

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana



Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre
Département des sciences biologiques
Mémoire de fin d'étude
En vue de l'obtention d'un diplôme de Master en sciences biologiques
Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

Etude de l'émergence des entérobactéries résistantes aux antibiotiques

Présenté par :

BELHENNICHE Maroua

YAHIAOUI Amel

Devant le jury

Mme DIDOUH N.

Mr AMROUCHE Z.

Mr ACHEK R.

MCB

MCB

MCB

Présidente

Examineur

Promoteur

UDB Khemis Miliana

UDB Khemis Miliana

UDB Khemis Miliana

Année universitaire : 2019/2020



Remerciements

Avant tout on remercie dieu tout puissant de nous avoir donné le privilège, la chance d'étudier et de nous avoir donné force, courage, et patience pour accomplir ce travail.

Nous avons l'honneur et le plaisir de présenter notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à Notre encadreur Mr Achek Rachid, pour sa précieuse aide, ces Orientations et le temps qu'il nous a accordé pour notre encadrement.

Nous remercions par ailleurs vivement les membres du jury de nous avoir fait l'honneur de juger notre travail.

On tient à remercier nos parent sans eux on ne serait pas là, merci pour votre soutien le long de la route, merci de nous avoir encouragé et de nous avoir poussez à montrer notre mieux,

Nous adressons nos sincères remerciements à DR. Riad de nous avoir Accueilli dans son laboratoire et pour la confiance et l'aide qu'il nous a Accordé, ainsi que toute l'équipe du laboratoire d'analyses médicales Meribai

Enfinement, nous remercions toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la concrétisation de ce mémoire.



Dédicace

*Je dédie ce modeste travail aux personnes les plus chères à mes yeux, mes parents Hannachi
et Fatma Zohra.*

*A ces deux grands cœurs qui m'entourent toujours par leur tendresse et leur affection.
A ceux qui m'ont toujours encouragée et soutenue dans mes études et m'ont éclairée et ouvert
la vie de l'avenir.*

A mes très chers parents, à qui je dois ma réussite.

*Les mots ne sont pas assez riches pour leur exprimer toute ma gratitude et mon amour envers
eux,*

*Je vous dédie le fruit de mes efforts, comme un symbole de gratitude. Vous qui avec tant rêvé
de ce jour, car je ne pourrais jamais vous remercier assez pour tous ce que vous faite pour
moi.*

Que Dieu vous me garde et que vous soyez toujours fières de moi

*A tous ceux qui me sont chers, qui m'ont aidée par leur soutien moral et leurs conseils, en
particulier :*

A mes sœurs Hadjer, Bouchra, Loubna et mon frère Abdelhak,

*A toute ma famille, mes oncles mes tentes et particulièrement ma tante Fatiha, que je
remercie infiniment de m'avoir accueillie pendant mes années d'études, et de m'avoir
soutenue.*

*A tous mes amis Dallila, Houda, Houda, Houria et Fatiha pour leur amitié, leur soutien
moral, et leur conseil*

A tous ceux que j'aime, et à tous ceux qui m'aiment...

Maroua Belhenniche



Dédicace

A ma très chère mère Fatima

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et Affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de M'encourager durant toutes les années de mes études. Qu'ALLAH te protégé et te Donne la santé, le bonheur et longue vie

A Mon Mari Belmekki Khaled avec tout mon amour

Je te remercie pour ton soutien inconditionnel durant toutes ces longues années d'études. Ton amour et ton affection remplissent mes jours de bonheur.

A la mémoire de mon Père Ahmed

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous.

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A Mes CHers Et Adoraables Soeurs

Kheira, sabrina, wassila, ibtissem En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, vous protégé et vous garde.

À MES CHERS PETITS NEVEUX ET NIECES

Ahmed, Khalil, Lina, Tasnim, Soundous

Aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour vous, Votre joie et votre gaieté me comblent de bonheur. Puisse Dieu vous garder, éclairer votre route et vous aider à réaliser à votre tour vos vœux les plus chers.

Liste des abréviations :

ADH : Arginine dihydrolase.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AMC : Amoxicilline + Acide Clavulanique

AN : Amikacine

API : Analytical profile index.

ATB : Antibiotique.

BGT : Bouillon glucosé tamponné.

BLSE : β -lactames à spectre étendu

C1G : céphalosporines de première génération.

C2G : céphalosporines de deuxième génération.

C3G : céphalosporines de troisième génération.

C4G : céphalosporines de quatrième génération.

CA-SFM : Comité Français de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.

CIP : Ciprofloxacine.

CMT : Complex mutant TEM.

CO₂ : Dioxyde de carbone.

CTX : Cefotaxime.

CTX-M : Cefotaximase, first isolated at Munich.

DHF : Dihydrofolate.

DHFR : dihydrofolateréductase.

E-BLSE: Entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu.

ECB : Examen cytotbactériologique.

FOS : Fosfomicine

GN : Gentamicine.

H₂S : Hydrogène sulfuré.

I : Intermédiaire

IM : Imipenème.

IR : intégrons de résistance.

IS : Les séquences d'insertion.

IU : Infection urinaire.

IUN : infection urinaire nosocomiale.

LDC : Lysine décarboxylase.

LPS : Lipopolysaccharides.

MH : Mueller Hinton

NaCl : Chlorure de sodium.

NADH : Nicotinamide-adénine-dinucléotide-hydrogéné.

NAL : Ac Nalidixique

O₂ : Dioxygène.

ODC : Ornithine décarboxylase.

OMS : organisation mondiale de la santé

ONPG : Orthonitrophényl-β-D-galactopyrannoside.

OXA : Oxacillinase.

PAB : L'acide para-amino-benzoïque.

pH : potentiel Hydrogène.

QRDR : région déterminant la résistance au quinolone.

R : Résistance.

S : Sensibilité.

SXT : Triméthoprime/sulfaméthoxazole.

TDA : Tryptophane désaminase.

TSB : Bouillon Tryptone-soja.

VP : Vosges-Proskauer

Liste des Figures

Figure 1 : Cibles des différentes classes d'antibiotiques	15
Figure 2 : Les modes de transmission du matériel génétique : la conjugaison, la transformation et la transduction chez les bactéries.	20
Figure 3 : différents mécanismes de résistance aux antibiotiques dans une bactérie Gram négative.....	25
Figure 4 : la galerie API20 E.....	42
Figure 5 : Disposition des disques d'antibiotiques pour le test de synergie	47
Figure 6 : Appareil NanoDrop utilisé pour vérifier la qualité de l'ADN.....	50
Figure 7 : Capture écran montre la vérification de la concentration et qualité de l'ADN.....	50
Figure 8 : Répartition des souches des entérobactéries selon la nature de prélèvement.	53
Figure 9 : Répartition des entérobactéries selon le sexe.....	54
Figure 10 : Répartition des entérobactéries selon l'âge des patients	55
Figure 11 : Répartition des entérobactéries en fonction des espèces	55
Figure 12 : Répartition des espèces des entérobactéries selon la nature de prélèvement.....	56
Figure 13 : Répartition des entérobactéries d'origine animale.....	57
Figure 14 : Taux de résistance des souches des entérobactéries d'origine humaine aux antibiotiques.....	60
Figure 15 : Taux de l'antibiorésistance chez souches des E. coli.....	61
Figure 16 : Taux de l'antibiorésistance chez K.pneumoniae.....	61
Figure 17 : Fréquences d'antibiorésistance des isolats d'entérobactéries d'origine animale.	62
Figure 18 : Taux de l'antibiorésistance chez souches des E. colid'origine animale.	63

Liste des tableaux

Tableau 1: Subdivisions hiérarchiques de classification des entérobactéries (Boone & Castenholz, 2001).	4
Tableau 2: Classification des espèces d'Entérobactéries les plus fréquentes en clinique Humaine (Perriere, 1992).	5
Tableau 3: Principales familles d'antibiotiques (Paolozzi et al., 2015).	14
Tableau 4: Antibiorésistance pour chaque famille d'antibiotiques (P Courvalin & Philippon, 1989; Duval, 1989).	23
Tableau 5: Principales résistances naturelles chez les entérobactéries (Gaudy et al., 2005)	25
Tableau 6: Phénotypes des entérobactéries aux β -lactamines (Fauchère, 1997).	26
Tableau 7: principales béta-lactamases et leurs inhibiteurs.	28
Tableau 8: Phénotypes de résistance des entérobactéries aux aminosides. (Fauchère, 1997).	30
Tableau 9: Phénotypes de résistance des entérobactéries aux quinolones (Fauchère, 1997).	32
Tableau 10: Nombre et provenance des échantillons d'origine animale.	38
Tableau 11: Tableau de lecture de l'API 20 E (BioMérieux, 2010).	44
Tableau 12: Caractéristiques des amorces utilisées dans la réaction PCR Simplex.	52

Tables des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé

Abstract

الملخص

Introduction	1
Partie I : Etude bibliographique	3
Chapitre I : Généralités sur les entérobactéries.	3
Introduction.....	3
1. Historique.....	3
2. Définition:	3
3. Classification.....	4
4. Habitat.....	5
5. Caractères bactériologiques:	5
5.1 Caractères morphologiques:	5
5.2 Caractères cultureux	6
5.3 Caractères biochimiques.....	6
5.4 Caractères antigéniques:.....	7
6. Entérobactéries en médecine:	7
6.1 Entérobactéries pathogènes:	7
6.1.1 Pathogènes opportunistes	7
6.1.2 Pathogènes spécifiques:	8
6.2 Facteurs de virulence.....	8
6.3 Infections dues aux entérobactéries	8
6.3.1 Chez l'homme.....	8
6.3.1.1 Infections communautaires:	9
6.3.1.2 Infections nosocomiales:.....	9
6.3.2 Chez les animaux	11
6.3.2.1 Les infections touchant l'espèce aviaire	11
Chapitre II : Résistance des entérobactéries aux antibiotiques	13
1. Généralités sur les antibiotiques	13
1.1 Historique	13
1.2 Définition:	13
1.3 Classification.....	14
1.4 Cibles bactériennes.....	15
1.5 Association des antibiotiques:	15
2. Principaux antibiotiques utilisés et leur mode d'action:	16

2.1 β -lactamines:	16
2.2 Aminosides ou aminoglycosides:	16
2.3 Quinolones/ Fluoroquinolones:	16
2.4 Autres antibiotiques.....	17
3. Résistance des entérobactéries aux antibiotiques	17
3.1 Notions de l'antibiorésistance	18
3.1.1 Résistance naturelle	18
3.1.2 Résistance acquise	18
3.1.3 Résistance croisée et Co-résistance	19
3.2 Supports génétiques de la résistance	19
3.2.1 Résistance chromosomique	19
3.2.2 Les éléments génétiques mobiles (Résistance extra-chromosomique).....	20
3.3 Mécanismes de la résistance acquise chez les entérobactéries:	24
3.3.1 Résistance acquise aux β -lactamines:.....	26
3.3.2 Résistance acquise aux aminosides:	29
3.3.3 Résistance acquise aux quinolones:.....	30
3.3.4 Résistance acquise à la fosfomycine:	32
3.3.5 Résistance acquise aux tétracyclines:	32
3.3.6 Résistance acquise aux atifolates : Sulfonamides etTriméthoprimé	32
3.3.7 Résistance acquise au chloramphénicol	33
Partie II : Matériel et méthodes	34
1. Méthodologie et contexte de l'étude:.....	34
2.Objectifs.....	34
3. Durée et lieu de l'étude	35
4. Matériels	35
4.1 Matériel biologique	35
4.1.1 Origine des souches:.....	35
4.1.2. Réalisation des prélèvements	36
4.1.2.1 Prélèvements d'urine	36
4.1.2.2 Prélèvements de pus.....	37
4.1.2.3 Prélèvements d'origine animale (poulet de chair)	37
4.2. Matériel non biologique	38
5. Méthodes:.....	38
5.1 Analyse cyto bactériologique des urines:.....	38
5.1.1 Examen cytologique:	38
5.1.1.1 Examen macroscopique	38
5.1.1.2 Examen microscopique	39
5.1.2. Examen bactériologique.....	39
5.2 Analyse cyto bactériologique du pus:	39
5.2.1 Examen cytologique:	39

5.2.2 Examen bactériologique	40
5.3 Analyse cyto bactériologique des souches d'origine animale:.....	40
6. Identification des entérobactéries:	40
6.1 Identification macroscopique:.....	40
6.2 Identification microscopique:.....	40
6.2.1 La coloration de Gram:.....	40
6.3 Test d'oxydase	41
6.4 Identification biochimique	42
6.4.1 Principe de la technique:.....	42
6.4.2 Méthode de réalisation:	42
7. Etude de la sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme):.....	44
7.1 Principe:	44
7.2 Technique	44
7.3 Tests de détection de BLSE	46
7.3.1 Test de synergie:.....	46
8. Détection des gènes de virulences et l'antibiorésistance par PCR	47
8.1 Activation et vérification de pureté des souches isolées	48
8.2 Extraction de l'ADN	48
8.3 Vérification de la qualité de l'ADN extrait	49
8.4 Réaction de PCR	50
8.5 Analyses statistiques	52
Partie III : Résultats et Discussion.....	53
Partie 1 : Description de la population d'étude	53
1. Répartition des souches humaines selon la nature des prélèvements:	54
2. Répartition des souches selon le sexe	55
3. Répartition des souches selon l'âge	55
4. Répartition des entérobactéries selon leurs espèces:	56
5. Répartition des espèces des entérobactéries isolées selon la nature de prélèvement:.....	56
6. Répartition des souches des entérobactéries d'origine animale:	57
Discussion partie 1	58
Partie 2 : Étude de la sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques.....	60
1. Étude de la sensibilité des entérobactéries d'origine humaine	60
1.1 Taux de sensibilité globale des entérobactéries d'origine humaine aux antibiotiques:	60
1.2 Taux de l'antibiorésistance chez <i>E. coli</i>	61
1.3 Taux de l'antibiorésistance chez <i>K. pneumoniae ssp</i> :.....	61
2. Étude de la sensibilité des entérobactéries d'origine animale:	62
2.1 Taux de sensibilité globale des entérobactéries d'origine animale aux antibiotiques:	62
2.2 Taux de l'antibiorésistance chez <i>E. coli</i>	63
Discussion partie 2.....	64
Conclusion.....	67

Référence bibliographique.....	68
Annexes I.....	82
Annexes II.....	83

Résumé :

Les infections bactériennes causées par les entérobactéries constituent de nos jours, une réalité alarmante et un problème de santé à l'échelle mondiale, que ce soit chez l'homme ou l'animale. La prise en charge des infections causées par ces souches, représente un enjeu prioritaire en raison de l'émergence des bactéries multi-résistantes. Cette étude vise comme objectif de suivre le profil épidémiologique des entérobactéries productrices des BLSE, de décrire leur niveau actuel de résistance aux antibiotiques et de rechercher certains gènes de virulence et de l'antibiorésistance. Les souches des entérobactéries ont été isolées à partir des prélèvements d'origine humaine (urine et pus) et animale (foie des poulets de chair). La sensibilité aux antibiotiques a été testée par la méthode de diffusion des disques gélose, les E-BLSE ont été détecté par le test de synergie. Le test PCR est utilisés pour la détection des gènes : *bla_{CTXMpan}*, *blaTEM*, *blaCMY*, *fimA*, *tet-W*. Un nombre de 49 souches des entérobactéries ont été isolées et identifiées, dont 31 (63,26%) souches ont été isolées à partir des prélèvements d'origine humaine (77,41% urine et 22,58% pus) et 18 (36,73%) souches ont été isolées à partir des prélèvements d'origine animale. les souches d'origine humaine ont montré une résistance élevée pour l'amoxiciline+ acide Clavulanique (80,64%), moyenne pour Cefotaxime (22,58%), Sulfaméthoxazole (48,38%) et très faible pour la gentamicine et colistine (6,45%). Les souches d'origine animale montrent une sensibilité très élevée à l'Amikacine, fosfomycine, colistine, céfotaxime (100%) et gentamicine (88.88%). Cette étude nous a permis d'avoir une idée sur les taux de résistance aux antibiotiques des entérobactéries impliquées dans les infections humaines et animales. Une action de sensibilisation au bon usage des antibiotiques couplés à une surveillance sont nécessaires pour maîtriser la diffusion de ces résistances.

Mots-clés : Entérobactéries, β -lactamases à spectre étendu, l'antibiorésistance, PCR, profil épidémiologique.

Abstract:

Bacterial infections caused by *Enterobacteriaceae* are an alarming reality today and a worldwide health problem, whether in humans or animals. The management of infections is a priority issue due to the emergence of multi-resistant bacteria. The objective of this study is to characterize the epidemiological profile of ESBL-producing *Enterobacteriaceae*, to describe their antibiotics resistance level and to investigate some virulence and antibiotic resistance genes. *Enterobacteriaceae* were isolated from human samples (urine and pus) and animal (liver of broilers chicken). The antibiotics sensitivity was tested by disc diffusion method, E-ESBLs were detected using the synergy test. The PCR method is used for the detection of genes: *bla_{CTXM pan}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CMY}*, *fimA*, *tet-W*. A number of 49 of *Enterobacteriaceae* were isolated and identified, in which 31 (63.26%) strains were isolated from human samples (77.41% from urine and 22.58% from pus) and 18 (36.73%) strains were isolated from animal samples. Human isolates showed high resistance to amoxicilin + clavulanic acid (80.64%), medium for Cefotaxime (22.58%), sulfamethoxazole (48.38%) and very low for gentamicin and colistin (6.45%). Animal isolates show very high sensitivity to Amikacin, fosfomicin, colistin, cefotaxime (100%) and gentamicin (88.88%). This study shows us the actual situation of antibiotic resistance of *Enterobacteriaceae* involved in human and animal infections. An action to raise awareness about the proper use of antibiotics coupled with surveillance is necessary to control the spread of this bacterial resistance.

Keywords : *Enterobacteriaceae*, extended spectrum β -lactamases, antibiotic resistance, PCR, epidemiological profile.

ملخص:

تعد الالتهابات البكتيرية التي تسببها البكتيريا المعوية حقيقة مقلقة اليوم ومشكلة صحية عالمية، سواء في البشر أو الحيوانات. تعتبر إدارة الالتهابات التي تسببها هذه السلالات قضية ذات أولوية بسبب ظهور بكتيريا متعددة المقاومة. الهدف من هذه الدراسة هو متابعة الملامح الوبائية لبكتيريا Enterobacteriaceae المنتجة ل-ESBL، لوصف المستوى الحالي لمقاومتها للمضادات الحيوية والبحث عن جينات معينة من أجل الفوعة ومقاومة المضادات الحيوية. تم عزل سلالات البكتيريا المعوية من عينات بشرية (بول وصدید) وحيوانات (كبد دجاج التسمين). تم اختبار الحساسية للمضادات الحيوية من خلال طريقة نشر قرص أجار، وتم الكشف عن E-ESBLs عن طريق اختبار التآزر. يستخدم اختبار PCR للكشف عن الجينات: blaCTXMpan و blaTEM و blaCMY و fimA و tet-W. تم عزل وتحديد 49 سلالة من البكتيريا المعوية، منها 31 سلالة (63.26%) تم عزلها من عينات بشرية (77.41% بول و 22.58% صديد) و 18 سلالة (36.73%) من عينات من أصل حيواني. أظهرت سلالات من أصل بشري مقاومة عالية للأموكسيسيلين + حمض الكلافولانك (80.64%)، والوسيط للسيفوتاكسيم (22.58%)، والسلفاميثوكسازول (48.38%) ومنخفضة جداً للجنتاميسين والكوليسيتين (6.45%). سلالات من أصل حيواني تظهر حساسية عالية جداً لأميكاسين، فوسفوميسين، كوليسيتين، سيفوتاكسيم (100%) والجنتاميسين (88.88%). أعطتنا هذه الدراسة نظرة ثاقبة لمعدلات مقاومة المضادات الحيوية لبكتيريا Enterobacteriaceae المرتبطة بالعدوى البشرية والحيوانية. من الضروري اتخاذ إجراء لزيادة الوعي حول تعدد الالتهابات البكتيرية التي تسببها البكتيريا المعوية حقيقة مقلقة اليوم ومشكلة صحية عالمية، سواء في البشر أو الحيوانات. تعتبر إدارة الالتهابات التي تسببها هذه السلالات قضية ذات أولوية بسبب ظهور بكتيريا متعددة المقاومة. الهدف من هذه الدراسة هو متابعة الملامح الوبائية لبكتيريا Enterobacteriaceae المنتجة ل-ESBL، لوصف المستوى الحالي لمقاومتها للمضادات الحيوية والبحث عن جينات معينة من أجل الفوعة ومقاومة المضادات الحيوية. تم عزل سلالات البكتيريا المعوية من عينات بشرية (بول وصدید) وحيوانات (كبد دجاج التسمين). تم اختبار الحساسية للمضادات الحيوية من خلال طريقة نشر قرص أجار، وتم الكشف عن E-ESBLs عن طريق اختبار التآزر. يستخدم اختبار PCR للكشف عن الجينات: blaCTXMpan, blaTEM, blaCMY, fimA, tet-W. تم عزل وتحديد 49 سلالة من البكتيريا المعوية، منها 31 سلالة (63.26%) تم عزلها من عينات بشرية (77.41% بول و 22.58% صديد) و 18 سلالة (36.73%) من عينات من أصل حيواني. أظهرت سلالات من أصل بشري مقاومة عالية للأموكسيسيلين + حمض الكلافولانك (80.64%)، والوسيط للسيفوتاكسيم (22.58%)، والسلفاميثوكسازول (48.38%) ومنخفضة جداً للجنتاميسين والكوليسيتين (6.45%). سلالات من أصل حيواني تظهر حساسية عالية جداً لأميكاسين، فوسفوميسين، كوليسيتين، سيفوتاكسيم (100%) والجنتاميسين (88.88%). أعطتنا هذه الدراسة نظرة ثاقبة لمعدلات مقاومة المضادات الحيوية لبكتيريا Enterobacteriaceae المرتبطة بالعدوى البشرية والحيوانية. من الضروري اتخاذ إجراء لزيادة الوعي حول الاستخدام السليم للمضادات الحيوية إلى جانب المراقبة للسيطرة على انتشار هذه المقاومة.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا Enterobacteriaceae، طيف ممتد-lactamases، مقاومة المضادات الحيوية، PCR، الملف الوبائي.

Introduction

Introduction

La famille des *Enterobacteriaceae* est le groupe le plus large et le plus hétérogène des bactéries Gram-négatives d'importance médicale (**Bay & Wodarg**). Elle comprend de nombreuses espèces présentes dans le tractus gastro-intestinal de l'homme et les animaux, ainsi que dans le sol, l'eau et les plantes. Environ un tiers des 30 genres connus dans cette famille regroupent des espèces pathogènes pour l'homme, provoquant diverses maladies allant des infections intestinales légères aux infections des voies urinaires, en passant par les infections nosocomiales des voies respiratoires, les infections des plaies et le choc septique.

La fréquence et la gravité des infections nosocomiales ou communautaires dont ces bactéries peuvent être responsables traduisent les difficultés de prise en charge liées principalement à leur résistance aux antibiotiques (**Frasca, Dahyot-Fizelier, & Mimosz, 2008**). Les entérobactéries sont en effet, capables de produire des enzymes inactivant les bêta-lactamines, y compris celles de large spectre comme les céphalosporines de 3^{ème} génération (**Robin, Gibold, & Bonnet, 2012**)

Dans une autre optique, les infections due aux entérobactéries chez les animaux (particulièrement les volailles) sont connues à l'échelle mondiale, elles sont responsables d'énormes pertes économiques dans le secteur avicole et constituent l'une des principales causes de saisie au niveau des abattoirs avicoles (**Alexander et al., 2003**). Ces bactéries sont transmises par les aliments ou les eaux contaminées où elles sont la principale cause des diarrhées chez les consommateurs (**Yehia, Riyadh, & Arabia, 2013**).

La pathogénicité des infections causées par les entérobactéries est associée à divers facteurs de virulence comme les toxines et les éléments d'attachement et d'effacement. Ces facteurs jouent un rôle essentiel dans la colonisation et la virulence bactériennes et sont codés par des groupes de gènes (d'origine plasmidique ou chromosomique) (**Deng et al., 2004; Hacker et al., 1997**). Les souches pathogènes vivent souvent dans un biotope de souches a virulentes qui colonisent l'homme et les animaux ; ces dernières souches représentent un réservoir de gènes de virulence et résistance aux antibiotiques, d'où la possibilité d'un transfert génétique par les éléments génétiques mobiles.

La résistance aux antibiotiques est une conséquence directe de l'utilisation massive aussi bien en médecine humaine, qu'en médecine vétérinaire ou dans l'alimentation animale (**Stöhr & Wegener, 2000; F. C. Tenover & McGowan, 1996**). Cette résistance bactérienne est la résultat d'interactions complexes entre la bactérie d'une part et son environnement d'autre part.

Introduction

La résistance aux antibiotiques est couramment détectée par des tests de sensibilité, qui décrivent le phénotype de résistance d'un organisme et ont des implications pratiques pour le traitement des patients. La résistance est en outre caractérisée par des techniques biochimiques et de biologie moléculaire comme l'analyse de restriction d'ADN, les puces à d'ADN et la PCR (**Fred C Tenover, Arbeit, & Goering, 1997**).

La résistance aux antibiotiques chez les bactéries telle que les entérobactéries est une problématique préoccupante en médecine humaine et en médecine vétérinaire. Autre, l'émergence de nouvelles résistances est un problème de santé publique dans nombreux pays. Cette problématique a été étudiée dans plusieurs publications dans le monde. En Algérie, malgré les travaux réalisés, mais très peu d'études ont été consacrées à la recherche des données épidémiologique et moléculaire concernant la résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries.

Dans le but d'avoir des nouvelles données épidémiologique et moléculaire relative à l'antibiorésistance des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) d'origine humaine et animale dans la région d'Ain defla et Médéa, nous nous sommes intéressés à réaliser ce travail qui s'est présenté en trois parties :

- Une 1^{ère} Partie, consacrée à un rappel bibliographique sur les entérobactéries et les différents types d'infections qu'elles génèrent, ainsi que leurs mécanismes de résistance aux antibiotiques.
- La 2^{ème} partie, décrit le matériel et méthodes pour l'analyse détaillée des souches isolées des prélèvements pathologiques humain et animal.
- Enfin, la 3^{ème} partie, est réservée à la présentation et discussion des résultats obtenus.

Partie I : Etude bibliographique :**Chapitre I : Généralités sur les entérobactéries.****Introduction :**

Les entérobactéries ou (*Enterobacteriaceae*) constituent une famille bactérienne hétérogène très importante, qui regroupe plus d'une quarantaine de genres et de plusieurs dizaines d'espèces, le nom d'Entérobactérie fait référence aux Entérocytes (cellule intestinale) car les bactéries appartenant à cette famille sont généralement des hôtes commensaux ou pathogènes du tube digestif. Elles participent aux grands cycles de dégradation des matières organiques ou sont étroitement associées aux plantes chez lesquelles elles peuvent déterminer des altérations nuisibles dans l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique mais aussi sont des agents causaux responsable d'infections communautaires et nosocomiales (**Pilly, 2013**).

1. Historique :

La naissance de la famille des *Enterobacteriaceae* se situe en **1937**, lorsqu'**Otto Rahn** proposa le genre *Enterobacter* pour regrouper des micro-organismes présentant des propriétés biochimiques et morphologiques communes et parmi lesquelles on trouvait déjà des noms tels qu'*Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, ou *Shigella*. Deux années après cette description qui concernait 112 espèces, ce nombre fut ramené à 67.

Avec les travaux de **Don Brenner** et de **Patrick Grimont**, cette famille a connu beaucoup de nouveaux genres et d'espèces qui furent alors découvertes.

En **1972**, **Edward** et **Ewing** intégraient 11 genres et 26 espèces dans la famille des *Enterobacteriaceae*. Une année après, 31 genres et 139 espèces étaient caractérisés.

En **1985**, **Farmer** et **al** décrivaient 22 genres comprenant 69 espèces et 29 groupes entériques.

En **1997**, 31 genres et 139 espèces étaient caractérisés (**Freney, 2000**).

2. Définition :

Les entérobactéries sont des bacilles ou coccobacilles à Gram négatif. Mobiles par une ciliature péritriche ou immobiles. Ils sont aéro- anaérobies facultatifs et se développent sur milieu ordinaire. Ne formant pas de spores. Elles sont dépourvues d'oxydase et ont la faculté d'acidifier le glucose par voie fermentative avec ou sans production de gaz, et aussi

de réduire les nitrates en nitrites (sauf quelques *Erwinia*). Elles sont à catalase positif (sauf *Shigella dysenteriae, serovar1*) (Avril *et al.*, 2000; Guiraud, 2012).

Les différences entre les nombreux genres et espèces viennent de critères plus précis comme la fermentation des différents sucres, la production ou non de sulfure, la production d'indole, la production d'uréase, la présence ou l'absence d'enzymes du métabolisme (désaminases, décarboxylases)...etc (Carip, 2008).

3. Classification :

La classification des genres, espèces, sous espèces, bio-groupes et sérotypes d'entérobactéries a longtemps été uniquement basée sur des caractéristiques biochimiques et antigéniques (Tableau 01) (Freney, 2000).

Tableau 01: Subdivisions hiérarchiques de classification des entérobactéries (Boone & Castenholz, 2001).

Rangs taxonomiques	Classification
Domaine:	<i>Bacteria</i>
Embranchement:	<i>Proteobacteria</i>
Classe:	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre:	<i>Enterobacteriales</i>
Famille:	<i>Enterobacteriaceae</i>

Les espèces les plus communément isolées en bactériologie clinique appartiennent à 12 genres : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia* (Tableau02) (Pilet, 1981).

Tableau 02: Classification des espèces d'Entérobactéries les plus fréquentes en clinique Humaine (Perriere, 1992).

	Tribu	Genre	Espèces
Groupe 1	<i>Edwardsiella</i> <i>Salmonelleae</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i> Typhi <i>Salmonella</i> paratyphi <i>Salmonella</i> enteritidis
Groupe 2	<i>Escherichieae</i> <i>Levineae</i>	<i>Escherichia</i> <i>Shigella</i> <i>Levinea</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Shigelladysenteriae</i> <i>Shigella</i> flexneri <i>Shigella</i> boydii <i>Shigella</i> sonne
Groupe 3	<i>Klebsielleae</i>	<i>Klebsiella</i> <i>Enterobacter</i> <i>Serratia</i> <i>Erwinia</i>	<i>Klebsiella</i> pneumoniae <i>Klebsiella</i> oxytoca <i>Enterobacter</i> aerogenes <i>Enterobacter</i> cloacae <i>Serratia</i> marcescens
Groupe 4	<i>Proteae</i>	<i>Proteus</i> <i>Providencia</i>	<i>Proteus</i> mirabilis <i>Proteus</i> vulgaris <i>Proteus</i> rettgerii
Groupe 5	<i>Yersinieae</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Yersinia</i> enterocolitica <i>Yersinia</i> pseudotuberculosis

4. Habitat :

Les entérobactéries sont des bactéries ubiquitaires avec un habitat très large. Ce sont des hôtes normaux ou pathologiques du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux à sang chaud relativement peu rencontrée dans d'autres sites du corps.

Dans l'intestin terminal, ces bactéries représentent plus de 10% de la flore totale (Guiraud, 2012)

Cette localisation digestive n'est pas exclusive. Les entérobactéries sont également retrouvées dans l'environnement (sol, eau...), sur les végétaux. Certaines ont un pouvoir phytopathogène ou participent à la dégradation des matières organiques, à l'altération des plantes suite à des nécroses, à une dégénérescence ou à un ramollissement (Carbonnelle, 1987).

5. Caractères bactériologiques :

5.1. Caractères morphologiques :

Les entérobactéries ont une morphologie habituellement typique de type bacilles à Gram négatif de 2 à 4 μ de long sur 0,4 à 0,6 μ de large. Généralement polymorphes, de

nombreuses espèces sont mobiles grâce à une ciliature péritriche, la longueur des flagelles dépend des conditions de culture, elle peut atteindre 20µm et la longueur d'onde des ondulations 2,3µm. D'autres sont immobiles (*Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia pestis*). La présence d'une capsule visible au microscope est habituelle chez les *Klebsiella* (**Bonnet, 2006**). La plupart des espèces pathogènes pour l'homme possèdent des fimbriae ou pili qui sont des facteurs d'adhésion. Certains genres sont thermodépendants et ne poussent pas à 37°C tels que : *Hafnia alvie* et *Yersinia enterocolitica* (**Carip, 2008**).

5.2. Caractères cultureux :

Les entérobactéries poussent facilement sur les milieux ordinaires en 24 heures à 37°C en aérobie et en anaérobie. La culture est également possible entre 20 et 40°C sur milieux gélosés. Les entérobactéries donnent les formes de colonies suivantes: (**Avril et al., 2000; Freney, 2000**).

Formes S (smooth) : Les colonies sont : rondes, lisses, bombées, blanches voire translucides, brillantes et humides. Elles ont entre 2 et 4 mm de diamètre.

Formes R (rough) : s'observent surtout avec des souches ayant subi plusieurs repiquages. Les colonies sont : vieilles ou anormales, rugueuses, sèches, à contours plats irréguliers et de teinte mate.

Formes M (muqueuses) : Les colonies sont plus grosses (le diamètre peut dépasser 10 mm) ; elles ont une tendance à la confluence. Certaines bactéries ont toujours cet aspect tel que : les *Klebsiella*. On peut les rencontrer aussi avec d'autres espèces, comme *Salmonella paratyphi* B.

Colonies naines : s'observent avec des souches déficientes dans certaines de leurs chaînes métaboliques. Elles ne sont pas exceptionnelles chez les *E. coli* isolés d'infections urinaires.

5.3. Caractères biochimiques :

L'identification des *Enterobacteriaceae* repose sur l'étude des caractères essentiellement "biochimiques" et utilisent des tests qui étudient le métabolisme protéique (présence d'uréase, production d'indole, dégradation du tryptophane) ou la fermentation des sucres (glucose, lactose, saccharose etc...), la capacité d'utiliser le citrate, la présence d'enzymes (décarboxylases, désaminases), la production d'hydrogène sulfuré ou la formation de gaz (**Kassama, 2013**).

5.4. Caractères antigéniques :

La détermination du sérotype peut être entreprise uniquement pour des souches dont l'identification est certaine. Toute autre façon de faire ne peut qu'entraîner des erreurs du fait d'agglutinations croisées non spécifiques (Avril *et al.*, 2000).

Antigènes O : ce sont des endotoxines des bactéries à Gram négatif. Ils sont composés de lipopolysaccharides (LPS) qui sont thermostables, résistent à l'alcool ou l'acide et très toxiques.

Antigènes K : ces antigènes capsulaires sont de nature polysaccharidique qui entoure la paroi de certaines entérobactéries. Parmi les antigènes K, se trouvent les antigènes L, A, B des *E.coli*, des Shigelles et l'antigène Vi de certaines *Salmonella* ou *Citrobacter*. Ces antigènes peuvent rendre la souche qui les possède inagglutinable par les antisérums O. Ils sont détruits par une ébullition de deux heures. Les antigènes d'adhérence ou adhésines, de nature protéique, en relation avec la présence de pili communs encore appelées fimbriae sont classés parmi les antigènes K (K88, K99).

Antigènes H : ce sont des antigènes flagellaires qui ne sont pas toxiques. Ils ne sont donc présents que chez les souches mobiles. Constitués d'une protéine (flagelline), ils sont thermolabiles et inactivés par l'alcool. Les réactions d'agglutination se produisent rapidement, et sont constituées d'agglutinats floconneux, facilement dissociables par agitation.

Antigène Kunin : (Ou antigène Enterobacterial Common Antigen) : cet antigène commun aux *Enterobacteriaceae* n'est pratiquement retrouvé que dans cette famille et a un intérêt taxonomique. Sa présence chez les *Yersinia* a permis d'inclure ce genre dans la famille des entérobactéries.

6. Entérobactéries en médecine :

6.1. Entérobactéries pathogènes :

Les entérobactéries pathogènes appartiennent aux deux types principaux :

6.1.1. Pathogènes opportunistes :

Ce sont des bactéries présentes au niveau intestinal mais qui peuvent, à des degrés variables, devenir agressives pour l'homme. On les dit "pathogènes opportunistes". La fréquence de leurs manifestations pathologiques est en augmentation, car souvent due à l'existence chez ces espèces de plasmides de résistance aux antibiotiques permettant leur

sélection et favorisant à leur avantage les dysmicrobismes. Ce caractère est particulièrement vérifié avec l'espèce *Klebsiella pneumoniae*, hôte des voies respiratoires, il peut être responsable d'infections (Flacrois, 2000; Hygis, 1998).

6.1.2. Pathogènes spécifiques :

Ce sont des bactéries non présentes au niveau intestinal, leur présence dans l'organisme est anormale quel que soit leur nombre et entraînent souvent une infection dont la gravité dépend de leur point d'entrée comme : *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* et *Yersinia* (Flacrois, 2000).

6.2. Facteurs de virulence :

Les souches pathogènes diffèrent des souches commensales par l'expression de facteurs de virulence dont les gènes sont le plus souvent situés sur des plasmides. On distingue : (Camille, 2014; Eyquem, Alouf, & Montagnier, 2000; Philippon & Arlet, 2005)

- **Antigènes d'adhésion ou adhésines** : représentés par les fimbriae qui permettent à la bactérie d'adhérer aux cellules (urinaires, entérocytes).
- **Toxines** : Il existe de nombreux types des toxines, certaines sont voisines de celles des *Shigelles* (*Shigellalike*), d'autres de celles du vibron cholérique.
- **Enzymes inactivant les antibiotiques** : qui confèrent un mécanisme de résistance aux bactéries. Les plus connues sont les bêta-lactamases (pénicillinases, céphalosporinases) et les enzymes inactivant les aminosides.

6.3. Infections dues aux entérobactéries :

6.3.1. Chez l'homme

Les entérobactéries représentent la flore endogène de l'intestin. Elles sont à l'origine d'un grand nombre d'infections communautaires et d'infections nosocomiales (Pilly, 2013).

Elles induisent un risque de complications sévères pour d'autres maladies. Leurs ports d'entrée les plus fréquentes sont les voies urinaires et digestives. Chez l'homme, notamment *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp, *Proteus* sp, *Providencia* sp, et *Serratia marcescens*, sont responsables d'environ 50 % des infections nosocomiales (Habi, 2009).

6.3.1.1. Infections communautaires :

Les infections communautaires à entérobactéries sont dues essentiellement à *E. coli*, *Proteus* et *Klebsiella pneumoniae*. Certaines infections communautaires ont une incubation supérieure à 48 heures (**Anonyme.01**).

6.3.1.2. Infections nosocomiales :

Une infection nosocomiale (IN) est une infection survenant plus de 48 heures après l'admission aux structures sanitaires et qui n'était ni présente, ni en incubation dans cette période chez le patient. Les services les plus concernés sont : le service de réanimation (20%), service des brûlés, service du Chirurgie, service d'hématologie et service de long séjour (**Bricaire & Bricaire, 2007**).

La surveillance des infections nosocomiales (IN) en réanimation est prioritaire car le risque est bien supérieur à celui encouru par les patients en hospitalisation conventionnelle (**Lepape, Machut, & Savey, 2018**).

On distingue plusieurs types d'infections nosocomiales qui relèvent de modes de transmission différents :

- **Infections d'origine endogène** : le malade s'infecte avec ses propres germes, à la faveur d'un acte invasif et/ou en raison d'une fragilité particulière.
- **Infections d'origine exogène**: il peut s'agir; soit d'infection croisée, transmises d'un malade à l'autre par les mains ou les instruments de travail du personnel médical ou paramédical, soit d'infections provoquées par les germes du personnel porteur ou bien des infections liées à la contamination de l'environnement hospitalier (eau, air, matériel, alimentation,...).

Chez l'homme, les infections nosocomiales, les plus fréquemment rencontrées sont :

les pneumopathies nosocomiales, les infections urinaires, les infections liées aux cathéters veineux, et les infections de site opératoire (**Marco.L, 2007**).

- **La pneumopathie nosocomiale** : est un problème de santé publique qui concerne tous les services hospitaliers représentant, la deuxième localisation d'infection nosocomiale et la première en réanimation (**Shimi et al., 2015**). Elle correspond à toute pneumonie survenant chez un malade dont la respiration est assistée par une machine soit de manière invasive par l'intermédiaire d'un tube endotrachéal ou d'une trachéotomie soit de manière non invasive par l'intermédiaire d'un masque facial dans les 4 premiers jours

de l'hospitalisation. Elles sont rencontrées chez les sujets immunodéprimés, âgés ou fragiles (broncho pneumopathie chronique, éthylisme), hospitalisés notamment pour cancers, leucémies, transplantations d'organe, comas... La cause de ces pneumonies est des bactéries à Gram négatif (60% des cas) : *K.pneumoniae*, *E.coli*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter* sp, *P.aeruginosa*. La pneumonie à *K.pneumoniae* réalisant généralement un tableau sévère, avec expectoration « rouillée » ou hémorragique avec opacité alvéolaire à la radiographie et évolution fréquente vers l'abcédation (Delmée.M, 2004; Pilly, 2013).

La plupart des patients de réanimation nécessitent le recours à la ventilation mécanique invasive et donc la pneumopathie acquise de ces ventilations (PAVM) est définie par une pneumopathie infectieuse nosocomiale développée dans un délai ≥ 48 h après l'intubation et la ventilation mécanique. Elle représente la première cause de mortalité due à une infection nosocomiale en réanimation (Malajati .B., 2012).

Le principal facteur de risque d'acquisition d'une (PNAVM) est la présence de la sonde d'intubation endotrachéal (Nasiriani *et al.*, 2016). La durée et l'usage d'équipements de ventilation assistée mal désinfectés est également considérée comme un des facteurs de risque de pneumopathie nosocomiale (Ricard, 2007).

- **L'infection urinaire (IU) :** est la plus fréquente des infections nosocomiales. Elle représente toujours la deuxième cause d'infection acquise en réanimation après les pneumopathies nosocomiales et elle est l'agression d'un tissu par un (ou plusieurs) micro-organisme, en terme global elle est définie par la présence anormale de germes dans l'urine. Elle regroupe à la fois la colonisation ou bactériurie asymptomatique et l'infection du tractus urinaire symptomatique qui génère une réponse inflammatoire et des signes de nature et d'intensité variables selon le terrain (Alfandari, 2003; Cabrolier, Lafolie, & Bertrand, 2014; Vincent *et al.*, 1995).

La plupart des infections urinaires comme : cystites, pyélonéphrites ou prostatites sont dues à la propagation par voie ascendante des bactéries d'origine intestinale d'où la prédominance des entérobactéries au sein des quels : *Proteus* (*P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. rettgeri*) et *Klebsiella* (*K.pneumoniae*, *K.oxytoca*) qui comptent pour environ 4% chacune et *Entérobacter. Escherichia coli* est le plus souvent mis en cause ($\geq 80\%$) (Pilly, 2013). Le risque de survenue d'une infection urinaire nosocomiale (IUN) est relativement stable dans les quatre premiers jours puis augmente de façon très significative de 5% par jour de sondage.

- **Les infections digestives :**

Se caractérisent par l'association d'une fièvre avec un syndrome diarrhéique au cours de salmonelloses, ou un syndrome dysentérique au cours de Shigelloses. *E. coli* est à l'origine de tableau diarrhéique dont le mécanisme est variable : toxinique entéro-invasif dont *E. coli* de type O157 : H7 a été décrite comme cause de syndrome hémolytique et urémique ; plus particulièrement chez l'enfant, après l'ingestion d'aliments contaminés.

On trouve aussi d'autres infections comme les méningites, les arthrites et spondylodiscites souvent secondaires à une bactériémie et les entérobactéries colonisant facilement les plaies et les ulcérations chroniques. Chez le diabétique, elles peuvent contribuer aux surinfections d'un mal perforant plantaire (Pilly, 2013).

6.3.2. Chez les animaux

Chez les animaux, *Escherichia coli*, peut provoquer des infections urinaires et gastro-intestinales « pyomètre » chez les chiens, une septicémie, des infections des voies respiratoires dans le cas des oiseaux ,et provoque une maladie extra-intestinale chez les poulets de chair âgés de 3 à 12 semaines « la colibacillose aviaire »,la bactérie est responsable de 20% à 40% de mortalité chez les poulets de chair en fonction de la gravité de la maladie (Ameen-Ur-Rashid *et al.*, 2017; Hricová *et al.*, 2017; Syuhada *et al.*, 2013).

6.3.2.1. Les infections touchant les volailles :

Chez les animaux, l'infection la plus fréquente c'est :

- **La colibacillose :** est une maladies infectieuse, la plus fréquente et la plus importante en pathologie aviaire, cause des mortalités, des baisses de performances et des saisies à la battoir (Boissieu., 2008). Les colibacilloses aviaires sont des surinfections lors des manifestations bactériennes ou virales et aussi prennent la forme générale contrairement aux infections des mammifères (Gudah, 2016). L'agent causal est *Escherichia coli*, de famille *Enterobacteriaceae*, qui sont des hôtes commensaux du tractus digestif et la plus part d'entre elles ne sont plus pathogènes seulement à la présence de la souche *Avianpathogenic E. coli* (APEC). Le pouvoir antigénique est caractérisée par l'antigène Ag O, Ag H, Ag K, ces derniers permettent d'identifier plusieurs sérotypes dont les plus pathogènes sont : O₂ :K₁, O₇₈ :K₈₀, O₁ :K₁. Elle résiste au système immunitaire et

capable de multiplier lors une carence en fer et production des effets cytotoxiques comme présente une sensibilité aux désinfectants usuels (**Boissieu, 2008**).

La colibacillose est très répandue dans le monde à cause de la sensibilité de toutes les espèces aviaires à *E. coli* dont les facteurs déclenchant sont : l'âge, le stress, le taux élevé d'ammoniac, baisse T°, des infections concomitantes. La transmission se fait par voie : aérienne, digestive, génitale ou par l'intermédiaire de l'eau potable.

La principale source d'infection est la matière fécale des oiseaux malades ou les porteurs sains qui contiennent des grandes quantités du germe :chez le poulet, les concentrations sont de l'ordre de 10⁶ colibacilles par gramme de matière fécale (**Bachir Pacha M, 2013; Stordeur & Mainil, 2002**). Le premier signe clinique rencontré est une chute importante de la consommation alimentaire, puis un abattement, hyperthermie (42-44°C). Les animaux les plus atteints présentent des signes de détresse respiratoire « bec ouvert, respiration accélérée et irrégulière » et une diarrhée blanchâtre (**Assane.M.M, 2012**).

- **Salmonelloses :**

A l'exception de *Salmonella enteritica* sérotype Typhi et *S.enteritica* sérotype Paratyphi A et *S.enteritica* sérotype *paratyphi C* qui sont spécifiques aux humains et dont le seul réservoir est l'homme, tous les autres sérotypes peuvent être considérés comme des espèces zoonotiques ou potentiellement zoonotiques (**Acha Jamet & Szyfres, 1980**).

Les volailles sont en général des porteurs sains (**Rostagno et al., 2006**), et l'incidence technico-économique du portage en poulet de chair semble être minime, en fait, c'est le rôle des salmonelles dans les toxi-infections alimentaires collectives qui explique leur importance dans la filière. En effet beaucoup de sérovars (plus de 156 selon ICMSF, 1996), isolés des poules et des canards aux Etats Unis sont largement la source la plus importante des contaminations alimentaires. Certains sérovars particulièrement *Salmonella enteritidis* et *Salmonella Typhimirium*, se sont avérés redoutables (**ICMSF, 1996**).

Chapitre II : Résistance des entérobactéries aux antibiotiques

1. Généralités sur les antibiotiques :

1.1. Historique :

-Dès l'année **1877**, **Pasteur et Joubert** mettent en évidence la notion d'antagonisme microbien (antibiose) : des cultures de bactéries charbonneuses poussent mal lorsqu'elles sont souillées par certaines bactéries saprophytes.

-En **1912**, **Vandenner** montra que les extraits obtenus à partir d'*Aspergillus fumigatus* avaient une activation anti-staphylococcique.

-En **1928**, **Fleming** découvre la pénicilline G.

-En **1935** les sulfamides sont découverts.

-Entre **1938** et **1942**, la pénicilline G est purifiée et utilisée en clinique par **H. Florey** et **E. Chain**.

-En **1940**, le terme d'antibiotique a été proposé par **R. Dubos**. **Waksman** isole l'actinomycine produite par une *Streptomyces* et il découvre la streptomycine active en particulier sur le bacille de Koch.

-A partir de cette date, de nombreux antibiotiques sont découverts : Chloramphénicol, Tétracyclines en **1949**, Aminosides en **1950**, Macrolides en **1952**, Glycopeptides en **1958**, Streptogramines en **1962**, Triméthoprimine en **1970** et Oxazolidinones en **2000** (**Ramdani B. N., 2016**).

1.2. Définition :

Le terme d'**antibiose** crée par **Vuillemin** (France) en **1889** pour décrire une situation dans laquelle un micro-organisme détruit un autre (**Paolozzi, Liébart, & Sansonetti, 2015**).

Les antibiotiques (Du grec **anti** : « contre », et **bios** : « la vie ») sont des substances élaborées par des micro-organismes (procaryotes ou eucaryotes) ou obtenues à l'heure actuelle par synthèse ou héli synthèse et capables d'inhiber la multiplication (action bactériostatique) ou de tuer d'autres micro-organismes (action bactéricide) (**Willoquet et al., 2015**).

1.3. Classification :

Pour mieux connaître les antibiotiques afin qu'ils soient utilisés à bon escient, on procède à leur classification selon certains critères : (Willoquet *et al.*, 2015).

- Les antibiotiques ayant une même structure chimique, à l'origine de leur mécanisme d'action se classent dans une même famille
- Au sein d'une même famille, les antibiotiques peuvent se différencier par leur spectre d'activité et sont réunis alors dans des groupes
- Au sein d'un même groupe, l'activité antibactérienne est identique mais les antibiotiques peuvent se différencier par leurs propriétés pharmacologiques ou leur tolérance
- Peuvent être aussi classés selon l'origine de la molécule : naturelle, synthétique ou semi synthétique (Ramdani B. N., 2016).

Les principales familles d'antibiotiques sont présentées dans le tableau 03.

Tableau 03 : Principales familles d'antibiotiques (Paolozzi *et al.*, 2015).

Familles	Caractéristiques chimiques	Sous familles
β-lactamines	Cycle à 4, 5 ou 6 atomes de C avec un -NH fixé au C-β	Pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes, monobactames
Glycopeptides	Heptapeptide cyclique liant un sucre (mannose, glucosamine ou glucose)	
Tétracyclines	Noyau naphtacène-carboxamidetétracyclique lié à des substituants en position 5, 6, 7	
Macrolides et apparentés	Anneau macrolactonique modifié par un ou plusieurs sucres	
Phenicolés	Dévisés de l'acide dichloroacétique et d'un phénylsubstitué	Chloramphénicoles, thiamphénicoles
Aminosides	Aminocyclitol, lié à 2 ou rarement 3 oses	Streptomycine
Ansamycines	2 cycles aromatiques liés par une longue chaîne constituée d'un aminocyclitol auquel sont liés des oses	Rifampycine, rifamycine, rifabutine
Sulfamides	Para-aminobenzène sulfamide	
Triméthoprime	Diaminopyrimidine	Inhibiteur compétitif la dihydrofolate-réductase
Polymyxines	Antibiotiques peptidiques cycliques	Polymyxines B et E

1.4. Cibles bactériennes :

Les antibiotiques se différencient des antiseptiques par leur mécanisme d'action. Ils agissent à un niveau précis des structures bactériennes, dénommé « site d'action » (figure 1) : (Willoquet *et al.*, 2015).

- **La paroi** : inhibition de synthèse de la paroi bactérienne (β -lactamines, glycopeptides, fosfomycine)
- **La membrane cytoplasmique** : inhibition de la synthèse de la membrane (polymyxines)
- **Le chromosome** : inhibition de la synthèse de l'ADN (quinolones)
- **Le ribosome** : inhibition de la synthèse protéique (cycline, aminosides, macrolides)

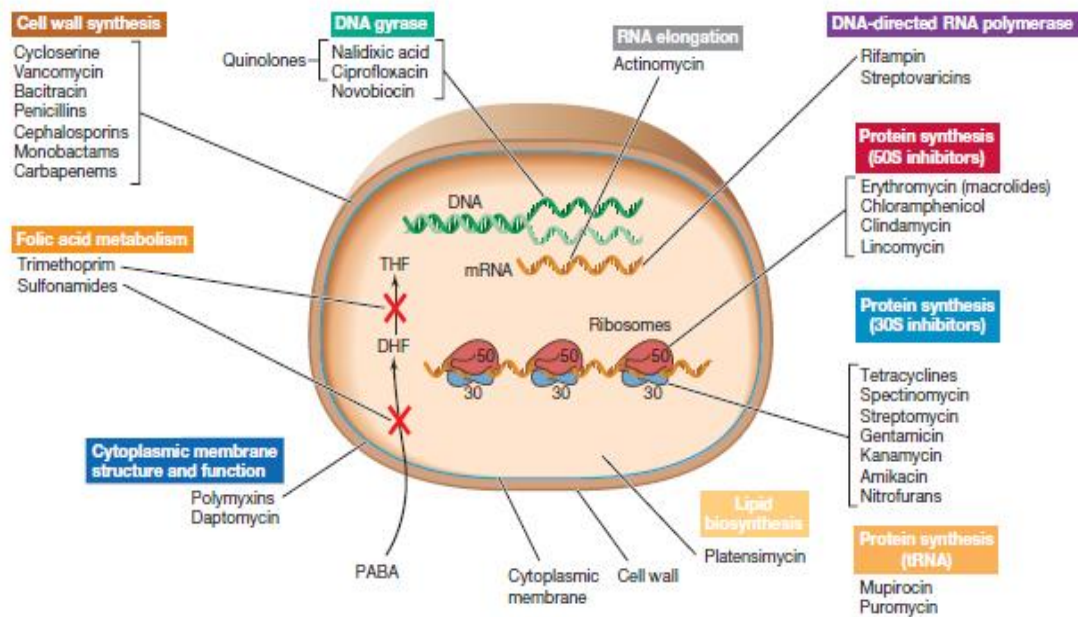


Figure 01: Cibles des différentes classes d'antibiotiques (Madigan, 2012).

1.5. Association des antibiotiques :

Dans des situations cliniques, l'association de deux antibiotiques ayant des sites d'action distincts sur la bactérie permet d'obtenir une meilleure efficacité thérapeutique. On peut distinguer quatre effets de l'association : (P. Courvalin & Leclercq, 2006).

- **Effet de synergie** ; l'effet est significativement supérieur à la somme des effets de chaque antibiotique étudié isolément à la même concentration, comme la synergie des associations β -lactamines et aminosides.
- **Effet additif** ; l'effet de l'association est égal à la somme des effets de chaque antibiotique étudié isolément à la même concentration que dans l'association.
- **Effet différent** ; l'activité de l'un des antibiotiques n'est pas affectée par la présence de l'autre.
- **Effet d'antagonisme** ; l'association diminue l'activité de l'un ou l'autre des antibiotiques comme l'association des tétracyclines avec une β -lactamine ou avec un aminoside.

2. Principaux antibiotiques utilisés et leur mode d'action :

2.1. β -lactamines :

Ce sont des antibiotiques caractérisés par la structure de base : le noyau β -lactame, elles sont subdivisées en 4 groupes majeurs : (Bryskier, 1999).

- **Les pénèmes** : principalement les pénicillines (ampicilline et dérivés, Ticarcilline, ...), et Oxapénèmes (Acide clavulanique, AC + Amoxicilline, AC + Ticarcilline).
- **Les céphèmes** : comprennent principalement les céphalosporines, qui classés en 4 générations (C1G, C2G, C3G et C4G).
- **Les pénèmes** : Carbapénèmes (Imipénème) sont des ATBs à large spectre.
- **Les β -lactamines monobactames** : Monobactames et Aztéréonam actifs particulièrement sur *Pseudomonas aeruginosa*.

2.2. Aminosides ou aminoglycosides :

Ces antibiotiques sont bactéricides à large spectre, en association avec d'autres familles d'antibiotiques plus souvent aux β -lactamines (effet synergique). Ils sont actifs sur Staphylocoque sensible à la méthicilline et les bacilles Gram négatif aérobies (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*). Ils agissent sur la synthèse protéique des bactéries en se fixant sur la sous unité 30S du ribosome (Adja.N, 2005).

2.3. Quinolones/ Fluoroquinolones :

Les quinolones sont des agents synthétiques à activité bactéricide qui inhibent des enzymes (Topoisomérase ou ADN gyrase) qui participent à l'enroulement des brins d'ADN. Ils sont

actifs uniquement sur les germes à Gram- (Delmée.M, 2004). Dans les années 80, la fluoration de ces molécules en position 6 a donné naissance à des Fluoroquinolones. (Willoquet *et al.*, 2015).

2.4. Autres antibiotiques :

Fosfomycine :

C'est un antibiotique bactéricide à large spectre, actif sur la plupart des *Enterobacteriaceae* et sur les Staphylocoques. Il agit au début de la synthèse du peptidoglycane aux chaînes glucidiques. Il se fixe de manière covalente sur une enzyme impliquée dans la formation de l'acide N-acétyl-muramique (Adja.N, 2005).

Triméthoprime-Sulfaméthoxazole :

C'est un antibiotique bactéricide résulte de l'association des sulfamides et les triméthoprimes qu'ils sont des antimétabolites qui entrent en compétition avec les substrats naturels dans la synthèse des folates (l'inhibition la synthèse de l'ADN) ; les deux sont des analogues structuraux de l'acide para-amino-benzoïque (PAB) et dihydrofolate (DHF), respectivement. Donc sont des inhibiteurs compétitifs des deux enzymes dihydroptéroate synthèse (DHPS) et dihydrofolateréductase (DHFR) (Gaudy, Buxeraud, & Mereghetti, 2005).

Chloramphénicol :

Cet antibiotique a un effet bactériostatique sur la plupart des espèces bactériennes. Leur mode d'action est l'inhibition la synthèse protéique par fixation réversible au site A du ribosome (P. Courvalin & Leclercq, 2006).

3. Résistance des entérobactéries aux antibiotiques :

L'efficacité des antibiotiques utilisés dans le traitement des infections causées par les *Enterobacteriaceae* dépend de la quantité d'antibiotique au contact de la cible, l'affinité de l'antibiotique pour la cible et la production d'enzyme inactivant l'antibiotique. Ces facteurs sont responsables soit d'une résistance naturelle, soit d'une résistance acquise (P. Courvalin & Leclercq, 2006).

3.1. Notions de l'antibiorésistance :

La résistance bactérienne aux antibiotiques a rapidement constitué un problème de santé important à l'échelle mondiale. Elle repose sur deux définitions ; une souche est résistante lorsque la concentration d'antibiotique qu'elle est capable de supporter est notamment plus élevée que la concentration atteignable in-vivo ; ou une souche supporte une concentration d'antibiotique notablement plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres bactéries de la même espèce (**Qassimi.L, 2010**).

Les bactéries sont dites multirésistantes lorsqu'à la suite d'une accumulation de résistance naturelle et acquise, elles ne sont sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotique. Il y a deux types de la résistance :

3.1.1. Résistance naturelle :

La résistance naturelle ou intrinsèque à un antibiotique est essentiellement due à la présence de gènes chromosomiques ; elle est donc commune à toutes les bactéries d'une même espèce (**Peyrou, 2001**).

Elle peut être due à des particularités structurales s'opposant à l'action de l'antibiotique sur sa cible comme la présence d'une membrane externe chez les bactéries à Gram négatif les rendant naturellement résistantes aux antibiotiques de poids moléculaire élevé comme les glycopeptides. Elle peut être aussi due à des particularités métaboliques spécifiques : le bacille de la tuberculose par exemple n'est sensible qu'à un nombre restreint d'antibiotiques en raison de son métabolisme original. La résistance naturelle peut enfin être médiée par l'expression constitutive ou induite d'une enzyme d'inactivation ou par la mise en œuvre d'un processus d'échappement vis à vis de l'antibiotique.

Dans tous les cas, la résistance naturelle fait partie des caractères normaux de l'espèce ; elle détermine le niveau de sensibilité « basal » des bactéries et définit le phénotype sauvage d'une espèce. C'est la résistance de classe. Elle est constitutive et touche toute une famille d'antibiotiques (**Gansmandel, 2011**).

3.1.2. Résistance acquise :

Ce terme est utilisé pour désigner le résultat d'un processus permettant à des bactéries d'une espèce originellement sensible de devenir résistante à un ou plusieurs antibiotiques (**Diallo, 2013**). L'acquisition de ces résistances est déterminée par des modifications génétiques

consécutives à des mutations ponctuelles ou à l'acquisition « de novo » de gènes de résistance exogènes.

La capacité de multiplication très rapide des bactéries favorise la sélection d'évènements génétiques favorables et la possibilité d'échange d'information même entre espèces lointaine leur conférant un très grand pouvoir d'adaptation aux contraintes du milieu. L'évolution des mécanismes de résistance aux antibiotiques, et notamment aux β -lactamines illustre parfaitement ce phénomène (**Gansmandel, 2011**).

3.1.3. Résistance croisée et Co-résistance :

La résistance croisée résulte d'un seul mécanisme biochimique et concerne des antibiotiques appartenant à la même famille.

La Co-résistance est liée à plusieurs mécanismes (plusieurs gènes de résistances impliquées) et concerne des antibiotiques appartenant à différentes familles (**Sekhr.A.N,2011**).

3.2. Supports génétiques de la résistance :

L'intérêt suscité par les enjeux liés à la résistance aux antibiotiques a mené de plus en plus de chercheurs à travailler sur le sujet, aboutissant à la découverte de nombreux mécanismes d'adaptation bactérienne. Parmi les modalités d'acquisition de la résistance aux antibiotiques, le transfert horizontal de gènes est un élément-clé. Ce type de transfert a probablement lieu dans tous les écosystèmes terrestres colonisés par les bactéries. Ainsi ces transferts ont été mis en évidence dans de nombreux écosystèmes, tels les sols, les rivières, les environnements marins, mais aussi les tubes digestifs d'insectes ou de mammifère (**Soto, Martín, & Mendoza, 2003**). Différents éléments génétiques sont impliqués dans ce transfert de gènes.

3.2.1. Résistance chromosomique :

a. Résistance naturelle :

Le chromosome bactérien est porteur des informations génétiques nécessaires à l'existence même de la bactérie et contient aussi les gènes responsables de sa résistance naturelle intrinsèque (liée à sa structure ou à son métabolisme). Les gènes de résistance codant pour des enzymes d'inactivation ou des systèmes d'échappement s'expriment de façon constitutive lorsqu'ils sont portés par le chromosome conférant les caractères de résistance naturelle de la bactérie (**Gansmandel, 2011**).

b. Résistance acquise :

La résistance chromosomique acquise résulte d'une mutation. La fréquence de ces mutations est faible et variable (10^{-6} à 10^{-9}) mais la mutation est stable et transmissible à la descendance. La résistance apparaît dans ce cas au hasard et n'est donc pas influencée par l'antibiotique qui ne fait que la révéler (**Rowe-Magnus *et al.*, 2001**).

La mutation du gène peut entraîner l'apparition d'une protéine particulière ou d'une variabilité structurelle responsable de la résistance ; elle peut aussi entraîner la disparition ou la modification d'une protéine structurale ou enzymatique normale. En absence d'antibiotiques dans le milieu exerçant une pression de sélection, la plupart des mutants naturels vont disparaître (**Manson, Hancock, & Gilmore, 2010**).

3.2.2. Les éléments génétiques mobiles (Résistance extra-chromosomique) :

La résistance aux antibiotiques acquise par les bactéries est principalement due à la présence de trois types d'éléments extra-chromosomiques portant des gènes de résistance : les plasmides, les transposons et des cassettes de résistances insérées sur un intégrons (**Bennett, 2008; Martinez, 2009; Walsh, 2006**). Ce type de résistance est transmissible d'une souche ou d'une espèce à une autre selon trois modes de transmission, à savoir la conjugaison (transfert direct entre deux bactéries ayant établi temporairement un contact physique), la transformation (transfert d'ADN nu) et la transduction (transport d'ADN bactérien par des bactériophages) (Figure 02).

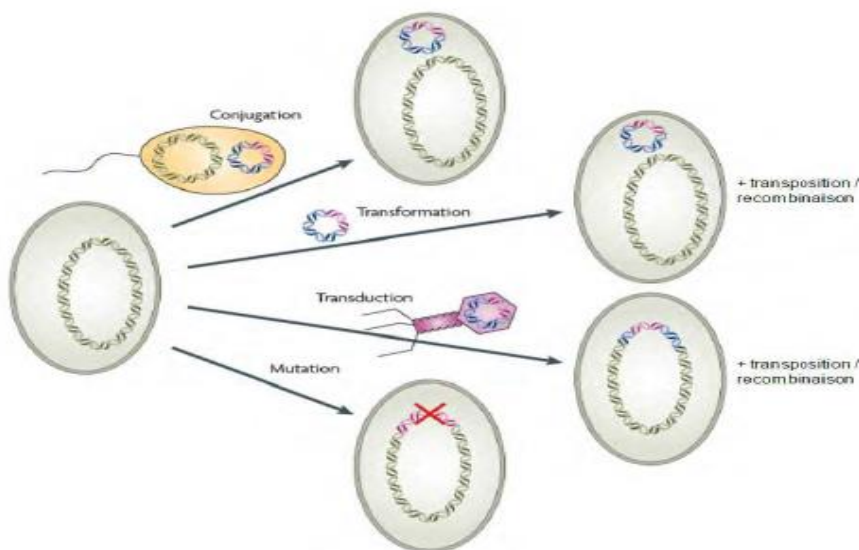


Figure 02 : Les modes de transmission du matériel génétique : la conjugaison, la transformation et la transduction chez les bactéries (**Andersson & Hughes, 2010**).

a. Les plasmides :

Les plasmides bactériens revêtent une importance toute particulière dans l'étude des phénomènes de résistance car ils constituent à la fois un vecteur de premier plan pour la dissémination des résistances et un immense réservoir génétique. Comme les chromosomes, les plasmides codent pour des protéines et des molécules d'ARN et se répliquent durant la croissance bactérienne. Les plasmides partagent certaines fonctions de partition et quelques recombinaisons spécifiques de site avec le chromosome de l'hôte. Contrairement aux chromosomes, les plasmides ne portent toutefois pas de gènes essentiels à la croissance bactérienne. Ils codent plutôt pour des protéines dont la fonction est de conférer un avantage sélectif comme la résistance aux antibiotiques ou encore des facteurs de virulence (**Snyder & Champness, 2007**).

b. Séquences d'insertion et transposons :

Les séquences d'insertion, aussi appelées éléments IS, sont de courtes séquences d'ADN (0,2 à 6 kpb) qui portent uniquement le gène codant pour la protéine responsable de la transposition, la transposase, et les sites reconnus par cette enzyme. Ces sites sont des séquences inversées répétées situées à chaque extrémité de la séquence d'insertion. Généralement d'une taille de 15 à 25 pb, elles varient de manière à ce que chaque type d'IS ait des séquences inversées répétées caractéristiques. Contrairement à d'autres mécanismes qui réorganisent l'ADN, la transposition de ces éléments génétiques ne requiert pas de régions d'homologie étendues pour que la recombinaison puisse s'effectuer. Ces éléments transposables jouent un rôle très important dans l'évolution des bactéries puisqu'ils sont à l'origine de multiples réarrangements de leur génome.

Les transposons (2-20 kpb) sont composés de séquences d'ADN qui fonctionnent comme des sites de recombinaison et de gènes codants pour des protéines qui participent à la réaction de recombinaison. Les sites de recombinaison sont situés aux deux extrémités du transposon et organisés en séquences inversées répétées. La taille de ces répétitions inversées terminales varie entre ~25 et quelques centaines de paires de bases. Les sites de recombinaison ne sont pas des répétitions exactes et portent les séquences de reconnaissance des transposases (**Diallo, 2013**).

c. Les intégrons :

Les intégrons, plus récemment décrits vers la fin des années 80, jouent un rôle majeur dans l'acquisition et l'expression de gènes de résistance aux antibiotiques, notamment chez les bactéries à coloration de Gram négative. Aujourd'hui, alors que l'implication des intégrons dans l'adaptation bactérienne au-delà de la résistance aux antibiotiques est avérée, le rôle d'une partie de ces intégrons, parfois nommés intégrons de résistance (IR), est majeur dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques et notamment chez des souches d'intérêt clinique.

Les intégrons ont une organisation commune et sont composés par trois éléments clés : un gène *intI*, un site primaire de recombinaison (*attI*) et un promoteur (Pc) permettant la transcription des gènes capturés ou cassettes. Les intégrons, supports majeurs de la multirésistance aux antibiotiques, peuvent contenir jusqu'à 8 cassettes (**Cambray, Guerout, & Mazel, 2010; Naas *et al.*, 2001**). Toutefois, des intégrons sans cassette ont également été retrouvés (**Soto *et al.*, 2003**). Pour les intégrons de classe 1, 2 et 3, il a été montré que les cassettes étaient majoritairement composées de gènes de résistances aux β -lactamines, aminosides (gènes *aad*) et au triméthoprime (gènes *dfr*) (**Partridge *et al.*, 2009; van Hoek *et al.*, 2011**).

Plusieurs intégrases d'intégrons (IntI) ont été décrites chez des souches bactériennes cliniques et environnementales. Les intégrases des souches cliniques sont généralement codées par des gènes portés par des plasmides alors que celles des souches environnementales sont codées par des gènes situés sur des chromosomes.

Les intégrases appartenant aux intégrons de classe 1, 2 et 3 (**Arakawa *et al.*, 1995; Hall *et al.*, 1999; Hansson *et al.*, 2002**) de même que les intégrases VchlntIA (**Mazel *et al.*, 1998**) et IntI9 (**Hochhut *et al.*, 2001**) sont les seules à être associées à des gènes de résistance aux antibiotiques .

Antibiorésistance pour chaque famille d'antibiotiques sont présentées dans le tableau 04.

Tableau 04 : Antibiorésistance pour chaque famille d'antibiotiques (P Courvalin & Philippon, 1989; Duval, 1989).

Antibiotique	Observations
Aminosides	<p>-Résistance intrinsèque : anaérobies</p> <p>-Résistance plasmidique : dans certains cas, croisée avec d'autres aminosides, mais aussi avec d'autres antibiotiques (ampicilline, amoxicilline, tétracyclines, sulfami des, macrolides)</p>
Bêta-lactamines	<p>-Résistance intrinsèque : micro-organismes dépourvus de paroi Mycoplasmes, Chlamydies, Rickettsies.</p> <p>-Résistance acquise : habituellement due à une inactivation enzymatique (synthèse de bêta-lactamases), Plasmidique ou chromosomique</p>
Colistine	<p>-Résistance intrinsèque : bactéries Gram+</p> <p>-Résistance acquise : chromosomique uniquement. Leur faible fréquence serait due à leur faible viabilité comparée à celle des souches sensibles.</p>
Quinolones	<p>-Résistance intrinsèque : peu de bactéries sont naturellement résistantes. Cependant, les bactéries Gram+ et les mycoplasmes ne sont que légèrement sensibles aux quinolones de 1ère et de 2ème génération.</p> <p>-Résistance acquise : exclusivement par mutation chromosomique.</p> <p>-Les germes résistants aux quinolones de 3ème génération sont généralement résistants aux quinolones de 1ère et de 2ème génération. Au contraire, les germes résistants aux quinolones de 1ère et de 2ème génération peuvent rester sensibles aux quinolones de 3ème génération.</p> <p>-La communauté structurale entre les quinolones facilite la résistance croisée entre les composés des différentes générations.</p> <p>-La résistance croisée avec d'autres antibiotiques (pénicillines, tétracyclines) pourrait être due aux mutations qui seront à l'origine d'une réduction de la pénétration des bactéries aux quinolones, et du phénomène d'expulsion hors de la cellule bactérienne.</p>

Tétracyclines	<ul style="list-style-type: none">-Résistance intrinsèque : peu de bactéries sont naturellement résistantes (large spectre). <i>Pseudomonas</i> est résistant car ses membranes sont imperméables.-Résistance acquise : principalement plasmidique : très fréquente en élevages avicoles suite à un usage abusif des tétracyclines.-Résistance croisée avec les pénicillines (réduction de la perméabilité).-La résistance à la doxycycline est généralement moins fréquente qu'aux autres tétracyclines (usage plus récent, meilleure liposolubilité, moins de résistances croisées avec les tétracyclines naturelles).
Triméthoprim- Sulfamides	<ul style="list-style-type: none">-Résistance intrinsèque : mycoplasmes, <i>Pseudomonas</i>, <i>Clostridium</i>, <i>Streptococcus</i>-Résistance acquise : identique à celle des sulfamides et de la triméthoprim

3.3. Mécanismes de la résistance acquise chez les entérobactéries :

Pour bien comprendre les résistances acquises, il est très important de bien connaître les résistances naturelles des différentes espèces bactériennes et le support génétique de la résistance (les caractères de résistance portée par des gènes qui sont situés sur chromosome ou sur plasmide) (Gaudy *et al.*, 2005).

Généralement, le nombre de mécanismes de la résistance bactérienne aux médicaments antimicrobiens est limité ; car le nombre de modes d'action des antibiotiques est limité. La figure 03 illustre les principaux mécanismes :

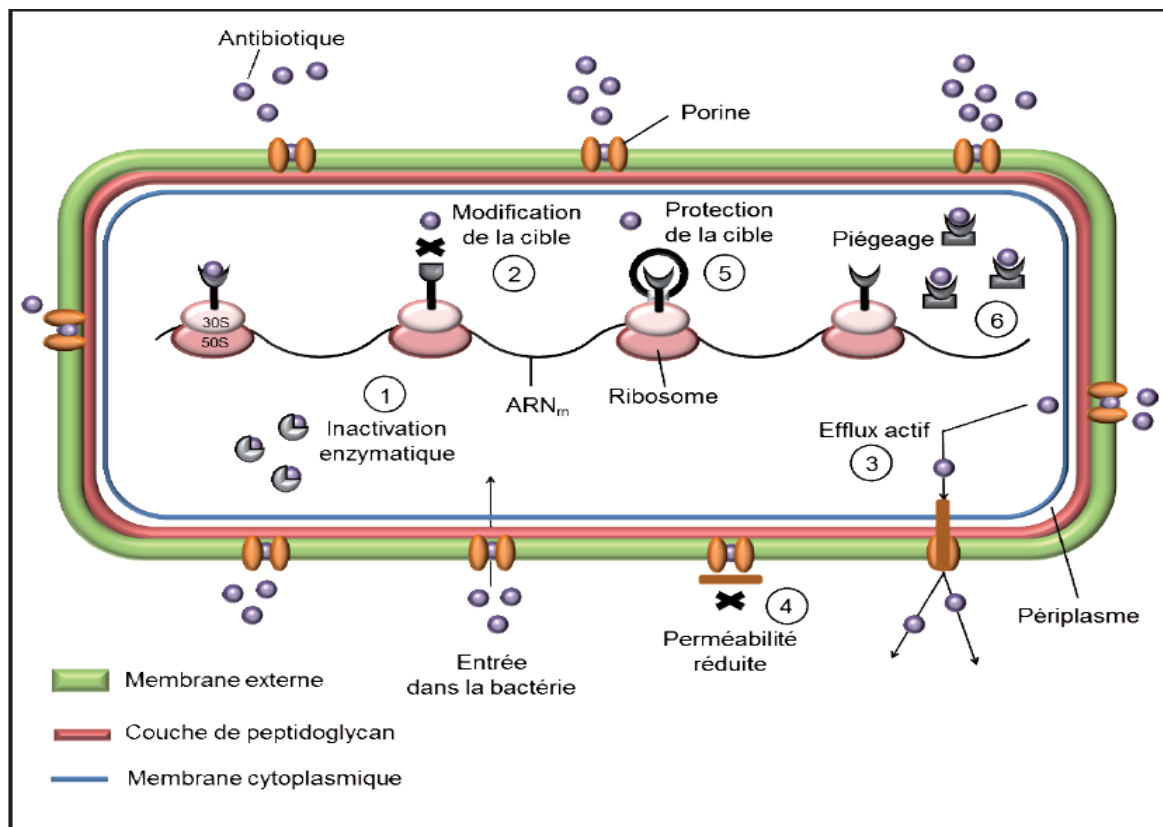


Figure 03 : différents mécanismes de résistance aux antibiotiques dans une bactérie Gram négative (Guardabassi & Courvalin, 2005)

Les entérobactéries sont naturellement résistantes aux nombreux antibiotiques par différents mécanismes (tableau 05).

Tableau 05 : Principales résistances naturelles chez les entérobactéries (Gaudy *et al.*, 2005)

Mécanismes		Antibiotiques	Entérobactéries
Enzymatique	Pénicillinases	Aminopénicillines Carboxypénicillines Urédopénicillines	Groupe II
	Céphalosporinases inducibles	Aminopénicillines C1G	Groupe III
	Acétyltransférases	Aminosides	<i>Serratia, Providencia</i>
Défaut de pénétration		Pénicilline M et G Macrolides Rifampicine Acide Fusique Glycopeptides Aminosides	Toutes Anaérobies
Défaut d'affinité		Aztéréonam Cefsulodine	Anaérobies Toutes

3.3.1. Résistance acquise aux β -lactamines :

Les entérobactéries utilisent différents mécanismes pour développer une résistance aux β -lactamines : (Vora & Auckenthaler, 2009).

a. Diminution de la perméabilité : par l'altération des porines par mutation, ce qui a été décrits chez *E. coli* en 1980 (Kumar & Schweizer, 2005). Et plus rare, la disparition de porine provoque l'augmentation des CMI de certaines β -lactamines comme cela a été mis en évidence chez certaines entérobactéries (*Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella* Typhimurium et *Escherichia coli*) et chez *P. aeruginosa* (Nikaido, 2000; Yoshimura & Nikaido, 1982).

b. Hyperproduction de systèmes d'efflux : qui impliqué dans la résistance aux β -lactamines a été identifiée en particulier chez *K. pneumoniae*. Ce type de mécanisme touchant préférentiellement la Céfoxitine et les C2G, semble difficile à distinguer du point de vue phénotypique des résistances par modification des porines (Bialek-Davenet *et al.*, 2011).

c. Modification des protéines liée aux pénicillines (PLP): peut avoir lieu par des mutations dans les gènes chromosomiques codant pour les PLPs ou par l'acquisition de gènes étrangers codants pour nouveaux PLPs ayant une affinité différente aux β -lactamines (N. H. Georgopapadakou, 1993).

Chez les entérobactéries, des souches de *Proteus mirabilis* résistantes à l'imipénème et aumécilline ont été observées suite à une perte d'affinité de la PLP2 et à une diminution de la quantité de PLP1. Cependant, ce type de mécanisme reste très rare chez ce groupe bactérien (Neuwirth *et al.*, 1995).

d. Production de β -lactamases : qui est le mécanisme prédominant de résistance acquise des entérobactéries aux β -lactamines (Livermore, 2003).

On peut individualiser six phénotypes de résistance aux β -lactamines (Tableau 06).

Tableau 06: Phénotypes des entérobactéries aux β -lactamines (Fauchère, 1997).

Phénotypes	AMX	AMC	TIC	Méicilline	Cétalotine	Céftazidime
Pénicillinase bas niveau	R	R	R	S	S	S
Pénicillinase haut niveau	R	I/R	R	R	R	S
Pénicillinase résistante aux I β L	R	R	R	R	S	S
Céphalosporinase inducible	R	R	S	S	R	S
Céphalosporinase déréprimée	R	R	R	S	R	R
BLSE	R	R	R	R	R	R

AMX: Amoxicilline, AMC: Amoxicilline + Acide clavulanique, TIC: Ticarcilline, I β L: inhibiteurs de β -lactamines, BLSE : β -lactamase à spectre étendu. R: Résistant, S: Sensible, I: Intermédiaire

Les bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) sont une grande famille très hétérogène d'enzymes bactériennes découverte dans les années 80 en Allemagne, puis en France. Elles sont induites soit par des plasmides (80 %), soit par la mutation du génome naturel chez *Klebsiella* spp, codant pour une bêta-lactamase SHV. Les deux mécanismes confèrent aux bactéries touchées la capacité d'hydrolyser une grande variété de pénicillines et de céphalosporines. La majorité des BLSE sont le résultat de mutations génétiques de bêta-lactamases naturelles, en particulier de TEM-1, TEM-2 et SHV-1. Elles sont très actives contre les pénicillines et moyennement actives contre les céphalosporines de première génération. Les mutations génétiques à l'origine des BLSE élargissent le spectre de ces enzymes et touchent également les céphalosporines de troisième génération (ceftazidime et céfotaxime) et les monobactames (aztréonam). Les bactéries produisant une BLSE n'hydrolysent pas les céphamycines (céfoxitine) ni les carbapénèmes (imipénem) et elles sont inhibées par les inhibiteurs : l'acide clavulanique, le tazobactam et le sulbactam, La présence de BLSE est fréquemment associée à la résistance aux aminosides, fluoroquinolones et à la résistance à d'autres antibiotiques(**(Paterson & Bonomo, 2005)**). Pratiquement tous les germes à Gram négatif possèdent un gène chromosomique qui code pour une céphalosporinase, en général de faible expression et sans hydrolyser efficacement les céphalosporines. Mais les *Enterobacter*, *Serratia* et *Citrobacter* produisent des céphalosporinases inductibles, pas faciles à détecter au laboratoire. Sous traitement aux céphalosporines, ces germes peuvent donc développer une résistance (inductible) à toutes les céphalosporines et elles ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique (tableau 07). Elles restent cependant sensibles aux carbapénèmes (**Vora & Auckenthaler, 2009**).

Tableau 07 : principales bêta-lactamases et leurs inhibiteurs

Enzyme	Activité enzymatique préférentielle					Inhibiteurs	
	Pénicilline	C1G	C3G	Aztréonam	Imipénem	Clavulanate	EDTA
Pénicillinases à spectre restreint (exemple : TEM-I, SHV-I)	+++	+/-	-	-	-	+++	-
Céphalosporinases (exemple : Enterobacter)	++	+++	+	-	-	-	-
Betalactamases à spectre élargi Dérivés de TEM, SHV	+++	++	++	++	-	+++	-
Métallo-betalactamases Carbapénémase	++	++	++	-	++	-	++

C1G : céphalosporinase de 1^{er} génération ; C3G : céphalosporinase de 3^{eme} génération ; EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique.

La résistance aux céfépime, une céphalosporine de la quatrième génération, est due à une hyperproduction de SHV-5. TEM-50 (qui confère la résistance aux inhibiteurs) et SHV-18 (une enzyme plasmidique de *klebsiella pneumoniae*) (Singleton, 2005). Les entérobactéries sont naturellement résistantes aux pénicillines des groupe G, V et M. Les phénotypes de résistance seront donc définis à l'aide des β -lactamines appartenant aux autre groupes de pénames seules et associées aux inhibiteurs des β -lactamases : aminopénicillines (amoxicilline), carboxypénicilline (ticarcilline) uréidopénicilline (pipéracilline); aux céphalosporines de première génération (céfalotine), de deuxième génération (céfuroxime et pour les céphamycines, la céfoxitine), de troisième génération (céfotaxime et ceftazidime), de quatrième génération (céfépime et cefpirome) ; aux monobactames (aztréonam) et aux carbapénèmes (imipénème) (P. Courvalin & Leclercq, 2006).

Les entérobactéries *Kluyvera ascorbata*, *Kluyvera cryocrescens*, *Kluyvera georgiana*, *Rahnella aquatilis*, *Citrobacter sedlakii* et *Erwinia persicina* produisent naturellement des β -lactamases à spectre étendu de classe A (groupe 2be). Ces BLSE, souvent exprimées à bas niveau, confèrent une diminution de sensibilité ou une résistance aux aminopénicillines, aux

carboxypénicillines, aux C1G et aux C2G, à l'exception des céphamycines. La résistance aux uréidopénicillines et aux C3G est souvent inapparente. Aucune règle de lecture interprétative n'a été proposée à ce jour pour ces espèces. L'activité des enzymes produites suggère une interprétation des résultats « sensibles » en « intermédiaire » pour (**P. Courvalin & Leclercq, 2006**).

Le Phénotype « β -lactamase à spectre étendu » (BLSE) comprend une résistance aux pénicillines et aux céphalosporines à l'exception des céphamycines. Cependant, la résistance aux C3G, C4G et l'aztréonam est plus ou moins marquée selon les enzymes et les souches (CMI de <1 à 128 mg/l). En règle générale, cette résistance est apparente pour au moins une de ces molécules, sauf quand l'expression est très faible comme parfois chez *P. mirabilis*. La plupart des BLSE sont plus sensibles aux β -lactamine inhibitrices que les pénicillinases à large spectre TEM-1 et SHV-1 (**Bonnet, 2011**).

Quelques BLSE, comme les enzymes CMT (Complex mutant TEM), présentent cependant une sensibilité diminuée aux inhibiteurs. L'efficacité des associations pénicillines β -lactamine inhibitrices reste généralement suffisante pour être à la base de la détection de ce phénotype qui repose sur la mise en évidence d'une image de synergie entre les inhibiteurs et les C3G et/ou les C4G et/ou l'aztréonam (**Bonnet, 2011**).

Les carbapénèmes et les céphamycines ne sont généralement pas hydrolysés par les BLSE. Toutefois, une diminution de la sensibilité à ces molécules a récemment été rapportée en Europe et au Japon chez *E. coli* et *K. pneumoniae*. Ces souches produisaient des enzymes possédant une faible activité carbapénémase et dérivées par mutations ponctuelle des BLSE de type GES (cf. carbapénémase de classe A) (**Bonnet, 2011; Patrice Nordmann, 2010**).

3.3.2. Résistance acquise aux aminosides :

Le mécanisme d'action des aminosides implique la liaison au site A de l'ARN ribosomal 16S et donc l'inhibition de la synthèse des protéines (**Fourmy et al., 1996; Moazed & Noller, 1987**), après avoir pénétré à travers la membrane externe via une voie «auto-favorisée» indépendante de la porine et par la voie cytoplasmique membrane par une voie dépendant de l'énergie (**Bryan, 1984; Davies & Wright, 1997**).

La résistance des entérobactéries à cette famille d'antibiotique est surtout due à la production d'enzymes inactivatrices : phosphotransférases (APH), nucléotidyltransférases (ANT) et acétylstranférases (AAC) qui catalysent la phosphorylation des groupements hydroxyles (OH), la nucléotidylation des groupements hydroxyle, et l'acétylation des groupements

aminés (NH₂), respectivement. Ces enzymes sont majoritairement codées par des gènes portés sur des plasmides.

On peut distinguer 9 phénotypes de résistance principaux (tableau 08) (Fauchère, 1997).

Tableau 08 : Phénotypes de résistance des entérobactéries aux aminosides. (Fauchère, 1997).

Phénotypes	Kanamycine	Tobramycine	Amikacine	Gentamicine	Nétilmicine
Sauvage	S	S	S	S	S
APH (3')	R	S	S	S	S
AAC (3)-I	S	S	S	S/I/R	S
AAC (3)-II	S/I/R	R	S	R	I/R
AAC (6')	S/I/R	I/R	S/I/R	S	I/R
ANT (2'')	S/I/R	I/R	S	I/R	S
AAC (2')	S	S/I/R	S	S/I/R	S/I/R
APH (3') + AAC (3)I	R	S	S	S/I/R	S
AAC (6') + AAC (3)I	I/R	I/R	S/I/R	S/I/R	I/R

3.3.3. Résistance acquise aux quinolones :

Les quinolones pénètrent dans les cellules bactériennes à travers les porines de la membrane externe et par diffusion à travers la membrane cytoplasmique (Chapman & Georgopapadakou, 1988; McCaffrey, Bertasso, Pace, & Georgopapadakou, 1992). Ils se complexent ensuite immédiatement, sélectivement et réversiblement avec l'ADN gyrase et la topoisomérase IV associée, des enzymes bactériennes essentielles pour la transcription, la réplication et la décaténation chromosomique. Ils piègent un complexe enzyme-ADN covalent (complexe clivable), dans lequel l'enzyme a brisé le squelette phosphodiester de l'ADN et inhibent ainsi la liaison ultérieure de l'ADN (Hooper, 1999, 2001). Le résultat est l'inhibition du surenroulement (ADN gyrase), la décaténation des chromosomes (topoisomérase IV) et, surtout, l'induction de lésions d'ADN, qui déclenchent la réponse SOS et aboutissent finalement à la mort cellulaire.

À l'exception des protéines Qnr, qui sont à médiation plasmidique (Martínez-Martínez, Pascual, & Jacoby, 1998; Robicsek, Jacoby, & Hooper, 2006), la résistance aux quinolones est exclusivement chromosomique et se propage avec l'organisme résistant. Les

protéines Qnr sont capables de protéger l'ADN gyrase des quinolones et ont des homologues dans les bactéries vivant dans l'eau. Ils semblent être en circulation depuis un certain temps, ayant atteint une distribution mondiale dans une variété d'environnements plasmidiques et de genres bactériens (**P. Nordmann & Poirel, 2005**). Bien que les gènes *qnr* fournissent une faible résistance aux quinolones, ils facilitent l'émergence d'une résistance clinique de plus haut niveau. La propagation horizontale rapide des gènes *qnr* et leur co-sélection avec d'autres éléments de résistance sont également préoccupantes. L'AAC (6')-Ib-cr, une variante aminoside acétyltransférase capable de modifier la cipro-oxacine et de réduire modestement son activité, semble avoir émergé plus récemment (**Park et al., 2006**), mais pourrait être encore plus répandue que les protéines Qnr.

Le mécanisme le plus courant de résistance clinique de haut niveau chez les entérobactéries est associé à des mutations dans *gyrA*, qui code la sous-unité A de l'ADN gyrase (**Weigel, Steward, & Tenover, 1998; Yoshida et al., 1990**). Les mutations de résistance ont tendance à se regrouper entre les résidus 67 et 106 (région déterminant la résistance au quinolone [QRDR]) (**Yoshida et al., 1990**). Les mutations de *parC*, qui code la sous-unité homologue A de la topoisomérase IV, sont également associées à la résistance (**Breines et al., 1997**). La réduction de l'accumulation dans la cellule, due à l'effet actif à travers la membrane cytoplasmique combiné à une diminution de l'ux à travers la membrane externe, semble ne provoquent que de faibles niveaux de résistance, mais peuvent faciliter l'émergence de souches résistantes à l'uroquinolone (**Nafsika.H Georgopapadakou, 1995; O'Hara et al., 1998**).

La résistance clinique n'est pas encore très courante chez les entérobactéries (**O'Hara et al., 1998**), malgré l'utilisation généralisée des quinolones et l'émergence d'une résistance aux quinolones associée aux plasmides. La seule exception est le pathogène d'origine alimentaire *Salmonella*, où une résistance à certains types de phages spécifiques a été trouvée en Europe, probablement en raison de l'utilisation intensive de quinolones chez les animaux destinés à l'alimentation (**Dworkin, 1999**). Néanmoins, comme la résistance affecte non seulement les quinolones en cours d'utilisation, mais aussi dans le développement clinique et dans le cas de la résistance associée à *qnr*- est liée à d'autres gènes de résistance, elle est préoccupante (Tableau 09).

Tableau 09 : Phénotypes de résistance des entérobactéries aux quinolones (Fauchère, 1997).

Marqueurs	NaIS	NaIS	PeFR	CipR
Acides Nalidixique	S	R	R	R
Péfloxacin	S	S	R	R
Ciprofloxacine	R	S	S	S

3.3.4. Résistance acquise à la fosfomycine :

La résistance acquise par mutation chromosomique est responsable le plus souvent d'une modification des systèmes de transport et plus rarement d'une modification de l'enzyme cible (Gaudy *et al.*, 2005).

3.3.5. Résistance acquise aux tétracyclines :

Le principal mécanisme de résistance à la tétracycline implique un système d'efflux actif inductible, par lequel la concentration intracellulaire de ces composés est réduite (McMurry, Petrucci, & Levy, 1980; Speer, Shoemaker, & Salyers, 1992). Plusieurs gènes codant pour des composants de ce système (*tetA-E* chez les bactéries à Gram négatif) (Magalhães, Schuman, & Castilho, 1998; Roberts, 1996), localisés principalement sur les plasmides, ont été identifiés. Différentes tétracyclines ne sont pas également reconnues par les protéines de transport : par exemple, TetA ne reconnaît pas la minocycline et la doxycycline. La protection ribosomale par une protéine soluble de 72-kDa, généralement codée par un plasmide, homologue au facteur d'élongation G impliqué dans la synthèse des protéines (Oliva & Chopra, 1992; Taylor & Chau, 1996), n'est pas un mécanisme de résistance significatif chez les entérobactéries.

Un développement notable dans le domaine a été la découverte de glycylicyclines, dérivés de minocycline, dont l'un, la tigécycline (anciennement GAR 936), a reçu l'approbation de la FDA et est maintenant disponible sous le nom de Tygacil® (Stein & Craig, 2006; Testa *et al.*, 1993). La tigécycline est active contre la plupart des souches résistantes à la tétracycline. Un autre développement récent est la potentialisation de l'activité antibactérienne des tétracyclines par les inhibiteurs des protéines Tet efflux (Nelson & Levy, 1999).

3.3.6. Résistance acquise aux atifolates : Sulfonamides et Triméthoprime

Les sulfamides, les plus anciens agents antibactériens totalement synthétiques, sont des inhibiteurs compétitifs de la dihydroptéroate synthétase en raison de leur forme active

(sulfone) est un analogue structural du substrat d'acide p-aminobenzoïque. Cliniquement, le mécanisme de résistance le plus commun et le plus important à ces agents bactériostatiques est une enzyme cible altérée, généralement à médiation plasmidique (**Huovinen *et al.*, 1995; Sköld, 2000**). Deux types distincts de dihydroptéroate synthetase altérée ont été caractérisés dans les bactéries Gram-négatives, **I** et **II**, codées respectivement par *sulI* et *sulII* (**Sundström *et al.*, 1988; Swedberg & Sköld, 1980**). Ils ont une liaison réduite aux inhibiteurs, mais remarquablement - conservent une liaison normale au substrat d'acide p-aminobenzoïque. Le gène *sulI* est souvent localisé dans des transposons liés à Tn21 ou sur de grands plasmides-R avec une région de résistance similaire à Tn21. Le gène *sulII* est transporté principalement sur de petits plasmides non conjugatifs.

Le triméthoprim, également totalement synthétique et couramment utilisé en association avec des sulfamides, est un agent bactéricide. C'est un inhibiteur sélectif, puissant et compétitif de la dihydrofolate réductase bactérienne (DHFR). La déplétion de tétrahydrofolate qui en résulte affecte les réactions de transfert de méthyle, en particulier celle impliquée dans la biosynthèse de la thymine, provoquant ainsi une mort sans thymine. Le mécanisme le plus courant de résistance au triméthoprim est une enzyme cible modifiée, généralement à médiation plasmidique (**Amyes & Towner, 1990; Huovinen, 1997**). Les formes mutantes de la DHFR chromosomique normale sont beaucoup moins fréquentes dans les isolats cliniques. Sept principaux types de DHFRs (I à VII) codés par des plasmides et résistants au triméthoprim ont été trouvés dans des bactéries à Gram négatif. Ils partagent une homologie variable entre eux et avec l'enzyme chromosomique normale, suggérant une évolution à la fois divergente et convergente.

3.3.7. Résistance acquise au chloramphénicol :

Le chloramphénicol, encore un agent bactériostatique important, doit son activité antibactérienne sélective à l'inhibition de la réaction peptidyltransférase de la synthèse protéique via la liaison à la sous-unité ribosomale 50S. Le principal mécanisme de résistance clinique au chloramphénicol est son inactivation par acétylation (**Shaw, 1983**). Trois groupes génétiquement distincts de chloramphénicol acétyltransférases ont été trouvés jusqu'à présent, certains inductibles et d'autres constitutifs, mais partageant tous une homologie de séquence (**Parent & Roy, 1992**). Comme indiqué précédemment, multirésistante *S. typhimurium* (DT104), qui représentent environ 10% des isolats de *Salmonella* aux États-Unis, est résistant au chloramphénicol (**Arcangioli *et al.*, 2000**).

Partie II : Matériel et méthodes

1. Méthodologie et contexte d'étude :

Les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (E-BLSE) ne sont pas plus pathogènes que d'autres entérobactéries, mais les infections qu'elles provoquent sont plus difficiles à traiter vu leur résistance à de nombreux antibiotiques.

Malgré les études réalisées sur les entérobactéries productrices de BLSE émergents en Algérie, mais, les connaissances sur l'état global de la résistance bactérienne aux antibiotiques et les facteurs de risque intervenants dans cette problématique restent restreint et insuffisantes que ce soit en santé humaine et en santé animale.

D'un autre côté, la réglementation actuelle relative à la vente des molécules d'antibiotiques et le niveau d'éducation sanitaire chez la population pourraient jouer également un rôle important dans l'émergence de la résistance des entérobactéries aux antibiotiques, en parallèle de l'émergence des E-BLSE.

Dans une autre optique, la possibilité de transmission de gènes de résistance entre souches des entérobactéries au sein de la même population humaine ou animale, ou entre l'homme et les animaux via la manipulation et la consommation des denrées alimentaires d'origine animale suscite beaucoup de questions, et inquiète les professionnels de la santé.

Ce travail qui rentre dans la préparation d'un mémoire de master spécialité de microbiologie appliqué constitué une pièce complémentaire dans la connaissance de ce pathogène important en Algérie. De ce fait, cette étude étaient réalisée pour déterminer la fréquence de résistance des entérobactéries aux antibiotiques et, la caractérisation de β -lactamases qui se produisent par la détection des gènes par PCR des souches d'entérobactéries productrices des β -lactamases à spectre étendu (EBLSE) isolées des prélèvements d'origine humaine et animale.

2. Objectifs :

Pour bien cerner cette problématique, et mener à bien notre étude, nous avons fixé des objectifs principaux et d'autres complémentaires réparties comme suit :

- ✓ L'isolement et l'identification des entérobactéries à partir des prélèvements des substances d'origine humaine (urine).

- ✓ L'isolement et l'identification de quelques espèces d'entérobactéries isolées à partir de poulets de chair.
- ✓ Détermination des profils de résistance aux antibiotiques des souches isolées et identifiées.
- ✓ Etude des facteurs de risque entourant les infections dues aux entérobactéries.
- ✓ Détection des gènes de résistance aux antibiotiques par PCR

3. Durée et lieu d'étude :

Les travaux pratiques relatifs à ce mémoire ont été réalisés durant une période de 1 mois allant du 1 mars au 30 mars 2020. La réalisation des prélèvements ainsi que les essais de l'isolement et l'identification des bactéries ont été effectuées au niveau de l'unité de bactériologie du laboratoire d'analyses médicales de Dr. Meribai Riad de Ain Defla.

La deuxième partie concerne la détection des gènes de virulence et de la résistance aux antibiotiques chez les souches isolées et identifiées a été programmé dans le laboratoire de microbiologie, centre de recherche en biotechnologie de Constantine CRBt (nouvelle ville Ali Mendjli, Constantine). Cette partie n'a pas été faite à cause de la crise sanitaire (Covid-19).

Les résultats obtenu de la première partie seront présentés et discutés. Par contre, pour la deuxième partie aucuns résultats n'ont pas été obtenus.

4. Matériels :

4.1. Matériel biologique :

4.1.1. Origine des souches :

Dans ce travail, les souches étudiées ont été isolées à partir des différents échantillons. Les souches d'origine humaine (souches dites **H**) ont été isolées à partir d'échantillons pathologique (urines et pus). Tous les échantillons ont été prélevés dans la région de Ain Defla dont la quelle nous avons travaillé dans le laboratoire d'analyse médicale Dr. Meribai Riad. Les prélèvements traités dans notre travail sont les urines et le pus, mais ne nous sommes intéressés seulement aux échantillons positifs, car le nombre des échantillons (urines et pus) réceptionnés chaque jours dans le laboratoire sont très élevé, il dépasse dans

certaines cas une cinquantaine par jour. En plus, nous présenteront dans la partie résultats que les souches isolés à partir des échantillons positifs.

Les souches d'origine animale ont été isolées à partir du foie des poulets de chair présentant des signes cliniques de la colibacillose (souches dites **A**). Les détails concernant le nombre et la provenance des échantillons d'origine animale sont présentés en bas (partie 4.1.2.3. Prélèvements d'origine animale (poulet de chair)).

4.1.2. Réalisation des prélèvements : Les prélèvements effectués ou reçus au laboratoire sont accompagnés d'une demande d'analyse comprenant les renseignements suivants :

- Age et sexes.
- Nature de prélèvement.
- Antibiothérapie en cours.

4.1.2.1. Prélèvements d'urine :

Pour éviter toute contamination des urines par les bactéries commensales de la peau et le tractus urinaire, la réalisation des prélèvements des urines ont été effectués selon la méthode citée par (**Mameri, 2011**). Brièvement, faire un lavage hygiénique des mains et toilette soigneuse des organes génitaux externes, de préférence les urine du matin. Après élimination du premier jet, les urines sont recueillies dans un tube stérile (environ 10 à 20 ml), le tube est fermé hermétiquement et porté au laboratoire dans une demi-heure, sinon il faut le placer dans de la glace

Chez les nouveaux nés et les petits enfants, un collecteur stérile spécifique est utilisé. Ce dispositif à usage unique se pose après désinfection soigneuse du périnée. A la fin de la miction, le collecteur est ôté et fermé hermétiquement et porté au laboratoire dans une demi heure, sinon il faut le placer dans de la glace.

Chez le patient porteur d'une sonde urinaire, il ne faut en aucun cas prélever dans le sac collecteur, le recueil est effectué par ponction à l'aide d'une seringue dans la paroi de la sonde après désinfection. On distingue le sondage avec des systèmes ouverts qui sont de moins en moins utilisés et le sondage avec un système fermé est plus représentatif, car il s'oppose à la colonisation par les bactéries grâce aux valves anti retour.

4.1.2.2. Prélèvements de pus

Dans le cas où le pus est localisé dans un abcès superficiel fermé ou dans une cavité séreuse, le pus est récolté par ponction à l'aide d'une seringue stérile et cela après une désinfection soigneuse de la peau.

Dans le cas des abcès ouverts, plaies suppurées ou pustules et les fistules où le pus écoule à l'extérieur, le prélèvement alors se fait à l'aide d'un écouvillon après désinfection de la plaie. Le prélèvement est effectué dans la partie la plus profonde de la plaie tout en évitant la contamination par la flore cutanée saprophyte. L'écouvillon doit être acheminé au laboratoire et humidifié par un bouillon afin d'éviter la dessiccation de prélèvement (**Martin & Ploy, 2014**).

4.1.2.3. Prélèvements d'origine animale (poulet de chair) :

Tous les prélèvements ont été réalisés à partir des poulets de chair présentant des signes cliniques de la colibacillose (gonflement de la tête dû à un œdème, diarrhées, les sujets sont indolents et anorexiques...). A partir de chaque élevage de poulet de chair un nombre de 3 à 5 sujets morbides ont fait l'objet d'une autopsie pour la recherche des lésions de la colibacillose (L'ombilic est œdémateux et enflammé, œdème et de l'exsudat caséux sous-cutané, les intestins, surtout les caeca, sont pâles et dilatés par un contenu liquide, lésions d'inflammation des séreuses viscérales : péricardite, périhépatite, aérosacculite, plus ou moins exsudatives).

Pour chaque sujet, le foie a été prélevé aseptiquement, mis dans un flacon stérile, numéroté et envoyé au laboratoire au froid. A l'arrivée au laboratoire, la surface externe du foie a été flambée pour éliminer toute possibilité de contamination et un écouvillon stérile a été introduit à l'intérieur du parenchyme hépatique. Les écouvillons servent à la recherche des entérobactéries éventuellement présentes dans le foie. Le nombre des prélèvements d'origine animale et leur provenance sont présentés dans le tableau (10).

Tableau 10 : Nombre et provenance des échantillons d'origine animale.

Wilaya	Numéro d'élevage	Age des animaux (poulet de chair)	Effectifs de l'élevage	Nombre des prélèvements par élevage
Djelfa	1	40 jours	4000	5
Médéa	1	23 jours	3400	3
	2	21 jours	2500	3
	3	14 jours	3000	4
	4	7 jours	4200	2
	5	19 jours	5000	3
	6	30 jours	1200	2
	7	25 jours	1500	3
	8	45 jours	4500	3
	9	40 jours	5000	3
	10	20 jours	2500	3
	11	30 jours	1500	3

4.2. Matériel non biologique :

On a utilisé différentes catégories de matériel de laboratoire (équipements, petit matériel et instrument), des milieux de culture et réactifs. L'annexe I regroupe la liste du matériel, ainsi que les formules et le mode de préparation des milieux de culture utilisés.

5. Méthodes :

La recherche des entérobactéries dépend de la nature du prélèvement traité.

5.1. Analyse cytot bactériologique des urines :

5.1.1. Examen cytologique :

5.1.1.1. Examen macroscopique :

Les urines doivent être analysées sans retard. Les urines sont normalement jaune claires et doivent être limpide. L'émission d'urines troubles suggère une infection urinaire (**Denis et al., 2016**).

5.1.1.2. Examen microscopique :

Il se réalise, au microscope, sur une urine fraîchement prélevée à l'objectif (x40), et sa préparation se fait comme suit (**Bruyère *et al*, 2008**).

- ✓ Homogénéiser soigneusement l'urine par retournement du flacon d'urine correctement bouché.
- ✓ Déposer sur une lame de Malassez, à l'aide d'une pipette propre, une goutte d'urine (sa taille doit être suffisante pour occuper la totalité du volume sous la lamelle mais pas trop grosse de façon à ce que l'urine ne déborde pas de la lamelle).
- ✓ Recouvrir d'une lamelle.
- ✓ Explorer soigneusement au microscope la totalité de la lamelle pour repérer et quantifier les éléments suivants :
 - Les éléments cellulaires : leucocytes, hématies, cellules épithéliales, rénales, ou autres
 - Les cristaux, les cylindres granuleux (mieux repérable à l'objectif x10)
 - En cas d'infection urinaire le processus inflammatoire se traduit par la présence de : $\geq 10^4$ /ml parfois en amas.

5.1.2. Examen bactériologique

Après la réalisation de l'examen à état frais des urines, nous avons réalisé une identification des bactéries par l'ensemencement des stries parallèles sur le CHROMagar Orientation à l'aide d'une anse de platine. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 18 H à 24H. Le 2^{ème} jour après l'incubation les cultures positives (les colonies présentant les caractéristiques des entérobactéries : la taille, la couleur, la forme) ont été isolées sur une gélose MacConkey, l'ensemencement a été fait par des stries bien serrées, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 18 H à 24H. Les souches identifiées ont été conservées sur gélose inclinée par l'ensemencement des zigzags ascendants, en douceur pour ne pas abîmer la gélose à l'aide d'une pipette Pasteur puis incubées à 37°C pendant 24H.

5.2. Analyse cytobactériologique du pus :

5.2.1. Examen cytologique :

L'examen direct à l'état frais qui concerne les écouvillons de pus, permet de rechercher la présence de levures, de cellules épithéliales, de polynucléaires et de globules rouges. Les prélèvements de pus sont dilués dans quelques gouttes d'eau physiologique stérile puis en les déposant sur une lame propre et sèche à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, tout en

respectant les règles de stérilisation. La préparation est recouverte d'une lamelle et examinée au microscope optique à l'objectif x40.

5.2.2. Examen bactériologique :

Après un examen direct en état frais ou coloration au bleu de méthylène en fonction du prélèvement, on ensemence quelques gouttes par stries, une gélose au sang cuit, une gélose au sang frais et une gélose Hektoen, tout en réalisant un enrichissement dans un bouillon glucosé tamponné (BGT). Après l'incubation, à partir de bouillon d'enrichissement on ensemence les mêmes milieux si la culture dans les boîtes d'origine est négative. L'incubation est faite à 35°C pendant 24H à 48H, les boîtes de géloses au sang (cuit et frais) sont incubées dans une atmosphère enrichie de 5% à 10% de CO₂ (Denis, 2002).

5.3. Analyse cyto bactériologique des souches d'origine animale :

Une étape d'enrichissement est réalisée dans le bouillon Tryptone-soja (TSB), pour chaque écouvillon. Les écouvillons sont incubés à 37°C pendant 18 H à 24H. Après enrichissement, l'isolement a été réalisé par ensemencement sur gélose MacConkey, puis incubation à 37°C pendant 24h. Les cultures positives en donnant des colonies rondes, lisses, à bords réguliers de couleur rose. Les souches identifiées ont été conservées sur la gélose inclinée.

6. Identification des entérobactéries :

6.1. Identification macroscopique :

Pour les souches humaines et animales, l'identification des germes est basée sur l'observation de l'aspect macroscopique de colonies obtenues à partir des différents milieux d'isolement (la taille, la forme, la couleur, la consistance, l'opacité, l'allure du contour) (Delarras, 2007).

6.2. Identification microscopique :

6.2.1. La coloration de Gram :

La réponse différente des bactéries vis-à-vis de la coloration de Gram s'explique par une différence d'accessibilité de leurs cellules, déterminées par la structure particulière de la paroi cellulaire de chacun des deux groupes de bactéries.

➤ **Technique :**

Les étapes de la coloration de Gram ont été fait selon la technique décrite par (**Figarella, 2001**).

- Préparer un frottis sur une lame propre, le fixer à la chaleur et le recouvrir avec un colorant de violet de gentiane, pendant 1 minute.
- Fixer la première coloration par le lugol, laisser 1 minute.
- Rejeter le lugol, rincer à l'eau.
- Décolorer à l'alcool jusqu'à ce que la dernière goutte devienne claire et laisser pendant 30 secondes.
- Rincer à l'eau et recouvrir la lame avec de la Fushine, laisser agir une minute.
- Rejeter la Fushine, laver abondamment égoutter, puis sécher à la chaleur.

➤ **Lecture :**

La lecture se fait au microscope à l'objectif x100 à l'aide de l'huile à immersion. On peut observer d'un type de cellules : (**Annexes II**)

Les bactéries colorées en violet ont gardées leur coloration primaire grâce à leur paroi épaisse et pauvre en lipide, qui ne laisse pas l'alcool passer, ce sont les Gram positifs. Les bactéries colorées en rose ont perdu leur première coloration à cause de leur paroi riche en lipide, qui laisse diffuser l'alcool qui à son tour décolore le contenu intracellulaire, ce sont les Gram négatifs.

6.3. Test d'oxydase :

La recherche de l'oxydase est le caractère de base de la différenciation entre les entérobactéries et les autres familles de bacilles gram négatif. Le test consiste à mettre en évidence la capacité que possède la bactérie à oxyder un réactif incolore (la NN-diméthyl-paraphénylène diamine) en un dérivé rose violacé.

➤ **Technique :**

A partir d'un milieu solide, une partie de la colonie a été déposée sur un disque oxydase humidifié placé sur une lame, à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée. La présence d'une cytochrome-oxydase se traduit, en 20 à 60 secondes, par l'apparition d'une coloration rouge virant rapidement au violet très foncé (**Joffin & Leyral, 2006**).

➤ **Lecture :**

- Oxydase positive : Couleur du disque vire au rose foncé à violet
- Oxydase négative : aucun changement n'est observé, (ce sont les entérobactéries) (**Annexes II**)

6.4. Identification biochimique :

L'identification biochimique a été réalisée par la galerie API 20E.

6.4.1. Principe de la technique :

Le système API 20E est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux. La galerie compte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée (figure 04). Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du tableau ou d'un logiciel d'identification (**BioMérieux, 2010**).



Figure 04 : la galerie API20 E.

6.4.2. Méthode de réalisation :

- **Préparation de la galerie :**

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Incrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.

- Sortir la galerie de son emballage.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

- **Préparation de l'inoculum :**

Préparer une suspension bactérienne dense dans 10 ml d'eau physiologique stérile à partir d'une culture pure et jeune de 18 à 24 h faite sur GN.

- **Ensemencement de la galerie :**

- Introduire la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, pointe appuyée à l'intérieur et sur le côté pour éviter la formation de bulles d'air.
- Pour les caractères soulignés : ADH, LDC, ODC, H₂S, URE, ensemercer le tubule par la suspension et la cupule par l'huile de vaseline stérile.
- Pour les caractères encadrés VP, CIT, Gel, ensemercer le tubule et la cupule par la suspension.
- Pour les caractères non encadrés, non soulignés ensemercer uniquement le tubule par la suspension.
- Refermer la boîte d'incubation et la placer à 37°C pendant 18 à 24 heures.
- Après 24 heures, ajouter 1 goutte de réactif TDA dans la cupule du test TDA, ajouter 1 goutte de réactif JAMES sur le test IND et ajouter 1 goutte des réactifs VP 1 et VP 2 sur le test VP (attendre au minimum 10 minutes).

- **Lecture (BioMérieux, 2010) :**

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de Lecture (Tableau 11). L'interprétation est faite à l'aide d'une feuille de calcul en format Excel.

Tableau 11 : Tableau de lecture de l'API 20 E (BioMérieux, 2010).

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	Positif
ONP G	Ortho-nitro-phenyl-galactoside	Beta-galactosidase	Incolore	Jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/orange
LDC	Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orangé
ODC	Ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orange
CIT	Citrate de sodium	Utilisation du citrate	Vert	Bleu-vert/vert
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Incolore/gris	Dépôt noir/ fin
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orangé
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA / Immédiat	
			Jaune	Marron foncé
IND	Tryptophane	Production d'indole	IND / 2 min, maxi	
			Jaune	Anneau rouge
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	VP 1 + VP 2 / 10 min	
			incolore	Rosé-rouge
GEL	Gélatine de Kohn	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	Glucose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-	Jaune
MAN	Mannitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-	Jaune
INO	Inositol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-	Jaune
SOR	Sorbitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-	Jaune
RHA	Rhamnose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-	Jaune
SAC	Saccharose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-	Jaune
MEL	Melibiose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-	Jaune
ARA	Arabinose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-	Jaune
Ox	Sur papier filter	Cytochrome-oxydase	Ox / 5-10 min	
			Incolore	Anneau violet

Min : minute ; maxi : maximum.

7. Etude de la sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme) :

7.1. Principe :

L'antibiogramme est réalisé par la méthode de diffusion en gélose (méthode des disques), selon le communiqué du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM, 2010), qui repose sur la connaissance du phénotype sauvage caractéristique de l'espèce et de différents phénotypes de résistance acquis. Ces dernières sont définies non seulement par des caractères de résistance en termes de catégories clinique ("I" ou "R"), mais aussi en termes de diminution significative de sensibilité et par des images typiques (Synergie, Antagonisme).

7.2. Technique :

- ✓ **Milieux :** Gélose MH, coulée en boîtes de Pétri sur épaisseur de 4mm, et séchées.
- ✓ **Inoculum :** A partir d'une culture pure de 24h sur milieu d'isolement approprié (Mac conkey), racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et

parfaitement identique, puis le décharger dans 5 à 10 ml de l'eau physiologie ainsi bien homogénéiser la suspension.

✓ **Ensemencement :**

- Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum
- L'essorer en le passant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération 3fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

✓ **Choix des antibiotiques :** les antibiotiques testés lors de la réalisation de l'antibiogramme des entérobactéries sont :

- Les β - lactamines :** Amoxicilline (AMX), amoxicilline + acide clavulanique (AMC), céfazoline (CZ), céfotaxime (CTX), Céfixime (CFM) et Imipénème(IM).
- **Les aminosides :** Gentamicine (GN), Amikacine (AN).
- **Les quinolones :** Acide nalidixique (NAL), Ciprofloxacine (CIP).
- **Nitrofuranes :** Furanes (F)
- **Triméthoprim-sulfamides :** Triméthoprim-sulfaméthoxazole (SXT).
- **Autre :** Fosfomycine (FOS).

✓ **Application des disques d'antibiotiques :**

- Les disques choisis sont déposés sur la gélose à l'aide d'une pince flambée, en appuyant doucement sur chaque disque pour assurer un contact uniforme avec le milieu.
- On dépose 6 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90 mm. Deux disques doivent être éloignés au minimum de 30 mm et une distance minimale de 15 mm doit séparer un disque du bord de la boîte.

✓ **Incubation :**

Laisser diffuser les disques après leur application à température ambiante pendant 15 min, puis incuber dans l'étuve à 37°C pendant 18 à 24h.

✓ **Lecture et interprétation de l'antibiogramme :**

L'identification des bactéries isolées s'effectue grâce aux résultats de la galerie biochimique et de l'antibiogramme.

La lecture de l'antibiogramme se fait par la mesure des diamètres d'inhibition à l'aide du pied à coulisse ou par une règle graduée.

Les résultats sont comparés aux valeurs critiques standards pour classer les bactéries dans l'une des catégories : Sensible (S), Intermédiaire (I), Résistante (R) (**Annexe II**).

7.3. Tests de détection de BLSE :

Les bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) engendrent une résistance à la majorité des bêta-lactamines. Leur apparition dans les bactéries Gram négatif et leur dissémination coïncident avec l'utilisation d'antibiotiques à large spectre tels que les céphalosporines et les quinolones.

7.3.1. Test de synergie :

➤ Principe :

Le teste de synergie permet la détection de β -lactamases à spectre étendue chez une souche donnée. Ces enzymes peuvent être mises en évidence par la méthode des disques, qui consiste à rechercher une image de synergie entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de B-lactamase et les disques de céphalosporines de troisième génération (cefotaxime, ceftazidime et céfepime) et l'aztréonam. Cette image dite en "bouchon de champagne" (**Jarlier *et al.*,1988**).

➤ Technique :

La recherche de β -lactamase à spectre étendue est fait dans les conditions standard 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 boites de Pétri (Figure05). Incubation pendant 18 heures à 37°C \pm 1°C.

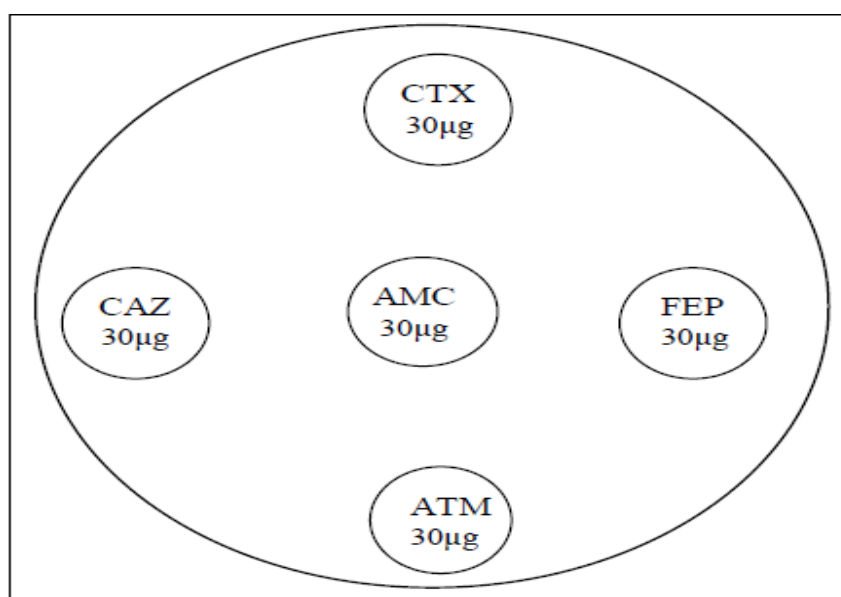


Figure 05 : Disposition des disques d'antibiotiques pour le test de synergie.

8. Détection des gènes de virulences et l'antibiorésistance par PCR :

Les Béta-lactamases à spectre élargi (BLSE) désignent des enzymes « β -lactamases » produites par les entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter* spp. Les BLSE représentent des enzymes qui ont évolué à partir de la classe A : TEM-1, TEM-2 et SHV-1, confèrent une résistance à l'ampicilline, à l'amoxicilline et à d'autres pénicillines, ainsi qu'aux céphalosporines de première et deuxième génération mais pas les nouvelles céphalosporines de troisième génération.

Récemment, les supports génétiques (généralement plasmidiques) ont subi des mutations ce qui confère la capacité des BLSE de type TEM ou SHV à hydrolyser les céphalosporines et l'aztréonam de troisième génération, mais ne sont généralement pas actifs contre les céphamycines (Ex., Céfotétan, céfoxitine ou céfmétazole) ou les carbapénèmes (imipénème, ertapénème et méropénem), et peuvent généralement être inhibés par la inhibiteurs des β - lactamase tels que le clavulanate, le sulbactam ou le tazobactam. Les entérobactéries peuvent également exprimer des BLSE qui ne sont pas étroitement liées aux espèces apparentées à TEM ou SHV, y compris les BLSE de type CTX-M et OXA. Les BLSE de type CTX-M hydrolysent généralement le céfotaxime plus efficacement que la ceftazidime.

Les gènes *bla_{TEM}* ont été les premiers gènes de bêta-lactamase trouvés dans les bactéries à Gram négatif. Ils sont spécifiquement transférés par des plasmides, et plus de 200 sous-types ont été identifiés, principalement codant pour des enzymes qui hydrolysent la pénicilline et les céphalosporines de première génération (**Clasen *et al.*, 2019**). En revanche, les enzymes codées par le gène *bla_{CTXM-pan}* hydrolysent principalement les céphalosporines de troisième génération et sont principalement localisées sur des plasmides de 40 à 200 kb (Zhao & Hu, 2013). D'autres gènes de résistance de type la bêta-lactamase, tels que *bla_{CMY}*, augmentent également dans les souches cliniques, ce qui entraîne une plus grande résistance aux céphalosporines (**Koh *et al.*, 2004**).

Le gène *tet-W* confère une résistance au tétracycline par une protéine cytoplasmique connue sous le nom de protéines de protection ribosomale, qui protègent les ribosomes en perturbant le site de liaison primaire de la tétracycline (**Roberts, 2005**).

Le gène *fimA* code pour la sous-unité structurale des fimbriae de type 1, des appendices protéiques de 7 nm de large trouvés sur les surfaces d'un grand nombre de bactéries à Gram négatif y compris *E. coli* (**B. Li, Koch, & Cebula, 1997**).

8.1. Activation et vérification de pureté des souches isolées

Tous les isolats conservés dans des géloses inclinées (d'origine humaine et animale) ont été activés sur bouillon trypticase soja (TSB), incubés pendant 18 à 24 h à 37 °C. Après incubation, un volume de 0,1 ml de la culture sur TSB a été ensemencé sur gélose Macconkey, les boîtes ont été incubées durant 18 à 24 h à 37°C. Après observation des colonies et vérification de la pureté des souches, Deux à trois colonies identiques et bien isolées sert à l'extraction de l'ADN bactérien.

8.2. Extraction de l'ADN

Les acides nucléiques des souches bactériennes isolées ont été extraits par la méthode de (De Boer & Ward, 1995). Les colonies bactériennes prélevées à partir de la gélose Macconkey ont été transférées dans 9 ml du bouillon nutritive et incubées pendant 24 h à 37°C. Un volume de 1 ml of suspension bactérienne est centrifugée à 14,000 rpm pendant 20 min, puis 100 µl du tampon (1% SDS + TAE) est aux ajouté et les cellules bactériennes contenues dans le culot sont bien vortexé. Les Tubes sont mes pendant 3 h dans un bain

marie à 50°C, puis 50 µl de l'acétate d'ammonium (7.5 M) est ajouté, bien mélangé et centrifugé à 14,000 rpm pendant 15 min. La phase aqueuse contenant l'ADN bactérien est transféré dans un nouveau tube Eppendorf, et un volume égal d'isopropanol réfrigéré au congélateur (2- propanol) est ajouté, puis mélangé doucement jusqu'à la précipitation de l'ADN.

Les tubes ont été conservés au congélateur pendant 45 min, puis centrifugé à 10,000 rpm pendant 10 min. Finalement, l'AND précipité est lavé dans 100 µl de l'éthanol 70% réfrigéré puis centrifugé pendant 10 min à 10,000 rpm. L'ADN a été suspendu dans 50 µl de l'eau bi-distillé stérile est conservé à la congélation jusqu'à les analyses par PCR (Mirik, Aysan, & Sahin, 2011).

8.3. Vérification de la qualité de l'ADN extrait

L'ADN peut contenir des contaminants. Certains contaminants impactent significativement les applications de la PCR et sont responsables d'analyses erronées, de résultats incohérents ou non reproductibles. Il est alors important de contrôler systématiquement la pureté des acides nucléiques en amont de toute application pour identifier les contaminants. La pureté là l'efficacité de l'extraction d'un acide nucléique grâce à le ratio A260 nm/A280 nm ont été vérifié avec l'appareil NanoDrop™. Un volume de 1 – 2 µL est porté sur l'appareil NanoDrop (figure 06), puis les résultats affiché sur microordinateur permet de vérifier la concentration de l'ADN en ng/ µL, la contamination par les protéines et les ARNs ou les solvants utilisés lors de l'extraction (figure 07).

Les résultats sont interprétés selon les rapports suivants :

$$\text{dsDNA purity} = A_{260} / A_{280}$$

- Un ratio entre 1.8 et 2.0 indique que l'ADN est pur.
- Augmentation des ratios généralement indique la présence de l'ARN
- Ratios inférieurs à 1.8 signale une contamination par les protéines ou les solvants utilisés lors de l'extraction de l'ADN.

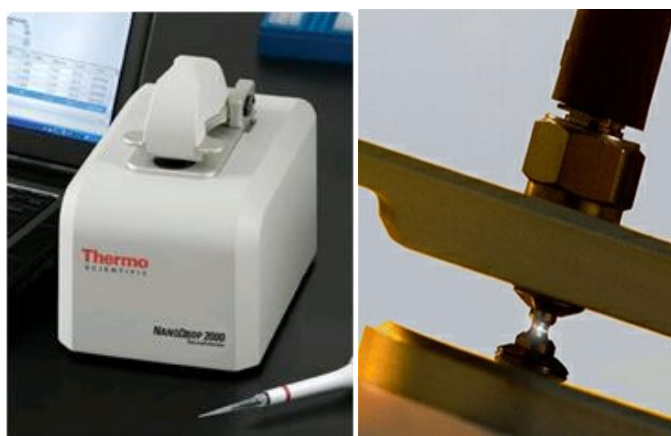


Figure 06 : Appareil NanoDrop utilisé pour vérifier la qualité de l'ADN (CRBt Constantine)

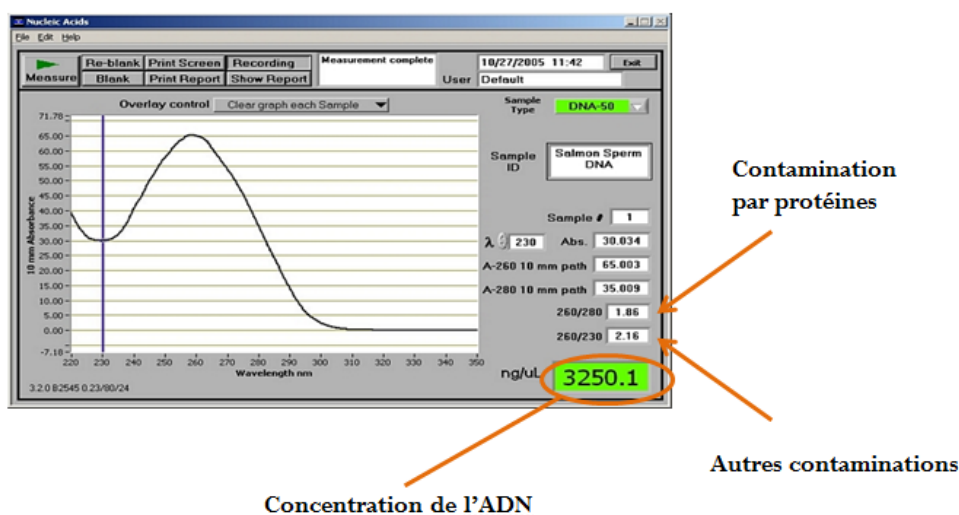


Figure 07 : Capture écran montre la vérification de la concentration et qualité de l'ADN

8.4. Réaction de PCR

Toutes les souches testés phénotypiquement pour la production des BLSE ont subies une extraction de l'ADN, l'ADN extrait sert à la recherche des gènes codant pour les facteurs de virulence (gène *fim-A*), pour les gènes codant les facteurs de résistance aux antibiotiques (*tet-W*) le support génétique des BLSE (*bla_{CTX-M-pan}* et *bla_{TEMetbla_{CMY}}*).

Le protocole de la PCR Simplex utilisé est celui recommandé dans la littérature et selon les instructions du fabricant des amorces. Le tableau 12 résume les caractéristiques des amorces utilisées.

Le choix des amorces et de la procédure utilisée pour la PCR pour l'amplification des gènes *bla_{CTX-M-pan}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CMY}* et *tet-W* a été réalisée selon la méthode décrite par **(Lalzampuia et al., 2013; Wang et al., 2019)**.

La réaction de PCR a été réalisée dans des tubes PCR à paroi mince de 0,2 ml en utilisant le d'ADN comme matrice avec un volume final de réaction de 25 µl. Le mix d'amplification de la PCR simplex contient 2,5 µl de 10X tampons de réaction PCR (100 mM Tris-HCl [pH 8,3]), 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de chacune des amorces, 200 µM pour chaque deoxynucleoside triphosphates dNTPS, 1 U of *Taq* polymérase et 4.0 µl de l'AND extrait. Le volume final du mélange a été ajusté à 25 µl avec de l'eau stérile ultra-pure.

L'amplification de l'ADN pour le gène *bla_{CTX-M-pan}* a été réalisée dans un thermocycleur selon les programmes suivants: dénaturation initiale à 94°C pendant 7 min, suivie par 30 cycles d'amplification avec dénaturation à 94 °C pendant 30 s, appariement à 57 °C pendant 30 s, et extension à 72 °C pendant 30 s, l'amplification se termine par une extension finale à 72°C pendant 5 min. Les mêmes conditions ont été appliquées pour les deux gènes *bla_{TEM}*, *bla_{CMY}*, et *tet-W* sauf pour la température d'appariement spécifique était 55 °C.

La préparation du mix pour l'amplification le gène *fim-A* a été réalisée selon la méthode décrite par **(B. Li et al., 1997)**.

Les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume total de 50 µl, contenaient du tampon PCR standard II 1X, avec 2,5 mM MgCl₂ ; 200 µM de chacun des quatre désoxyribonucléotides dNTPS ; 0,25 µM de chaque amorce ; et 2,5 U ADN polymérase ; et 2% (v / v) d'ADN matrice. Les mélanges réactionnels ont été recouverts avec 50 µl d'huile minérale avant amplification pendant 30 cycles (94, 65 et 72 ° C, 1 min chacun) en utilisant un thermocycleur. Le volume final du mélange a été ajusté à 50 µl avec de l'eau stérile ultra-pure.

Après amplification, 10 microlitres de produit de PCR et 5µl du marqueur de taille de DNA (100 bp) ont été ensuite analysés par sur gel d'agarose à 2%; teinté par 5 µl de RedSafe™ d'acide nucléique, immergé dans le tampon TBE (0.09 M Tris-HCl, 0.09 M acide borique, 2 mM EDTA, pH 8.3) pendant 35 min à 120 V. Les fragments d'ADN obtenus ont été visualisés dans un trans illuminateur UV et traités par le logiciel Alpha Ease FC Software.

Tableau 12 : Caractéristiques des amorces utilisées dans la réaction PCR Simplex.

gene	Structure des amorces	Taille des amplicons (bp)	Température d'appariement en 0C	Références
<i>bla_{CTXM}_{pan}</i>	F- TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA R- CGATATCGTTGGTGGTGCCATA	950	57	(Horton et al., 2011)
<i>bla_{TEM}</i>	F-ATGAGTATTCAACAT TTC CG R-CCAATGCTTAATCAG TGA GG	1080	55	(Weill, Demartin, Fabre, & Grimont, 2004)
<i>bla_{CMY}</i>	F- ATGATGAAAAAATCGTTATGC R- TTGCAGCTTTTCAAGAATGCGC	1146	55	(R. Li, Lin, Chen, Wong, & Chen, 2015)
<i>fimA</i>	F- CACTACGCTCACCATTCAACAAG R- GCTGTAATCCGCTTTGTCTGTG	331	65	(Marc & Dho-Moulin, 1996)
<i>tet-W</i>	F- GACAACGAGAACGGACACTATG R- CGCAATAGCCAGCAATGAACGC	168	55	(de Vries et al., 2011)

8.5. Analyses statistiques

Le test de Fisher exact a été utilisé pour comparer la prévalence de souches isolées à partir des prélèvements d'origine animale et celles d'origine humaine. Les prévalences des gènes codants les facteurs de virulence et la résistance aux antibiotiques chez les souches isolées ont été aussi comparées par le test Fisher exact. Les résultats des différences ont été jugés significatives si la probabilité trouvée est inférieure au seuil de 0.05 ($P < 0,05$).

Partie III : Résultats et Discussion

Nous présentons seulement les résultats obtenus de la première partie qui concerne la recherche, identification et l'étude de la résistance aux antibiotiques chez souches des entérobactéries. Nos résultats seront présentés et discutés en deux parties.

Partie 1 : les résultats présentés dans cette partie concernent la description des échantillons soumis à l'analyse ainsi que le taux de contamination globale des échantillons.

Partie 2 : Rapporte les degrés de l'antibiorésistance des souches isolées et l'exploration des profils de résistance aux antibiotiques testés.

Partie 1 : Description de la population d'étude :

1. Répartition des souches humaines selon la nature des prélèvements :

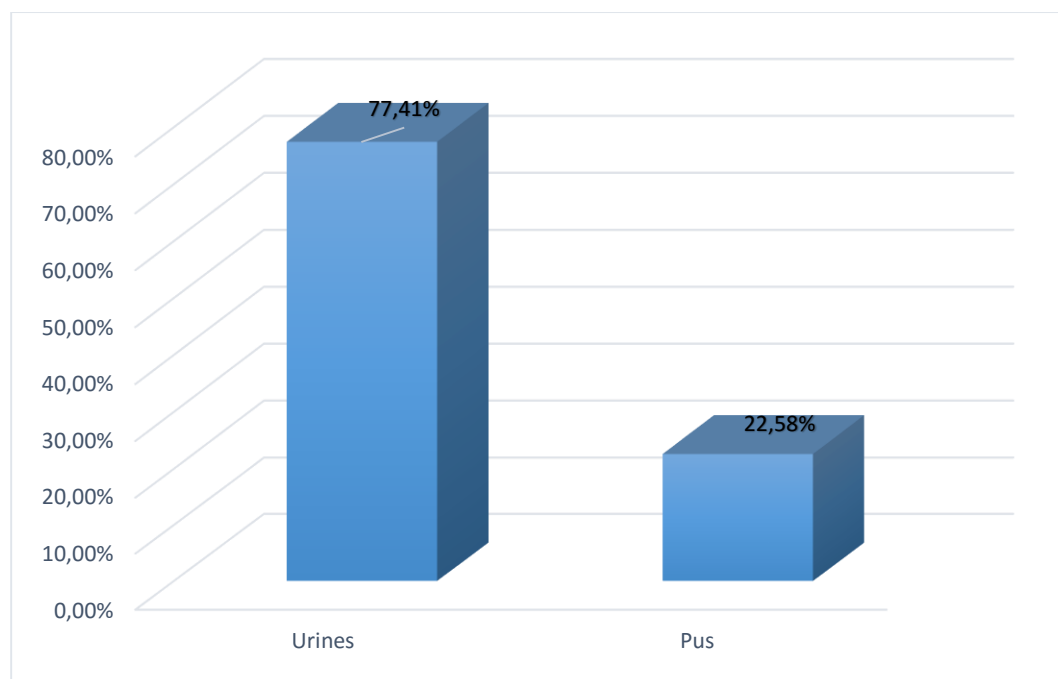


Figure 08 : Répartition des souches des entérobactéries selon la nature de prélèvement.

La figure 08 indique que le taux des entérobactéries isolés à partir des échantillons des urines est plus élevé (77.41%) par rapport le prélèvement du pus (22.58%).

2. Répartition des souches selon le sexe :

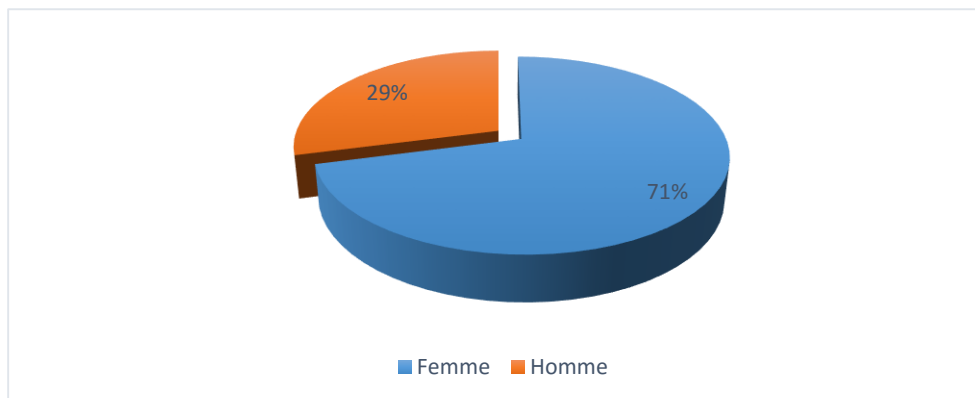


Figure 09 : Répartition des entérobactéries selon le sexe.

La figure 09 montre que les taux des entérobactéries les plus élevés sont isolés à partir des prélèvements issus du sexe féminin avec 71 % par rapport 29 % pour le sexe masculin.

Pour les prélèvements des urines on note une prédominance des souches des entérobactéries isolées chez des patients du sexe féminin avec une prévalence de 70,83 % contre 29,16 % pour le sexe masculin. Cette prédominance féminine 71 % est confirmée par d'autres auteurs (**Levy, 1977; Pezzlo et al., 1982**). Elle pourrait s'expliquer par :

- les caractéristiques anatomiques de l'urètre féminin qui est court, large, droit et proche de la région péri-anale.
- la fréquence des rapports sexuels qui favorisent l'ouverture du méat urétral favorisant ainsi l'accès des germes à la vessie.
- les grossesses, la ménopause et le manque d'hygiène.

3. Répartition des souches selon l'âge :

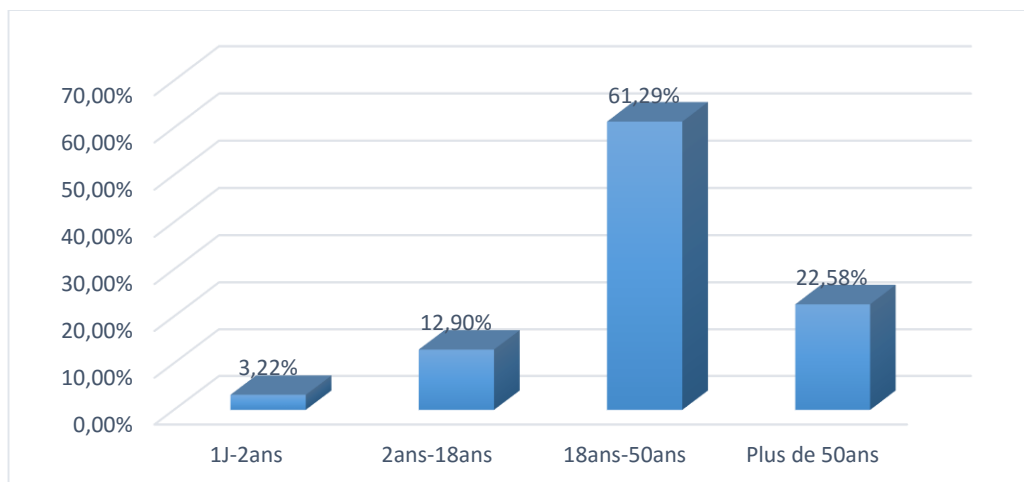


Figure 10 : Répartition des entérobactéries selon l'âge des patients

La figure10 montre que les taux d'isolement des entérobactéries les plus élevés a été observés chez les patients dont les catégories d'âge de (18 - 50ans) et (Plus de 50 ans) avec une taux de 61,29% et 22,58% respectivement.

4. Répartition des entérobactéries selon leurs espèces :

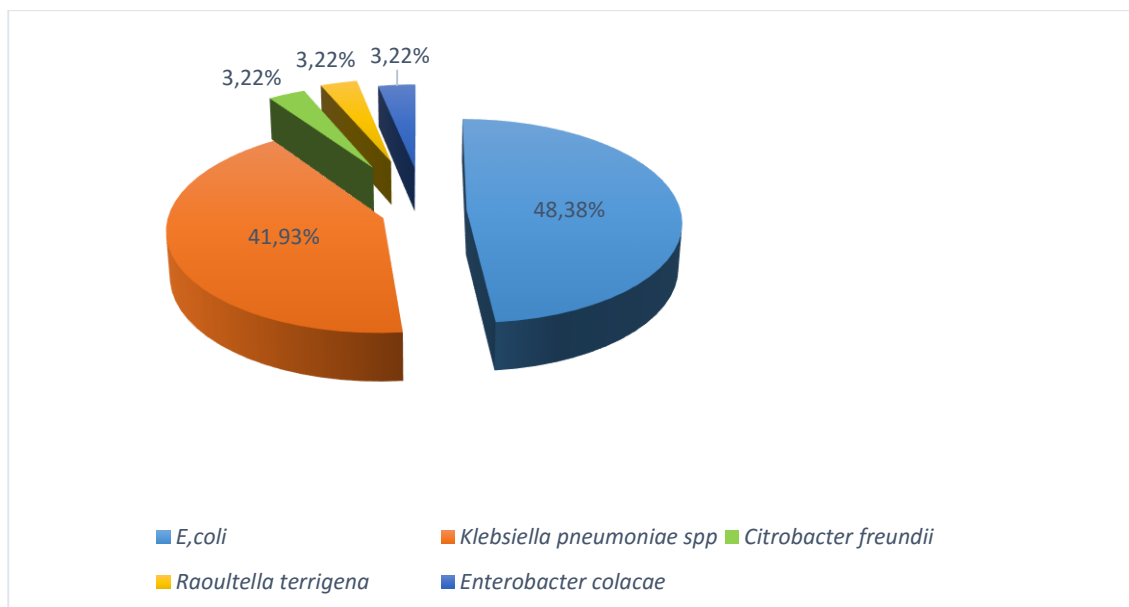


Figure11 : Répartition des entérobactéries en fonction des espèces.

Dans cette étude, un total de 31 souches des entérobactéries ont été isolées. La répartition des souches isolées montre une diversité importante avec prédominance des *Escherichia coli* 48.38% (15/31), suivie par *Klebsiella pneumoniae spp* (41,93%). Alors que, *Citrobacter freundii*, *Raoultella terrigena* et *Enterobacter colacae* avec un taux d'isolement identique 3.22%.

5. Répartition des espèces des entérobactéries isolées selon la nature de prélèvement :

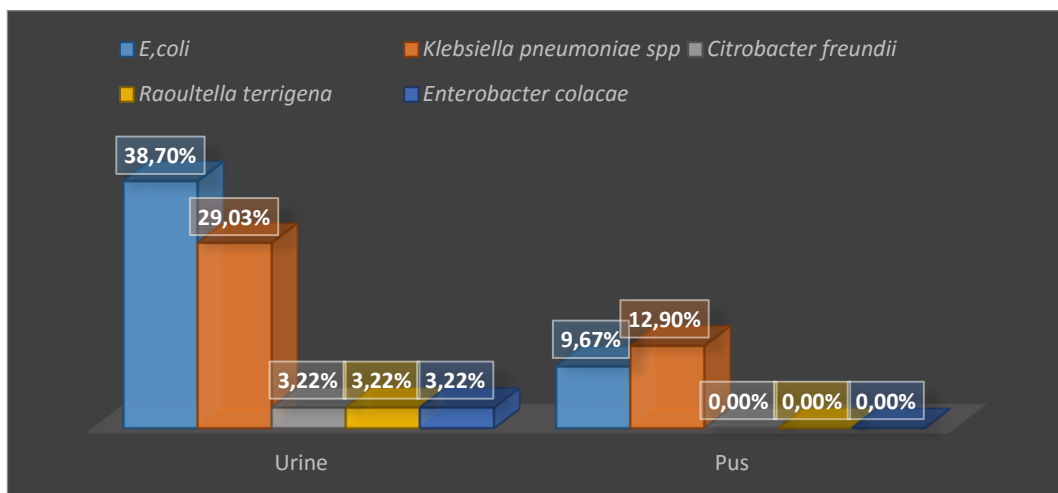


Figure12 : Répartition des espèces des entérobactéries selon la nature de prélèvement.

L'analyse des résultats présentés dans la figure12 révèlent la prédominance des Entérobactéries dans les prélèvements des urines avec un taux de 38,70% pour les souches d'*Escherichia coli* suivi par *Klebsiella pneumonie* (29,03%). Les autres souches comme *Citrobacter freundii*, *Raoultella terrigena* et *Enterobacter colacae* ne represent que des pourcentages très faibles dans les prélèvements des urines : 3,22% ; 3,22% et 3,22% respectivement. Pour les prélèvements de pus, *Klebsiella pneumonie* représente (12.90 %) suivi par *E. Coli* (9,67%).

6. Répartition des souches des entérobactéries d'origine animale :

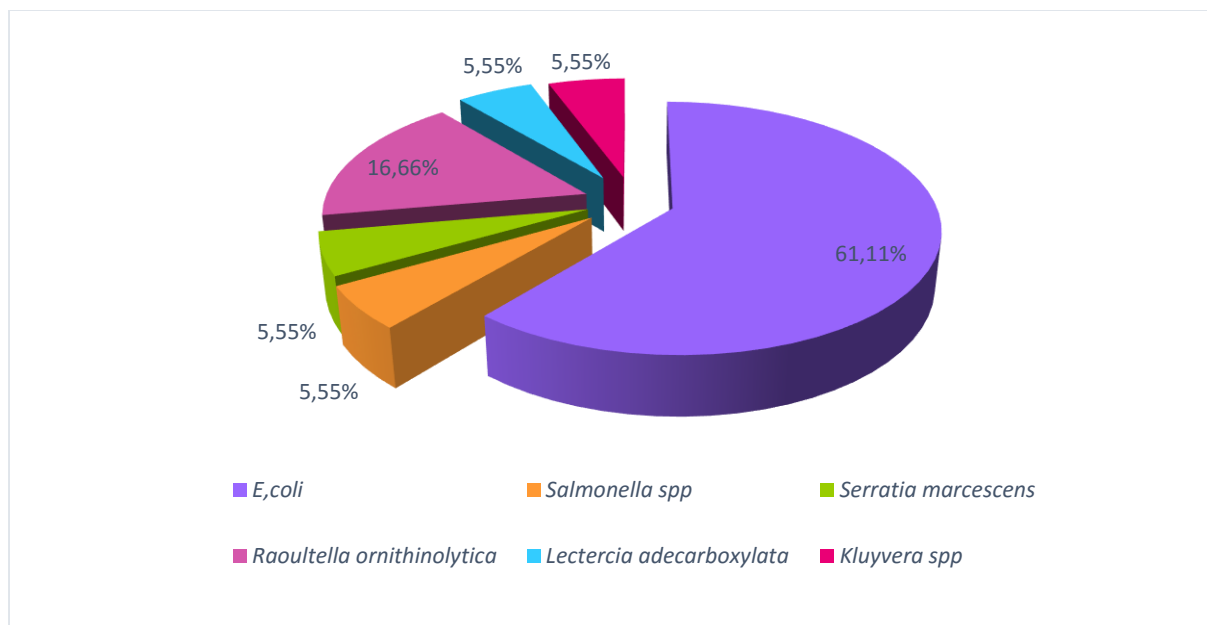


Figure 13 : Répartition des entérobactéries d'origine animale

L'étude bactériologique des 37 souches isolées nous a permis d'identifier 18 souches d'entérobactéries. Les résultats trouvés révèlent que *Escherichia coli* est l'espèce majoritaire (61.11%), suivie *Raoultella orinithinolytica* avec un taux de (16.66%). Alors que, *Salmonella spp*, *Serratia marcescens*, *Lectercia adecarboxyla* et *Kluyvera spp* avec un taux d'isolement identique 5,55%.

Discussion partie 1 :

- Discussion des souches d'origine humaine :

Dans cette étude, 31 souches des entérobactéries ont été isolées, *Escherichia coli* est l'espèce la plus fréquente (48.38%), suivie par *Klebsiella pneumoniae* (41.93%), ces résultats sont en accord avec plusieurs études réalisées au par avant (**Messai, Achour, & Ben, 2007; Nadmi et al., 2010**).

Une étude réalisée en France en 2000, montre que 91,1% des prélèvements demandés pour analyses bactériologiques sont d'origine urinaire(**Péan, Goldstein, & De Bels, 2001**).

La fréquence la plus élevée d'*E. coli* peut probablement s'expliquer que par le fait que cette espèce est la plus dominante de la flore intestinale et qu'elle peut migrer vers l'intestin puis vers l'appareil urinaire. Par ailleurs *E. coli* fait partie des coliformes fécaux, donc un mauvais nettoyage de la partie intime peut facilement provoquer l'entrée de la bactérie dans la vessie.

La plus part des souches entérobactéries ont été isolées par prélèvement des urines ce qui reflète que le tractus urinaire est le principal site d'infection. En Tunisie, un taux de 60% des souches isolées dans les urines a été rapporté par (**Mkaouer et al., 2008**).

L'infection urinaire est une pathologie fréquente en pratique quotidienne. L'espèce bactérienne principale impliquée dans cette infection est *Escherichia coli* puisqu'elle représente 50 à 80% des agents en cause (**Bouzenoune et al., 2009; Matute et al., 2004; Zhanel et al., 2006**). Ceci correspond aux résultats obtenus dans notre étude avec un taux de 38.70 % pour *E. coli* suivi par *K pneumoniae* avec 29.03%. En Tunisie *E. coli* occupe aussi la première place avec 81,7% suivi par *K pneumoniae* avec 3.7% dans l'étude de (**Péan et al., 2001**). De son côté, Perrin et ses collaborateurs ont trouvé 63,6 % d'*E. coli* et 6,3 % de *K. pneumoniae* (**Perrin et al., 1998**).

Selon (**Lobel & Soussy, 2007**), *E. coli* est le germe le plus souvent retrouvé au cours de l'IU, cette prédominance est en rapport avec leurs caractères de virulence. Ainsi, *E. coli* possède des adhésines, capables de fixer la bactérie à l'épithélium urinaire et d'empêcher son élimination par les vidanges vésicales (**Sekhsokh, Chadli, & El Hamzaoui, 2008**).

On a noté au cours de cette étude que parmi les cas positifs il y a une prédominance du sexe féminin avec une prévalence de 70.96 %. Nos résultats sont en concordance avec d'autres travaux où des taux de 75% et 25% ont été retrouvés chez la gent féminine et masculine respectivement (**Bourjilat et al., 2009; De Mouy, Fabre, & Cavallo, 2007**).

Donc ceci est lié aux raisons suivantes : L'anatomie de l'appareil génital chez la femme favorise l'infection urinaire, elle a un urètre très court, facilite à être accédé par de bactéries ; la proximité entre l'anus et le méat urinaire facilite grandement l'accès de l'urètre aux bactéries intestinales provenant de rectum, en outre l'homme a un appareil génital bien protégé ; l'urètre est plus long. Chez certaines femmes, l'augmentation de l'activité sexuellement peut provoquer les symptômes d'une infection urinaire (**Lemaitre et al., 2015**)

Les femmes enceintes sont particulièrement à risque en raison de la pression exercée par le fœtus sur le système urinaire, les changements hormonaux, aussi la grossesse dilate les voies excrétrices. Après la ménopause, les IU peuvent être plus fréquentes à cause de l'absence de certaines hormones (**Berthélémy, 2014**).

Selon nos résultats, on a constaté que le nombre des cas d'ECBU, positifs à *E. coli* est plus important chez les tranches d'âge avancées: ceux de [18-50 ans] avec 61.29% et la catégorie d'âge allant plus de ≥ 50 ans avec 22,58%, l'âge moyen était de 41,5 ans ; ce dernier est similaire à celui trouvé par (**Amazian et al., 2010**), en Algérie qui ont montré que : sur 4634 patients, l'âge moyen était de 41,1 avec 19,4 % des patients étaient âgés de 65 ans ou plus.

Ceci rejoint les résultats de l'étude faite à Meknès (**Moukrad, Filali, & Makoudi, 2012**). Il ya donc un rapport entre le risque infectieux et l'âge. L'infection urinaire à *E. coli* est fréquente chez les patients âgés. Ceux-ci peuvent être expliqués chez la femme avec deux pics, l'un au début de l'activité sexuelle et l'autre en période post ménopausique. Chez l'homme, ces infections sont moins fréquentes mais peuvent être augmenté après 50 ans, en relation avec la pathologie prostatique (**Abdallah, 2008**).

Beaucoup de femmes en contracteront plusieurs cas d'infection urinaire au cours de leur vie. Environ 2 % à 3 % des femmes adultes auraient une cystite chaque année. Les hommes jeunes sont peu touchés par cette affection, les hommes d'âge mûr atteints de troubles de la prostate en sont plus à risque. Les personnes âgées, qui cumulent plusieurs des facteurs : alitement, hospitalisation, sonde urinaire, troubles neurologiques, diabète. Ainsi, 25 % à 50 % des femmes et 20 % des hommes de plus de 80 ans sont sujets aux infections urinaires fréquentes (**Iacobelli, Bonsante, & Guignard, 2009**).

Quant aux enfants, ils sont plus rarement touchés. Environ 2 % des nouveau-nés et des nourrissons contractent des infections urinaires. Ce sont surtout les bébés de sexe masculin qui présentent une anomalie des voies urinaires qui en souffrent. À l'âge de 6 ans, 7 % des filles et 2 % des garçons ont présenté au moins une fois une infection urinaire (**Iacobelli et al., 2009**)

- **Discussion des résultats des souches d'origine animale :**

Les résultats trouvés de la population d'origine animale révèlent que *Escherichia coli* est l'espèce majoritaire (61.11%), suivie *Raoultella orinithinolytica* avec un taux de (16.66%).

La prédominance de *E coli* dans le poulet à été révélée par plusieurs travaux scientifiques à travers le monde. Dans l'étude menée à l'ouest Algérien par (**Ahmed et al., 2017**), sur les 150 souches d'entérobactéries étudiées 101 isolats appartenait à *Escherichia coli*. (**Moawad et al., 2018**) ont isolé 72 souches d'entérobactéries qui ont été identifiés comme suit : 63 *E. coli* (87.5%), 5 *Enterobacter cloacae* (6.9%), *Klebsiella pneumoniae* (2.8%).

Au Nigeria, (**Ojo et al., 2012**) ont isolés 184 souches dont 104 *Escherichia coli*, 44 *Klebsiella* spp, 20 *Salmonella* spp et 16 *Enterobacter aerogenes*.

Au Pakistan (2018) 214 souches ont été isolées a partir des poulets de chair par (**Kamboh et al., 2018**), dont 103 *E. coli* ,81 *Salmonella* et 30 *Klebsiella*.

Les entérobactéries sont le groupe des bactéries le plus fréquemment isolées dans les laboratoires de bactériologie, *E. coli* étant les espèces revenant le plus souvent (**Bao et al., 2013**)

Cette prédominance peut être expliquée par le fait que les *Escherichia coli* sont des hôtes commensaux du tractus digestif de la volaille jeune et adulte. 10 à 15% des coliformes intestinaux peuvent appartenir à des sérotypes potentiellement pathogènes (**Moawad et al., 2018**).

Partie 2 : Étude de la sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques.

1. Étude de la sensibilité des entérobactéries d'origine humaine :

1.1. Taux de sensibilité globale des entérobactéries d'origine humaine aux antibiotiques :

Nous avons utilisé une lecture impérative : c'est-à-dire qu'on détermine la sensibilité ou la résistance d'une souche en comparant les diamètres des zones d'inhibition de nos souches avec ceux de la souche de référence, les valeurs trouvées ont permis de classer les souches étudiées en trois catégories : sensible (S), résistante (R) "intermédiaire (I).

Les taux de sensibilité aux antibiotiques des souches isolées sont représentés dans la figure 14 est déterminés selon les valeurs critiques décrits par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de la Microbiologie (CA-SFM, 2010; Wayne, 2011).

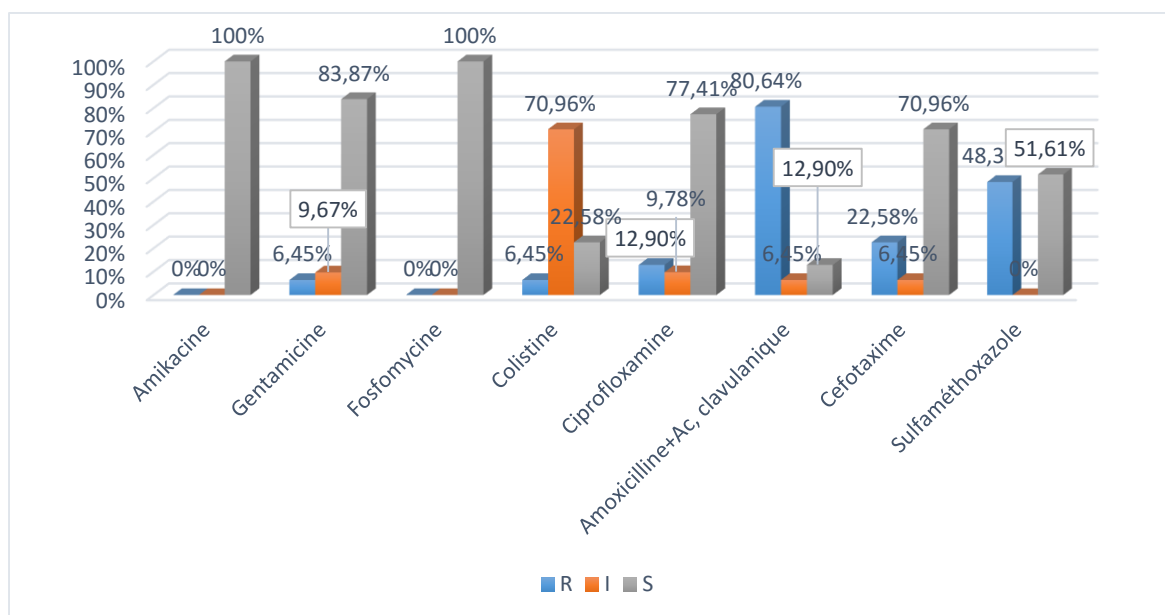


Figure 14 : Taux de résistance des souches des entérobactéries d'origine humaine aux antibiotiques.

Les résultats de la figure 14 montrent que les entérobactéries isolées présentent une résistance très élevée à l'amoxicilline+ acide Clavulanique (80,64%), et une résistance moyenne pour Cefotaxime, Sulfaméthoxazole et ciprofloxacine avec des pourcentages de 22.58 %, 48,38% et 12,90% respectivement. Une très faible résistance a été observée pour la gentamicine et colistine avec un taux de 6.45%.

1.2. Taux de l'antibiorésistance chez *E. coli* :

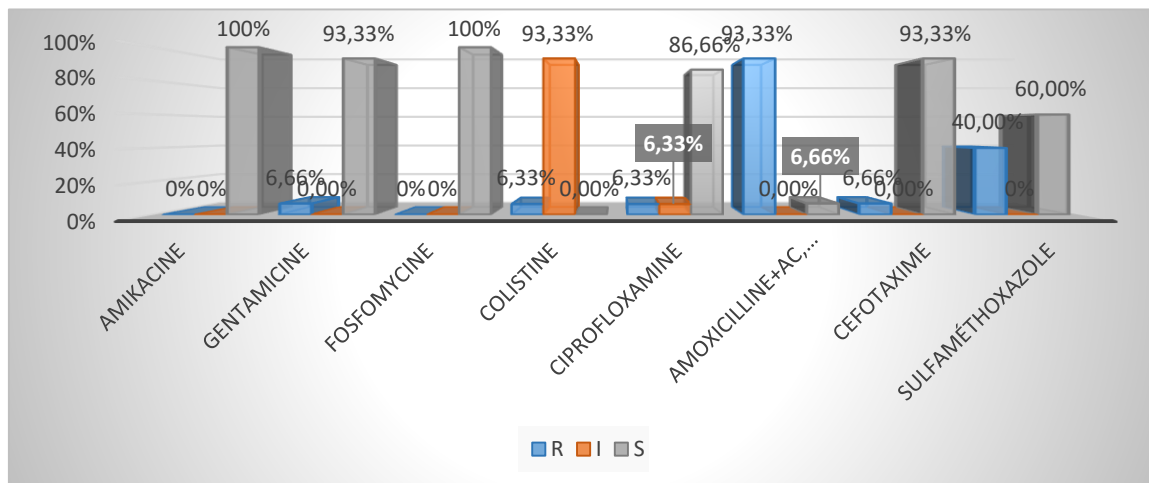


Figure 15 : Taux de l'antibiorésistance chez souches des *E. coli*.

D'après la figure 15, on note que les souches *E. coli* montrent une résistance élevée à l'Amoxicilline + acide Clavulanique (93,33%) et pour le triméthoprime-sulfaméthoxazole (40%). Une très bonne sensibilité pour Amikacine, Fosfomycine, Gentamicine, céfotaxime, et ciprofloxacine avec des pourcentages 100% ,100%, 93.33%, 93.33%, et 86.66% respectivement. Une sensibilité modérée au triméthoprime-sulfaméthoxazole (60%). Une résistance intermédiaire importante à été observé pour Colistine avec taux 93.33%.

1.3. Taux de l'antibiorésistance chez *K. pneumoniae* :

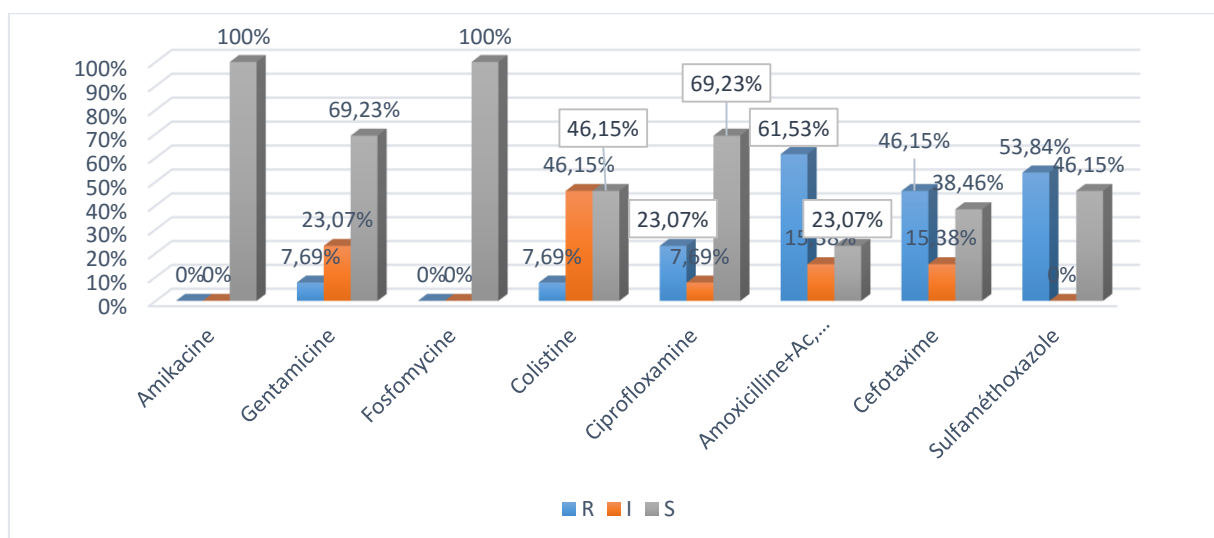


Figure 16 : Taux de l'antibiorésistance chez *K.pneumoniae*.

Nos résultats révèlent des taux de sensibilité de 100% pour Amikacine, Fosfomycine et 69.23% ont été observés pour les deux antibiotiques Gentamicine et Ciprofloxacine, respectivement. Les souches de *K.pneumoniae* étaient résistantes à l'Amoxiciline + acide Clavulanique, Céfotaxime et le trimethoprime-sulfamethoxazole avec des taux 61.53%,46.15%, 53.84%respectivement. Une résistance intermédiaire moyenne à été observé pour Colistine 46.15% et faible Gentamicine, l'Amoxiciline + acide Clavulanique et Cefotaxime avec des pourcentages 23.07%, 15.38%, 15.38% respectivement.

2. Étude de la sensibilité des entérobactéries d'origine animale :

2.1. Taux de sensibilité globale des entérobactéries d'origine animale aux antibiotiques :

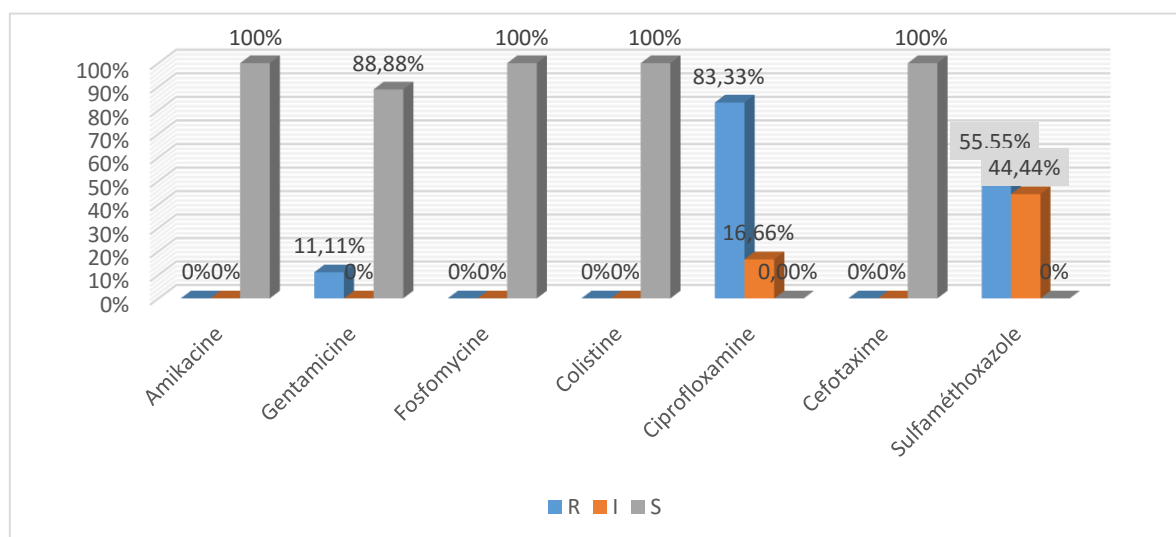


Figure 17 : Fréquences d'antibiorésistance des isolats d'entérobactéries d'origine animale.

Les résultats de la figure 17 montrent que les entérobactéries isolées présentent une sensibilité très élevée d'Amikacine, fosfomycine, colistine, céfotaxime 100% et gentamicine 88.88% respectivement. Une résistance importante au ciprofloxacine 83.33% et trimethoprime-sulfamethoxazole 55.55%. Une résistance intermédiaire faible pour ciprofloxacine 16.66% et moyenne pour le trimethoprime-sulfamethoxazole 44.44%.

2.2. Taux de l'antibiorésistance chez *E. coli* :

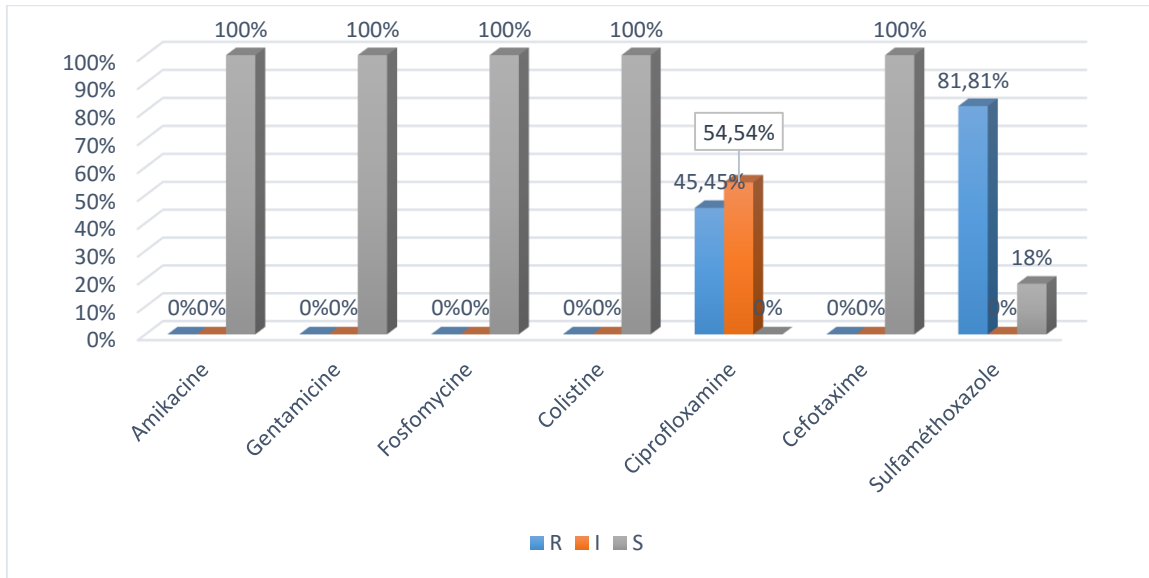


Figure 18 : Taux de l'antibiorésistance chez souches des *E. coli* d'origine animale.

Nos résultats révèlent que 100% de (11 souches) *E.coli* présentent une sensibilité pour Amikacine, gentamicine, fosfomycine, colistine et céfotaxime. Une résistance importante au trimethoprim-sulfamethoxazole 81.81% et moyenne pour ciprofloxacine 45.45%. Les souches *E. coli* montrent une résistance intermédiaire élevée à ciprofloxacine 54.54%.

Discussion partie 2 :

- Discussion des résultats des souches d'origine humaine :

Les niveaux des résistances bactériennes varient d'un pays à l'autre et d'une année à l'autre. Aussi, la connaissance de la situation locale et de son évolution sont nécessaires pour le choix de l'antibiothérapie de première intention (**El Bakkouri et al., 2009**). En effet, nos résultats montrent un taux de sensibilité considérable à la majorité des antibiotiques testés pour les souches d'origine humaine : Amikacine et fosfomycine 100%, gentamicine 83.87%, ciprofloxacine 77.41%, cefotaxime 70,96% et faible pour l'Amoxicilline + l'Acide clavulanique 12.90%. Ces résultats sont presque comparables dans la plupart des pourcentages de sensibilités avec ceux de l'étude réalisée par (**Sissoko, 2006**), qui a trouvé : L'Amikacine (93.3%), la Gentamycine (64.8 %), la Ciprofloxacine (56%), l'Amoxicilline + l'Acide clavulanique (38.2 %).

Les souches *E. coli* montrent une très bonne sensibilité pour Amikacine, Fosfomycine, Gentamicine, céfotaxime, et ciprofloxacine avec des pourcentages 100% ,100%, 93.33%, 93.33%, et 86.66% respectivement. Ces résultats concordent avec ceux de l'étude réalisée par (**Sissoko, 2006**) et (**Ait Miloud, 2011**), pour quelques pourcentages de sensibilités : l'Amikacine (93%) et (96,4%), la Gentamycine (72,2%) et (88,3%), la Ciprofloxacine (57,9%) et (69,7%), l'Amoxicilline + l'Acide clavulanique (29,86%) et (35%).(**Michaël, 2010**), et (**Chafai, 2008**), ont trouvé des résultats proches pour la Ciprofloxacine (95.8%) et (90.5%).

D'autre part, les Entérobactéries ont montrées une sensibilité totale à la Fosfomycine. Ces résultats concordent avec ceux de (**Bouguenoun, 2017**) obtenu à l'hôpital de Guelma. La Fosfomycine est considérée comme molécule d'antibiotique de choix efficace pour traiter les infections à Entérobactéries surtout lorsqu'il s'agit des BLSE. La Fosfomycine est réservée uniquement pour les infections urinaires en Algérie, mais elle pourrait être utilisée pour traiter d'autres infections. Par ailleurs, les aminosides comme (Gentamicine avec 6,45%) et le Fluoroquinolone (Ciprofloxacine soit un taux de 12,90%), ont gardé leur activité, mais les médecins ne prescrivent pas ces molécules pour traiter les infections hospitalières du fait de leur forte toxicité, leur forme injectable et beaucoup d'effet secondaires. Ces résultats sont inférieurs à ceux trouvés par (**Saadaoui, 2008; Saïdani et al., 2006**) à Rabat.

Concernant la résistance des souches isolées à l'Amoxicilline + l'Acide clavulanique, on note une résistance élevée chez *K. pneumoniae* et *E. coli* avec un taux de 61.53% et 93.33% respectivement, nos résultats sont similaires de ceux de (**Souna, 2010**) avec pourcentages de résistance 100%.

En Algérie, (**Bouzenoune et al., 2009**) ont enregistré un taux plus élevé de 50% de résistance à AMC ,43% de résistance à SXT chez *E.coli*.

En ce qui concerne les polypeptides, on a enregistré une très faible résistance chez *K. pneumoniae* de 7,69% à la colistine. Un résultat proche a été observé dans une étude menée par (**Djahida, Imane, & Mourad, 2011**)

La résistance aux aminosides observée dans notre étude est faible, 6.45% pour la gentamycine et 0% pour l'amikacine. Nos résultats identiques à ce qui menées par Koeck : (98%) des souches de *Klebseilla pneumoniae* et *E. coli* étaient sensibles à l'amikacine (**Koeck et al., 1996**). En effet, on observe des taux élevés de résistance aux aminosides qui est rapporté par (**Mechergui et al., 2011**).

L'étude de la sensibilité des entérobactéries aux C3G, montrait des taux de résistance faible (22.58%). Les niveaux de résistance étant considérés supérieurs à ceux observés au CHU de Tlemcen (**Ayad, 2010**). En revanche plus élevés que ceux rapportés en Algérie (**Amazian et al., 2006**). Une revue de la littérature est réalisée par **Mkaouar en 2008** donne les taux de résistance aux C3G dans des différents pays : 15% en Tunisie, 6% en France et 34% en Inde (**Mkaouar et al., 2008**).

Les entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3eme génération occupent une place importante dans les infections nosocomiales. Ces bactéries deviennent de plus en plus résistantes aux antibiotiques et commencent à franchir les limites de l'hôpital pour émerger dans la communauté. La dissémination de ces bactéries présente une menace grave qui met en cause la validité de l'arsenal antibiotique actuellement disponible, d'autant plus qu'aucune classe nouvelle d'antibiotique n'est attendue dans les prochaines années (**Mkaouar et al., 2008**)

- Discussion des résultats des souches d'origine animale :

Dans cette étude les 18 souches des entérobactéries d'origine animale isolées présentent une résistance moyenne à SXT 55.55% et faible à la Gentamicine 11.11%. Nos résultats sont similaires de ceux obtenus à l'ouest algérien par(**Ahmed et al., 2017**),avec pourcentages de résistance 77.75% et 6% respectivement .En revanche un taux plus élevé pour Gentamicine 78.79% on observe par (**Kamboh et al., 2018**) au Pakistan et faible par (**Moawad et al., 2018**) en Égypte avec taux 19.6%.

Cette variation des taux d'antibiorésistance enregistrés dans les différentes études peut être liée à la différence de la fréquence d'utilisation de certaines molécules, selon le pays, pour traiter ou prévenir les maladies.

Le taux enregistré pour les isolats *E. coli* d'origine animale sont élevés vis à vis : le triméthoprime-sulfaméthoxazole (81,81%), moyen à faible pour Ciprofloxacine 45,45% et 0% pour la colistine. Nos résultats concordent avec ceux rapportés par (**Ibrahim et al., 2019**) dans leur étude menée en Égypte pour triméthoprime-sulfaméthoxazole (100%), pour la colistine elle est très élevée 20.59%. Un résultat proche a été observé pour la ciprofloxacine 47.70% dans une étude menée par (**Chen et al., 2014**).

Au Maroc, (**Rahmatallah, 2017**) ont obtenu de fréquence similaire pour le triméthoprime-sulfaméthoxazole (82,8% contre 81,81%) par contre elles sont plus élevées pour la gentamicine (24,8% contre 0%).

Ces taux d'antibiorésistance sont alarmants et inquiétants et reflètent l'utilisation de plus en plus importante de ces antibiotiques dans l'élevage avicole.

L'utilisation inappropriée de ces derniers ainsi que la résistance croisée entre différentes molécules peuvent être incriminées aussi.

Ce phénomène d'antibiorésistance, peut être aussi expliqué par l'utilisation accrue de ces molécules grâce à leur grande disponibilité sur le marché algérien (présence de génériques) avec des prix abordables, alors qu'il y a quelques années, il n'existait que la molécule mère qui était très chère. La diversité des mécanismes de résistance des bactéries peut être aussi responsable de cette hausse.

Par ailleurs, plus une molécule est utilisée, plus on doit s'attendre à l'apparition de résistance. C'est pourquoi, l'usage très limitée de la gentamicine en aviculture du fait de son coût élevé explique sa plus grande efficacité.

L'analyse de la sensibilité des souches *E. coli* a montré une très bonne réponse vis-à-vis de l'amikacine, gentamicine, fosfomycine, colistine, céfotaxime avec un taux identique 100%. Des travaux antérieurs de (**Fatma et al., 2009**) au Maroc ont démontré l'efficacité de la gentamicine chez les *Escherichia coli* avec une sensibilité de 90%.

Ce résultat diffère de celui rapporté par **Alexandre Blanc-Gonnet**, où 3% des souches isolées de poulets de chair, ont été résistantes au céfotaxime (**Alexandre, 2012**).

De même, (**Rao et al., 2014**) ont rapporté une augmentation de pourcentage de la résistance des *E. coli* aux CTX en Chine de 1,4% en 2003 à 48,5% en 2012. Par ailleurs, une étude tunisienne a également rapporté un taux de résistance au CTX égale à 46,1% (18/ 39 souches isolées de poulets de chair et dinde (**Slama et al., 2010**).

Conclusion

Conclusion et recommandations :

Ce travail avait pour objectif de définir le profil épidémiologique et moléculaire de la résistance aux antibiotiques chez des souches d'entérobactéries isolées des infections humaines et animales.

Durant cette étude, 49 souches des entérobactéries ont été isolées dont 63,26% des souches ont été isolées à partir des échantillons d'origine humaine et 36,73% des souches isolées à partir des échantillons d'origine animale.

Les entérobactéries d'origine humaine ont été majoritairement isolées des prélèvements urinaires (77,41%) avec prédominance du sexe féminin (70,96%) par rapport au sexe masculin (29,03%). L'espèce *Escherichia coli* constitue plus de 38,70% des bactéries isolées dans les infections urinaires suivi par *Klebsiella pneumoniae* (29,03%), les autres espèces (*Raoultella terrigena*, *Citrobacter freundii* et *Enterobacter colacae*) sont présentes avec des taux relativement faibles 3,22%.

Parmi les entérobactéries isolées du poulet de chair, *E. coli* est la bactérie la plus répandue avec 61,11% suivie par *Raoultella ornithinolytica* (16,66%).

Cette étude montre un niveau de résistance élevé des souches d'origine humaine à l'amoxiciline + acide Clavulanique (80,64%), faible à moyen pour triméthoprime-sulfaméthoxazole (48,38%) par contre les souches d'origine animale présentent une résistance plus élevée au triméthoprime-sulfaméthoxazole par rapport aux souches d'origine humaine avec un taux (81,81%). Pour la Ciprofloxacine, les souches d'origine animale sont plus résistantes que les souches d'origine humaine (83,33% vs 12,90%).

Sachant que la partie de la recherche des gènes de virulence et la résistance aux antibiotiques par la PCR a été annulée à cause de la crise sanitaire COVID-19, aucun résultat relatif à cette investigation moléculaire n'a été obtenu.

Afin d'éviter l'émergence de nouveaux profils de résistance et/ou de réduire l'émergence des anciens profils, il faut agir à deux niveaux : en amont, en contrôlant la prescription, la délivrance et la consommation de l'antibiotique, et en aval, en réduisant les risques de dissémination et de transmission des entérobactéries résistantes (commensales ou pathogènes) par le respect strict et le maintien rigoureux des mesures d'hygiène et de sécurité sanitaire.

Nous proposons aussi de mener des études plus approfondies en augmentant le nombre d'échantillons, et d'élargir l'étude par la réalisation d'autres types de prélèvements.

Référence bibliographique

Référence bibliographique :

- Abdallah, H. B. N., S Khélifa, A Ben Elhadj Sahnoun, O Elargoubi, A Mastouri, M. (2008). Profil de sensibilité aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées dans la région de Monastir. *Médecine et maladies infectieuses*, 38(10), 554-556.
- Acha Jamet, P. N., & Szyfres, B. (1980). Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. In *PAHO. Scientific Publication: Pan American Health Organization*.
- Adja.N. (2005). Les entérobactéries sécrétrices de Béta-lactamines à spectre élargi. Thèse de doctorat en pharmacie. 18,23
- Ahmed, A., Moulaya, M., Bouzidc, R., Benameurd, Q., & Aggada, H. (2017). Bacterial resistance of enterobacteria isolates in Western Algeria. *J. Appl. Environ. Biol. Sci*, 7(1), 140-145.
- AIT MILOUD, K. (2011). L'infection urinaire: expérience du laboratoire de microbiologie de l'hôpital des spécialités de Rabat.
- Alexander, D., Gough, R., Saif, Y., Barnes, H., Glisson, J., Fadly, A., . . . Swayne, D. (2003). Newcastle disease, other avian Paramyxoviruses, and Pneumovirus infections. *Disease of Poultry*, vol. 11th. In: Iowa State Press, Ames, IA.
- Alexandre, B.-G. (2012). Les plans de surveillance de la résistance aux antibiotiques de *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Enterococcus* et *Campylobacter* mis en oeuvre dans les filières animales en France.
- Alfandari, S. (2003). Prévention des infections urinaires nosocomiales: effets de l'infection urinaire nosocomiale sur la durée de séjour, le coût et la mortalité. *Médecine et maladies infectieuses*, 33, 247-254.
- Amazian, K., Fendri, C., Missoum, M., Bouzouaia, N., Rahal, K., Savey, A., . . . Fabry, J. (2006). Multicenter pilot survey of resistant bacteria in the Mediterranean area. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 25(5), 340-343.
- Amazian, K., Rossello, J., Castella, A., Sekkat, S., Terzaki, S., Dhidah, L., . . . Fabry, J. (2010). Prévalence des infections nosocomiales dans 27 hôpitaux de la région méditerranéenne. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 16(10).
- Ameen-Ur-Rashid, S. S., Khan, M., Rafiullah, A. A., & Anwar, M. (2017). Isolation of *Escherichia coli* from Poultry Liver and its Antibigram Profile. *Res. J. Vet. Pract*, 5(1), 12-14.
- Amyes, S., & Towner, K. (1990). Trimethoprim resistance; epidemiology and molecular aspects:—a review based upon a Symposium held on 19 April 1989 at the 4th European Congress of Clinical Microbiology, Nice, France. *Journal of medical microbiology*, 31(1), 1-1.
- Andersson, D. I., and D. Hughes. 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol* 8:260-71.
- Anonyme.01. Collège national des enseignants de réanimation médicale. (2005). Réanimation et urgences. Paris: Masson.

Référence bibliographique

- Arakawa, Y., Murakami, M., Suzuki, K., Ito, H., Wacharotayankun, R., Ohsuka, S., . . . Ohta, M. (1995). A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. *Antimicrob Agents Chemother*, 39(7), 1612-1615. doi:10.1128/aac.39.7.1612
- ARCANGIOLI, M.-A., LEROY-SETRIN, S., MARTEL, J.-L., & CHASLUS-DANCLA, E. (2000). Evolution of chloramphenicol resistance, with emergence of cross-resistance to florfenicol, in bovine Salmonella Typhimurium strains implicates definitive phage type (DT) 104. *Journal of medical microbiology*, 49(1), 103-110.
- Assane.M.M. (2012). *La colibacillose du poulet de chair : étude anatomo-clinique et circonstances d'apparition dans la zone peri-urbaine de DAKAR (SRNEGAL) ; Thèse de doctorat vétérinaire. Ecole inter état des sciences et médecine vétérinaire de DAKAR.*
- Avril, J. L., Dabernat, H., Monteil, H., & Denis, F. (2000). *Bactériologie clinique*: Ellipses-Marketing.
- AYAD, A. (2010). Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries au CHU de Tlemcen.
- BACHIR PACHA M, T. Y. R., Bounar K.S, Abdul H A.S. . (2013). *Manuel des pathologies aviaires.*
- Bao, L., Peng, R., Ren, X., Ma, R., Li, J., & Wang, Y. (2013). Analysis of some common pathogens and their drug resistance to antibiotics. *Pakistan journal of medical sciences*, 29(1), 135.
- BAY, P., & WODARG, M. G. D. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST (Eds), 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, The Williams and Wilkins Comp.
- Bennett, P. M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol*, 153 Suppl 1(Suppl 1), S347-357. doi:10.1038/sj.bjp.0707607
- Berthélémy, S. (2014). Une patiente souffrant d'une infection urinaire. *Actualités Pharmaceutiques*, 53(536), 41-44.
- Bialek-Davenet, S., Marcon, E., Leflon-Guibout, V., Lavigne, J.-P., Bert, F., Moreau, R., & Nicolas-Chanoine, M.-H. (2011). In vitro selection of ramR and soxR mutants overexpressing efflux systems by fluoroquinolones as well as cefoxitin in Klebsiella pneumoniae. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(6), 2795-2802.
- BioMérieux. (2010). Système d'identification des Entérobactériaceae et autres bacilles à gram négatif non fastidieux (API20E) .07584J-fr .
- Boissieu., C. G., JL. (2008). AVIcampus Ecole Nationale vétérinaire Toulouse., les colibacilloses ou infections à Escherichia Coli.[en ligne]. Accès internet: <http://www.avicampus.fr/PDF/pathologie/colibacilloses.pdf> (page consultée le 30 octobre 2011).
- Bonnet, R. (2006). Bêtalactamines et entérobactéries. *Antibiogramme. Paris: Eska*, 141-162.
- Bonnet, R. (2011). *Antibiogramme.*
- Boone, D. R., & Castenholz, R. W. (2001). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.*
- Bouguenoun, W. (2017). *Etudes de la résistance aux antibiotiques des bactéries incriminées dans les infections nosocomiales et leur dissémination dans l'environnement hospitalier de la région de Guelma. Thèse de Doctorat en Biologie Moléculaire et Cellulaire. Université Badji.*

Référence bibliographique

- Bourjilat, F., Dersi, N., Bouchrif, B., Amarouch, H., & Timinouni, M. (2009). Profil de résistance aux antibiotiques des *Escherichia coli* uropathogènes communautaires au Maroc. *Eur J Sci Res*, 38(1), 57-62.
- Bouzenoune, F., Boudersa, F., Bensaad, A., Harkat, F., & Siad, N. (2009). Les infections urinaires à Ain M'lila (Algérie). Résistance aux antibiotiques des 239 souches isolées entre 2006 et 2007. *Médecine et maladies infectieuses*, 39(2), 142-143.
- Breines, D. M., Ouabdesselam, S., Ng, E. Y., Tankovic, J., Shah, S., Soussy, C. J., & Hooper, D. C. (1997). Quinolone resistance locus *nfxD* of *Escherichia coli* is a mutant allele of the *parE* gene encoding a subunit of topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother*, 41(1), 175-179. doi:10.1128/aac.41.1.175
- Bricaire, L., & Bricaire, F. (2007). *Maladies infectieuses*: Elsevier Masson.
- Bryan, L. (1984). Mechanisms of action of aminoglycoside antibiotics. *CONTEMP. ISSUES INFECT. DIS*. 1984.
- Bryskier, A. (1999). *Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques*: Ellipses Marketing.
- Cabrolier, N., Lafolie, J., & Bertrand, X. (2014). Épidémiologie et facteurs de risques des infections liées à *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal des Anti-infectieux*, 16(1), 8-12.
- Cambray, G., Guerout, A. M., & Mazel, D. (2010). Integrons. *Annu Rev Genet*, 44, 141-166. doi:10.1146/annurev-genet-102209-163504
- Camille, D. (2014). *Pratique en microbiologie de laboratoire? Recherche de bactéries et de levures-moisissures*: Lavoisier.
- Carbonnelle, B. (1987). *Bactériologie médicale: techniques usuelles*: Simep.
- Carip, C. (2008). *Microbiologie, hygiène: bases microbiologiques de la diététique*: Tec & Doc.
- CA-SFM. (2010). AntibioGramme en diffusion. Recommandations techniques et Guide d'interprétation. Communiqué du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie .Sanofi Diagnostics Pasteur.
- CHAFAI, N. (2008). *Les infections urinaires a l'hôpital militaire avicenne de marrakech (2004–2006)*.
- Chapman, J. S., & Georgopapadakou, N. H. (1988). Routes of quinolone permeation in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 32(4), 438-442. doi:10.1128/aac.32.4.438
- Chen, X., Zhang, W., Yin, J., Zhang, N., Geng, S., Zhou, X., . . . Jiao, X. (2014). *Escherichia coli* isolates from sick chickens in China: changes in antimicrobial resistance between 1993 and 2013. *Vet J*, 202(1), 112-115. doi:10.1016/j.tvjl.2014.06.016
- Clasen, J., Birkegård, A. C., Græsbøll, K., & Folkesson, A. (2019). Evolution of TEM-type extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* by cephalosporins. *J Glob Antimicrob Resist*, 19, 32-39. doi:10.1016/j.jgar.2019.03.010
- Courvalin, P., & Leclercq, R. (2006). *Antibiogramme*: Editions Eska.
- Courvalin, P., & Philippon, A. (1989). Mécanismes biochimiques de la résistance bactérienne aux agents antibactériens. *Bactériologie médicale*. Paris: Flammarion, 332-355.

Référence bibliographique

- Davies, J., & Wright, G. D. (1997). Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends Microbiol*, 5(6), 234-240. doi:10.1016/s0966-842x(97)01033-0
- De Boer, S., & Ward, L. (1995). PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. *Phytopathology*, 85(8), 854-858.
- De Mouy, D., Fabre, R., & Cavallo, J.-D. (2007). Infections urinaires communautaires de la femme de 15 à 65 ans: sensibilité aux antibiotiques de *E. coli* en fonction des antécédents: étude AFORCOPI-BIO 2003. *Médecine et maladies infectieuses*, 37(9), 594-598.
- De Vries, L. E., Vallès, Y., Agersø, Y., Vaishampayan, P. A., García-Montaner, A., Kuehl, J. V., . . . Francino, M. P. (2011). The gut as reservoir of antibiotic resistance: microbial diversity of tetracycline resistance in mother and infant. *PLoS One*, 6(6), e21644. doi:10.1371/journal.pone.0021644
- Delarras, C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire.
- Delmée, M. (2004). *Microbiologie médicale*. Louvain: Université Catholique.
- Deng, W., Puente, J. L., Gruenheid, S., Li, Y., Vallance, B. A., Vázquez, A., . . . Finlay, B. B. (2004). Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(10), 3597-3602. doi:10.1073/pnas.0400326101
- Denis, F. (2002). *Les bactéries, champignons et parasites transmissibles de la mère à l'enfant* : John Libbey Eurotext.
- Denis, F., Cattoir, V., Martin, C., Ploy, M.-C., & Poyart, C. (2016). *Bactériologie médicale : techniques Usuelles* : Elsevier Masson.
- Diallo, A. (2013). *Escherichia coli* pathogènes et résistantes aux antibiotiques dans les effluents d'origine humaine et animale : Prévalence et caractérisation avant et après traitement épuratoire. *Toulouse: Université Paul Sabatier*.
- DJAHIDA, S., IMANE, S., & MOURAD, D. (2011). Résistance aux antibiotiques des entérobactéries au niveau du CHU de Sidi Bel Abbes (Algérie). *MHA (Sousse)*, 23(67), 37-41.
- Duval, J. (1989). Classification et mécanisme d'action des agents antibactériens. *Bactériologie médicale*. Paris: Flammarion, 273-296.
- Dworkin, R. J. (1999). Aminoglycosides for the treatment of gram-negative infections: therapeutic use, resistance and future outlook. *Drug Resist Updat*, 2(3), 173-179. doi:10.1054/drup.1999.0080
- El Bakkouri, J., Belabbes, H., Zerouali, K., Belaiche, A., Messaoudi, D., Claude, G., . . . El Mdaghri, N. (2009). Résistance aux antibiotiques d'*Escherichia coli* uropathogène communautaire et consommation d'antibiotiques à Casablanca (Maroc). *European Journal of Scientific Research*, 36(1), 49-55.
- Eyquem, A., Alouf, J., & Montagnier, L. (2000). *Traité de microbiologie clinique : deuxièmes mises à jour et compléments* : Piccin.
- Fauchère, J.-L. (1997). *Bactériofiches: Techniques en bactériologie clinique*: Ellipses.
- Figarella, J. L., Guy Terret, M. Ichele. (2001). *Microbiologie générale et appliquée*, Editions Jacques-

Référence bibliographique

- Lanore. In : Paris.
- Flacrois, J. (2000). Bactériologie médicale, Presses Universitaires de Lyon. In : Lyon.
- Fourmy, D., Recht, M. I., Blanchard, S. C., & Puglisi, J. D. (1996). Structure of the A site of Escherichia coli 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. *Science*, 274(5291), 1367-1371. doi:10.1126/science.274.5291.1367
- Frasca, D., Dahyot-Fizelier, C., & Mimos, O. (2008). La colistine en réanimation. *Reanimation*, 17(3), 251-258.
- Freney, J. (2000). *Précis de bactériologie clinique* : Eska.
- Gansmandel, T. (2011). Etude épidémiologique des résistances d'Escherichia coli BLSE au centre hospitalier de Valenciennes.
- Gaudy, C., Buxeraud, J., & Mereghetti, L. (2005). Antibiotiques (pharmacologie et thérapeutique). Collection pharma.
- Georgopapadakou, N. H. (1993). Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to beta-lactams. *Antimicrob Agents Chemother*, 37(10), 2045-2053. doi:10.1128/aac.37.10.2045
- Georgopapadakou, N. H. (1995). *Drug Transport in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy* (Vol. 17): Informa Health Care. *Gestion* (Editions le Harmattan ed.).
- Guardabassi, L., & Courvalin, P. (2005). Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin, 1-18.
- Gudah, K. e. (2016). *Les pathologies aviaires les plus fréquentes dans un cabinet vétérinaire dans la région de Ksar El Boukhari* Projet de fin d'étude ; université Blida Guiraud, P. (2012). *Microbiologie alimentaire*.
- Habi, S. (2009). Etude de la métallo-résistance et de l'Halo-tolérance des entérobactéries isolées des eaux de surface de la région de Sétif.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, I., & Tschäpe, H. (1997). Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol*, 23(6), 1089-1097. doi:10.1046/j.1365-2958.1997.3101672.x
- Hall, R. M., Collis, C. M., Kim, M. J., Partridge, S. R., Recchia, G. D., & Stokes, H. W. (1999). Mobile gene cassettes and integrons in evolution. *Ann N Y Acad Sci*, 870, 68-80. doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb08866.x
- Hansson, K., Sundström, L., Pelletier, A., & Roy, P. H. (2002). IntI2 integron integrase in Tn7. *J Bacteriol*, 184(6), 1712-1721. doi:10.1128/jb.184.6.1712-1721.2002
- Hochhut, B., Lotfi, Y., Mazel, D., Faruque, S. M., Woodgate, R., & Waldor, M. K. (2001). Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in vibrio cholerae O139 and O1 SXT constins. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(11), 2991-3000. doi:10.1128/aac.45.11.2991-3000.2001
- Hooper, D. C. (1999). Mode of action of fluoroquinolones. *Drugs*, 58 Suppl 2, 6-10. doi : 10.2165/00003495-199958002-00002
- Hooper, D. C. (2001). Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clin Infect*

Référence bibliographique

- Dis*, 32 Suppl 1, S9-s15. doi : 10.1086/319370
- Horton, R. A., Randall, L. P., Snary, E. L., Cockrem, H., Lotz, S., Wearing, H., . . . Coldham, N. G. (2011). Fecal carriage and shedding density of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in cattle, chickens, and pigs: implications for environmental contamination and food production. *Appl Environ Microbiol*, 77(11), 3715-3719. doi:10.1128/aem.02831-10
- Hricová, K., Röderová, M., Pudová, V., Hanulík, V., Halová, D., Julínková, P., . . . Bardoň, J. (2017). Quinolone-resistant *Escherichia coli* in Poultry Farming. *Cent Eur J Public Health*, 25(2), 163-167. doi:10.21101/cejph.a4328
- Huovinen, P. (1997). Increases in rates of resistance to trimethoprim. *Clin Infect Dis*, 24 Suppl 1, S63-66. doi:10.1093/clinids/24.supplement_1.s63
- Huovinen, P., Sundström, L., Swedberg, G., & Sköld, O. (1995). Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 39(2), 279-289. doi:10.1128/aac.39.2.279
- Hygis, N. (1998). *Hygiène hospitalière* : Presses Universitaires Lyon.
- Iacobelli, S., Bonsante, F., & Guignard, J.-P. (2009). Infections urinaires en pédiatrie. *Archives de pédiatrie*, 16(7), 1073-1079.
- Ibrahim, W. A., Marouf, S. A., Erfan, A. M., Nasef, S. A., & Jakee, J. K. E. (2019). The occurrence of disinfectant and antibiotic-resistant genes in *Escherichia coli* isolated from chickens in Egypt. *Vet World*, 12(1), 141-145. doi:10.14202/vetworld.2019.141-145
- ICMSF. (1996). *Microorganisms in foods 5 : Characteristics of microbial pathogens*. 5.
- Jarlier, V., Nicolas, M.-H., Fournier, G., & Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Clinical Infectious Diseases*, 10(4), 867-878.
- Joffin, J., & Leyral, G. (2006). *Microbiologie Technique Tome 1 "Dictionnaire des techniques"*. Bordeaux, France, centre régional de documentation d'Aquitaine.
- Kamboh, A. A., Shoaib, M., Abro, S. H., Khan, M. A., Malhi, K. K., & Yu, S. (2018). Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae isolated from liver of commercial broilers and backyard chickens. *Journal of Applied Poultry Research*, 27(4), 627-634.
- Kassama, M., et Hamadi, S. (2013). *Evaluation de la résistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries isolées à l'établissement hospitalier spécialisé de Constantine*. Université Constanstine
- Koeck, J., Cavallo, J., Fabre, R., Meyran, M., & Roué, R. (1996). Sensibilité aux antibiotiques des bacilles à gram négatif aérobies isolés d'infections sévères en 1992 : résultats d'une étude multicentrique française. *La Presse médicale* (1983), 25(30), 1363-1366.
- Koh, T. H., Wang, G. C., Sng, L. H., & Koh, T. Y. (2004). CTX-M and plasmid-mediated AmpC-producing Enterobacteriaceae Singapore. *Emerg Infect Dis*, 10(6), 1172-1174. doi:10.3201/eid1006.030726

Référence bibliographique

- Kumar, A., & Schweizer, H. P. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev*, 57(10), 1486-1513. doi:10.1016/j.addr.2005.04.004
- Lalzampuaia, H., Dutta, T. K., Warjri, I., & Chandra, R. (2013). PCR-Based Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases (bla CTX-M-1 and bla TEM) in *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Pigs in North Eastern India (Mizoram). *Indian J Microbiol*, 53(3), 291-296. doi:10.1007/s12088-013-0378-z
- Lepape, A., Machut, A., & Savey, A. (2018). Réseau national Réa-Raisin de surveillance des infections acquises en réanimation adulte-Méthodes et principaux résultats. *Médecine Intensive Réanimation*, 27(3), 197-203.
- Levy, S. B. (1977). Fecal flora in recurrent urinary-tract infection. In: Mass Medical Soc.
- Li, B., Koch, W. H., & Cebula, T. A. (1997). Detection and characterization of the fimA gene of *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Cell Probes*, 11(6), 397-406. doi:10.1006/mcpr.1997.0132
- Li, R., Lin, D., Chen, K., Wong, M. H., & Chen, S. (2015). First detection of AmpC β -lactamase bla(CMY-2) on a conjugative IncA/C plasmid in a *Vibrio parahaemolyticus* isolate of food origin. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(7), 4106-4111. doi:10.1128/aac.05008-14
- Livermore, D. M. (2003). Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis*, 36(Suppl 1), S11-23. doi:10.1086/344654
- Lobel, B., & Soussy, C. (2007). *Les infections urinaires*: Springer Science & Business Media.
- Madigan, M. T. (2012). *Brock Biology of Microorganisms*: Benjamin Cummings.
- Magalhães, V. D., Schuman, W., & Castilho, B. A. (1998). A new tetracycline resistance determinant cloned from *Proteus mirabilis*. *Biochim Biophys Acta*, 1443(1-2), 262-266. doi : 10.1016/s0167-4781(98)00210-3
- Malajati .B. E. H., Charra.B., et Bansslama.A (2012). Etude épidémiologique des pneumopathies acquises sous ventilation mécanique en réanimation médicale.
- Mameri, N., Touati. AE. (2011). Etude de la sensibilité aux antibiotiques des bacilles à Gram négatif isolés au niveau de l'EPSP de Boghni, Tizi Ouzou.
- Manson, J. M., Hancock, L. E., & Gilmore, M. S. (2010). Mechanism of chromosomal transfer of *Enterococcus faecalis* pathogenicity island, capsule, antimicrobial resistance, and other traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(27), 12269-12274.
- Marc, D., & Dho-Moulin, M. (1996). Analysis of the fim cluster of an avian O2 strain of *Escherichia coli*: serogroup-specific sites within fimA and nucleotide sequence of fimI. *J Med Microbiol*, 44(6), 444-452. doi : 10.1099/00222615-44-6-444
- Marco.L. (2007). *Management de la santé, nouvelles perspectives, histoire et sciences de*
- Martin, C., & Ploy, M.-C. (2014). Automatisation en bactériologie. *Journal des Anti-infectieux*, 16(3), 122-130.
- Martinez, J. L. (2009). The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc Biol Sci*, 276(1667), 2521-2530. doi:10.1098/rspb.2009.0320

Référence bibliographique

- Martínez-Martínez, L., Pascual, A., & Jacoby, G. A. (1998). Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*, 351(9105), 797-799. doi : 10.1016/s0140-6736(97)07322-4
- Matute, A. J., Hak, E., Schurink, C. A., McArthur, A., Alonso, E., Paniagua, M., . . . Hoepelman, I. M. (2004). Resistance of uropathogens in symptomatic urinary tract infections in León, Nicaragua. *Int J Antimicrob Agents*, 23(5), 506-509. doi:10.1016/j.ijantimicag.2003.10.003
- Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V. A., & Davies, J. (1998). A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science*, 280(5363), 605-608. doi:10.1126/science.280.5363.605
- McCaffrey, C., Bertasso, A., Pace, J., & Georgopapadakou, N. H. (1992). Quinolone accumulation in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 36(8), 1601-1605. doi:10.1128/aac.36.8.1601
- McMurry, L., Petrucci, R. E., Jr., & Levy, S. B. (1980). Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(7), 3974-3977. doi:10.1073/pnas.77.7.3974
- Mechergui, A., Touati, A., Baaboura, R., Achour, W., & Hassen, A. B. (2011). Phenotypic and molecular characterization of β -lactams resistance in commensal *Neisseria* strains isolated from neutropenic patients in Tunisia. *Annals of microbiology*, 61(3), 695-697.
- Messai, L., Achour, W., & Ben, A. H. (2007). Epidemiological profile of enterobacteria isolated from neutropenic patients. *Pathologie-biologie*, 55(5), 230-234.
- Michaël, M. V. (2010). PYELONEPHRITES ET PROSTATITES AIGUËS PRISES EN CHARGE EN VILLE:-EPIDEMIOLOGIE BACTERIENNE ET SENSIBILITE DE ESCHERICHIA COLI AUX ANTIBIOTIQUES-APPORT DE LA BANDELETTE URINAIRE ET DE L'IMAGERIE.
- Mirik, M., Aysan, Y., & Sahin, F. (2011). Characterization of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strains isolated from several host plants in Turkey and report of fontanesia as a new host. *Journal of Plant Pathology*, 263-270.
- Mkaouar, D., Mahjoubi, F., Mezghani, S., Znazen, A., Ktari, S., & Hammami, A. (2008). Étude de la résistance des entérobactéries aux céphalosporines de troisième génération dans les hôpitaux de Sfax, Tunisie (1999–2005). *Médecine et maladies infectieuses*, 38(6), 293-298.
- Moawad, A. A., Hotzel, H., Neubauer, H., Ehricht, R., Monecke, S., Tomaso, H., . . . El-Adawy, H. (2018). Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae from healthy broilers in Egypt: emergence of colistin-resistant and extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *Gut pathogens*, 10(1), 39.
- Moazed, D., & Noller, H. F. (1987). Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature*, 327(6121), 389-394. doi : 10.1038/327389a0
- Moukrad, N., FILALI, F. R., & Makoudi, Y. (2012). Prévalence de la multi-résistance bactérienne aux antibiotiques des infections urinaires dans la ville de Meknes (Maroc) et son evolution dans le temps. *Sciences Lib ED. Mercenne*, V. 4 N° 121105 (2012), ISSN 2111-4706.

Référence bibliographique

- Naas, T., Mikami, Y., Imai, T., Poirel, L., & Nordmann, P. (2001). Characterization of In53, a class 1 plasmid- and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. *J Bacteriol*, *183*(1), 235-249. doi:10.1128/jb.183.1.235-249.2001
- Nadmi, H., Elotmani, F., Talmi, M., Zerouali, K., & Perrier-Gros-Claude, J. (2010). Profil de résistance aux antibiotiques des entérobactéries uropathogènes communautaires à El Jadida (Maroc). *Médecine et maladies infectieuses*, *40*(5), 303-305.
- Nasiriani, K., Torki, F., Jarahzadeh, M. H., & Rashidi Maybodi, F. (2016). The Effect of Brushing with a Soft Toothbrush and Distilled Water on the Incidence of Ventilator-Associated Pneumonia in the Intensive Care Unit. *Tanaffos*, *15*(2), 101-107.
- Nelson, M. L., & Levy, S. B. (1999). Reversal of tetracycline resistance mediated by different bacterial tetracycline resistance determinants by an inhibitor of the Tet(B) antiport protein. *Antimicrob Agents Chemother*, *43*(7), 1719-1724. doi:10.1128/aac.43.7.1719
- Neuwirth, C., Siébor, E., Duez, J. M., Péchinot, A., & Kazmierczak, A. (1995). Imipenem resistance in clinical isolates of *Proteus mirabilis* associated with alterations in penicillin-binding proteins. *J Antimicrob Chemother*, *36*(2), 335-342. doi:10.1093/jac/36.2.335
- Nikaido, H. (2000). Crossing the envelope: how cephalosporins reach their targets. *Clin Microbiol Infect*, *6* Suppl 3, 22-26. doi:10.1111/j.1469-0691.2000.tb02036.x
- Nordmann, P. (2010). Résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif. *médecine/sciences*, *26*(11), 950-959.
- Nordmann, P., & Poirel, L. (2005). Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*, *56*(3), 463-469. doi:10.1093/jac/dki245
- O'Hara, C. M., Steward, C. D., Wright, J. L., Tenover, F. C., & Miller, J. M. (1998). Isolation of *Enterobacter intermedium* from the gallbladder of a patient with cholecystitis. *J Clin Microbiol*, *36*(10), 3055-3056. doi:10.1128/jcm.36.10.3055-3056.1998
- Ojo, O. E., Ogunyinka, O. G., Agbaje, M., Okuboye, J. O., Kehinde, O. O., & Oyekunle, M. A. (2012). Antibiogram of Enterobacteriaceae isolated from free-range chickens in Abeokuta, Nigeria. *Veterinarski arhiv*, *82*(6), 577-589.
- Oliva, B., & Chopra, I. (1992). Tet determinants provide poor protection against some tetracyclines: further evidence for division of tetracyclines into two classes. *Antimicrob Agents Chemother*, *36*(4), 876-878. doi:10.1128/aac.36.4.876 OPU ed.).
- Paolozzi, L., Liébart, J.-C., & Sansonetti, P. (2015). *Microbiologie : biologie des procaryotes et de leurs virus*. Paris : Dunod.
- Parent, R., & Roy, P. H. (1992). The chloramphenicol acetyltransferase gene of Tn2424 : a new breed of cat. *J Bacteriol*, *174*(9), 2891-2897. doi:10.1128/jb.174.9.2891-2897.1992
- Park, C. H., Robicsek, A., Jacoby, G. A., Sahm, D., & Hooper, D. C. (2006). Prevalence in the United

Référence bibliographique

- States of aac(6)-Ib-cr encoding a of cat. *J Bacteriol*, 174(9), 2891-2897. doi:10.1128/jb.174.9.2891-2897.1992 50(11), 3953-3955. doi:10.1128/aac.00915-06
- ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*, 50(11), 3953-3955. doi:10.1128/aac.00915-06
- Partridge, S. R., Tsafnat, G., Coiera, E., & Iredell, J. R. (2009). Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev*, 33(4), 757-784. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00175.x
- Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews*, 18(4), 657-686.
- Péan, Y., Goldstein, F., & De Bels, F. (2001). Évolution de la sensibilité et épidémiologie de la résistance des entérobactéries de ville au cours des enquêtes Vigil'Roc. *Médecine et maladies infectieuses*, 31(10), 609-621.
- Perriere, G. (1992). *Application d'une présentation par objet des connaissances de modélisation certains aspects de l'expression des gènes chez E. coli UCBL*. Thèse Université de Lyon I, France 1992,
- Perrin, M., Le Garzic, J., Tas, A., & Avril, J. (1998). Infections urinaires communautaires et nosocomiales à bacilles à Gram négatif en milieu gériatrique. *Médecine et maladies infectieuses*, 28(6-7), 505-510.
- Peyrou, M. (2001). *Antibiorésistance des souches bactériennes d'origine équine : étude bibliographique et exemple de l'hôpital vétérinaire de St-Hyacinthe*.
- Pezzlo, M. T., Tan, G. L., Peterson, E. M., & Luis, M. (1982). Screening of urine cultures by three automated systems. *Journal of Clinical Microbiology*, 15(3), 468-474.
- Philippon, A., & Arlet, G. (2005). Les bêta-lactamases chez les bacilles à Gram-négatif : que de nouveautés en 15 ans! *Antibiotiques*, 7(4), 247-259.
- Pilet, C. (1981). *Bactériologie médicale et vétérinaire : systématique bactérienne*.
- Pilly, E. (2013). *Maladies infectieuses tropicales*. In è. édition (Ed.), (Groupe Burlat ed., pp. 227).
- Qassimi.L. (2010). *Epidémiologie des infections nosocomiales en milieu de réanimation*. Univesité Sidi Mohammed Ben Abd-Ellah.
- Rahmatallah, N. N., Saadia EL RHAFFOULI, Hicham AMINE, Idriss LAHLOU EL HOUADFI, Mohammed. (2017). Détection de souches multi-résistantes d'Escherichia coli d'origine aviaire dans la région de Rabat-Salé-Zemmour-Zaer. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 5(2).
- Ramdani B. N., S. M., Belouni R., Bensliman A. (2016). *Manuel de microbiologie* (
- Rao, L., Lv, L., Zeng, Z., Chen, S., He, D., Chen, X., . . . Wu, P. (2014). Increasing prevalence of extended-spectrum cephalosporin-resistant Escherichia coli in food animals and the diversity of CTX-M genotypes during 2003–2012. *Veterinary microbiology*, 172(3-4), 534-541.
- Ricard, J.-D. (2007). Prévention des pneumopathies acquises sous ventilation mécanique : comment

Référence bibliographique

- l'améliorer? D'après la communication de Jean-Damien Ricard. *Reanimation*, 16, S249-S252.
- Roberts, M. C. (1996). Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol Rev*, 19(1), 1-24. doi:10.1111/j.1574-6976.1996.tb00251.x
- Roberts, M. C. (2005). Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol Lett*, 245(2), 195-203. doi:10.1016/j.femsle.2005.02.034
- Robicsek, A., Jacoby, G. A., & Hooper, D. C. (2006). The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis*, 6(10), 629-640. doi : 10.1016/s1473-3099(06)70599-0
- Robin, F., Gibold, L., & Bonnet, R. (2012). Résistances naturelles et acquises aux β -lactamines chez les entérobactéries: comment les identifier en pratique quotidienne? *Revue Francophone des laboratoires*, 2012(445), 47-58.
- Rostagno, M., Wesley, I., Trampel, D., & Hurd, H. (2006). Salmonella prevalence in market-age turkeys on-farm and at slaughter. *Poultry science*, 85(10), 1838-1842.
- Rowe-Magnus, D. A., Guerout, A. M., Ploncard, P., Dychinco, B., Davies, J., & Mazel, D. (2001). The evolutionary history of chromosomal super-integrations provides an ancestry for multiresistant integrons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(2), 652-657. doi:10.1073/pnas.98.2.652
- SAADAoui, M. (2008). *La fréquence des bactéries multi résistantes à l'hôpital Hassan ii de Settat*.
- Saïdani, M., Boutiba, I., Ghozzi, R., Kammoun, A., & Redjeb, S. B. (2006). Profil bactériologique des bactériémies à germes multirésistants à l'hôpital Charles-Nicolle de Tunis. *Médecine et maladies infectieuses*, 36(3), 163-166.
- Sekhr.A.N. *Fréquence et marqueurs épidémiologique de Klébsiella pneumoniae dans les services à haut risque infectieux au niveau du CHU Ben Badis de Constantine*. Université Mentouri.
- Sekhsoh, Y., Chadli, M., & El Hamzaoui, S. (2008). Fréquence et sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées dans les urines. *Médecine et maladies infectieuses*, 38(6), 324-327.
- Shaw, W. V. (1983). Chloramphenicol acetyltransferase: enzymology and molecular biology. *CRC Crit Rev Biochem*, 14(1), 1-46. doi : 10.3109/10409238309102789
- Shimi, A., Touzani, S., Elbakouri, N., Bechri, B., Derkaoui, A., & Khatouf, M. (2015). Les pneumopathies nosocomiales en réanimation de CHU Hassan II de Fès. *Pan African Medical Journal*, 22(1).
- Singleton, P. (2005). Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies.
- Sköld, O. (2000). Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resist Updat*, 3(3), 155-160. doi:10.1054/drup.2000.0146
- Slama, K. B., Jouini, A., Sallem, R. B., Somalo, S., Sáenz, Y., Estepa, V., . . . Torres, C. (2010). Prevalence of broad-spectrum cephalosporin-resistant Escherichia coli isolates in food samples in Tunisia, and characterization of integrons and antimicrobial resistance mechanisms implicated. *International journal of food microbiology*, 137(2-3), 281-286.
- Snyder, L., & Champness, W. (2007). Molecular genetics of bacteria, ASM Press. Washington, DC

Référence bibliographique

- [Google Scholar].
- SOUNA, D. (2010). *Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries au niveau du CHU de Sidi Bel Abbes.*
- Soto, S. M., Martín, M. C., & Mendoza, M. C. (2003). Distinctive human and swine strains of *Salmonella enterica* serotype Wien carry large self-transferable R-plasmids. A plasmid contains a class 1-qacE Δ 1-sul1 integron with the dfrA1-aadA1a cassette configuration. *Food microbiology*, 20(1), 9-16.
- Speer, B. S., Shoemaker, N. B., & Salyers, A. A. (1992). Bacterial resistance to tetracycline : mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clin Microbiol Rev*, 5(4), 387-399. doi:10.1128/cmr.5.4.387
- Stein, G. E., & Craig, W. A. (2006). Tigecycline : a critical analysis. *Clin Infect Dis*, 43(4), 518-524. doi : 10.1086/505494
- Stöhr, K., & Wegener, H. C. (2000). Animal use of antimicrobials: impact on resistance. *Drug Resist Updat*, 3(4), 207-209. doi:10.1054/drup.2000.0151
- Stordeur, P., & Mainil, J. (2002). *La colibacillose aviaire*. Paper presented at the Annales de médecine vétérinaire.
- Sundström, L., Rådström, P., Swedberg, G., & Sköld, O. (1988). Site-specific recombination promotes linkage between trimethoprim-and sulfonamide resistance genes. Sequence characterization of dhfrV and sulI and a recombination active locus of Tn21. *Molecular and General Genetics MGG*, 213(2-3), 191-201.
- Swedberg, G., & Sköld, O. (1980). Characterization of different plasmid-borne dihydropteroate synthases mediating bacterial resistance to sulfonamides. *J Bacteriol*, 142(1), 1-7. doi:10.1128/jb.142.1.1-7.1980
- Syuhada, Z., Hair-Bejo, M., Zunita, Z., Omar, A., & Khairani-Bejo, S. (2013). *Isolation of Escherichia coli* from various organs of broiler chickens with complicated chronic respiratory disease. Paper presented at the proceeding of : WPSA & WVPA conference.
- Taylor, D. E., & Chau, A. (1996). Tetracycline resistance mediated by ribosomal protection. *Antimicrob Agents Chemother*, 40(1), 1-5. doi:10.1128/aac.40.1.1
- Tenover, F. C., & McGowan, J. E., Jr. (1996). Reasons for the emergence of antibiotic resistance. *Am J Med Sci*, 311(1), 9-16. Doi : 10.1097/00000441-199601000-00003
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., & Goering, R. V. (1997). How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections a review for healthcare epidemiologists. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 18(6), 426-439.
- Testa, R. T., Petersen, P. J., Jacobus, N. V., Sum, P. E., Lee, V. J., & Tally, F. P. (1993). In vitro and in vivo antibacterial activities of the glycolcyclines, a new class of semisynthetic tetracyclines. *Antimicrob Agents Chemother*, 37(11), 2270-2277. doi:10.1128/aac.37.11.2270
- Van Hoek, A. H., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A. P., & Aarts, H. J. (2011). Acquired

Référence bibliographique

- antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol*, 2, 203. doi:10.3389/fmicb.2011.00203
- Vincent, J.-L., Bihari, D. J., Suter, P. M., Bruining, H. A., White, J., Nicolas-Chanoin, M.-H., Hemmer, M. (1995). The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe: results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. *Jama*, 274(8), 639-644.
- Vora, S., & Auckenthaler, R. (2009). Que signifie «bêtalactamases à spectre élargi» en pratique. *Rev Med Suisse*, 5, 1991-1994.
- Walsh, T. R. (2006). Combinatorial genetic evolution of multiresistance. *Curr Opin Microbiol*, 9(5), 476-482. doi:10.1016/j.mib.2006.08.009
- Wang, X., Kong, N., Cao, M., Zhang, L., Sun, M., Wei, Q., & Liu, W. (2019). Characterization of bêta-lactamases in bloodstream-infection *Escherichia coli* : Dissemination of blaADC-162 and blaCMY-2 among bacteria via an IncF plasmid. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2175.
- Wayne, P. (2011). Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.
- Weigel, L. M., Steward, C. D., & Tenover, F. C. (1998). gyrA mutations associated with fluoroquinolone resistance in eight species of Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*, 42(10), 2661-2667. doi:10.1128/aac.42.10.2661
- Weill, F. X., Demartin, M., Fabre, L., & Grimont, P. A. (2004). Extended-spectrum-bêta-lactamase (TEM-52)-producing strains of *Salmonella enterica* of various serotypes isolated in France. *J Clin Microbiol*, 42(7), 3359-3362. doi:10.1128/jcm.42.7.3359-3362.2004
- Willoquet, G., Talbert, M., Gervais, R., & Calop, J. (2015). *Le guide pharmaco-clinique : Le Moniteur des pharmacies*.
- Yehia, H. M., Riyadh, K., & Arabia, S. (2013). Antimicrobial resistance patterns of Enterobacteriaceae and non-Enterobacteriaceae isolated from poultry intestinal. *Life Sci. J*, 10, 3438-3446.
- Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, M., & Nakamura, S. (1990). Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase gyrA gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 34(6), 1271-1272. doi:10.1128/aac.34.6.1271
- Yoshimura, F., & Nikaido, H. (1982). Permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane to hydrophilic solutes. *J Bacteriol*, 152(2), 636-642.
- Zhanel, G. G., Hisanaga, T. L., Laing, N. M., DeCorby, M. R., Nichol, K. A., Weshnoweski, B., . . . Karlowsky, J. A. (2006). Antibiotic resistance in *Escherichia coli* outpatient urinary isolates: final results from the North American Urinary Tract Infection Collaborative Alliance (NAUTICA). *International journal of antimicrobial agents*, 27(6), 468-475.
- Zhao, W. H., & Hu, Z. Q. (2013). Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol*, 39(1), 79-101. doi:10.3109/1040841x.2012.691460

Annexes I :

Matériel :

Instruments et appareillages :

Flacons Stériles, Boîtes Pétri. Anse De Platine. Les Ecouvillons. Pince. Réactives. Étuve. Bec Bunsen. Réfrigérateur. Vortex. Microscope Optique. Tubes à essais. Portoir. Eau Physiologique Stérile. Gants. Pipette Pasteur. Lames Et Lamelles.

Réactifs utilisés :

- Galerie API 20 E.
- TDA
- VP 1 et VP 2
- Huile de vaseline.
- Lugol.
- Violet de Gentiane.
- Alcool.
- Fuchsine basique.

Les antibiotiques :

Amoxicilline + acide clavulanique (AMC), céfotaxime (CTX), Gentamicine (GN), Amikacine (AN), Ciprofloxacine (CIP), Triméthoprim-sulfaméthoxazole (SXT), Fosfomycine(FOS), Colistine(CL).

Milieux de culture :

Milieux de culture liquides :

Bouillon tryptone soja (TSB)	
Tryptone.....	17,0 g
Peptone papainique de soja	3,0 g
Glucose	2,5g
Sels biliaries	1,5g
Chlorure de sodium	5,0g
Phosphate dipotassique.....	4,0g
Novobiocine.....	0,020g
Eau distillée	1000 ml

pH =7,4 ± 0,2

Milieux de culture solides :

Annexes

Gélose nutritive

Peptone.....	15g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	02g
Chlorure de sodium	05g
Agar	20g
Eau distillée	1000ml

pH =6,8-7,4

Gélose Mueller-Hinton

Infusion de viande de bœuf	300ml
Peptone de caséine.....	17.5g
Amidon de maïs.....	1.5g
Agar	10g

pH = 7,5

Gélose Mac Conkey

Peptone	20.0g
Sucre.....	10.0g
Cristal viole.....	0.001g
Sels biliaries	31.5g
Rouge neutre	0.05g
Chlorure de sodium	5.00g
Agar-Agar	15.0g

pH = 7,1

Bouillon tryptone soja (TSB)

Agar	15 g
Peptone et extrait de levure	17 g
Mélange chromogénique	1.0g

pH =7,0 ± 0,2

Annexes II :

Identification des entérobactéries :

Identification macroscopique :

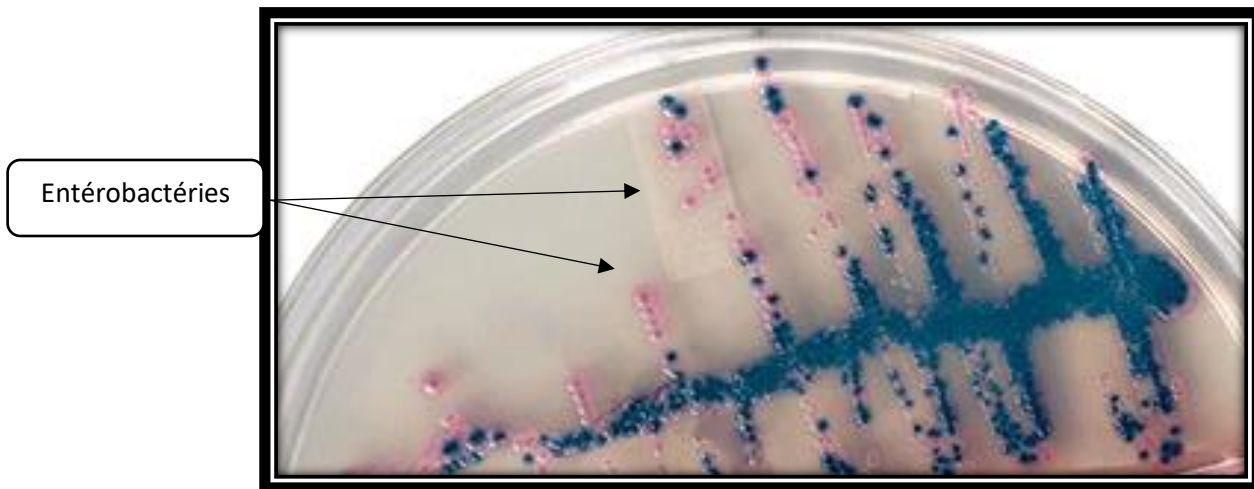


Figure 19: Aspect des différentes colonies sur le milieu Chromagar (photo personnelle)

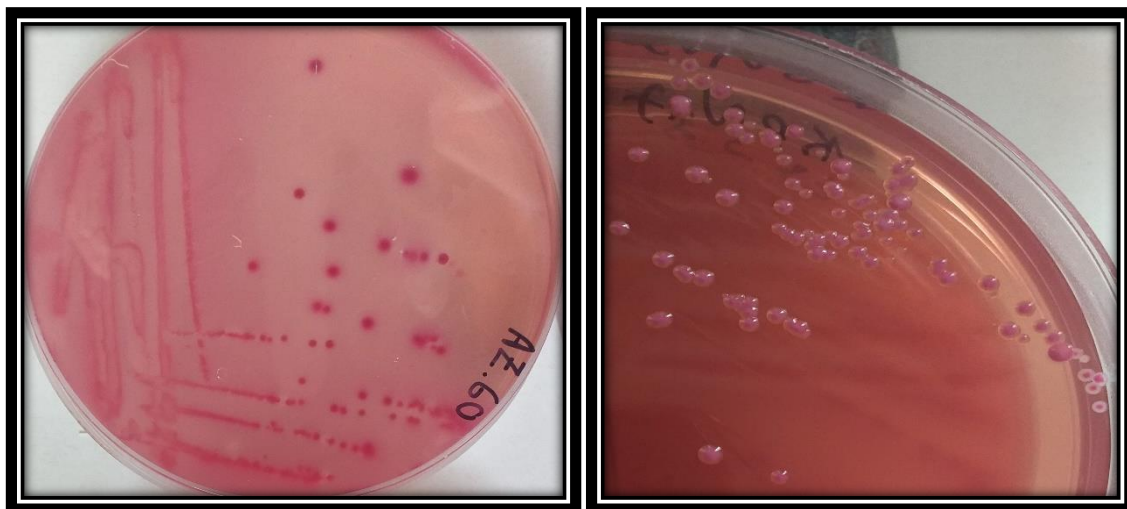


Figure 20 : Aspect des différentes colonies des enterobactéries sur le milieu Mac conkey (photo personnelle).

Identification microscopique :

La coloration de Gram :

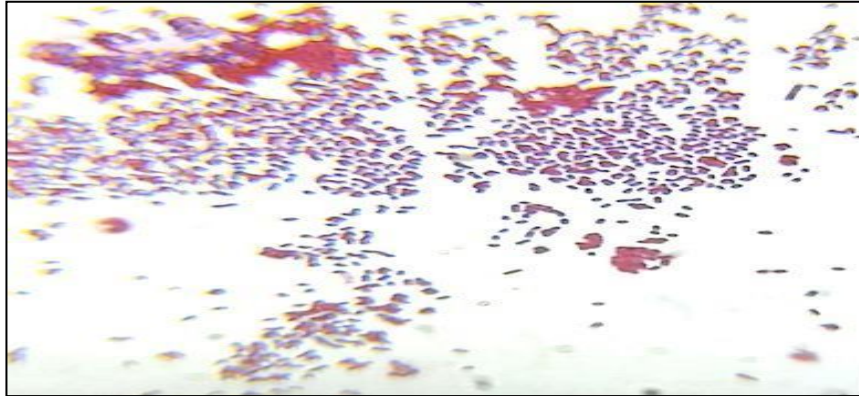


Figure 21 : Observation microscopique (coloration de Gram) des entérobactéries

Test d'oxydase :

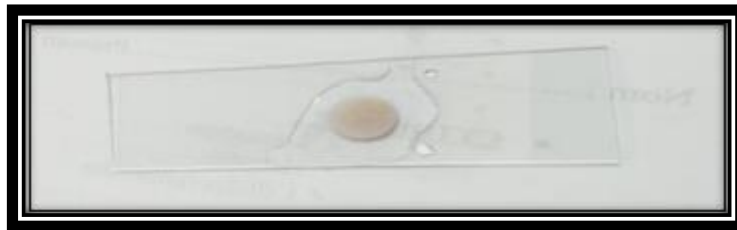


Figure 22 : Résultat du test oxydase des entérobactéries (photo personnelle).

Identification biochimique :



Figure 23 : Résultat de la galerie API 20 E de la souche d' *E coli* et *Raoultella ornithinolytica*. (photo personnelle).

Antibiogramme :

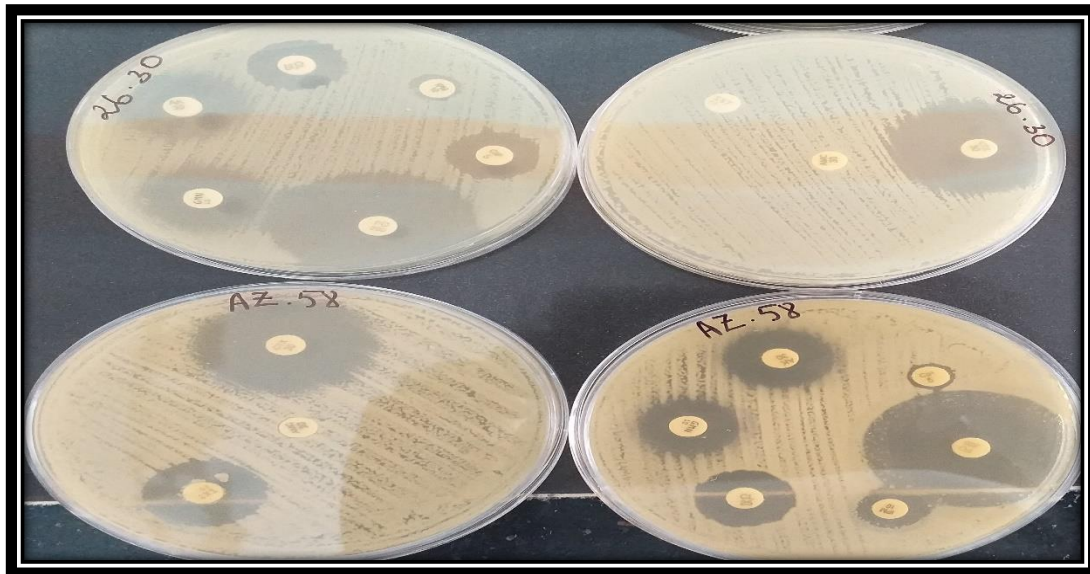


Figure 24 : Résultat de l'antibiorésistance de la souche d' *E coli* (photo personnelle).

Valeurs critiques des diamètres (mm) des zones d'inhibition pour *Entérobactéries* (Wayne, 2008)

Familles d'antibiotiques	Antibiotiques testés	Charge des Disques	Diamètres critiques (mm)	
			S	R
β-Lactamines	Ampicilline	10µg	≥19	<16
	Amoxicilline+Ac.clavulanique	20/10µg	≥21	<16
	Céfazoline	30µg	≥23	≤19
	Céfotaxime	30µg	≥26	<23
	Céfixime	10µg	≥25	<22
	Imipénème/Meropénème	10µg	≥24	<17
Aminosides	Amikacine	30µg	≥ 17	< 15
	Gentamicine	15µg (10UI)	≥18	<16
Quinolones	Ciprofloxacine	5µg	≥25	<22
	Acide nalidixique	30	≥ 19	≤ 13
Divers	Furanes	300µg	≥17	≤14
	Fosfomycine	50µg	≥14	<14
	Triméthoprimesulfamétoazole	1.25+23.75	≥ 16	≤ 10