antibiogramme des souches d'E.coli isolées .....	28
<b>Tableau 8:</b> Résultats antibiogramme des souches d'Enterobacter cloacae isolées.....	30
<b>Tableau 9:</b> Résultat de la confirmation de la présence de souches d'E.coli productrices de BLSE .....	31
<b>Tableau 10:</b> Résultat de la confirmation de la présence de souches d'Enterobacter cloacae productrices de BLSE.....	31
<b>Tableau A:</b> Screening de la présence de bactéries productrices de BLSE de la ferme 1 .....	46
<b>Tableau B:</b> Screening de la présence de bactéries productrices de BLSE de la ferme 2 .....	46
<b>Tableau C:</b> Screening de la présence de bactéries productrices de BLSE de la ferme 3 .....	46
<b>Tableau D:</b> Screening de la présence de bactéries productrices de BLSE de la ferme 4.....	47
<b>Tableau E:</b> Résultats d'isolement et d'identification sur Chrom agar de la ferme 1 traditionnelle Hamma Bouziane .....	48
<b>Tableau F:</b> Résultats d'isolement et D'identification par Chrom agar de la ferme 2 industrielle Hammza Bouziane .....	48
<b>Tableau G:</b> Résultats d'isolement et D'identification par Chrom agar de la ferme 3 traditionnelle de Mridje.....	48
<b>Tableau H:</b> résultats d'isolement et d'identification par chrom agar de la ferme 4 industrielle de Didouche Mourad.....	49

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Mécanismes de résistance des microorganismes (Dauvergne, 2018).....	7
<b>Figure 2:</b> Diffusion de la résistance aux antibiotiques entre l'homme, l'environnement et l'élevage (exemple de la résistance à la colistine) (Touati et al., 2020) .....	8
<b>Figure 3:</b> Laboratoire de microorganismes et bioprocédés C.R.Bt Constantine.....	13
<b>Figure 4:</b> Conception de l'étude.....	14
<b>Figure 5:</b> Prélèvement cloacal réalisé dans la présente étude .....	15
<b>Figure 6:</b> Prélèvement de l'environnement réalisé sur le sol de l'élevage avicole .....	15
<b>Figure 7:</b> Milieu Chrom Agar préparé pour l'identification .....	17
<b>Figure 8:</b> Ensemencement par stries sur Chrom Agar .....	17
<b>Figure 9:</b> Préparation de l'inoculum pour l'antibiogramme et pour la Galerie API E.....	19
<b>Figure 10:</b> Dépôt des disques d'antibiotiques pour l'antibiogramme .....	20
<b>Figure 11:</b> E.coli ATCC 25922 sur Macconkey (MC), MacConkey + cefazoline (MAC+CAZ), MacConkey + cefotaxime (MAC+CTX) .....	24
<b>Figure 12:</b> Résultats de culture de la souche de référence E.coli ATCC 25922 sur MH et Chrom agar .....	25
<b>Figure 13:</b> Profil biochimique de la souche de référence ATCC 25922 sur galerie API 20 E 27	
<b>Figure 14:</b> Schéma des étapes de l'isolement et l'identification des souches d'entérobactéries résistantes .....	27
<b>Figure 15:</b> Résultats de l'antibiogramme des souches d'E.coli isolées.....	29
<b>Figure 16:</b> Profil de l'antibiogramme de deux souches d'E.coli isolées .....	29
<b>Figure 17:</b> Résultat du test de confirmation de BLSE de la souche HIF1 .....	31

## Liste des abréviations

**°C** : Degré Celsius ;

**ADH** : Arginine dihydrolase ;

**AK** : Amikacine ;

**AMC** : Amoxicilline + Acide clavulanique ;

**AMP** : Ampicilline ;

**API 20 E** : Système standardisé pour l'identification des Entérobactérie (20 caractères pour les entérobactéries) ;

**ATB** : Antibiotiques ;

**ATB**: Antibiogramme ;

**ATBr** : bactéries antibiorésistantes ;

**ATCC**: American Type Culture Collection ;

**BLSE** :  $\beta$ -lactamase à spectre étendu ou élargi ;

**BMR** : Les bactéries multirésistantes ;

**C3G** : Céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération ;

**CEP**: Chloramphénicol ;

**CIP** : Ciprofloxacine ;

**CIT** : Utilisation du citrate ;

**CL** : Colistine ;

**CRBt** : Centre de Recherche en Biotechnologie ;

**CTX** : Céfotaxime ;

**CZ** : Céfazoline ;

**D.O.** : Densité optique ;

**DD** :double disque ;

**E.Coli** : Escherichia coli ;

**Ech** : Echantillon ;

**G 20** : Le groupe des 20 (Afrique du sud ,Allemagne ,Arabie saoudite ,Argentine ,Australie ,Brezil, Canada , Chine ,Corée du sud ,états –unies ,France ,Inde ,Indonisie ,Italie ,Japon ,Mexique ,Royaume –uni,Russi , Espagne ,Turquie) ;

**G7** : Le groupe des sept ( Allemagne, Canada, États-Unis, France, Italie, Japon et Royaume-Uni) ;

**GE** : Gélatinase ;

**GEN** : Gentamicine ;

**h** : Heure ;  
**H<sub>2</sub>S**: Production d'H<sub>2</sub>S;  
**I** : Intermédiaire ;  
**KES** : Klebsiella, Entérobacter et Serratia ;  
**LDC** : Lysine décarboxylase ;  
**MF** : McFarland standards ;  
**MH** : Milieu Muller Hinton ;  
**mm** : Millimètre ;  
**NA** : Acide nalidixique ;  
**Nm** : Nanomètre ;  
**ODC**: Ornithine decarboxylase;  
**OIE** : Organisation Mondiale de la santé Animale ;  
**OMS** : Organisation mondiale de la santé ;  
**ONU** : Organisation des Nations unies ;  
**R** : résistante ;  
**S** : Sensible ;  
**TCC** : Ticarcilline + Acide clavulanique ;  
**TDA** : Tryptophane Désaminase ;  
**TE**: Tétracycline ;  
**TSB** : bouillon Tryptone soja ;  
**TSB** : Bouillon Tryptone Soja ;  
**URE** : Uréase ;  
**VP** : Production d'acétoïne ;  
**VP1** : Réactif de Barrit A .

## Liste des annexes

<b>Annexe 1:</b> Tableau des valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour Entérobactéries .....	<b>46</b>
<b>Annexe 2 :</b> Résultats de l'identification biochimique par galerie API 20 E de quelques souches d'E.coli isolées .....	<b>47</b>
<b>Annexe 3:</b> Tableaux représentant les résultats de screening sur milieu MacConkey supplémenté d'antibiotiques .....	<b>48</b>
<b>Annexe 4 :</b> Tableaux représentant les résultats de l'identification préemptive par Chrom agar .....	<b>50</b>

## Table des matières

<i>Remerciement</i> .....	<i>i</i>
<i>Dédicace</i> .....	<i>ii</i>
<i>Liste des tableaux</i> .....	<i>iii</i>
<i>Liste des figures</i> .....	<i>iv</i>
<i>Liste des abréviations</i> .....	<i>v</i>
<i>Liste des annexes</i> .....	<i>vi</i>
<i>Table des matières</i> .....	<i>vii</i>
Introduction .....	1

### Chapitre I : Synthèse bibliographique

1	Généralités .....	4
1.1	Concept «One World, One Health».....	4
1.2	Antibiotiques .....	4
1.3	Bactéries multirésistantes (BMR).....	5
1.4	Types de la résistance bactérienne aux antibiotiques .....	5
1.4.1	Résistance naturelle .....	5
1.4.2	Résistance acquise .....	5
1.5	Bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE).....	5
1.6	Mécanismes de résistance bactérienne .....	6
1.6.1	Modification de la cible .....	6
1.6.2	Antibiotiques à flux actif .....	6
1.6.3	Modification ou destruction de l'enzyme .....	6
1.6.4	Imperméabilité membranaire .....	6
2	Résistance aux antibiotiques dans l'élevage.....	7
3	Résistance aux antibiotiques dans les différents compartiments environnementaux ....	8
3.1	Voies d'introduction des antibiotiques dans l'environnement .....	8
3.2	Résistance aux antibiotiques dans l'environnement du sol.....	9
3.3	Résistance aux antibiotiques dans l'environnement aquatique .....	10
3.4	Prévalence de la résistance aux antibiotiques dans certaines sources environnementales.....	10
3.4.1	A l'échelle mondiale .....	10
3.4.2	En Algérie .....	11

## **Chapitre II: Matériels et méthodes**

1	Contexte de l'étude et lieu de stage .....	13
1.1	Présentation du lieu de stage .....	13
1.2	Conception de l'étude .....	13
2	Echantillonnage.....	14
2.1	Prélèvement cloacal :.....	15
2.2	Prélèvements environnementaux : échantillonnage sur le sol.....	15
2.3	Prélèvement du fumier destiné à la fertilisation : .....	15
3	Transport des échantillons au laboratoire .....	16
4	Isolement.....	16
4.1	Préparation du milieu Macconkey aux antibiotiques .....	16
4.2	Enrichissement.....	16
4.3	Screening de bactéries productrices de BLSE.....	17
5	Identification des souches bactériennes isolées .....	17
5.1	Identification présomptive par Chrom Agar.....	17
5.2	Identification biochimique par Galerie API 20 E.....	18
5.2.1	Préparation de la pré culture : .....	18
5.2.2	Préparation de l'inoculum.....	18
5.2.3	Préparation et inoculation de la galerie API 20E.....	18
5.3	Lecture des galeries .....	18
6	Antibiogramme .....	19
6.1	Préparation de la pré culture :.....	19
6.2	Préparation de l'inoculum : .....	19
6.3	Ensemencement :.....	19
6.4	Application des disques d'antibiotiques : .....	20
6.5	Incubation et lecture : .....	20
7	Confirmation de la présence d'une BLSE : .....	21
7.1	Test de synergie .....	21
7.2	Test de confirmation ou technique du double disque :.....	21

## **Chapitre III: Résultats et discussion**

1	Enrichissement.....	24
2	Screening.....	24
2.1	Contrôle de qualité.....	24

2.2	Résultats du screening .....	25
3	Identification présomptive par Chrom agar .....	25
3.1	Contrôle de qualité.....	25
3.2	Résultats de l'identification présomptive .....	26
4	Identification biochimique .....	26
4.1	Contrôle de qualité.....	26
4.2	Résultats de l'identification .....	27
5	Antibiogramme .....	28
5.1	Contrôle de qualité.....	28
5.2	Résultats de l'antibiogramme .....	28
5.2.1	<i>E.coli</i> .....	28
5.2.2	<i>Enterobacter cloacae</i> .....	30
	Les résultats de l'antibiogramme des différentes souches <i>Enterobacter cloacae</i> ..	30
	isolées dans la présente étude sont présentés dans le tableau 8. ....	30
6	Confirmation de la production de BLSE .....	30
6.1	<i>E.coli</i> .....	30
6.2	<i>Enterobacter cloacae</i> .....	31
7	Discussion .....	34
	Conclusion.....	37
	Références bibliographiques .....	40
	Annexes.....	46

## Résumé

L'incidence croissante des infections causées par des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) est une préoccupation majeure dans le monde entier. De nombreux rapports ont indiqué la propagation de ces bactéries des animaux via l'environnement aux humains. Le but de la présente contribution était d'étudier l'occurrence d'entérobactéries productrices de BLSE chez les volailles et leur environnement dans la région de Constantine. Des échantillons cloacaux, fécaux et de fumier ont été prélevés dans quatre fermes de la région. Après criblage sur gélose sélective BLSE, la confirmation de la résistance à la production de BLSE des souches isolées a été déterminée par la méthode phénotypique. Les résultats de ce travail ont révélé que les quatre fermes abritaient des entérobactéries BLSE, avec des *Enterobacter cloacae* dans les deux premières fermes de Hamma Bouziane et *E.coli* dans les fermes de Didouche Mourad et Meridje. Tous les isolats étaient résistants à toutes les bêtalactamines testées et sensibles aux aminosides. En conclusion, les résultats démontrent une fréquence élevée d'entérobactéries productrices de BLSE dans les élevages avicoles industriels et traditionnels de Constantine et d'autres études sont nécessaires pour caractériser davantage les bactéries résistantes et leurs mécanismes de résistance.

Mots clés :Entérobactéries, Bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE), Antibioresistance

## **Abstract**

The increasing incidence of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing enterobacteria is of serious concern all over the world. Many reports indicated the spread of these bacteria from animals via the environment to humans. The aim of the present study was to study the occurrence of ESBL-producing in poultry and their environment in the region of Constantine. Cloacal, fecal and manure samples were taken from four farms of the region. After screening on selective ESBL agar, confirmation of ESBL production resistance of the isolated strains was determined by the phenotypic method. As a result, all the four farms harbored ESBL enterobacteria, with *Enterobacter cloacae* in the two first farms of Hamma Bouziane and *E.coli* from the farms of Didouche Mourad and Meridje. All the isolates were resistant to all the betalactamins tested and sensitive to aminosides. In conclusion, the findings demonstrate a high frequency of ESBL-producing Enterobacteriaceae in industrial and traditional poultry farms in Constantine and more studies are necessary to further characterize resistant bacteria and their mechanisms.

**Keywords:** Entérobactéries, Extended spectrum beta-lactamases (ESBL), antibiotic resistance

## الخلاصة

إن تزايد حالات العدوى التي تسببها البكتيريا المعوية المنتجة لببتا لاكتاماز ذات الطيف الممتد (BLSE) هي مصدر قلق بالغ في جميع أنحاء العالم. أشارت العديد من التقارير إلى انتشار هذه البكتيريا من الحيوانات عبر البيئة إلى الإنسان. الهدف من هذه الدراسة هو دراسة وجود بكتيريا منتجة ل BLSE في الدواجن وبيئتها في منطقة قسنطينة. تم أخذ عينات من المخرق والبراز والسماط الطبيعي من أربع مزارع في المنطقة. بعد الفحص الانتقائي ، تم تحديد تأكيد , تأكيد وجود سلالات مقاومة منتجة BLSE للسلالات المعزولة بطريقة النمط الظاهري. حيث ، كانت جميع المزارع الأربع تأوي البكتيريا المعوية المنتجة ل BLSE، من صنف *Enterobacter cloacae* في أول مزرعتين من مزرعة حمة بوزيان و *E.coli* من مزارع ديدوش مراد والمريج . جميع السلالات المنتقات كانت مقاومة لجميع المضادات الحيوية من نوع البييتالاكتامين المختبرة وحساسة للأمينوسيدات..

في الختام ، تُظهر النتائج تواتراً عالياً للبكتيريا المعوية المنتجة ل-ESBL في مزارع الدواجن الصناعية والتقليدية في ناحية قسنطينة ، والمزيد من الدراسات ضرورية لتوصيف وتصنيف البكتيريا المقاومة وآلياتها.

كلمات مفتاحية: مضادات حيوية مقاومة ، لببتا لاكتاماز ذات الطيف الممتد ، بكتيريا الأمعاء

# **Introduction**

## **Introduction**

Les antibiotiques sont des micropolluants organiques et comptent aujourd'hui parmi un des groupes les plus importants des polluants émergents. Les principales voies d'émission de ces composés sont les rejets des eaux usées et l'épandage des déjections animales comme fertilisants des terres agricoles. Ils ont été détectés dans des milieux aquatiques et terrestres partout dans le monde (Archundia Peralta, 2016). Depuis 1950, l'usage intensif des antibiotiques en médecines humaines et animales comme promoteur de croissance dans l'élevage, s'est accompagné d'une augmentation sans précédent de la résistance bactérienne en milieu clinique, et une contamination croissante de l'environnement (eaux, sols et sédiments) par des antibiotiques et des bactéries antibiorésistantes (ATBr) (Petit, 2018).

En 2001, l'antibiorésistance bactérienne a été reconnue comme un problème majeur de santé publique par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'Organisation des Nations Unies (ONU) (Petit, 2018). Il est actuellement estimé que la résistance bactérienne aux antibiotiques cause 700000 morts chaque année dans le monde. Ce nombre pourrait s'élever à 10 millions en 2050 si aucune action n'est mise en œuvre. La découverte de nouveaux antibiotiques ne compense pas l'émergence de résistances ce qui aboutit, à long terme, à des impasses thérapeutiques (Dauvergne, 2018).

En santé animale, la législation européenne interdit tout usage d'antibiotiques depuis le 1er janvier 2006 comme facteurs de croissance chez les animaux de rente (terrestres ou aquacoles). Cependant, la législation est différente dans toutes les parties du monde (Dauvergne, 2018). En Algérie, depuis 2016, certains antibiotiques sont interdits en médecine vétérinaire, par la réglementation. Il s'agit, des nitrofuranes, du chloramphénicol principalement (Zamoum, 2019).

En Algérie comme partout dans le monde, la filière aviaire est le principal consommateur d'antibiotiques. Les déjections des volailles sont souvent utilisées comme fertilisants. Ces déjections peuvent être une source de bactéries résistantes aux antibiotiques vu l'utilisation intensive des antibiotiques chez ces animaux. Une grande partie des bactéries résistantes aux antibiotiques sont excrétées avec les excréments dans l'environnement amenant les gènes de résistance dans le sol. Ainsi, les humains peuvent être exposés aux bactéries résistantes et gènes de résistance par la consommation de légumes et fruits fertilisé de ces déjections (Touati et al., 2020). Dans ce contexte, Mesbah Zekar et al. (2017, 2019) ont isolé des souches d'entérobactéries multirésistantes à partir de fruits et légumes dont ceux consommés crus. De

plus, Touati et al. (2020) ont isolé des souches résistantes à la colistine à partir du fumier et des eaux usées provenant de fermes, à l'ouest algérien. Tous ces travaux mettent l'accent sur le risque lié à la diffusion de résistance dans l'environnement via les souches d'origine fécale.

La résistance bactérienne aux antibiotiques ne connaît ni frontières géographiques, ni barrière d'espèces les bactéries résistantes aux antibiotiques émergent aussi bien chez l'homme, les animaux ou l'environnement et peuvent se propager de l'un à l'autre, et même d'un pays à l'autre ; Suite à cette émergence et accroissement des bactéries multirésistantes aux antibiotiques dont les entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE), la situation apparaît particulièrement préoccupante dans les différents écosystèmes environnementaux. S'inscrivant dans ce contexte, notre contribution vise à faire l'état des lieux de l'antibiorésistance dans l'environnement avicole, nous nous sommes intéressés à la recherche des entérobactéries dont *E.coli* et *Enterobaceter.sp* productrice de BLSE.

Pour ce faire, ce travail est divisé en deux parties. Une synthèse bibliographique qui commence avec des généralités sur les antibiotiques puis la résistance aux antibiotiques dans l'élevage et dans les différents compartiments environnementaux. En second lieu, une étude de terrain est réalisée afin de connaître la présence de bactéries productrices de bétalactamases à spectre élargi dans les élevages avicoles dans différentes régions de la wilaya de Constantine. Pour développer ces aspects, nous avons effectué la démarche suivante :

- Isolement et identification des germes en cause
- Etude des profils de résistance des souches isolées vis-à-vis quelques familles d'antibiotiques.
- Confirmation phénotypiques de la présence des BLSE.

# ***CHAPITRE I :***

## **Synthèse bibliographique**

## **1 Généralités**

### **1.1 Concept «One World, One Health»**

La promiscuité entre les Hommes et les animaux, ainsi que les facilités de déplacement actuelles font que la diffusion de bactéries et/ou de gènes de résistance impacte l'ensemble des activités de médecines humaine et vétérinaire ainsi que l'environnement. Ceci justifie une approche intersectorielle et interministérielle, selon le concept «Un Monde, Une Santé» («One World, One Health») (OIE, 2018) prônée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'Organisation Mondiale de la santé Animale (OIE), afin de maîtriser l'expansion de l'antibiorésistance et de préserver les immenses bénéfices apportés à la médecine par les antibiotiques. Cette approche appliquée à la politique publique nationale s'inscrit nécessairement en étroite coordination avec les nombreuses instances internationales qui ont fait de la maîtrise de l'antibiorésistance une priorité de santé publique (Union européenne, G7 et G20, OMS, OIE) sur lesquelles nous nous attarderons plus loin. La figure 2 illustre les différentes voies de transmissions des résistances entre l'environnement, l'Homme et l'animal, et montre combien tous ces mécanismes sont interconnectés. Elle met en évidence que l'existence de l'antibiorésistance doit être traitée comme un problème global, avec tous ses paramètres, et non comme un problème qui ne concernerait que l'Homme ou que l'animal sans interconnexion (Manyi-Loh et al., 2018).

### **1.2 Antibiotiques**

On appelle antibiotique toute substance chimique, d'origine naturelle, semi-synthétique ou synthétique, agissant de manière spécifique sur une étape du métabolisme des bactéries (antibiotique antibactériens) ou des champignons (antibiotique antifongique) (Delarras, 2014).

Les antibiotiques représentent l'une des principales innovations de la médecine au XXe siècle. Ils ont permis de révolutionner le traitement de certaines maladies infectieuses comme les pneumonies, la tuberculose ou la peste, en réduisant considérablement le nombre de décès liés à ces maladies (O'Neill, 2016). Mais au cours des dernières décennies, des mécanismes d'adaptation développés par les bactéries ont été découverts. Ils leur permettent de résister à des environnements hostiles, et notamment à la présence d'antibiotiques. Ces bactéries devenues résistantes, ne cessent de se propager, sur tous les continents. Mirabaud (2003) rappelle que dès 1940, les premières résistances aux antibiotiques ont été détectées chez des bactéries vis-à-vis de molécules de la famille des sulfamides.

### **1.3 Bactéries multirésistantes (BMR)**

On parle de **BMR** lorsque les bactéries ont acquis une résistance à plusieurs familles d'antibiotiques. Elles ne sont alors plus sensibles qu'à un petit nombre d'entre eux, ce qui pose de nombreux soucis en terme thérapeutique (Kumar et Khan, 2015).

La lutte contre les BMR dans les établissements de santé s'intègre dans la politique globale de lutte contre les infections associées aux soins et à la maîtrise de l'antibiorésistance. La surveillance des BMR dans les établissements de santé est un élément clé. En raison de leur fréquence élevée et de leur potentiel pathogène, certaines BMR font l'objet d'un programme national de surveillance, telles que les entérobactéries possédant une  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (Haut Conseil de la santé publique de France, 2010).

### **1.4 Types de la résistance bactérienne aux antibiotiques**

Il existe deux grands types de la résistance aux ATB : la résistance intrinsèque (naturelle) et la résistance acquise.

#### **1.4.1 Résistance naturelle**

C'est une caractéristique propre d'un genre ou d'une espèce bactérienne. Portée par les chromosomes, la résistance naturelle est stable et transmise à la descendance. Elle constitue un caractère d'identification des bactéries et détermine le phénotype « sauvage » des bactéries (Abada et Rouidji, 2020).

#### **1.4.2 Résistance acquise**

La résistance acquise concerne certaines souches bactériennes au sein d'une espèce donnée. Elle est variable dans le temps et dans l'espace et se propage de façon importante (Mirabaud, 2003). Cette résistance peut être de deux types : soit une mutation spontanée sur un chromosome, soit l'acquisition de gènes par un autre microorganisme (l'acquisition de gènes extra-chromosomiques) (Abada et Rouidji, 2020).

### **1.5 Bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE)**

Les bêta-lactamases, sont des enzymes qui inactivent les antibiotiques bêta-lactamines par ouverture du cycle bêta-lactame. Ce mécanisme fait partie des mécanismes classiques de résistance bactérienne, comme en font également partie l'imperméabilité membranaire et la modification de la molécule-cible sur laquelle se fixe l'antibiotique (Mirabaud, 2003). La résistance des bêta-lactamases peut être chromosomique ou extra-chromosomiques. En ce qui concerne la résistance médiée par le chromosome bactérien, elle peut être due à une mutation

spontanée (changement fortuit dans la séquence des acides nucléiques qui peut par exemple transformer la molécule-cible d'un antibiotique et rendre l'interaction avec l'antibiotique impossible) ou à une recombinaison (transfert de fragments de gènes d'un endroit du chromosome bactérien à un autre. (Mirabaud, 2003).

## **1.6 Mécanismes de résistance bactérienne**

Abada et Rouidji (2020) ont résumé les mécanismes de la résistance bactérienne en quatre groupes comme suit :

### **1.6.1 Modification de la cible**

La modification des récepteurs a lieu, quand la cible intracellulaire ou le récepteur de l'antibiotique est altéré par la bactérie. Ce type de résistance peut être la conséquence de l'acquisition de matériel génétique mobile codant pour une enzyme modifiant la cible de l'antibiotique ou peut résulter d'une mutation au niveau de la séquence nucléotidique de la cible. La modification structurelle de la cible entraîne une perte d'affinité dans le couple cible-antibiotique. L'antibiotique ne pouvant plus se fixer correctement à sa cible, son action sera limitée.

### **1.6.2 Antibiotiques à flux actif**

Il s'agit d'un système d'exportation de l'antibiotique en dehors de la bactérie. L'antibiotique ne peut atteindre son site d'action que grâce à son pompage actif à l'extérieur de la bactérie.

### **1.6.3 Modification ou destruction de l'enzyme**

Cette modification se produit lorsque la bactérie produit un ou plusieurs enzymes qui dégradent ou modifient l'antibiotique, en les rendant inactifs, tels que les bêta-lactamases qui hydrolysent le noyau bêta-lactame. Ces enzymes se retrouvent à la fois chez les bactéries Gram négatif et Gram positif.

### **1.6.4 Imperméabilité membranaire**

Ce type de la résistance est lié aux porines (canaux aqueux ou hydrophiles) qui sont constitués de trois molécules de protéines et qui ont normalement pour rôle de laisser diffuser les substances hydrophiles dans certains antibiotiques. La diminution de la perméabilité à l'antibiotique dans le cytoplasme est due à des mutations affectant la structure et le nombre des porines par lesquelles l'antibiotique peut pénétrer dans la bactérie.

Dauvergne (2018) classe les grands types de mécanismes de résistance en 4 catégories selon leurs modes d'action : le brouillage, le blindage, le camouflage et l'esquive (Figure 1).

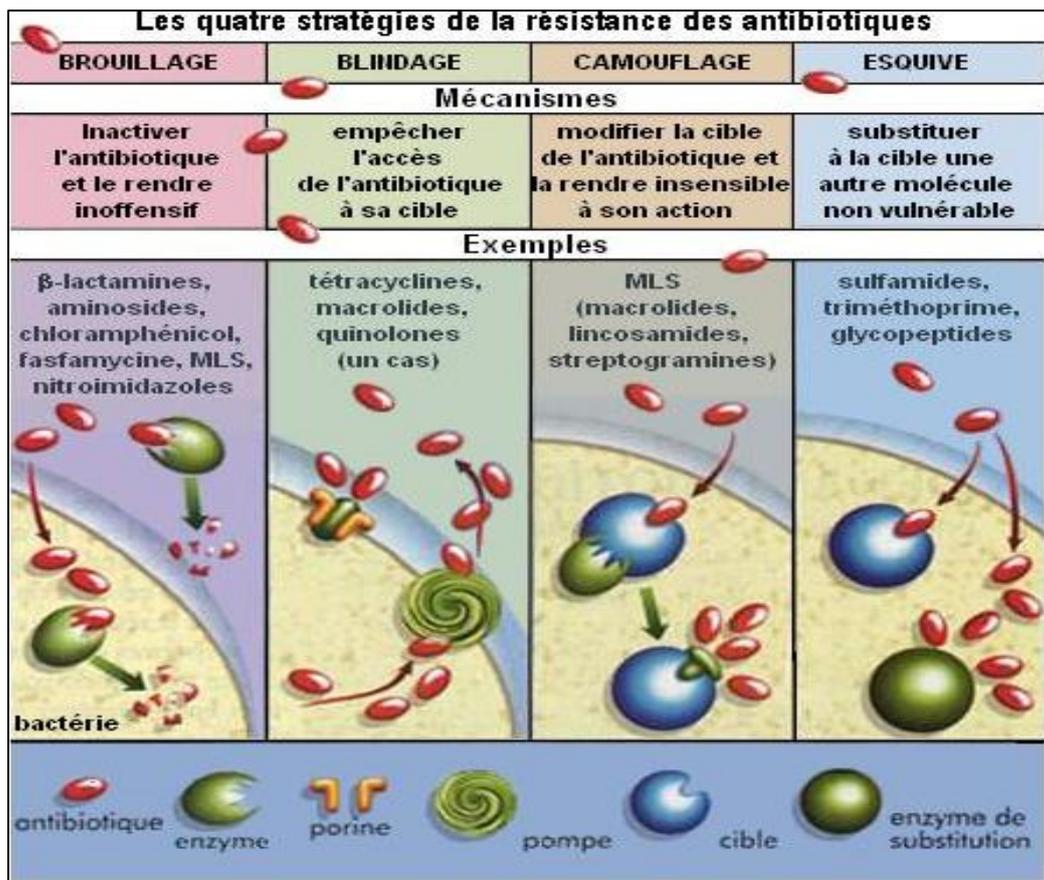


Figure 1: Mécanismes de résistance des microorganismes (Dauvergne, 2018)

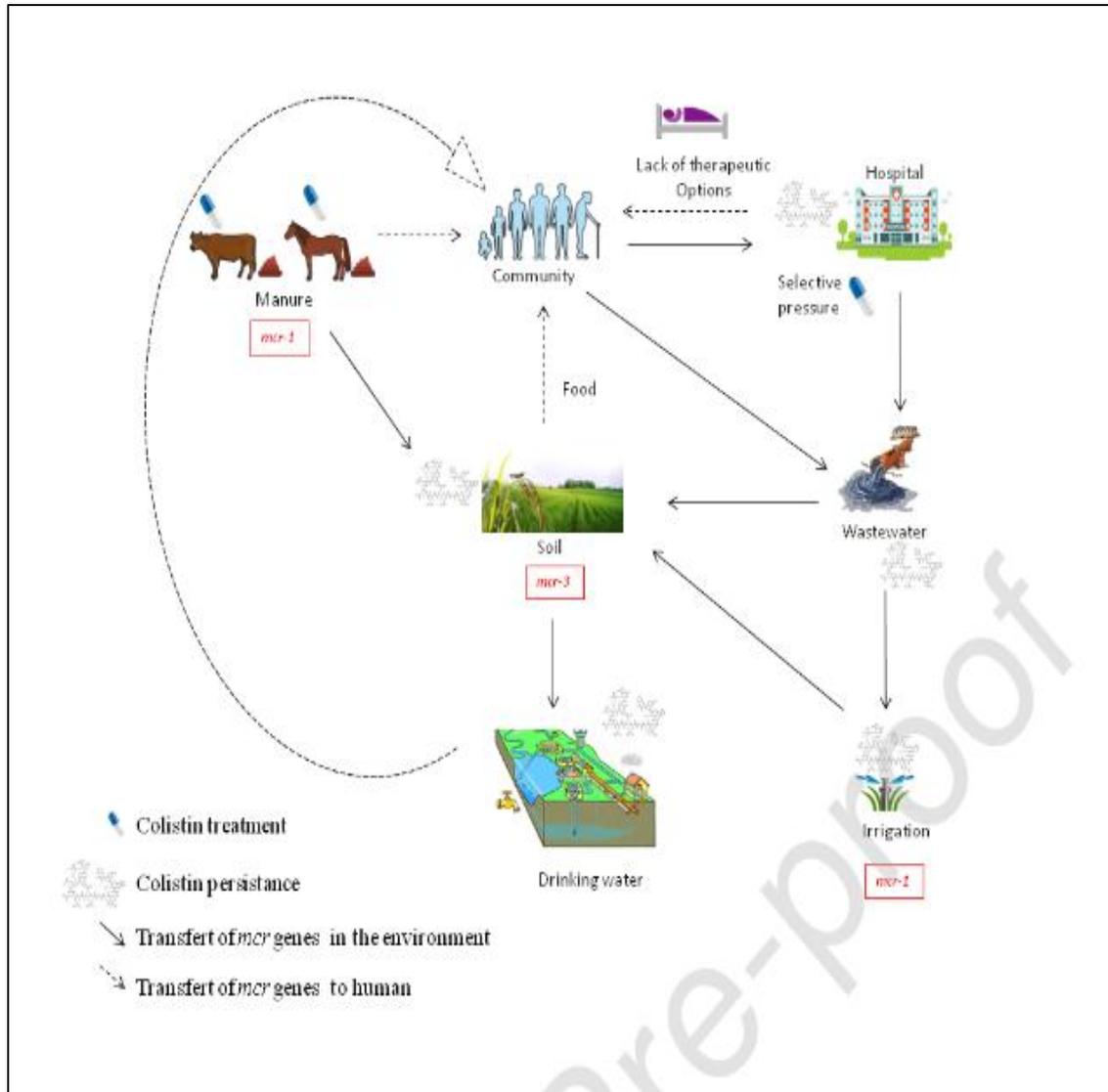
## 2 Résistance aux antibiotiques dans l'élevage

Manyi-Loh et al. (2018) proposent d'examiner la résistance aux antibiotiques dans l'élevage sous quatre angles différents, à savoir :

- les animaux,
- les produits d'origine animale,
- les travailleurs agricoles,
- les sites environnementaux de la ferme (eau, sol, aliments pour animaux), eaux usées, lagune, fumier et boues après traitement).

Concernant les bactéries, les antibiotiques et le mouvement des gènes de résistance aux antibiotiques, les animaux de ferme sont un élément très important dans la compréhension de l'interaction entre les humains, les animaux et l'environnement. Le tube digestif des animaux, comme celui des humains (travailleurs agricoles), est colonisé par divers micro-organismes, notamment des commensaux et des bactéries résistantes. Ainsi, il sert de réservoir le plus

important de micro-organismes. Par conséquent, il peut jouer un rôle essentiel dans la dissémination et l'acquisition de bactéries résistantes et de leurs gènes de résistance.



**Figure 2:** Diffusion de la résistance aux antibiotiques entre l'homme, l'environnement et l'élevage (exemple de la résistance à la colistine) (Touati et al., 2020)

### 3 Résistance aux antibiotiques dans les différents compartiments environnementaux

#### 3.1 Voies d'introduction des antibiotiques dans l'environnement

Les sources par lesquelles les antibiotiques peuvent être rejetés dans l'environnement sont diverses. Au cours des décennies qui ont suivi la découverte des antibiotiques, il a été observé que l'utilisation des antibiotiques en médecine humaine, en médecine vétérinaire et en agriculture est liée à la contamination des différents compartiments de l'environnement (exemple : eaux de surface, eaux souterraines, eau potable, égouts municipaux, sols, légumes,

boues) et par conséquent à l'augmentation de la résistance aux antibiotiques et a des effets écologiques négatifs. De plus, l'utilisation d'antibiotiques enrichit les bactéries résistantes aux antibiotiques ou les gènes de résistance, qui pourraient être transférés de l'environnement à l'homme (Polianciuc et al., 2020).

De plus, ces antibiotiques et/ou leurs métabolites contenus dans les sols ou le fumier animal stocké peuvent ruisseler vers les eaux de surface et s'infiltrer vers les eaux souterraines. C'est le cas des antibiotiques à hautement hydrosolubles, ce qui accélère leur propagation et leur écotoxicité dans l'environnement (Manyi-Loh et al., 2018).

Dans la même optique, les antibiotiques peuvent être introduits dans l'environnement via la fertilisation des sols avec du fumier animal brut, l'irrigation avec les eaux usées générées par les activités agricoles ou via les rejets accidentels par les eaux de ruissellement des fermes (Lima et al., 2020).

On peut noter que des antibiotiques peuvent être aussi trouvés dans l'environnement naturel par l'élimination inappropriée de médicaments périmés ou non utilisés dans les magasins de produits pharmaceutiques et de produits pharmaceutiques domestiques périmés indésirables. En outre, les agriculteurs éliminent leurs conteneurs (flacons) d'antibiotiques usagés en les jetant simplement dans les égouts, les décharges ou sur le sol nu, au lieu de les enterrer comme recommandé (Kumar et al., 2019).

### **3.2 Résistance aux antibiotiques dans l'environnement du sol**

Les antibiotiques et les gènes de résistance correspondants sont présents dans l'environnement depuis plus de 500 millions d'année. L'analyse des sols par des approches de métagénomique montre que ces environnements où se développent des micro-organismes producteurs d'antibiotiques, sont des réservoirs importants de gènes de résistance aux antibiotiques (Simonet, 2013).

Les micro-organismes considérés comme la partie principale de la communauté du sol sont essentiellement responsables de la décomposition de la matière organique et de la dégradation des composés toxiques. Le microbiote du sol est l'une des anciennes origines évolutives de la résistance aux antibiotiques et a été proposé comme réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques disponibles pour l'échange avec des agents pathogènes cliniques. Lorsque les sols sont traités ou modifiés, des antibiotiques et leurs métabolites dégradés, ainsi que des bactéries résistantes aux antibiotiques et leurs gènes de résistance correspondants, sont introduits dans l'environnement du sol. Ainsi, il a été démontré que les sols agricoles

contiennent des populations plus diversifiées de bactéries résistantes aux antibiotiques avec des niveaux de résistance plus élevés que les sols compostés et forestiers (Lee et al., 2018).

### 3.3 Résistance aux antibiotiques dans l'environnement aquatique

L'eau représente l'un des habitats les plus importants pour les bactéries sur la planète. Elle sert de principale voie naturelle pour la dissémination des micro-organismes entre les différents compartiments environnementaux, les humains et les animaux (Manyi-Loh et al., 2018).

Dans de nombreux pays, les eaux souterraines constituent l'approvisionnement public en eau le plus important et également une source d'eau potable. Ainsi, l'évaluation de la qualité et la surveillance de ces environnements devraient recevoir une attention particulière (Szekeres et al., 2018).

Néanmoins, selon l'emplacement et donc l'environnement, les eaux souterraines deviennent vulnérables à la contamination par des résidus d'antibiotiques, des bactéries résistantes aux antibiotiques et des gènes de résistance. Dans une étude, les antibiotiques, les gènes de résistance aux antibiotiques sont répandus dans les eaux souterraines étudiés, avec des abondances accrues non seulement autour d'une agglomération urbaine, mais aussi dans des zones reculées, à une distance considérable des villes. Des concentrations accrues de céfépime, de tazobactam, d'érythromycine, de sulfaméthoxazole et de triméthoprim ont été observées, ce dernier étant retrouvé dans tous les échantillons d'eau souterraine étudiés (Szekeres et al., 2018).

### 3.4 Prévalence de la résistance aux antibiotiques dans certaines sources environnementales

De nombreux auteurs ont caractérisé les bactéries résistantes aux antibiotiques et les gènes de résistance des légumes, y compris y compris ceux consommés crus ainsi que dans le fumier et les eaux usées et d'irrigation.

#### 3.4.1 A l'échelle mondiale

Plusieurs auteurs ont étudié la prévalence de la résistance aux antibiotiques de certaines bactéries dans différents échantillons environnementaux.

En Espagne, Rasheed et al. (2014) ont noté une incidence globale de 14,7% d'*E. coli* résistant aux médicaments provenant de salade, de légumes, de lait non pasteurisé, de poulet cru, de viande crue et de surface des oeufs crus ; 4% de ces isolats présentent une bêta-lactamase à spectre étendu.

Carballo et al. (2013) ont récupéré trois résidus de tétracycline et soixante-trois bactéries Gram-négatives résistantes à cinq antibiotiques bien connus utilisés dans l'élevage, à savoir tétracycline, chloramphénicol, acide nalidixique, sulfaméthoxazole et ampicilline à partir de la litière d'animaux d'élevage.

De plus, Lin et al. (2004) ont isolé et caractérisé cent treize entérobactéries de la rivière Mhlatuze en Afrique du Sud. Parmi ces bactéries, 75,2% étaient multirésistantes et les isolats entérobactéries obtenus en aval des régions urbaines et industrielles, présentaient une plus grande résistance aux antibiotiques, contrairement à ceux de l'amont (voisinage rural). Cela suggère que les activités environnementales, industrielles et humaines ont un impact énorme sur le niveau de résistance aux antibiotiques dans l'environnement.

Wahome (2013) a rapporté la contamination microbienne d'échantillons d'eaux souterraines obtenus à Ongata Rongai, comté de Kajiado Nord au Kenya, avec des entérobactéries pathogènes, notamment *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella* et *Vibrio*, *E. coli* et *Salmonella*. Ces entérobactéries pathogènes ont montré une résistance élevée, de 87,5% à 98,5%, à l'ampicilline, la kanamycine et le sulfaméthoxazole.

### **3.4.2 En Algérie**

Touati et al. (2020) ont investigué la sensibilité aux antibiotiques de souches d'*E.coli* dans les fèces d'animaux sains et l'environnement dans des fermes de l'ouest algérien. Ils ont conclu que les fermes représentent un réservoir de souches d'*E.coli* résistantes à la colistine. Ils ont suggéré que le transfert de déjections des animaux au sol et à l'eau d'irrigation pourrait en être la cause.

Le rôle des fruits et légumes dans les fermes et les eaux d'irrigations ainsi que dans les marchés, dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques a été étudié par Mesbah Zekar et al. (2017 ; 2020). Dans leurs travaux, ils ont conclu que les fruits et légumes, y compris ceux consommés crus constituent une source de bactéries Gram-négatif résistantes aux céphalosporines de troisième génération et de bactéries multirésistantes en générale.

# ***CHAPITRE II***

## **Matériel et méthodes**

## **1 Contexte de l'étude et lieu de stage**

L'objectif de travail est la recherche d'entérobactéries productrices de BLSE chez les poulets (dans des fermes) et dans leur environnement. Le travail a été réalisé au niveau du laboratoire de microorganismes et bioprocédés au sein du Centre National de Recherche en Biotechnologie durant la période allant du mois de mars au mois de mai 2021. Cette étude concerne 04 fermes de la région de Constantine entre élevages traditionnels et industriels.

### **1.1 Présentation du lieu de stage**



**Figure 3:** Laboratoire de microorganismes et bioprocédés C.R.Bt Constantine

Le laboratoire des microorganismes et bioprocédés du Centre de Recherche en Biotechnologie (C.R.Bt) a été créé par décision N° 330 du 30 septembre 2015. Ce laboratoire répond en partie aux missions et objectifs des équipes et projets de recherches du CRBT dans le domaine des biotechnologies.

Le laboratoire des microorganismes et bioprocédés est situé au rez-de-chaussée du C.R.Bt, il est d'un niveau de confinement type 2 selon les normes nationales et internationales. Ce type de confinement a comme avantage de protéger à la fois le manipulateur, l'échantillon et l'environnement.

### **1.2 Conception de l'étude**

La conception de l'étude est présentée dans la figure 4.

Dans les quatre fermes, l'échantillonnage est effectué par prélèvement cloacal, les fientes collectées à partir de la terre puis du fumier. Ensuite, les souches productrices de BLSE sont isolées et identifiées. Enfin, la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées et la confirmation de la production de BLSE sont réalisées.

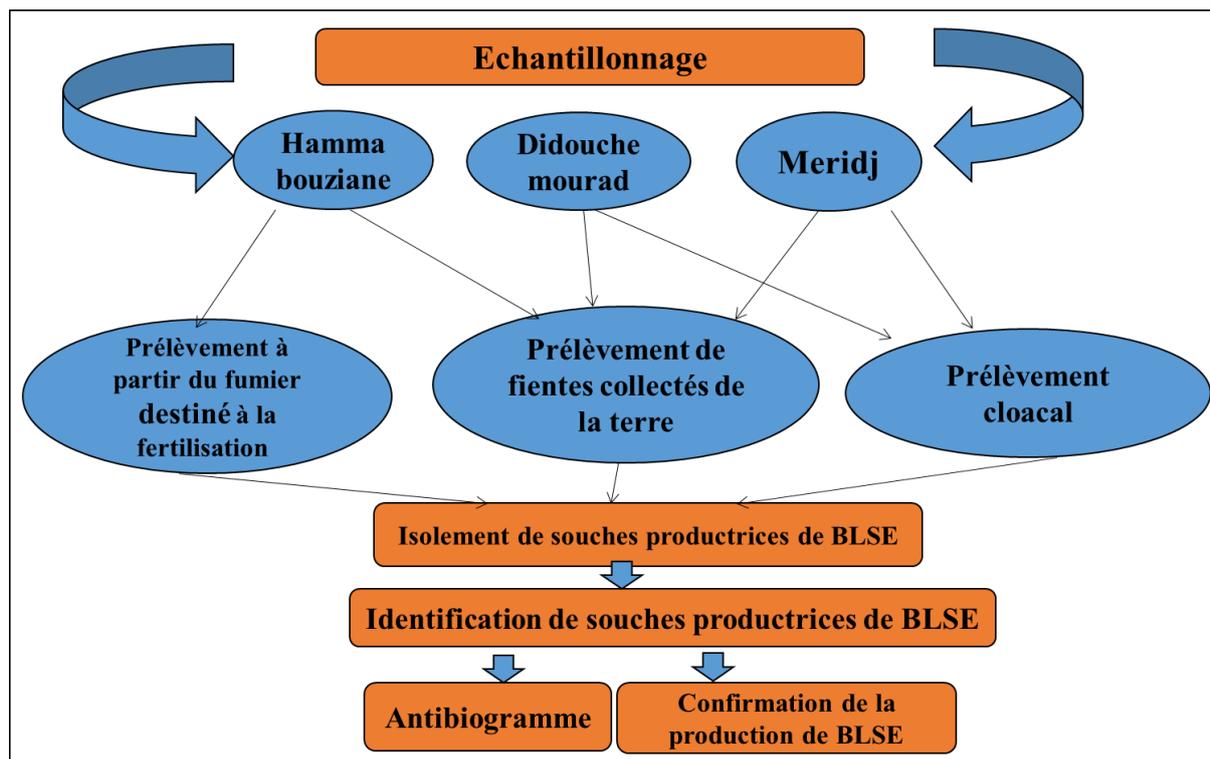


Figure 4: Conception de l'étude

## 2 Echantillonnage

L'échantillonnage a été réalisé à partir des poulaillers privés d'élevage de poulet de chair localisés dans des régions de quelques subdivisions agricoles de la wilaya de Constantine ainsi que des fermes traditionnelles (Tableau 1), en respectant les modalités pratiques pour la réalisation d'un échantillonnage représentatif et intègre afin d'assurer le maintien de l'état des prélèvements identique à l'état initial jusqu'à l'analyse. Toutes les mesures nécessaires doivent être prises pour prévenir toute contamination, prolifération ou destruction microbienne durant la manutention et le transport.

Tableau 1: Sites des prélèvements réalisés dans le cadre de l'étude

Site numéro	Les sites de prélèvement	Type d'élevage	Nombre d'échantillons	Type d'échantillons
01	Hamma bouziane	Traditionnel	03	-Fumier -Fiente
02	Hamma bouziane	Industriel	04	-Fumier -Fiente
03	Didouche mourad	Industriel	13	-Fiente (n=6) -Cloacal (n=7)
04	Meridje	Traditionnel	10	-Cloacal (04) -Fiente (06)

Les méthodes d'échantillonnage diffèrent selon le type de prélèvement :

### **2.1 Prélèvement cloacal :**

Les prélèvements sont effectués par écouvillonnages sur la zone cloacale (figure 5) de chaque sujet et mis dans 5 ml de bouillon nutritif. Cependant, ce type de prélèvement n'a pas pu être réalisé dans les fermes de Hamma Bouziane, suite aux refus catégoriques des propriétaires de toute manipulation directe des volailles.



**Figure 5:** Prélèvement cloacal réalisé dans la présente étude

### **2.2 Prélèvements environnementaux : échantillonnage sur le sol**

Un prélèvement des fientes des poules est effectué au sein du poulailler (Figure 6) où une quantité de fiente est prélevée en utilisant une spatule stérile puis placée dans un contenant approprié stérile (la fiente de consistance normale est originaire d'un sujet sain).



**Figure 6:** Prélèvement de l'environnement réalisé sur le sol de l'élevage avicole

### **2.3 Prélèvement du fumier destiné à la fertilisation :**

Une quantité de fumier est prélevée à l'aide d'une spatule stérile et placée dans un conteneur approprié stériles.

### **3 Transport des échantillons au laboratoire**

Tous les échantillons, bien scellés et emballés afin de prévenir toute fuite ou contamination, sont transportés au « Laboratoire de Microorganismes et Bioprocédés » au niveau du Centre National de Recherche en Biotechnologie (CRBt), dans une glacière contenant des blocs réfrigérants pour maintenir les échantillons à une température d'environ 4°C pendant toute la durée du trajet. Arrivés au laboratoire, les échantillons sont soit congelés ou passés directement à l'isolement selon les possibilités (pendant les heures du travail ou après).

### **4 Isolement**

L'isolement de bactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi s'est fait en ensemençant les échantillons, après enrichissement, sur milieu MacConkey supplémenté de 1µg/ml d'une céphalosporine de 3<sup>ième</sup> génération (céfotaxime ou ceftazidime) comme décrit par Valverde et al. (2004).

#### **4.1 Préparation du milieu Macconkey aux antibiotiques**

D'abord, 400 ml du milieu MacConkey est préparée selon les recommandations du fabricant. Ensuite, on a préparé une solution mère des antibiotiques comme suit :

- une quantité de 0.01 g cefotaxime ou ceftazidime dans 10 ml d'eau distillée stérile,
- l'antibiotique est filtré à 0.22 µm,
- des aliquotes de 500 µl sont réalisés et conservés à -20°C,

Puis 400 µl de solution mère d'antibiotique est ajoutée à 400 ml de milieu MacConkey en surfusion (45°C), pour obtenir une solution finale de 1µg/ml. Le milieu est conservé à +4 °C jusqu'à utilisation.

#### **4.2 Enrichissement**

L'enrichissement est une étape importante en microbiologie. En effet, la plupart des méthodes de détection nécessitent une étape d'enrichissement, étant donné les faibles taux de bactéries pathogènes présumés retrouvés dans les échantillons environnementaux (Savoy, 2011).

Dans notre cas, cette étape consiste à ensemencher directement un bouillon Tryptone soja (BTS). Le mélange est ensuite incubé à la température optimale de croissance, 37°C pendant 24 heures.

### 4.3 Screening de bactéries productrices de BLSE

Après enrichissement, on ensemence par stries sur une gélose MacConkey supplémentée de 1 µg/ml de cefotaxime et MacConkey supplémenté de 1 µg/ml de ceftazidime, puis on incube à 37°C pendant 24h. La purification des souches a été effectuée par cultures répétées jusqu'à l'obtention d'une culture pure.

## 5 Identification des souches bactériennes isolées

### 5.1 Identification présomptive par Chrom Agar

En se référant au mode d'emploi du fournisseur (BD CHROM agar Orientation Medium ; 2019), l'identification présomptive est faite en utilisant le milieu Chrom Agar orientation qui est un milieu chromogène servant à l'identification directe, à la différenciation et à l'énumération des agents pathogènes. Il permet d'isoler de nombreux microorganismes se développant en conditions aérobies, tels que les *Enterobacteriaceae*. A cette fin, à partir des cultures pures de MacConkey, des boîtes préalablement coulées et refroidies par le Chrom agar, ont été ensemencées par stries, puis incubées à 37°C pendant 24h (figures 7 et 8).



**Figure 7:** Milieu Chrom Agar préparé pour l'identification



**Figure 8:** Ensemencement par stries sur Chrom Agar

## **5.2 Identification biochimique par Galerie API 20 E**

L'identification est réalisée en se référant à la fiche technique (GALERIE API 20E ®) du fournisseur BioMérieux. Les galeries Api 20 E sont des galeries de tests biochimiques, miniaturisées et standardisées, exploitables via des bases de données d'identification complètes (20 caractères pour les entérobactéries).

### **5.2.1 Préparation de la pré culture :**

L'identification par Galerie API doit être réalisée sur des souches bactériennes jeunes en phase de croissance exponentielle (effectuée sur un milieu MH coulé dans des boîtes de pétrie et incubées à 37°C pendant 18 à 24h).

### **5.2.2 Préparation de l'inoculum**

Une suspension bactérienne est préparée à partir d'une culture fraîche de 24h, en dissociant 1 à 2 colonies dans 5 ml d'eau physiologique stérile ; la suspension bactérienne est bien homogénéisée et ajustée à une opacité à 0,5 MF ou à une D.O. de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm.

### **5.2.3 Préparation et inoculation de la galerie API 20E**

La première étape consiste à réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et marquer le plateau avec le code identifiant de la souche puis à l'aide d'une pissette l'eau est répartie dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.

Après avoir préparé et identifié les boîtes d'incubation ; l'ensemencement des cupules à partir de la suspension bactérienne ajustée à une opacité à 0,5 MF est fait en posant l'embout contre la paroi de la cupule de manière à ne pas créer de bulles lors de l'inoculation qui pourraient fausser le résultat.

Pour les tests : ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, URE, le tube est rempli de la suspension puis recouvert d'huile de paraffine afin de créer une anaérobiose et pour les tests : CIT ; VP ; GE et le tube et la cupule sont remplis alors que les tests restants le remplissage se limite uniquement dans les tubules.

## **5.3 Lecture des galeries**

Après 18-24 heures d'incubation à 35-37°C la lecture de la galerie est réalisée en se référant au tableau de lecture fourni soit directement soit après l'addition de réactifs. Les souches sont identifiées en utilisant une base de données en ligne ( APIWEB™).

## 6 Antibiogramme

La sensibilité aux antibiotiques est testée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Muller Hinton selon les recommandations de standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire, 6<sup>ème</sup> version, 2011).

### 6.1 Préparation de la pré culture :

L'activité antibactérienne a été réalisée sur des souches bactériennes jeunes en phase de croissance exponentielle. La réactivation des cultures est effectuée par repiquage sur un milieu Muller-Hinton (MH) dans des boites de pétrie, puis incubées à 37C° pendant 18 à 24h.

### 6.2 Préparation de l'inoculum :

A partir des cultures pures de 18 à 24 h sur MH, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont repiquées l'aide d'une pipette pasteur et déchargées dans 5 ml d'eau physiologique stérile puis homogénéisées et ajustées à une opacité à 0,5 MF ou à une D.O. de 0,08 à 0,10, lue à 625 nm (figure 9).



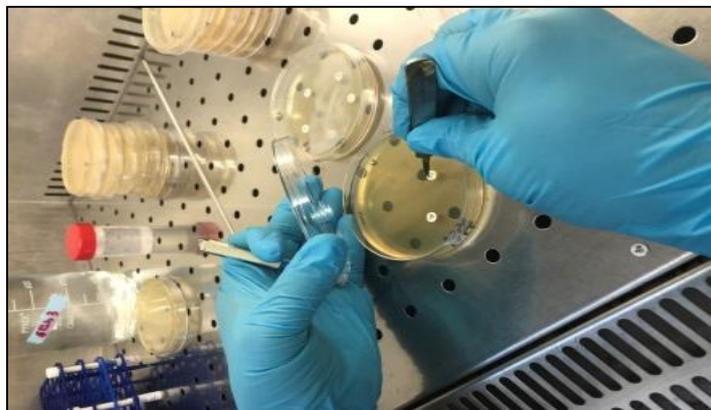
**Figure 9:** Préparation de l'inoculum pour l'antibiogramme et pour la Galerie API E

### 6.3 Ensemencement :

Pour l'ensemencement, un écouvillon stérile trempé dans l'inoculum et essoré en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum. Ensuite, l'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée (des boites de pétrie précoulées par milieu de culture gelosé MH), sèche, de haut en bas, en stries serrées. L'opération est répétée 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. A la fin de l'ensemencement l'écouvillon est passé sur la périphérie de la gélose.

#### 6.4 Application des disques d'antibiotiques :

Chaque disque d'antibiotique est pressé à l'aide d'une pince bactériologique stérile en prenant le soin de ne pas déplacer les disques après application (figure 10).



**Figure 10:** Dépôt des disques d'antibiotiques pour l'antibiogramme

La liste des antibiotiques testés est présentée dans le tableau 2

**Tableau 2:** Liste des antibiotiques utilisés pour tester le profil de sensibilité des germes

Désignation	Code	Charge
Céfotaxime	CTX	30µg
Amoxicilline+acide clavulanique	AMC	20/10µg
Ampicilline	AMP	10 µg
Gentamycine	GEN	15 µg
Amikacine	AK	30 µg
Colistine	CL	30 µg
Ciprofloxacine	CIP	5 µg
Cefazoline	CZ	30 µg
Tétracycline	TE	30 µg
Acide Nalidixique	NA	30 µg
Cloramphénicole	CEP	30 µg

#### 6.5 Incubation et lecture :

Les boîtes de MHensemencées sont incubées pendant 18 à 20 heures à 37°C. Après incubation on procède à la lecture des diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un Pied de coulisse. Le diamètre des zones d'inhibition est interprété sensible, intermédiaire ou résistant

conformément aux recommandations de standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire, sixième version, 2011) (Annexe 1).

## **7 Confirmation de la présence d'une BLSE :**

Ce test est effectué et interprété selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (version avril 2021).

### **7.1 Test de synergie**

- **Technique**

La recherche de la BLSE a été faite dans les conditions standards de l'antibiogramme en déposant un disque d'amoxicilline + acide clavulanique (AMC) à 30 mm centre à centre d'un disque de Céfotaxime (CTX) puis incubé pendant 18 h à 35°C.

- **Lecture :**

La production d'enzyme peut se traduire par l'apparition d'une image de synergie, ou bouchon de champagne, entre les disques AMC et CTX

### **7.2 Test de confirmation ou technique du double disque :**

Ce test devra être fait systématiquement devant :

- l'absence de synergie avec diminution des diamètres des Céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération (C3G) ;
- la présence d'une résistance aux molécules suivantes : ampicilline, ticarcilline, céfazoline avec un diamètre inférieur à 6mm, par contre l'AMC présente un diamètre d'inhibition.

- **Technique**

Ce test se fait dans la condition standard de l'antibiogramme en déposant un disque d'AMC et un disque de C3G (CTX) à une distance de 30 mm (centre à centre) et en laissant diffuser les antibiotiques pendant une heure, à la température ambiante ; la boîte est déposée couvercle vers le haut. Après une heure d'incubation, le disque d'AMC est ôté et remplacé par un disque de CTX et les boîtes sont incubées 18 à 24 h à 37°C.

- **Lecture et interprétation**

Le test du double disque est positif quand le diamètre d'inhibition autour du C3G, appliqué après diffusion du disque AMC est  $\geq 5$  mm par rapport au diamètre d'inhibition autour du disque de C3G.

**Exemple :** diamètre de CTX = 16mm ; diamètre de CTX+AMC = 21mm donc souche BLSE(+).

# **CHAPITRE III**

## **Résultats et discussion**

## 1 Enrichissement

Après incubation pendant 24 dans un bouillon TSB, tous les échantillons ont donné un milieu trouble. Ceci indique que tous les échantillons ont poussé sur ce milieu.

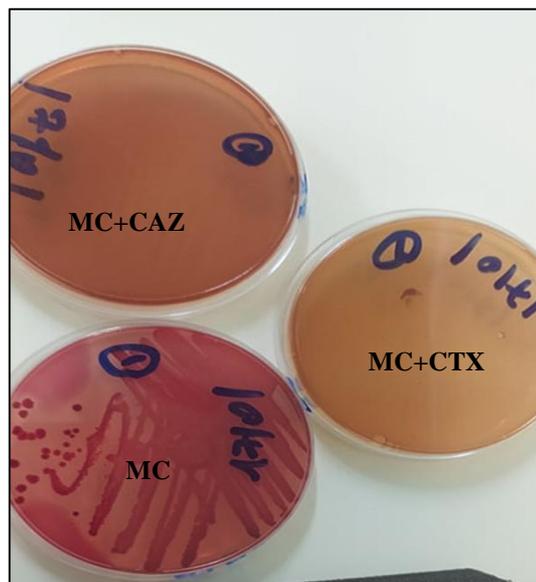
## 2 Screening

L'objectif du screening sur milieu sélectif pour entérobactéries additionné d'antibiotiques (céfotaxime et ceftazidime) est la croissance sélective d'entérobactéries résistantes à l'antibiotique ajouté. De plus, ce milieu permet de mettre en évidence la fermentation du lactose.

L'objectif de ce travail est d'isoler les souches d'entérobactéries du groupe KES et *E.coli*. Les bactéries de ces deux groupes fermentent le lactose ; les souches bactériennes qui fermentent le lactose (virement de la couleur du milieu autour de la colonie) sont choisies pour l'étape suivante. Le tableau 3 résume le résultat de croissance du screening.

### 2.1 Contrôle de qualité

Pour ce test la souche de référence (*E.coli*, ATCC 25922) est ensemencée sur trois milieux de culture (MacConkey, MacConkey + cefazoline, MacConkey + cefotaxime) et après incubation dans les conditions cités ci-dessus les test a révélé que la souche a uniquement poussé sur le milieu exempt d'antibiotique, *illustration* sur la Figure 12.



**Figure 11:** *E.coli* ATCC 25922 sur Macconkey (MC), MacConkey + cefazoline (MAC+CAZ), MacConkey + cefotaxime (MAC+CTX)

## 2.2 Résultats du screening

Le résultat récapitulatif du screening des quatre fermes est présenté dans le tableau 3 et le détail des résultats est présenté dans l'annexe 3 (tableau 10; 11; 12; 13)

Des souches qui fermentent le lactose (lac+) sont isolées à partir des quatre fermes :

- pour la ferme 1 traditionnelle de Hamma Bouziane, trois échantillons prélevés (3/3) contenaient des souches lactose + résistantes.
- la ferme 2 industrielle de Hamma Bouziane, deux échantillons (2/4) contenaient des souches lactose + résistantes.
- la ferme 3 traditionnelle de Meridje, 3 échantillons cloacaux (3/4) ainsi que cinq échantillons de fientes (5/6) contenaient des souches lactose + résistantes.
- la ferme 4 industrielle de Didouche Mourad, un échantillon cloacal (1/6) et quatre échantillons de fientes (4/7) contenaient des souches lactose + résistantes.

**Tableau 3:** Récapitulatif des souches isolées sur milieu sélectif d'entérobactéries additionné d'antibiotiques

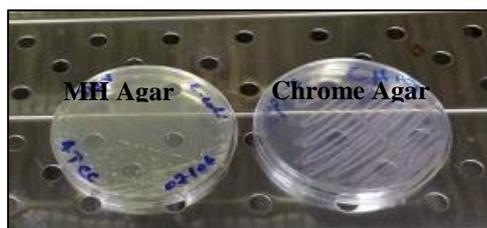
Milieu/Fermentation	Ferme 1	Ferme 2	Ferme 3	Ferme 4
MC+CTX Lac+	0	2	1	5
MC+CTX Lac-	1	1	0	0
MC+CAZ Lac+	3	0	7	0
MC+CAZ Lac-	3	0	0	0

## 3 Identification présomptive par Chrom agar

L'objectif de cette étape était de déterminer les souches appartenant aux groupes KES et *E.coli* à partir d'entérobactéries qui fermentent le lactose isolées précédemment.

### 3.1 Contrôle de qualité

Après 24 heures d'incubation à 37°C, la souche *Escherichia coli* ATCC 25922 sur milieu de culture Chrom agar, a révélé une bonne croissance avec des colonies de taille moyenne à grande, rose ( figure 13).



**Figure 12:** Résultats de culture de la souche de référence *E.coli* ATCC 25922 sur MH et Chrom agar

### 3.2 Résultats de l'identification présomptive

Les souches bactériennes sont réparties selon la couleur des colonies qui ont poussé. Les colonies du groupe KES apparaissent « bleu » et celles de groupe *E.coli* apparaissent « rose » (Ohtaki et al., 2020). Les résultats de l'identification présomptive sur Chrom Agar sont présentés dans le tableau 4.

**Tableau 4:** Résultats de l'identification présomptive des souches isolées sur Chrom Agar

Couleur des colonies	Ferme 1	Ferme 2	Ferme 3	Ferme 4
Rose	0	0	8	5
Bleu	2	2	0	0

Des souches des groupes KES et *E.coli* étaient isolées à partir des quatre fermes :

- Pour la ferme 1 traditionnelle de Hamma Bouziane, deux souches d'entérobactéries lactose + (2/3) ont poussé avec des colonies de couleur bleue.
- Pour la ferme 2 industrielle de Hamma Bouziane, un échantillon (2/2) a poussé avec des colonies de couleur bleue.
- Pour la ferme 3 traditionnelle de Meridje, 3 échantillons cloacaux (3/3) ainsi que cinq échantillons de fiente (5/5) ont poussé avec des colonies de couleur rose.
- Pour la ferme 4 industrielle de Didouche Mourad, un échantillon cloacal (1/1) et quatre échantillons de fientes (4/4) ont poussé avec des colonies de couleur rose.

## 4 Identification biochimique

A partir des résultats de l'identification présomptive, les souches ont données le même type de colonies pour chacun des groupes (KES, *E.coli*). Des souches appartenant à chacune des quatre fermes sont choisies pour l'identification par Galerie API 20<sup>E</sup> comme suit :

- ferme 1 : deux souches,
- ferme 2 : deux souches,
- ferme 3 : cinq souches,
- ferme 4 : trois souches.

### 4.1 Contrôle de qualité

Dans le but de vérifier que les conditions de stockage et de transport n'ont pas d'impact sur les performances de la galerie API E20 système, on a procédé à la réalisation d'un test de contrôle de qualité du système vis-à-vis de la souche de référence ATCC 25922 *E.coli*. Ce dernier a révélé une bonne identification de la souche testée sur le logiciel API web (96%).

L'aspect des réactions biochimiques de la souche sus-citée est présenté dans la figure 14.

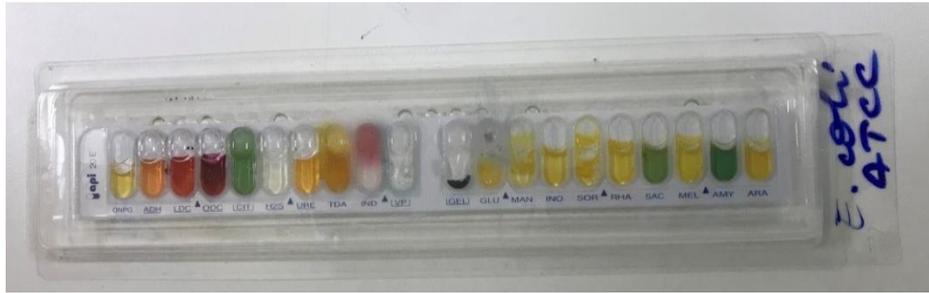


Figure 13: Profil biochimique de la souche de référence ATCC 25922 sur galerie API 20 E

#### 4.2 Résultats de l'identification

Le résultat d'identification par Galerie API 20E est présenté dans le tableau 5. Toutes les souches donnant une couleur bleue sur Chrom agar appartenaient à l'espèce *Enterobacter cloacae* avec une bonne identification. Toutes les souches donnant une couleur rose sur Chrom agar appartenaient à l'espèce *E. coli* avec une bonne identification (résultat APIWEB annexe 2)

Tableau 5: Résultats de l'identification biochimique des souches isolées par galerie API

Espèce bactérienne	ferme 1	ferme 2	ferme 3	ferme 4
<i>E. coli</i>	0	0	5	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	2	0	0

La figure 15 schématise les étapes de l'isolement et de l'identification des souches d'entérobactéries résistantes.

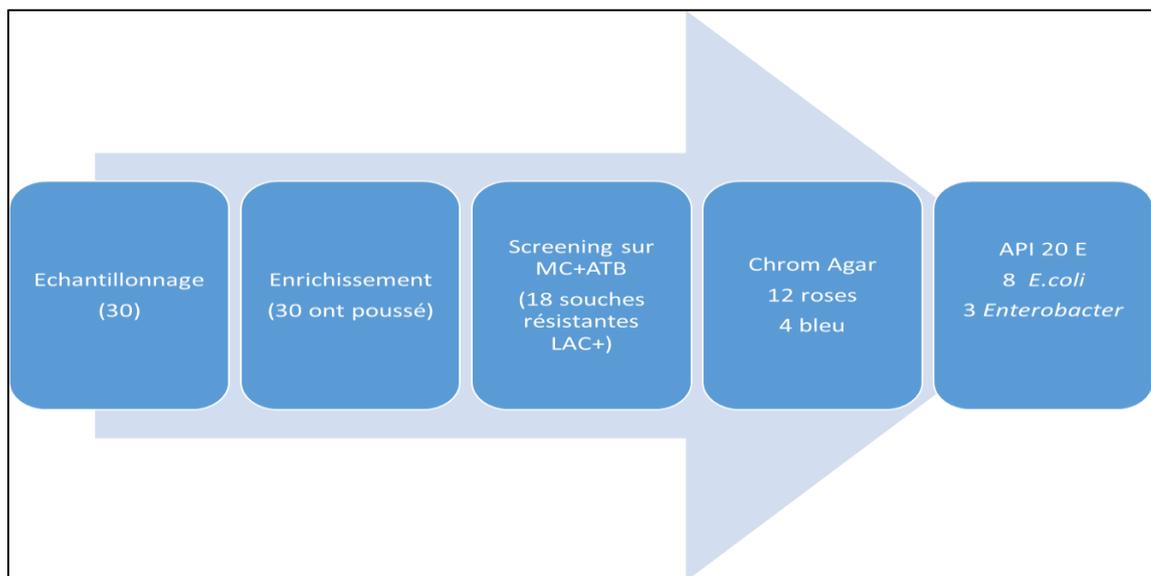


Figure 14: Schéma des étapes de l'isolement et l'identification des souches d'entérobactéries résistantes

## 5 Antibiogramme

### 5.1 Contrôle de qualité

Les résultats de l'antibiogramme de la souche de référence ATCC 25922 sont présentés dans le tableau 6. Toutes les valeurs des diamètres d'inhibition des différents antibiotiques sont dans la fourchette des normes de l'antibiogramme.

**Tableau 6:** Résultat du profil de l'antibiogramme de la souche de référence ATCC 25922

Antibiotique	Diamètre d'inhibition ATCC 29	Norme
CTX	35	29-35
AMC	24	18-24
AMP	21	16-22
GEN	26	23-29
AK	24	19-26
CL	16	11-17
CIP	40	30-40
CZ	26	21-27
TE	30	/
NA	28	22-28
CEP	18	18-22

### 5.2 Résultats de l'antibiogramme

#### 5.2.1 *E.coli*

Les résultats de l'antibiogramme des différentes souches d'*E.coli* isolées dans la présente étude sont présentés dans le tableau 7.

**Tableau 7:** Résultats de l'antibiogramme des souches d'*E.coli* isolées

Famille	ATB	ME2 CAZ	ME3 CAZ	ME 4 CTX	M1 CAZ	M2 CAZ	DE 6 CTX	D 4 CTX	D7 CTX
Bétalactamines	CTX	21 R	18 R	10 R	19 R	20 R	17 R	14 R	16 R
	AMP	08 R	<6 R	<6 R	<6 R	<6 R	<6 R	<6 R	<6 R
	CZ	14 R	<6 R	<6 R	15 R	16 R	12 R	<6 R	<6 R
Bétalactamines+ inhibiteur	AMC	23 S	21 S	24 S	25 S	26 S	21 S	20 S	26 S
Aminosides	GEN	24 S	20 S	20 S	20 S	20 S	23 S	18 S	20 S
	AK	24 S	//	//	21 S	20 S	24 S	22 S	//
Polymyxines	CL	//	//	17 //	15 //	12 //	//	//	12 //
Quinolones	CIP	24 S	22 S	9 R	22 S	30 S	18 I	14 R	20 I
	NA	20 S	16 I	<6 R	20 S	22 S	<6 R	<6 R	<6 R
Tétracyclines	TE	09 R	//	//	19 R	10 R	12 R	08 R	//
Phénicolé	CEP	10 R	08 R	<6 R	10 R	13 I	<6 R	<6 R	<6 R

Toutes les souches isolées étaient résistantes à tous les antibiotiques de la famille des bêtalactamines. Cependant elles étaient toutes sensibles à l'association amoxicilline-acide clavulanique. Ceci présume la possibilité que ce soient des souches multi-résistantes par production d'une bêtalactamase à spectre élargi. L'ensemble des souches ont montré une sensibilité aux aminosides testés (amikacine, gentamicine) (Figure 15 et 16).

Pour les quinolones, deux souches étaient sensibles aux deux quinolones testées alors qu'une souche est résistante et une autre est intermédiaire pour la ciprofloxacine et résistante pour l'acide nalidixique. Toutes les souches d'*E.coli* sont résistantes aux tétracyclines.

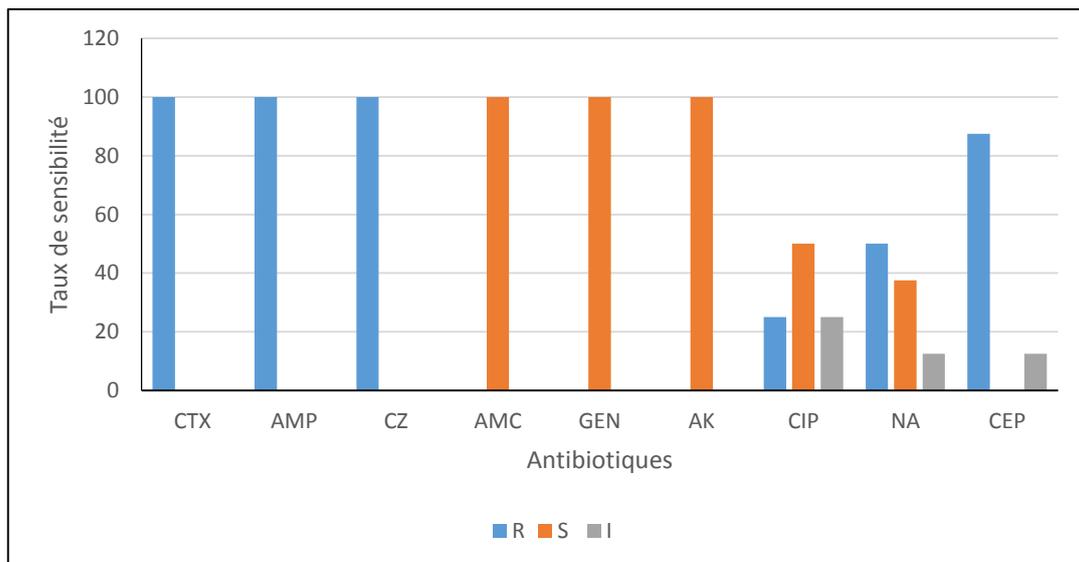


Figure 15: Résultats de l'antibiogramme des souches d'*E.coli* isolées

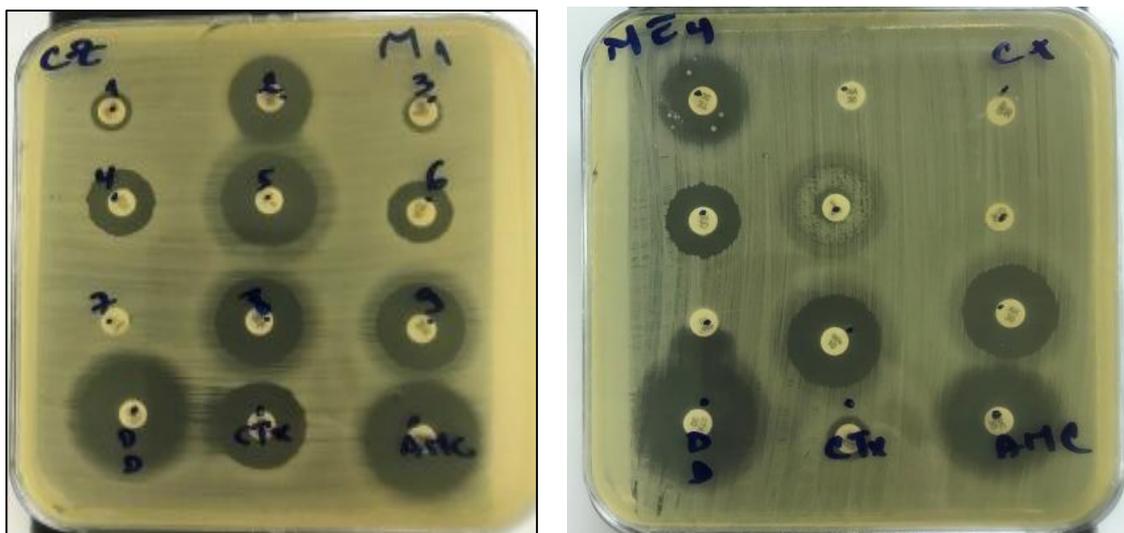


Figure 16: Profil de l'antibiogramme de deux souches d'*E.coli* isolées

### 5.2.2 *Enterobacter cloacae*

Les résultats de l'antibiogramme des différentes souches *Enterobacter cloacae* isolées dans la présente étude sont présentés dans le tableau 8.

**Tableau 8:** Résultats antibiogramme des souches d'*Enterobacter cloacae* isolées

Famille	ATB	HTF2	HTM	HIM1	HIF1				
Bétalactamines	CTX	23	S	07	R	08	R	09	R
	AMP	<6	R	<6	R	<6	R	<6	R
	CZ	15	R	<6	R	<6	R	<6	R
Bétalactamines+ inhibiteur	AMC	20	//	25	//	24	//	//	//
Aminosides	GEN	18	S	24	S	24	S	24	S
	AK	20	S	26	S	25	S	25	S
Polymyxines	CL	14	///	16	//	15	//	15	//
Quinolones	CIP	24	S	36	S	13	R	14	R
	NA	25	S	30	S	<6	R	<6	R
Tétracyclines	TE	//	//	26	S	8	R	7	R
Phénicolé	CEP	//	//	<6	R	<6	R	<6	R

Toutes les souches isolées étaient résistantes à tous les antibiotiques de la famille des bétalactamines. Cependant toutes étaient sensibles à l'association amoxicilline-acide clavulanique. Ceci présume la possibilité que ce soient des souches multi-résistantes par production d'une bétalactamase à spectre élargi.

L'ensemble des souches a montré une sensibilité aux aminosides testés (amikacine, gentamicine).

Deux souches étaient sensibles et deux souches étaient résistantes à quinolones testées.

La totalité des souches était résistante aux phénicolés.

## 6 Confirmation de la production de BLSE

### 6.1 *E.coli*

Les résultats du test de confirmation de la production d'une BLSE par la méthode double disque (DD) est présentée dans le tableau suivant.

Parmi les huit souches d'*Escherichia coli*, une seule (1/8) a n'a pas montré un résultat positif pour la production d'une BLSE.

**Tableau 9:** Résultat de la confirmation de la présence de souches d'E.coli productrices de BLSE

ATB	ME2 CAZ	ME3 CAZ	ME 4 CTX	M1 CAZ	M2 CAZ	DE 6 CTX	D 4 CTX	D7 CTX
DD	23	24	25	25	30	24	22	28
CTX	21	18	10	19	20	17	14	16
DD-CTX	02	06	15	06	10	07	08	12
BLSE	-	+	+	+	+	+	+	+

DD : Double disque

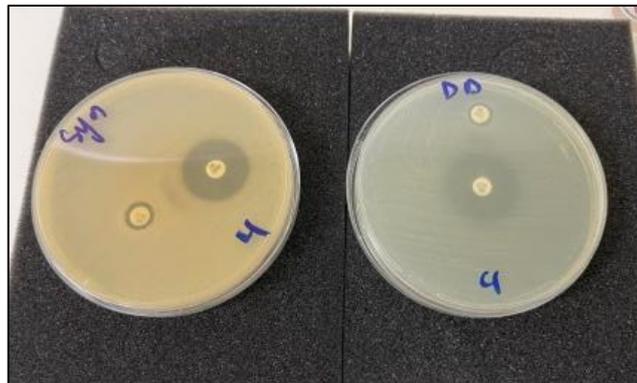
## 6.2 *Enterobacter cloacae*

Les résultats du test de confirmation de la production d'une BLSE par la méthode double disque (DD) est présentée dans le tableau 11. Parmi les quartes souches d'*Enterobacter cloacae*, une seule (1/4) n'a pas montré un résultat positif pour la production d'une BLSE.

**Tableau 10:** Résultat de la confirmation de la présence de souches d'*Enterobacter cloacae* productrices de BLSE

ATB	HTF2 CAZ	HTM CAZ	HIM1 CTX	HIF1 CTX
DD	24	19	23	23
CTX	23	07	08	09
DD-CTX	01	12	15	14
BLSE	-	+	+	+

DD : Double disque

**Figure 17:** Résultat du test de confirmation de BLSE de la souche HIF1 CTX d'*Enterobacter cloacae*

## 7 Discussion

Il est devenu maintenant clair que l'épidémiologie des organismes multirésistants aux antibiotiques a changé et n'est plus confinée au milieu hospitalier. Les bactéries à Gram négatif productrices de BLSE sont fréquemment détectées chez le bétail, les animaux de compagnie et les animaux sauvages (Shen *et al.*, 2020). Les entérobactéries, et particulièrement *E. coli*, sont considérées comme « bactéries indicatrices » importantes qui pourraient être utilisées pour suivre l'évolution de la résistance aux antibiotiques dans différents écosystèmes. *E. coli* aviaire est récemment considérée, en Algérie, comme l'une des causes les plus importantes de pertes économiques dans le secteur avicole (Halfaoui *et al.*, 2017).

Dans la présente étude, Nous avons détecté des souches d'entérobactéries y compris *E. coli* résistantes aux antibiotiques et productrices de BLSE dans des échantillons de fientes et de sols dans des fermes de poulets, suggérant leur large dissémination. Des études précédentes réalisées dans différentes régions de notre pays ont rapporté la détection des entérobactéries productrices de BLSE dans des échantillons de poulets. Des souches d'*E. coli* BLSE ont été aussi isolées à Béjaia. Ainsi, dans une étude, à partir de 61 écouvillons cloacaux prélevés à partir de poulet de chair, 20 souches d'*E. coli* résistantes aux céphalosporines de troisième génération ont été isolées. Parmi celles-ci, 16 étaient productrices de BLSE et 4 étaient productrices de céphalosporinases plasmidiques (Belmahdi *et al.*, 2016). De plus, d'autres études ont rapporté l'isolement des *E. coli* productrices de BLSE à partir de lésions de colibacillose chez le poulet, collectées dans différentes régions y compris Bouira, Bejaia, Tizi Ouzou, Boumerdes et Ain Defla (Halfaoui *et al.*, 2017, Meguenni *et al.*, 2019).

Récemment, l'émergence d'une résistance à la colistine à médiation plasmidique impliquant les gènes *mcr* a été largement signalée. Parmi les souches isolées dans notre étude, deux souches d'*E. coli* présentaient des diamètres réduits (12 mm) contre la colistine. Ces souches peuvent être résistantes à la colistine et probablement par gènes *mcr*. Ce résultat est très important et nécessite plus d'investigations pour sa confirmation. D'autres études ont mis en évidence la résistance à la colistine en Algérie. Chabou *et al.* (2016) ont analysé 503 échantillons prélevés dans différentes régions dont El Tarf, Souk Ahras, Skikda, Sétif, Jijel, Alger, Biskra et Ouargla. Au total, cinq échantillons ont été positifs pour le gène *mcr-1* par PCR et trois souches d'*E. coli* positives pour ce gène ont été isolées. Dans une autre étude, 25 échantillons fécaux de volaille étaient positifs pour le gène *mcr-1* par PCR, parmi lesquels les auteurs ont pu isoler 8 souches d'*E. coli* positives pour ce même gène (Chabou *et al.*, 2019). Actuellement, la colistine est utilisée en dernier recours pour traiter les infections par des

pathogènes multirésistants (Karaïskos et al., 2017). Chez les animaux, la colistine est utilisée pour prévenir ou traiter les infections causées par les bactéries à Gram négatif. De plus, cet antibiotique est administré avec leur nourriture. Des bactéries résistantes à la colistine chez les animaux ont été identifiées dans de nombreux pays.

Dans la présente étude, Nous avons aussi isolées des souches d'*Enterobacter cloacae* productrices de BLSE à partir de deux fermes sur quatre. Cette bactérie a été aussi isolée dans une autre étude en Algérie à partir des œufs de poulet à couver. Parmi, les quatre souches d'entérobactéries BLSE dans cette étude, trois appartenaient à l'espèce *E.cloacae* (Mezhoud et al. 2016).

L'aviculture est incontestablement la branche de production animale qui a enregistré un développement remarquable en Algérie ces dernières années (Megueni *et al.*, 2019). L'utilisation d'antibiotiques est considérée comme le facteur le plus important favorisant l'émergence, la sélection et la diffusion de micro-organismes résistants aux antibiotiques en médecine vétérinaire et humaine. L'usage des antibiotiques sélectionne la résistance non seulement des bactéries pathogènes mais aussi de la flore endogène des individus, animaux et humains, exposés (Belmahdi et al., 2016).

Plus inquiétant, dans une autre étude, les auteurs ont détecté des souches de *Klebsiella pneumoniae* productrices de BLSE et de carbapénémases à partir de la viande de poulet issue de trois villes algériennes à savoir Oran, Saida et Tiaret (Chaalal et al., 2020). La circulation des bactéries multirésistantes dans la chaîne de production avicole est un phénomène préoccupant. Ainsi, les risques potentiels pour l'une des sources de protéines les plus essentielles au monde devraient être soigneusement évalués. L'importance de ce problème pour la santé publique est d'autant plus critique que plusieurs études ont suggéré une association entre la viande de volaille et la survenue d'infections humaines persistantes (Apostolakos et Piccirillo, 2018).

# Conclusion

Approximativement 80% des antibiotiques importants en médecine humaine sont consommés dans le secteur animal comme outil thérapeutique, mais en grande partie, pour favoriser la croissance chez les animaux sains, La résistance aux antibiotiques est un phénomène naturel mais le mauvais usage de ces médicaments chez l'homme et l'animal accélère le processus. Cette utilisation inadaptée, incontrôlée et excessive des antibiotiques chez les animaux de production industrielle ou d'élevage traditionnel contribue à amplifier la menace de la résistance aux antibiotiques.

C'est le cas de plusieurs bactéries responsables d'infections graves chez l'homme et qui sont devenues résistantes à la plupart des traitements disponibles dont les entérobactéries sont les plus incriminées.

Dans ce contexte nous avons étudié le portage digestif (prélèvement cloacal) ainsi que dans l'environnement (fientes et fumier) des entérobactéries productrices de BLSE chez le poulet de chair et élevage traditionnel. Notre étude a montré que les fermes de poulets quel que soit le type d'élevage représentent un réservoir de bactéries productrices de BLSE et multirésistantes aux antibiotiques. Celles-ci peuvent être transmises à l'homme par contact direct ou par la chaîne alimentaire.

En outre, nos résultats actuels suggèrent que la volaille peut servir de réservoir pour *E. coli* résistantes à la colistine.

Au vu de ces résultats intéressants et compte tenu des connaissances actuelles sur l'émergence du phénomène d'antibiorésistance, il nous paraît important de formuler les recommandations suivantes en vers les éleveurs :

- Améliorer leur technicité en matière d'aviculture par des formations,
- Veiller à l'état sanitaire de leurs volailles et signaler tout animal malade aux vétérinaires cliniciens (pas d'automédication),
- Favoriser l'application des bonnes pratiques d'élevage (habitat, alimentation, hygiène, biosécurité, gestion des déchets).
- Ne pas utiliser des antibiotiques de façon abusive et anarchique.

L'ensemble de ces résultats obtenus ouvrent la voie de plusieurs perspectives de recherche, qui peuvent être développés comme suit :

- Nous pourrions nous intéresser à l'identification moléculaire des bactéries multi résistantes ainsi que leurs gènes de résistance.
- Ceci nous permettra également de réaliser des enquêtes ayant pour but d'évaluer les conséquences sanitaires, technologiques et économiques, que la persistance de l'éventuelle augmentation des résistances bactériennes pourrait avoir.

# **Références bibliographiques**

- Abada S, Rouidji W. (2020). Etude du profil microbiologique des infections urinaires dans la région de Ouargla. Mémoire de Master II. Université de Ouargla.171p.
- An den Bogaard, A. E., London, N., Driessen, C. and Stobberingh, E. E. (2001). Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(6), 763-771.
- Apostolakos, I. and Piccirillo, A. (2018). A review on the current situation and challenges of colistin resistance in poultry production. *Avian Pathol*, 47(6), 546-558.
- Archundia P . D. (2016). Etude du devenir et de l'impact des antibiotiques à l'échelle d'un bassin versant : application au bassin versant du Katari (Bolivie). Environnement et Société. Université Grenoble Alpes, France.10p.
- Belmahdi, M., Bakour, S., Al Bayssari, C., Touati, A. and Rolain, J. M. (2016). Molecular characterisation of extended-spectrum beta-lactamase- and plasmid AmpC-producing *Escherichia coli* strains isolated from broilers in Bejaia, Algeria. *J Glob Antimicrob Resist*, 6, 108-112.
- Carballo, M., Esperón, F., Sacristán, C., González, M., Vázquez, B., Aguayo, S., & de la Torre, A. (2013). Occurrence of tetracycline residues and antimicrobial resistance in gram-negative bacteria isolates from cattle farms in Spain. *Adv. Biosci. Biotechnol.*4, 295–303.
- Chaalal, N., Touati, A., Bakour, S., Aissa, M. A., Sotto, A., Lavigne, J. P., & Pantel, A. (2020). Spread of OXA-48 and NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST48 and ST101 in Chicken Meat in Western Algeria. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 27(4), 492–500.
- Chabou, S., Leangapichart, T., Okdah, L., Le Page, S., Hadjadj, L. and Rolain, J. M. (2016). Real-time quantitative PCR assay with Taqman® probe for rapid detection of MCR-1 plasmid-mediated colistin resistance. *New Microbes and New Infections*, 13, 71-74.

- Chabou, S., Leulmi, H. and Rolain, J. M. (2019). Emergence of mcr-1-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* isolates from poultry in Algeria. *J Glob Antimicrob Resist*, 16, 115-116.
- Dandachi, I., Fayad, E., Sleiman, A., Daoud, Z. and Rolain, J. M. (2020). Dissemination of Multidrug-Resistant and mcr-1 Gram-Negative Bacilli in Broilers, Farm Workers, and the Surrounding Environment in Lebanon. *Microb Drug Resist*, 26(4), 368-377.
- Dauvergne, E. (2018). Détection de gènes de résistance aux antibiotiques dans les bactéries isolées des produits de la mer. Microbiologie et Parasitologie. Master 2 BioMANE (Biotechnologies Microbiologie Aliment Nutrition et Environnement). Mention Microbiologie Environnementale et sanitaire. Université de Lorraine. 56 p.
- Delarras, C. (2014). Pratique en microbiologie de laboratoire. Recherche de bactéries et de levures-moisissures. *Lavoisier*. 800 p.
- Halfaoui, Z., Menoueri, N. M. and Bendali, L. M. (2017). Serogrouping and antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from broiler chicken with colibacillosis in center of Algeria. *Vet World*, 10(7), 830-835.
- Haut Conseil de la Santé Publique. (2010). Recommandations relatives aux mesures à mettre en œuvre pour prévenir l'émergence des entérobactéries BLSE et lutter contre leur dissémination Propositions rédigées dans l'optique de définir un programme national de prévention. 71p.  
<https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=162>
- Karaiskos, I., Souli, M., Galani, I. and Giamarellou, H. (2017). Colistin: still a lifesaver for the 21st century?" *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 13(1), 59-71.
- Kumar, M., Jaiswal, S., Sodhi, K. K., Shree, P., Singh, D. K., Agrawal, P. K., & Shukla, P. (2019). Antibiotics bioremediation: Perspectives on its ecotoxicity and resistance. *Environment international*, 124, 448–461.
- Kumar, V. A., & Khan, S. (2015). Defining multidrug resistance in Gram-negative bacilli. *The Indian journal of medical research*, 141(4), 491.

- Lee, J. H., Park, K. S., Jeon, J. H., & Lee, S. H. (2018). Antibiotic resistance in soil. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(12), 1306-1307.
- Lima, T., Domingues, S., & Da Silva, G. J. (2020). Manure as a Potential Hotspot for Antibiotic Resistance Dissemination by Horizontal Gene Transfer Events. *Veterinary sciences*, 7(3), 110.
- Lin, J., Biyela, P. T., & Puckree, T. (2004). Antibiotic resistance profiles of environmental isolates from Mhlathuze River, KwaZulu-Natal (RSA). *Water Sa*, 30(1), 23-28.
- Manyi-Loh, C., Mamphweli, S., Meyer, E., & Okoh, A. (2018). Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications. *Molecules*, 23 (4), 795.
- Mesbah Zekar, F., Granier, S. A., Marault, M., Yaici, L., Gassilloud, B., Manceau, C., ... & Millemann, Y. (2017). From farms to markets: gram-negative bacteria resistant to third-generation cephalosporins in fruits and vegetables in a region of North Africa. *Frontiers in microbiology*, 8, 1569.
- Mesbah Zekar, F., Granier, S. A., Touati, A., & Millemann, Y. (2020). Occurrence of Third-Generation Cephalosporins-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in fresh fruits and vegetables purchased at markets in Algeria. *Microbial Drug Resistance*, 26(4), 353-359.
- Mezhoud, H., Boyen, F., Touazi, L. H., Garmyn, A., Moula, N., Smet, A., Haesbrouck, F., Martel, A., Iguer-Ouada, M. and Touati, A. (2015). Extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* in broiler breeding roosters: Presence in the reproductive tract and effect on sperm motility. *Anim Reprod Sci*, 159, 205-211.
- Mezhoud, H., Chantziaras, I., Iguer-Ouada, M., Moula, N., Garmyn, A., Martel, A., Touati, A., Smet, A., Haesebrouck, F., & Boyen, F. (2016). Presence of antimicrobial resistance in coliform bacteria from hatching broiler eggs with emphasis on ESBL/AmpC-producing bacteria. *Avian pathology : journal of the W.V.P.A.*, 45(4), 493–500.

- Mirabaud, M ; I. (2003). Entérobactéries à bêta-lactamases à spectre élargi en pédiatrie en 1996. Thèse de doctorat, Université de Genève. 52 p.
- Ohtaki, H., Takahashi, A., Niwa, A., Yonetamari, J., Nakayama, A., Kuchibiro, T., Ohta, H., Ito, H., Baba, H., Murakami, N., & Ohkusu, K. (2020). Evaluation of presumptive identification of Enterobacterales using CHROMagar Orientation medium and rapid biochemical tests. *Journal of clinical laboratory analysis*, 34(10), e23453.
- Organisation Mondiale de la santé Animale.( 2018). 86<sup>th</sup> General Session , Paris, 20–25 May 2018. Final Report.
- Petit, F. L’antibiorésistance dans les environnements aquatiques : une problématique d’écologie microbienne et de santé publique. *Environnement, Risques & Santé*. 2018;17(1):40-46. doi:10.1684/ers.2017.1098
- Polianciuc, S. I., Gurzău, A. E., Kiss, B., Ştefan, M. G., & Loghin, F. (2020). Antibiotics in the environment: causes and consequences. *Medicine and pharmacy reports*, 93(3), 231–240.
- Rasheed, M. U., Thajuddin, N., Ahamed, P., Teklemariam, Z., & Jamil, K. (2014). Antimicrobial drug resistance in strains of Escherichia coli isolated from food sources. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 56(4), 341-346.
- Savoye F., (2011). Optimisation du protocole de recherche des Escherichia coli Producteurs de Shiga-toxines (STEC) dans les aliments. Thèse de Doctorat. Université de Bourgogne, France. 197 p.
- Shen, Y., Zhang, R., Schwarz, S., Wu, C., Shen, J., Walsh, T. R. and Wang, Y. (2020). Farm animals and aquaculture: significant reservoirs of mobile colistin resistance genes. *Environmental Microbiology*, 22(7), 2469-2484.
- Simonet, P. (2013). Évolution de l’antibiorésistance dans le sol. *Les cahiers de la Recherche. Santé, Environnement, Travail*, (3), 42-44.
- Szekeres, E., Chiriac, C. M., Baricz, A., Szöke-Nagy, T., Lung, I., Soran, M. L., Rudi, K., Dragos, N., & Coman, C. (2018). Investigating antibiotics, antibiotic resistance genes, and microbial contaminants in groundwater in relation to the proximity of urban areas. *Environmental pollution* 236, 734–744.

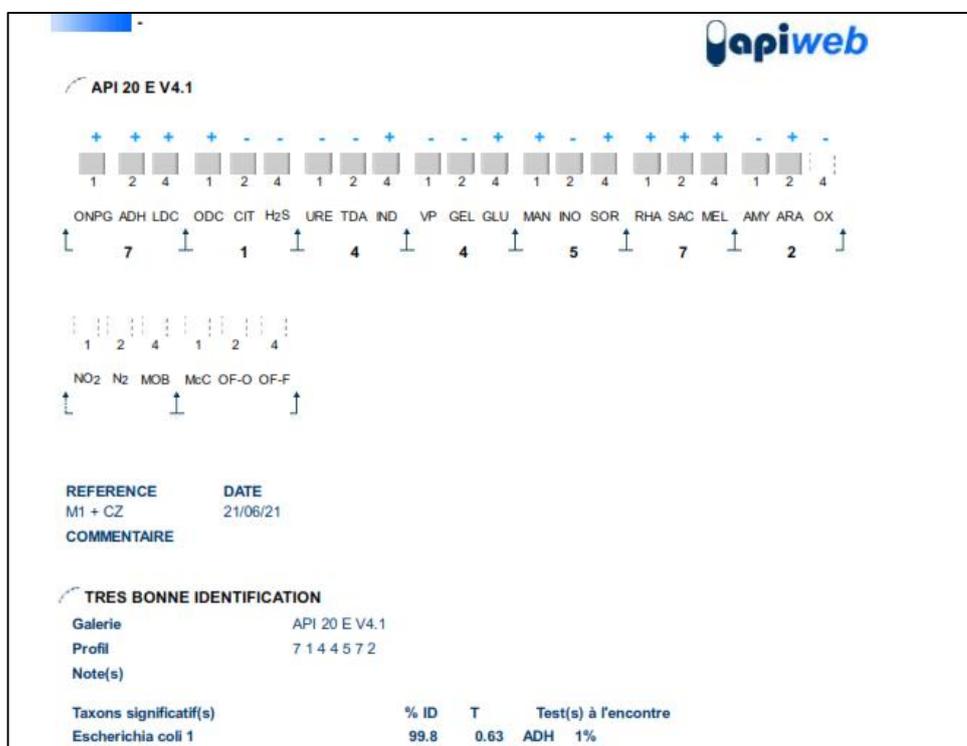
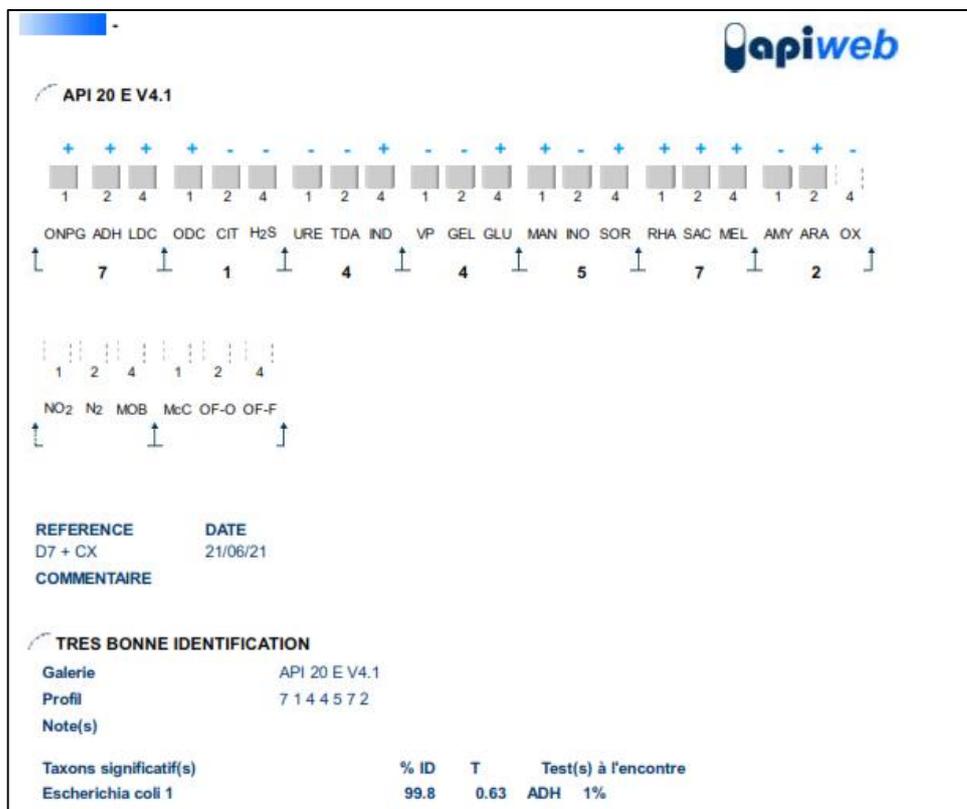
- Touati, A., & Mairi, A. (2020). Carbapenemase-Producing Enterobacterales in Algeria: A Systematic Review. *Microbial drug resistance* 26(5), 475–482.
- Touati, M., Hadjadj, L., Berrazeg, M., Baron, S. A., & Rolain, J. M., (2020). Emergence of *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* and *mcr-3* genes in North West Algerian farmlands. *Journal of global antimicrobial resistance*, 21, 132–137.
- Valverde, A., Coque, T. M., Sánchez-Moreno, M. P., Rollán, A., Baquero, F., & Cantón, R. (2004). Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* during nonoutbreak situations in Spain. *Journal of clinical microbiology*, 42(10), 4769–4775.
- Wahome, C. N. (2013). Contamination levels of groundwater, antimicrobial resistance patterns, plasmid profiles and chlorination efficacy in Ongata Rongai, Kajiado North County, Kenya (Master's Thesis, Kenyatta University). 111 p.
- Zamoume M. R. (2020)., Évaluation des teneurs d'antibiotiques dans la chair de poulet de la région centre : Contribution au Projet Algérien de Surveillance des Résidus et Contaminants dans l'Aliment « PASCRA ». Thèse de doctorat en sciences médicales, Université d'Alger. 327p.

# **Annexes**

Annexe 1: Tableau des valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour Entérobactéries

Antibiotiques testés	Charges des Disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)			Commentaires
		R	I	S	R	I	S	
Ampicilline	10µg	≤ 13	14 – 16	≥ 17	≥ 32	16	≤ 8	La réponse à l'ampicilline est valable pour l'amoxicilline  Les breakpoints des céphalosporines et de l'Aztreonam ont été révisés en fonction des propriétés PK-PD et des données cliniques. Ainsi, l'application de ces breakpoints dépend du respect de posologies précises : cefazoline (2g toutes les 8h), ceftriaxone (1g toutes les 8h), ceftriaxone (1g toutes les 24h) ... Suite à la révision des breakpoints des céphalosporines, la lecture interprétative anciennement basée sur la détection ou non d'une BLSE, n'est plus nécessaire. La réponse R, I ou S se fait en se référant aux seuls diamètres mesurés. A souligner cependant, que la détection phénotypique de la BLSE garde tout son intérêt dans les études épidémiologiques et en hygiène hospitalière. (voir chapitre recherches complémentaires).  Les breakpoints des carbapénèmes ont été révisés en fonction des propriétés PK-PD et des données cliniques. L'application de ces breakpoints dépend du respect des posologies suivantes : Imipénème : 500 mg toutes les 6h ou 1 g toutes les 8h, Ertapénème : 1g toutes les 24h, Meropénème : 1g toutes les 8h. La détection phénotypique d'une carbapénémase par le test MHT est réservée aux études épidémiologiques (voir chapitre recherches complémentaires).
Amoxicilline +Ac clavulanique	20/10µg	≤ 13	14 – 17	≥ 18	≥ 32/16	16/8	≤ 8/4	
Cefazoline	30µg	≤ 19	20 – 22	≥ 23	≥ 8	4	≤ 2	
Cefalotine	30µg	≤ 14	15 – 17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8	
Cefotaxime	30µg	≤ 14	15 – 17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8	
Ceftriaxime	30µg	≤ 22	23 – 25	≥ 26	≥ 4	2	≤ 1	
Ceftiaxone	30µg	≤ 19	20 – 22	≥ 23	≥ 4	2	≤ 1	
Imipénème/Meropénème	10µg	≤ 19	20 - 22	≥ 23	≥ 4	2	≤ 1	
Ertapénème	10µg	≤ 19	20 - 22	≥ 23	≥ 1	0,5	≤ 0,25	
Amikacine	30µg	≤ 14	15 – 16	≥ 17	≥ 64	32	≤ 16	
Gentamicine	10µg	≤ 12	13 – 14	≥ 15	≥ 16	8	≤ 4	
Acide nalidixique	30µg	≤ 13	14 – 18	≥ 19	≥ 32	---	≤ 16	
Ciprofloxacine	5µg	≤ 15	16 – 20	≥ 21	≥ 4	2	≤ 1	
Chloramphenicol	30µg	≤ 12	13 – 17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8	
Colistine	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
Furanes	300µg	≤ 14	15 – 16	≥ 17	≥ 128	64	≤ 32	
Fostomycine	200µg	≤ 12	13 – 15	≥ 16	≥ 256	128	≤ 64	
Triméthoprime+ Sulfaméthoxazole	1,25/23,75µg	≤ 10	11 – 15	≥ 16	≥ 4/76	.....	≤ 2/38	

Annexe 2 Résultats de l'identification biochimique par galerie API 20 E de quelques souches d'*E.coli* isolées



**Annexe 3** : Tableaux représentant les résultats de screening sur milieu MacConkey supplémenté d'antibiotiques

**Tableau A:** Screening de la présence de bactéries productrices de BLSE de la ferme 1

Echantillon	Code	Milieu/ fermentation Lactose
1	Ham T1 Fien1	CTX/ Lac-
		CAZ/ Lac+
		CAZ/ Lac -
2	Ham T1 Fien 2	CAZ/ Lac+
		CAZ/ Lac -
3	Ham T1 Fum 1	CAZ/ Lac+
		CAZ/Lac-

**Tableau B:** Screening de la présence de bactéries productrices de BLSE de la ferme 2

Echantillon	Code	Milieu/ fermentation Lactose
4	Ham I Fum 1	CTX/ Lac +
5	Ham I Fien 1	CTX/ Lac+
		CTX / Lac-
6	Ham I Fum 2	Neg
7	Ham I Fien 2	Neg

**Tableau C:** Screening de la présence de bactéries productrices de BLSE de la ferme 3

Echantillon	Code	Milieu/ fermentation Lactose
1	M Cloac 1	Neg
2	M Cloac 2	CAZ : Lac +
3	M Cloac 3	CAZ: Lac +
4	M Cloac 4	CTX: Lac+
5	M Fien 1	CAZ : Lac +
6	M Fien 2	CAZ : Lac+
7	M Fien 3	CAZ : Lac+
8	M Fien 4	CAZ : Lac+
9	M Fien 5	Neg
10	M Fien 6	CAZ : Lac+

**Tableau D:** Screening de la présence de bactéries productrices de BLSE de la ferme 4

<b>Echantillon</b>	<b>Code</b>	<b>Milieu/ fermentation Lactose</b>
<b>1</b>	D Cloac 1	Neg
<b>2</b>	D Cloac 2	Neg
<b>3</b>	D Cloac 3	Neg
<b>4</b>	D Cloac 4	Neg
<b>5</b>	D Cloac 5	Neg
<b>6</b>	D Cloac 6	CTX : Lac+
<b>7</b>	D Fien 1	Neg
<b>8</b>	D Fien 2	Neg
<b>9</b>	D Fien 3	Neg
<b>10</b>	D Fien 4	CTX : Lac+
<b>11</b>	D Fien 5	CTX : Lac+
<b>12</b>	D Fien 6	CTX : Lac+
<b>13</b>	D Fien 7	CTX : Lac+

**Annexe 4 :** Tableaux représentant les résultats de l'identification présumptive par Chrom agar

**Tableau E:** Résultats d'isolement et d'identification sur Chrom agar de la ferme 1 traditionnelle Hamma Bouziane

Ech 1	Ham T1 Fien1	Incolore
		Incolore
		incolore
Ech 2	Ham T1 Fien 2	Bleue
		incolore
Ech 3	Ham T1 Fum 1	Bleu
		incolore

**Tableau F:** Résultats d'isolement et D'identification par Chrom agar de la ferme 2 industrielle Hammza Bouziane

Ech 4	Ham I Fum 1	Bleu
Ech 5	Ham I Fien 1	Bleu
		incolore
Ech 6	Ham I Fum 2	Neg
Ech 7	Ham I Fien 2	Neg

**Tableau G:** Résultats d'isolement et D'identification par Chrom agar de la ferme 3 traditionnelle de Mridje

Numéro	Code	Résultat
2	M Cloac 2	Rose
3	M Cloac 3	Rose
4	M Cloac 4	Rose
5	M Fien 1	Rose
6	M Fien 2	Rose
7	M Fien 3	Rose
8	M Fien 4	Rose
10	M Fien 6	Rose

**Tableau H:** résultats d'isolement et d'identification par chrom agar de la ferme 4 industrielle de Didouche Mourad

Numéro	Code	Résultat
6	D Cloac 6	Rose
10	D Fien 4	Rose
11	D Fien 5	Rose
12	D Fien 6	Rose
13	D Fien 7	Rose

**INTITULÉ :****Isolement et identification d'entérobactéries productrices de BLSE chez les volailles et leur environnement dans la région de Constantine**

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Ecologie fondamentale et Appliquée

L'incidence croissante des infections causées par des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) est une préoccupation majeure dans le monde entier. De nombreux rapports ont indiqué la propagation de ces bactéries des animaux via l'environnement aux humains. Le but de la présente contribution était d'étudier l'occurrence d'entérobactéries productrices de BLSE chez les volailles et leur environnement dans la région de Constantine. Des échantillons cloacaux, fécaux et de fumier ont été prélevés dans quatre fermes de la région. Après criblage sur gélose sélective BLSE, la confirmation de la résistance à la production de BLSE des souches isolées a été déterminée par la méthode phénotypique. Les résultats de ce travail ont révélé que les quatre fermes abritaient des entérobactéries BLSE, avec des *Enterobacter cloacae* dans les deux premières fermes de Hamma Bouziane et *E. coli* dans les fermes de Didouche Mourad et Meridje. Tous les isolats étaient résistants à toutes les bêtalactamines testées et sensibles aux aminosides. En conclusion, les résultats démontrent une fréquence élevée d'entérobactéries productrices de BLSE dans les élevages avicoles industriels et traditionnels de Constantine et d'autres études sont nécessaires pour caractériser davantage les bactéries résistantes et leurs mécanismes de résistance.

Mots clés : Entérobactéries, Bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE), Antibioresistance

Laboratoire de recherche : Biologie et Environnement

**Jury d'évaluation :**

<b>Président du jury :</b>	<b>KARA Karima</b>	<b>MCA</b>	<b>UFMC 1</b>
<b>Rapporteur :</b>	<b>AFRI-MEHENNAOUI Fatima-Zohra</b>	<b>Professeur</b>	<b>UFMC 1</b>
<b>Co-encadreur :</b>	<b>RAHAB Hamza</b>	<b>MRB</b>	<b>C.R.Bt</b>
<b>Examineur :</b>	<b>TOUATI Laid</b>	<b>MCA</b>	<b>UFMC 1</b>

Date de soutenance : 12/07/2021;