

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Béjaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Spécialité : Microbiologie Fondamentale.



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Caractérisation de la résistance aux
antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif isolés
de denrée alimentaires (viandes et lait cru)**

Présenté par :

Ouali Kahina & Lafifi Kenza

Soutenu le : **25 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

Mme **TETILI Fatiha**

Mme **Gharout Alima**

Mme **Mezhoud Halima**

Mr **Mansouri Abdelhafid**

MAA

MCB

MCB

Directeur du

Laboratoire

QUALLILAB

Présidente

Promotrice

Examinatrice

Invité

Année universitaire : 2017 / 2018

Remerciement

On remercie dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de Mme Gharout Alima, on la remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.

Nous adressons aussi nos vifs remerciements aux membres de jury pour avoir bien voulu examiner et juger notre travail

On tient à remercier énormément monsieur Mansouri Abdelhafid pour avoir accepté de nous accueillir dans son laboratoire et pour tous ses conseils et son aide tout au long de notre stage et sans oublier l'ensemble du personnel du laboratoire Quallilab pour leur patience, leurs conseils pleins de sens et pour le suivi et l'intérêt qu'ils ont porté pour notre travail.

En guise de reconnaissance, on tient à témoigner nos sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de notre stage de fin d'étude et à l'élaboration de ce modeste travail.

Dédicaces

A l'homme de ma vie mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, 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 que dieu te garde dans son vaste paradis, à toi mon père repose en paix.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur

Mon cher frère Samir qui m'est le père et la mère, les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour toi. Mon ange gardien et mon fidèle compagnant dans les moments les plus délicats de cette vie mystérieuse. Aux personnes dont j'ai bien aimé la présence dans ce jour, à tous mes frères Sofiane Lamine et mes sœurs Haoua, Karima et Hassiba, mes nièces Célia et Roumaïssa, je dédie ce travail dont le grand plaisir leurs revient en premier lieu pour leurs conseils, aides, et encouragements. Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagnaient durant mon chemin d'études supérieures, mes aimables amis, collègues d'étude, et frères de cœur.

A tous les membres de ma famille, petits et grands Veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection

Kahina

Dédicaces

A mon cher père,

Les mots ne suffiront pas pour vous dire à quel point je vous aime. Vos encouragements et conseils m'ont été d'une aide précieuse. Vous m'avais toujours soutenu dans n'importe circonstance partagé durant toutes ces années. Merci d'être pour moi le meilleur des pères, tu es mon repère, tu es mon chemin qui mène vers le bonheur, un exemple à suivre .ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

Puisse Dieu t'accueillir dans son paradis en récompense de toutes les bonnes actions réalisées sur terre .repose en paix papa.

A ma très chère mère,

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessés de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même a l'âge adulte. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

Je dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mes frères, Lounis et mouloud

A ma sœur et son mari;

Malgré la distance vous êtes toujours dans mon cœur.

A mes adorables neveux et nièces : Yanis, Badis Sarah

A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour,

A ceux qui m'ont encouragé et soutenu dans mes moments les plus difficiles

KENZA

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction générale.....1

Matériel et méthodes

I. Échantillonnage.....8

II. Enrichissement et isolement.....9

II.1. Isolement des bacilles à Gram négatif résistantes aux C3G.....9

II.2. Isolement des bacilles à Gram négatif résistantes aux carbapénèmes.....9

II.3 Identification des souches9

III.4. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques11

IV. Détermination des phénotypes de résistance aux β -lactamines chez les bacilles à Gram négatif13

Résultats

I Souches bactériennes.....19

II Détermination des phénotypes de résistance aux β -lactamines19

II.1 Recherche des bacilles à Gram négatif résistantes aux C3G.....20

II.2 Recherche des bacilles à Gram négatif résistantes aux carbapénèmes26

Discussion32

Conclusion.....35

Références bibliographiques

Annexes

Liste des tableaux

Tableau I: Les différentes denrées alimentaires analysées durant cette étude.....	7
Tableau II: Galerie biochimique d'identification des bactéries à Gram négatif	8
Tableau III: Les antibiotiques testés pour les souches analysées.	11
Tableau IV: Souches représentant une image de synergie isolées des différentes denrées alimentaires	15
Tableau V: Comparaison des zones d'inhibition sur gélose MH et MH additionnée de cloxacilline	Erreur ! Signet non défini.
Tableau VI: Résultat des MCIM positifs	Erreur ! Signet non défini.
Tableau VII: Résultats de l'antibiogramme pour les souches CIM positives.....	19

Liste des annexes

Annexe I : composition des milieux de culture

Annexe II : Les étapes de la coloration de Gram

Annexe III : Les différents échantillons analysés au cours de cette étude

Liste des figures

Figure 1: Relation écologique entre bactéries résistantes aux antibiotiques et principales voies de transmission	4
Figure 2: DD-test	12
Figure 3: Etapes du test CIM modifié	13
Figure 4: Résultat du DD-test de la souche <i>Escherichia sp D1</i>	15
Figure 5: Les souches BLSE isolées de différentes denrées alimentaires.	17
Figure 6 DD-test avec et sans cloxacilline pour la souche <i>Escherichia sp C3R</i>	18
Figure 7: Résultats du test MCIM positif de la souche <i>Klebsiella sp LBB33R</i>	19
Figure 8: Répartition des souches CIM positives en fonction des denrées alimentaires	20

Liste des abréviations

AMC: Amoxicilline-clavulanate.

ATM: Aztréonam.

ATB: Antibiotique.

AmpC: Céphalosporinase.

BGN : Bacille à Gram Négatif.

BMR : Bactérie Multi Résistante.

BLSE : Bêta-Lactamases à Spectre Etendu.

BHIB : Brain-Heart Infusion Broth.

CTX: Céfotaxime.

C1G: Céphalosporines de première génération.

C2G: Céphalosporines de deuxième génération.

C3G : Céphalosporines de troisième génération.

C4G : Céphalosporines de quatrième génération.

CAZ: Ceftazidime.

Cloxa : Cloxacilline.

CASFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française.

CTX: Céfotaxime.

CTX-M : Céfotaximase-Munich.

DD-test : Double Disc synergie test.

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique.

EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.

EPC : Entérobactéries productrices de carbapénèmases.

ERT : Ertapénème.

EMB : Milieu Eosine Bleu de Méthylène.

FEP: Céfépime.

FOX: Céfoxitine.

IMP: Imipénème.

I : Intermédiaire

KPC : *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase.

MEM : Méropénème.

MβL: Métallo-β-Lactamases.

MAC : Mac Conkey.

MH : Mueller Hinton.

MCIM : Modified Carbapenem Inactivation Method.

NDM : New Delhi Metallo- β -lactamases.

OXA : Oxacilline.

OMS: organisation mondiale de la santé.

PLP : Protéine Liant Pénicilline.

R : Résistant.

S : Sensible.

SHV : Sulfhydryl Variable.

TEM : Temoniera.

TIC: Ticarcilline.

UFC: Unité Formant Colonies.

VP : Réactif de Voges-Proskauer.

Introduction

Depuis plusieurs années, les antibiotiques ont joué un rôle crucial dans la lutte contre de nombreuses maladies infectieuses. Leur découverte a été l'une des principales causes de l'augmentation spectaculaire de l'espérance de vie moyenne durant le XXI^e siècle.

Leur importance est d'une grande utilité pour une meilleure prise en charge de la santé publique (Carle, 2009). Cependant, l'utilisation massive et parfois abusive des antibiotiques a modifié considérablement l'écologie microbienne, les bactéries ont appris à se défendre et à s'adapter et certaines sont devenues résistantes aux antibiotiques. Cette situation est particulièrement préoccupante (Soussy, 2007).

En plus de leur utilisation dans le traitement des infections humaines, ces antibiotiques sont aussi largement utilisés dans le domaine vétérinaire et agricole. En 2001, l'organisation mondiale de la santé (OMS) a estimé qu'au moins 50 % des antibiotiques produits dans le monde étaient destinés aux animaux d'élevage et de compagnie. L'usage de ces antibiotiques dans les fermes d'élevage à des fins prophylactiques, métaphylactiques, curatifs mais également en tant que facteur de croissance dans les élevages intensifs en incorporant de faible dose dans les aliments. Cependant, l'utilisation abusive de ces antibiotiques conduit à des conséquences néfastes telles que la sélection et l'émergence des souches résistantes et la présence de résidus d'antibiotiques dans les aliments d'origine animale (Ma et *al.*, 2018).

L'utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire et humaine est considérée comme étant le facteur le plus important pour l'apparition et la diffusion des microorganismes résistants aux antibiotiques. Cette résistance n'inclue pas que les agents pathogènes mais aussi la flore endogène des individus (animaux et humains) (Bogaard et *al.*, 2001).

La flore commensale représente une grande partie des germes présents chez l'Homme et l'animal. Ces bactéries sont autant de germes qui peuvent acquérir et disséminer des résistances de manière silencieuse. La majorité des bactéries commensales sont présentes dans le tube digestif (Andremont, 2000). Ces bactéries intestinales sont considérées comme des indicateurs de la contamination fécale de l'environnement et souvent aussi en tant que microorganismes modèles pour détecter l'apparition de la résistance aux antibiotiques chez l'Homme et les animaux domestiques (Poirel et *al.*, 2012).

Les bacilles à Gram négatif représentent un groupe bactérien hétérogène qui comprend les Entérobactéries et d'autres genres comme *Pseudomonas*. Elles sont responsables d'une grande partie des infections graves et potentiellement mortelles. Le pouvoir d'adaptation de ces bactéries se manifeste par leur capacité à s'approprier de nouvelles propriétés soit par

Introduction

modification de leur génome (mutations) soit par acquisition d'informations génétiques par l'intermédiaire d'éléments génétiques mobiles que sont les éléments transposables et les plasmides (Munita and Arias, 2016). La plupart des espèces bactériennes sont capables d'intégrer dans leur génome différents déterminants de résistance. Ces gènes de résistance peuvent ensuite être transférés horizontalement entre différentes cellules bactériennes, ou bien transférés verticalement entre différentes espèces pendant la division cellulaire (Perdrix., 2015). Ainsi, la dissémination de gènes de résistance entre bactéries a conduit à l'apparition de bactéries résistantes à plusieurs antibiotiques. L'acquisition de la résistance peut être liée aussi à une modification au niveau de l'enveloppe bactérienne en diminuant la production de Porine, l'augmentation de l'expression des systèmes d'efflux, et réduction de l'affinité de l'antibiotique par la modification des cibles des antibiotiques (Zeng et Lin, 2013).

Certaines souches arrivent à établir une multirésistance *vis-à-vis* de plusieurs antibiotiques à la fois donnant lieu à ce qu'on appelle les bactéries multirésistantes aux antibiotiques (BMR). Parmi les bactéries pathogènes qui sont devenues de vrais problèmes pour la santé humaine, on trouve des espèces appartenant aux familles des *Enterobacteriaceae*, des *Pseudomonadaceae*s et des bactéries de la famille des *Moraxellaceae* (*Acinetobacter*) qui sont quasiment résistantes à tous les antibiotiques prescrits (Bouyahya et al., 2017).

Les β -lactamines, représentent la famille d'antibiotiques la plus utilisée en antibioprophyxie et en antibiothérapie. L'importance de leur utilisation résulte de leur large spectre d'action, leur faible toxicité, leur efficacité thérapeutique ainsi que le faible coût de certaines molécules. Ces molécules ont un spectre d'activité plus ou moins large et agissent sur les bactéries en phase de multiplication en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne par fixation aux protéines liant pénicillines (PLP). Cette famille, qui regroupe les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames sont caractérisées par la présence constante du cycle β -lactame associé à des cycles et des chaînes latérales variables qui expliquent leur spectre d'activité (Cavallo et al., 2004).

Les β -lactamase constituent le principal mécanisme de résistance naturelle et acquise aux β -lactamines, en particulier chez les bacilles à Gram négatif. Ce sont des enzymes produites par les micro-organismes capables d'hydrolyser le noyau β -lactame. Chez les bactéries à Gram négatif, les gènes codant pour ces enzymes sont soit d'origine chromosomique ou plasmidique, produites d'une manière inductible ou constitutive. Les β -lactamases peuvent être divisé selon deux classifications. La classification d'Ambler, basée

Introduction

sur la séquence peptidique du site enzymatique et distingue quatre classes. La classe A correspond aux pénicillinases inhibées par l'acide Clavulanique (TEM-1,SHV-1,CTX-M, KPC), la classe B correspond aux métallo-bêta-lactamases inhibées par l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) (NDM,IMP, VIM), la classe C regroupe les céphalosporinases non inhibées par l'acide clavulanique mais sont inhibées par la cloxacilline (AmpC, CMY) et la classe D correspond aux oxacillinases de sensibilité variable à l'acide Clavulanique (OXA-48,OXA23). Les enzymes des classes A, C et D sont des enzymes à sérine. En revanche, les enzymes de la classe B sont des métallo-bêta-lactamases (Ambler, 1980). La classification fonctionnelle de Bush, Jacoby et Medeiros repose sur l'activité hydrolytique et la sensibilité des bêta-lactamases aux inhibiteurs(Bush *et al.*, 1995; Bush et Jacoby, 2010).

L'un des mécanismes de résistance les plus importants chez les bacille à Gram négatif, qui réduit l'efficacité des céphalosporines à spectre élargi (sauf céphamycines et carbapénèmes) et des monobactames, repose sur la production plasmidique des β -lactamases à spectre étendu (Machado *et al.*,2008).L'épidémiologie des BLSE au sein des entérobactéries a récemment changé avec la dissémination massive des enzymes de type CTX-M. Dans les années 1990, les principales BLSE étaient dérivées des enzymes de type TEM-1, SHV-1 et diffusaient majoritairement au sein de clones hospitaliers de *K. pneumoniae* et d'*Enterobacter* *sp.* La diffusion de CTX-M au sein de l'espèce *E. coli*, aussi bien en milieu communautaire qu'en milieu hospitalier a bouleversé cette situation (Pitout *et al.*, 2010).

Les carbapénèmes ont été développée et introduites dans l'arsenal thérapeutique vers les années 1990 (Hawkey, 2008). L'excellente activité antibactérienne de ces carbapénèmes est liée à la rapidité de leur pénétration à travers la paroi des bacilles à Gram négatif et à leur stabilité vis-à-vis de la plupart des β -lactamases naturelles ou acquises dont les céphalosporinases et les BLSE (Livermore *et al.*, 2007). En 1988, la première carbapénémase plasmidique, IMI-1, a été rapportée chez un isolat de *Pseudomonas aeruginosa* au Japon (Sefraoui, 2015). Cependant, le premier cas de production de carbapénémase chez les *Enterobacteriaceae* (NmcA) n'a été identifiée qu'en 1993 dans un isolat clinique de *Enterobacter cloacae* (Nordmann *et al.*, 1993). Cette carbapénémase de classe A était codée chromosomiquement, mais rarement était signalée. Par la suite, de nombreuses souches productrices de carbapénémases ont été identifiées (Naas et Nordmann,1994). Les carbapénémases décrites chez *Enterobacteriaceae* sont divisés en trois classes selon la classification d'Ambler: les β -lactamases de calasse A (KPC, IMI, GES) sont inhibées par l'acide clavulanique ou l'acide boronique, métallo- β -lactamases de classe B (NDM, IMP ,

Introduction

VIM) codées par les intégrons hydrolysent toutes les β -lactamines sauf l'Aztréonam et inhibées par des agents chélateurs tel que l'EDTA, et la classe D (Oxacilnases), y compris les enzymes de type OXA-48 hydrolysant les carbapénèmes mais seulement faiblement (ou non) hydrolysant les céphalosporines et non inhibées par l'acide clavulanique (Nordmann et *al.*, 2012).

Le problème de la résistance aux antibiotiques tend de plus en plus à être un problème écologique global. La flore intestinale commensale des animaux étant considérée comme réservoir hébergeant des bactéries résistantes. Il existe de multiples liens entre les compartiments humains, animaux et environnementaux qui permettent non seulement le déplacement des bactéries mais aussi des éléments génétiques mobiles (EGM) (figure1). L'image devient encore plus complexe si l'on considère également que la résistance se déplace régulièrement entre les espèces de microbes *via* les EGM (Woolhouse et *al.*, 2015).

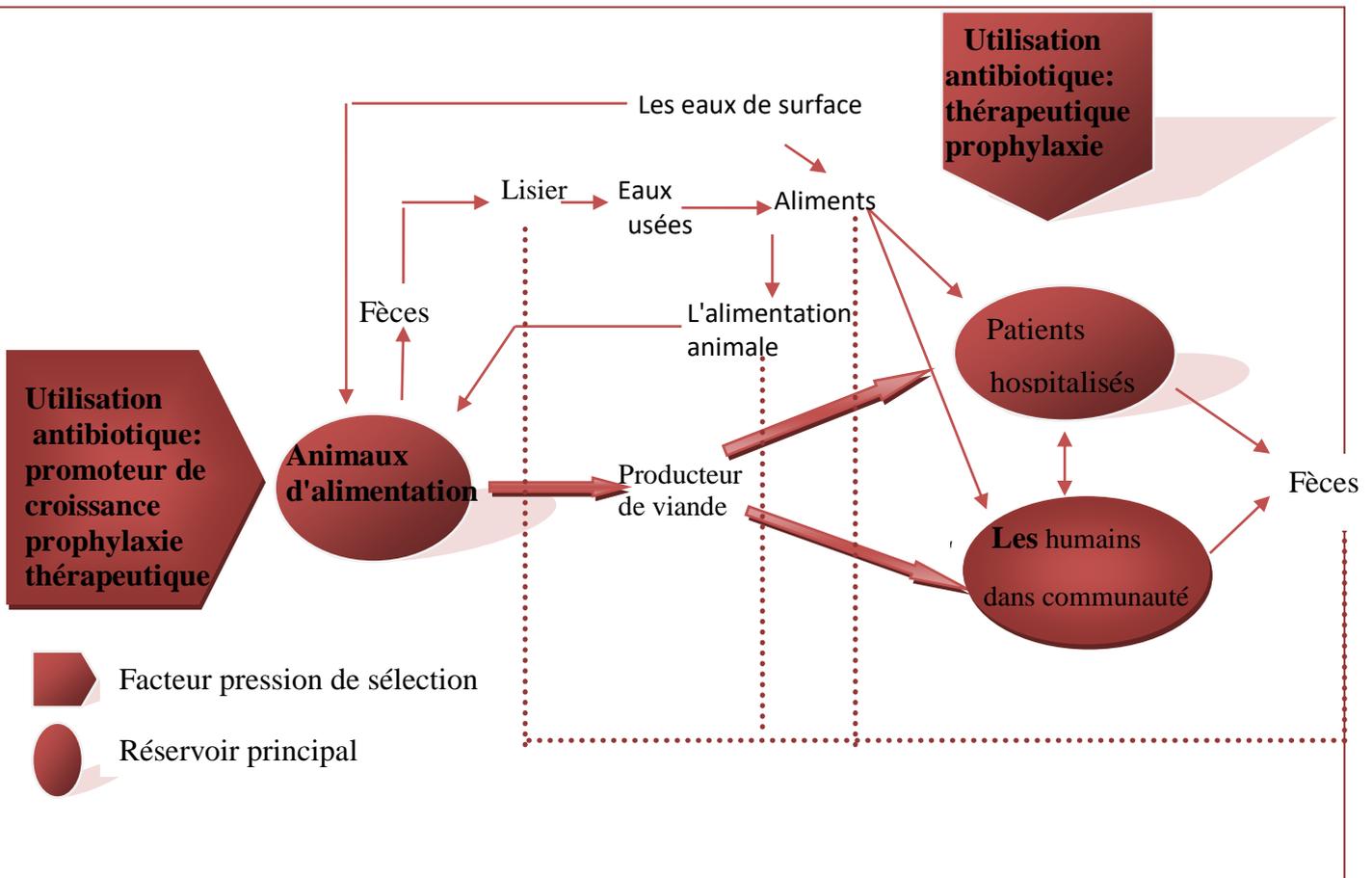


Figure 1: Relation écologique entre bactéries résistantes aux antibiotique S et principaux voies de transmission (Witte, 1998).

Introduction

La résistance des bactéries à Gram négatif aux céphalosporines de troisième génération (C3G) et aux carbapénèmes ont été fréquemment mis en évidence dans le microbiote d'animaux destinés à l'alimentation. Cela peut représenter un danger pour la santé humaine car ces gènes peuvent être présents dans les bactéries zoonotiques ce qui causerait un problème direct. La chaîne alimentaire a récemment attiré l'attention car elle peut servir de réservoir de gènes de résistance (Reuland et *al.*, 2014). Plusieurs études soutiennent l'hypothèse d'un lien entre l'utilisation des antibiotiques dans l'agriculture et l'élevage et l'émergence des souches résistantes avec l'alimentation comme moyen de transmission (Madec, 2013). Récemment des études ont rapporté la présence des BGN isolés du bétail et de son environnement. A Bejaia, plusieurs études ont rapporté la résistance aux céphalosporines de troisième génération et/ou carbapénèmes chez des bacilles à Gram négatif dans différents produits alimentaires tels que le poisson (Brahmi et *al.*, 2015), le lait (Yaici et *al.*, 2016), le poulet (Belmahdi et *al.*, 2016), les fruits et légumes (Mesbah et *al.*, 2017; Touati et *al.*, 2017).

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude qui a pour objectif la caractérisation de la résistance aux β -lactamines chez les BGN isolés de produits alimentaires. Pour cela nous avons adopté la démarche expérimentale suivante :

- Isolement et identification des BGN résistantes aux céphalosporines de troisième génération et/ou aux carbapénèmes à partir des denrées alimentaires (viandes et lait cru)
- Détermination de leurs phénotypes de résistance.

A decorative horizontal scroll border with a black outline and a white fill. The scroll is unrolled at the top and bottom edges, and has a small circular detail at the right end.

Matériel et Méthodes

I. Echantillonnage

Notre travail a été réalisé au sein de deux laboratoires : le Laboratoire Quallilab (d'Etude et Conseil en Sécurité, Environnement, Essai et Analyse de la Qualité à Bejaia) et le Laboratoire d'Ecologie Microbienne de l'Université A-Mira Bejaia pendant une période allant de 25 février au 11 juin 2018.

Cette étude concerne la recherche des bacilles à Gram négatif résistants aux céphalosporines de 3^{ème} génération et/ou aux carbapénèmes dans différentes denrées alimentaires. Pour cela, nous avons effectué en première partie des prélèvements de différentes denrées alimentaires incluant des unités de merguez, d'abats de poulet, viande de bœuf, viande de poulet, lait de vache. Ces prélèvements ont été effectués dans différentes boucheries, marchés et fermes de la wilaya de Bejaia. Nous avons aussi récupéré des souches de bacille à Gram négatif des différentes Laboratoires agroalimentaires de la wilaya de Bejaia (Quallilab, Idres, DSP, Sommam) (Tableau I).

Ces prélèvements ont été acheminés au Laboratoire Quallilab dans une glacière.

Tableau I: Les différentes denrées alimentaires analysées durant cette étude.

Echantillons	Nombre	Date	Lieu
Viande de boeuf	29	01/03/18	Marchés/commerces Bejaia
Viande de poulet	25	28/02/18	Marchés/commerces Bejaia
Merguez	22	03/03/18	Marchés/commerces Bejaia
Les abats (cœur)	3	16/04/18	Marchés/commerces Bejaia
Les abats (Foie)	5		
Les abats (gésier)	3		
Lait de vache	51	06/04/18	Collecte laiterie Algérie

II Enrichissement et isolement

L'enrichissement des différents produits alimentaires (abats, merguez, viande et le lait) a été réalisé en dissociant 1g ou 1ml de l'échantillon dans 5 ml de bouillon BHIB, après homogénéisation, les mélanges obtenus ont été incubés pendant 24h à 37°C.

II.1 Isolement des bactéries à Gram négatif résistantes aux C3G

Un isolement a été réalisé en ensemençant 40µl du bouillon BHIB dans 160µl du BHIB additionné de Céfotaxime et de Vancomycine. L'incubation a été effectuée à 37°C/24h. A partir du bouillon d'enrichissement, un ensemencement en surface de 50µl du BHIB a été effectué sur la gélose Mac Conkey additionnée de Céfotaxime et de Vancomycine (32µg/ml). Les boîtes ont été incubées à 37°C/24h.

II.2 Isolement des bactéries à Gram négatif résistantes aux carbapénèmes.

Un isolement a été réalisé en ensemençant 40µl du bouillon BHIB dans 160µl du BHIB additionné de méropénème et de Vancomycine. L'incubation a été effectuée à 37°C/24h. A partir du bouillon d'enrichissement, un ensemencement en surface de 50µl du bouillon BHIB a été effectué sur gélose Mac Conkey additionnées de méropénème et de Vancomycine. Les boîtes ont été incubées à 37°C/24h.

Une purification a été effectuée sur gélose Mac Conkey ou EMB.

II.3 Identification des souches

Les souches isolées ont été identifiées en utilisant une mini galerie biochimique classique (TSI, citrate de Simmons, Clark et Lubs, Bouillon nitraté, milieux urée/indole) (tableau II) (Denis *et al.*, 2007). La composition des différents milieux et réactifs utilisés durant cette étude est donnée en **Annexe I**.

Le milieu ChromAgar orientation a également été utilisé pour l'identification de certaines souches (Merlino *et al.*, 1996). L'aspect des souches sur le milieu Chromagar

Tableau II : Aspect des colonies sur milieu CHROMagar (CHROMagar™ Orientation).

Espèce	Couleur de colonies
<i>Escherichia coli</i>	Colonies roses à pourpres
KES-C (<i>Klebseilla, Entérobacter, Serratia, Citrobacter</i>)	Colonies bleues vert à bleues avec ou sans auréole violette
<i>Proteus mirabilis, Morganella, Providencia</i>	Colonies pales à beiges cernées d'une auréole ambre à marron
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Colonies muqueuses blanches brunâtres
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Colonies muqueuses blanches opaques
Entérocoque	Petites colonies bleues turquoise

Matériel et méthodes

Tableau II: Galerie biochimique d'identification des bactéries à Gram négatif (Denis et *al.*, 2007)

Test	Ensemencement	Réactif à ajouter	Interprétation des résultats	
			Positif	Négatif
Recherche de nitrate réductase sur bouillon nitraté	Ensemencement à partir d'une culture fraîche puis incubation à 37°C/24h	NRI et NRII Poudre de zinc	Couleur Rouge	Couleur Jaune
Utilisation de Glucose Lactose, Saccharose et production du Gaz et d'H ₂ S sur milieu TSI	Ensemencement de la pente par des stries et pique centrale. à partir d'une culture fraîche Incubation à 37°/24h	/	Virage de la pente au Jaune (fermentation de Lactose)	Couleur de la Pente Rouge
			Virage du culot Au jaune (fermentation du Glucose)	Couleur du Culot Rouge
			Virage de centre au Jaune (Fermentation du Saccharose)	Couleur de centre Rouge
			Apparition de bulles (production du Gaz)	Pas de Bulles
			Noircissement du milieu (Production d'H ₂ S)	Pas de couleur Noir
Utilisation de Citrate comme seule source de carbone sur gélose Citrate de Simmons.	Ensemencement à partir d'une culture fraîche puis. incubation à 37°C/pendant 1 à 7 jours	/	Croissance sur la pente et virage du Milieu au bleu (utilisation du Citrate)	Pas de Croissance Couleur verte
Etude du type fermentaire sur bouillon Clark et Lubs	Ensemencement à partir d'une culture fraîche puis incubation à 37°C/48h	VPI et VPII	Couleur rouge cerise (Formation d'acétoïne)	Incolore
		RM	Couleur Rose Formation des acides Mixtes)	Incolore
Production d'indole sur milieu Eau Peptonée Exempte d'indole	Ensemencement a Partir d'une culture Fraiche puis incubation à 44°/24h	Kovacs	Anneau Rouge en Surface (production d'indole)	Incolore

➤ **Coloration de Gram**

La coloration de Gram est une coloration différentielle qui permet de différencier entre deux grands groupes bactériens : bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif.

Annexe II.

➤ **Recherche de la catalase**

Une ose de culture bactérienne a été prélevé, puis placée sur une lame contenant une goutte de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Une réaction positive se traduit par l'observation d'une effervescence.



III. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion sur gélose Mueller-Hinton (MH) selon les recommandations du comité Européen de l'antibiogramme (EUCAST, 2018).

A partir d'une culture fraîche de 24h, une suspension bactérienne a été préparée en dissociant 4 à 5 colonies de même morphologie dans un tube contenant 5 ml à 0.85% chlorure de sodium stérile avec une turbidité équivalente à celle de l'étalon 0,5 de la gamme de Mc Farland (correspondant à une charge de 10⁸UFC/ml).

Des boîtes de gélose Mueller Hinton sont ensemencées par écouvillonnage par des stries serrées. Des disques d'antibiotiques sont déposés à l'aide d'une pince puis les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h.

Les différents diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés avec une règle. L'interprétation en Sensible (S), Intermédiaire (I) ou Résistante (R) a été faite selon les recommandations de CA-SFM 2018 pour les antibiotiques (Amoxicilline clavulanate, Aztréonam, Méropénème, Imipénème céfoxitine céfepime) et CA-SFM 2013 pour les antibiotiques (Céfotaxime, Céftazidime) (Tableau III).

Matériel et méthodes

Tableau III : Antibiotiques testés pour les souches analysées.

Antibiotique	Abréviation	Charge (µg)	Famille	Diamètres critiques (mm)		Remarque	Marque de l'antibiotique
				S _≥	R<		
Céfoxitine	FOX	30	β-lactamines	19	19	CA-SFM 2018	Liofilchim
Céfotaxime	CTX	30	β-lactamines	26	23	CA-SFM 2013	Liofilchim
Céftazidime	CAZ	30	β-lactamines	26	21	CA-SFM 2013	Liofilchim
Amoxicilline clavulanate	AMC	20+10	β-lactamines	19	19	CA-SFM 2018	Liofilchim
Aztréonam	ATM	30	β-lactamines	26	21	CA-SFM 2018	Biorad
Méropénème	MER	10	β-lactamines	22	16	CA-SFM 2018	Liofilchim
Céfepime	FEP	30	β-lactamines	27	24	CA-SFM 2018	Liofilchim
Imipénème	IMP	10	β-lactamines	22	16	CA-SFM 2018	Liofilchim
Colistine	CST	50	polymyxine	15	15	CA-SFM 2013	Bio-rad

IV. Détermination des phénotypes de résistance aux β-lactamines chez les bacilles à Gram négatif

IV.1. Recherche de la production de BLSE

❖ Test de synergie

La production d'une BLSE a été recherchée chez les souches ayant poussées sur la gélose Mac Conkey additionnée de Céfotaxime. La production d'une BLSE est recherchée par le test de synergie (DD-test) qui consiste à déposer des disques de Céftazidime (CAZ,30µg) et de Céfotaxime (CTX,30µg) à une distance de 20mm (centre à centre)d'un disque d'Amoxicilline/acide Clavulanique (AMC20/10µg) (figure 2).L'observation d'une image de synergie entre le disque d'AMC et les disque CAZ ou CTX indique la production

Matériel et méthodes

d'une BLSE (Jarlier et *al.*,1988) .Des disques de méropénème (MEM) ,céfoxitine (FOX), Aztréonam (ATM,30 μ g) et Céfepime (FEP,30 μ g) ont été testés sur la même boîte.

❖ Test de synergie sur gélose MH additionnée de cloxacilline.

La cloxacilline (Orbénine®), est un inhibiteur des céphalosporinases de la classe C d'Ambler chromosomique ou plasmidique. En cas de présence de ces enzymes, les diamètres autour des disques de C3G très diminués peuvent masquer les images de synergies évocatrices de BLSE entre des disques de C3G et d'acide Clavulanique. Dans ce cas, le test de synergie est refait en utilisant la gélose MH additionnée de cloxacilline (250 μ g/l) afin d'inhiber l'activité céphalosporinase. La comparaison des diamètres d'inhibition entre les boîtes avec et sans cloxacilline permet de mettre en évidence la présence d'une BLSE seule ou associée à une céphalosporinase (Giraud-Morin et Fosse, 2008)

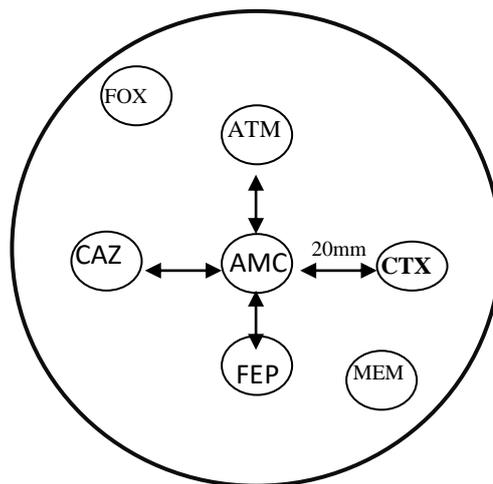


Figure 2: DD-test (Jarlier et *al.*, 1988).

IV-2 Recherche de la production des carbapénémases.

❖ Test MCIM (modified Carbapenem inactivation method)

Un nouveau test phénotypique, appelé, la méthode modifiée d'inactivation des carbapénèmes (MCIM) a été développée pour détecter les carbapénémases chez les bacilles à Gram négatif isolé sur gélose Mac Conkey additionnées de méropénème (Pierce et *al.*, 2017).

Ce test est réalisé comme suit: quelques colonies bactériennes des souches à tester ont été mises dans des tubes à Eppendorfs contenant 500µl BHIB (souche témoin positive, témoins négative *E. coli* ATCC25922 et des souches à tester). Puis, un disque de méropénème (MEM) de 10µg a été introduit dans la suspension bactérienne puis incubé pendant 4h à 37°C. Après incubation, les disques de MEM ont été retirés et déposés sur une boîte contenant de la gélose MH préalablementensemencée par une souche de référence *E.coli* ATCC25922. L'incubation est réalisée pendant 24h à 37°C (figure 3).

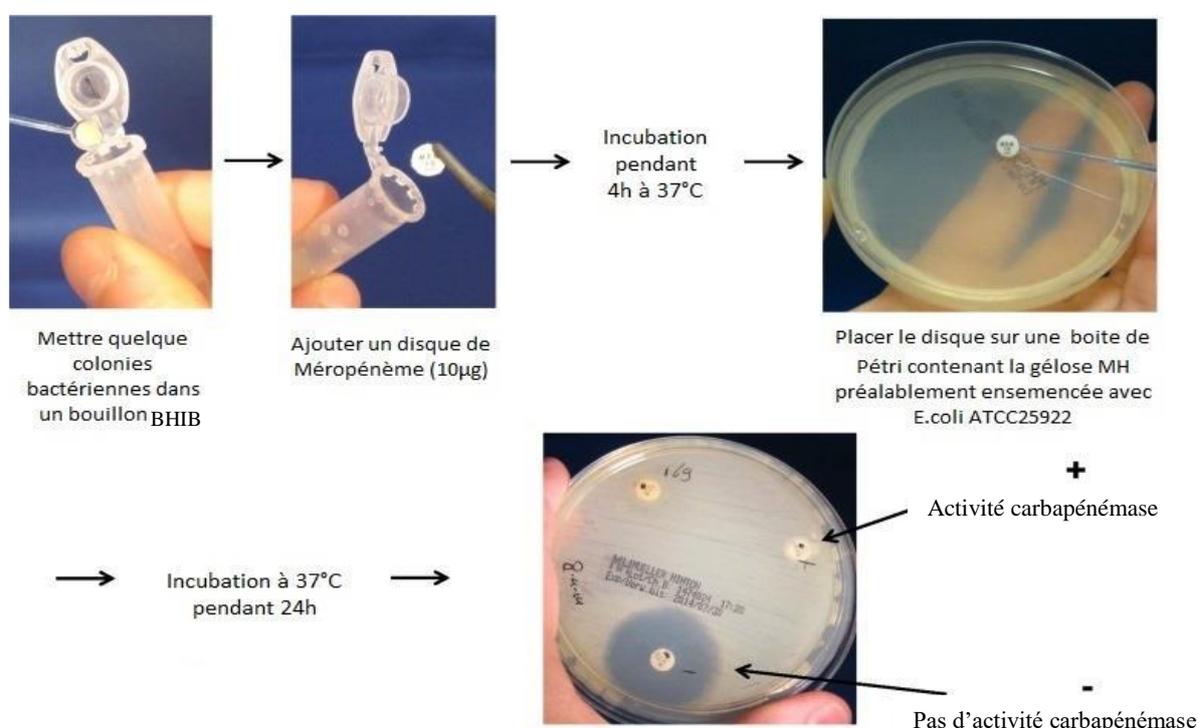


Figure 3: Les étapes du test CIM modifié (Pierce et *al.*, 2017).

Dans le cas où la souche produit une carbapénémase, le Méropénème sera dégradé ce qui favorise la croissance de la souche de référence *E. coli* (ATCC25922) tout autour du disque. Par contre, si la souche testée ne produit pas une carbapénémase, le Méropénème garde son

Matériel et méthodes

activité antimicrobienne et inhibe la croissance bactérienne qui se traduit par l'apparition d'une zone claire au tour du disque.

Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés pour déterminer si la souche bactérienne produit une carbapénémase.

- 6-15mm de diamètre zone d'inhibition le résultat est positif.
- 16-18mm de diamètre zone d'inhibition le résultat est indéterminé (nécessite d'autres tests pour établir la présence ou l'absence de production de carbapénémase comme le Hodge test).
- ≥ 19 mm de diamètre de la zone d'inhibition le résultat est négatif (Pierce et al., 2017).

La sensibilité de ces souches vis-à-vis de β -lactamines a été testée.

A decorative horizontal border with a scroll-like appearance, featuring a vertical line on the left side and a small circular flourish at the top right corner.

Résultats et Discussion

Résultats

I. Souches bactériennes

Au cours de cette étude, un total de 138 échantillons ont été analysés à partir de différentes denrées alimentaires dont 29 échantillons de viande, 22 merguez, 51 lait, 11 abats, 25 poulets.

L'isolement sur gélose de sélection a permis de sélectionner 155 souches BGN résistantes, dont 64 souches sur gélose Mac Conkey + Céfotaxime et 91 souches sur gélose Mac Conkey+Méropénème.

II. Détermination des phénotypes de résistance aux β -lactamines

II-1. Recherche de la production de BLSE

- **DD-test**

Le DD-test effectué sur gélose Muller Hinton (64 souches) a révélé la présence d'une image de synergie chez les 14 (Figure4).



Figure 4: Résultat du DD-test pour la souche *Escherichia sp.D1*

Tableau IV: Souches représentant une image de synergie isolées des différentes denrées alimentaires

Résultats

Souche	AMC (mm)	CTX (mm)	CAZ (mm)	FOX (mm)	IMI (mm)	FEP (mm)	ATM (mm)	MEM (mm)	Phénotype probable
BL(1)	6 R	12 R	6 R	26 S	33 S	14 R	23 I	NT	BLSE
AML(7)	6 R	14 R	18 R	6 R	37 S	14 R	23I	NT	BLSE
F3R	6	15 R	15 R	24 S	18 I	18 R	20R	NT	BLSE
P20E.C	6 R	10 R	14 R	29 S	21 I	15 R	18R	NT	BLSE
G3VF	6 R	17 R	16 R	30 S	30 S	20 I	25 I	NT	BLSE
P24(D1)	6 R	11 R	19 R	25 S	28 S	15 R	15 R	NT	BLSE
P21 VP	6 R	12 R	19 R	26 S	28 S	24 I	17 R	NT	BLSE
M21	6 R	14 R	23 I	28 S	ND	22 I	24 I	22 S	BLSE
M22	6 R	18 R	25 I	27 S	ND	22 I	26 S	23 S	BLSE
M8 VM	6 R	12 R	14 R	24 S	21 I	16 R	19 R	NT	BLSE
M8VF	6 R	11 R	21 R	28 S	30 S	17 R	19 R	NT	BLSE
M8(2)	6 R	16 R	19 R	28 S	NT	23 R	23 I	22 S	BLSE
P23	12 R	24 I	22 I	24 S	NT	26 I	23 I	28 S	BLSE
P19	6 R	18 R	14 R	22 S	NT	24 I	21 R	25 S	BLSE

Légende : **AMC** : Amoxicilline+Clavulanique, **CTX**: Céfotaxime, **CAZ**: Céftazidime, **FOX** : Céfoxitine, **ATM** : Aztréonam, **MEM**: Méropénème **FEP**: Céfepime, **S** : sensible, **R** : Résistant. **NT**: non testé.

Résultats

La figure suivante donne le nombre BLSE par produit alimentaire

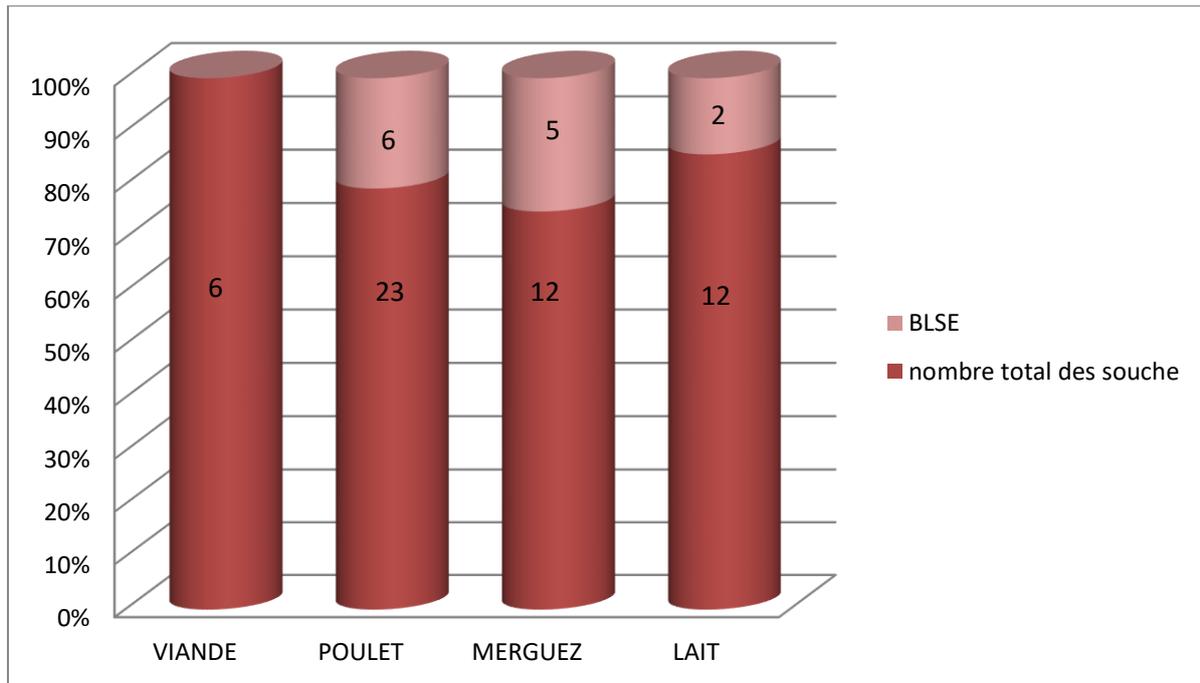


Figure 5: Les souches BLSE isolées de différentes denrées alimentaires.

- **DD-test avec cloxacilline**

Sur un total de 34 souches testées aucune image de synergie n'a été détectée. Une récupération des diamètres des zones d'inhibition est montrée chez 34 souches testées, la résistance aux C3G peut être expliquée par l'hyperproduction de leur céphalosporinase naturelle chez *Enterobacter sp*, *Morganella sp*. Chez *Proteus mirabilis*, *Escherichia* et *K. pneumoniae* appartenant aux groupes 0, 1 et 2 respectivement, la résistance aux C3G peut être expliqué par la production de céphalosporinase plasmidique (**Figure 06**).

Résultats

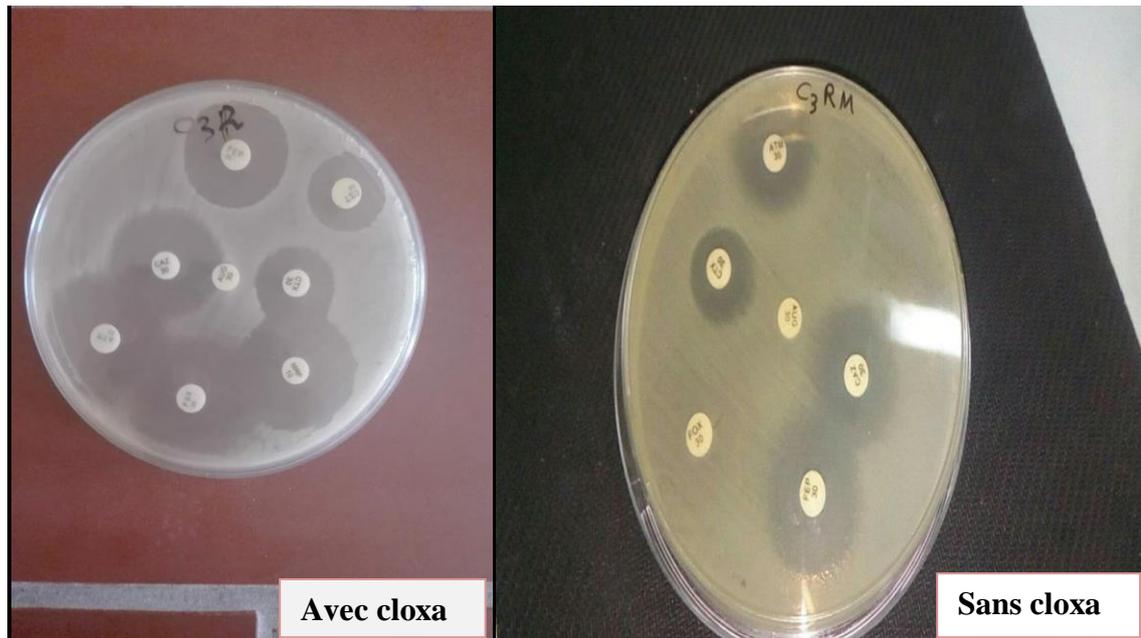


Figure 6: DD-test avec et sans cloxacilline pour la souche *Escherichia spC3R*.

Le tableau ci-dessous donne les résultats du DD-Test avec et sans cloxacilline pour l'ensemble des souches testées.

II-2. Recherche de la production de carbapénémases

❖ Test MCIM

Le test MCIM a été réalisé pour 91 souches, les résultats ont montré que parmi ces souches 21 d'entre elles ont été positives (figure 7) ce qui signifie qu'elles résistent au Méropénème par production probable d'une carbapénémase (Tableau V)

Résultats

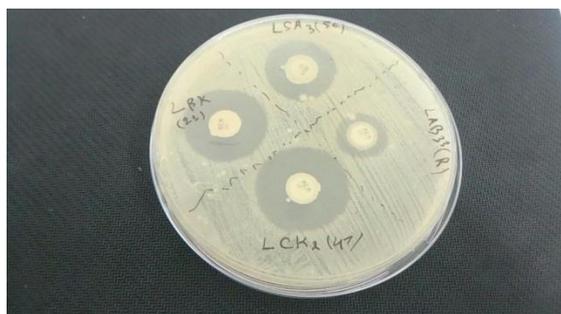


Figure 7: Résultat du test MCIM positif de la souche *Klebsiella sp.*LBB33R

Les résultats de l'antibiogramme sur gélose MH additionnée de cloxacilline réalisé sur l'ensemble des souches retrouvées MCIM positives sont montrés dans le tableau VII.

Tableau V: Résultats de l'antibiogramme pour les souches MCIM positifs

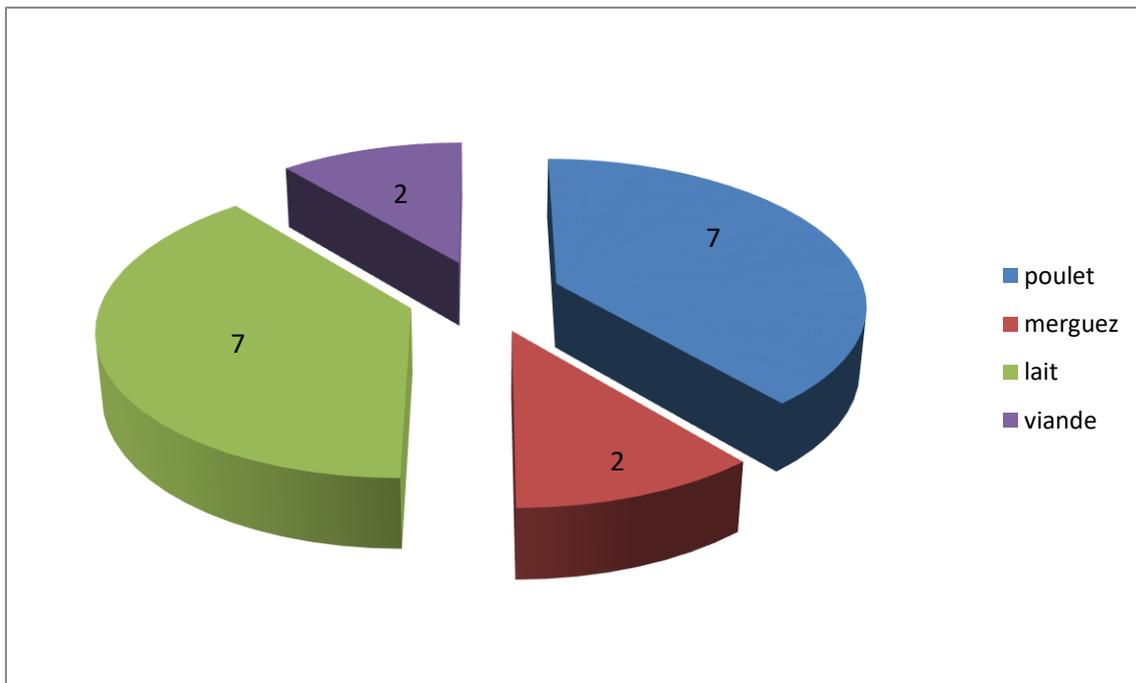
Souche	AMC	CTX	CAZ	FOX	FEP	ATM	MEM	CST
M6	6mm R	6mmR	6mmR	6mmR	6mmR	6mmR	6mmR	20mmS
M7	6mmR	20mmS						
V16	6mmR	6mmR	6mmR	6mmR	13mmR	6mmR	6mmR	22mmS
V17	6mmR	35mmS	30mmS	27mmS	40mmS	32mmS	29mmS	20mmS
V18	6mmR	6mmR	6mmR	6mmR	12mmR	6mmR	6mmR	20mmS
P5(ECR)	6mmR	20mmS						
P5 (vb)	6mmR	22mmS						
P3	6mmR	20mmS						
G1vb	6mmR	23mmS						
KCL 6 V	6mmR	25mmS	21mmS	19mmR	28mmS	28mmS	25mmS	20mmS
ABL 4	6mmR	16mmR	21mmS	6mmR	28mmS	28mmS	6mmR	20mmS
LAB 33 R	6mmR	6mmR	6mmR	6mmR	14mmR	6mmR	6mmR	22mmS
LAB 33 V	6mmR	20mmS						
p21	6mmR	23mmS						
P5BV	6mmR	21mmS						
P1BR	6mmR	22mmS						
ML2	6mmR	6mmR	6mmR	6mmR	17mm	6mmR	6mmR	22mmS
KCL 6 R	6mmR	19mmS	24mmS	6mmR	22mmS	25mmS	26mmS	18mmS
LBB1	6mmR	22mmS						
LBB3	6mmR	22mmS						
p25	6mmR	20mmS						

Légende : MEM : Méropénème, CTX : Céfotaxime, CAZ : Céftazidime, AMC : Amoxicilline + Acide Clavulanique .CST : Colistine, ATM : Aztréonam, FEP : Cefépime, FOX : Céfoxitine.

Résultats

D'après le tableau ci-dessus, on constate que toutes les souches CIM positifs résistent aux antibiotiques testés (CTX, ATM, MEM, CAZ, AMC, FEP, CST) à l'exception de trois souches (V17, KCL6V, KCL6R) qui présentent une sensibilité vis-à-vis du méropénème. La résistance aux carbapénèmes chez ces souches peut être expliquée par la production d'une céphalosporinase associée à une imperméabilité.

La figure suivante donne la répartition des souches MCIM positives en fonction du



produit alimentaire.

Figure 8: Répartition des souches CIM positives en fonction des denrées alimentaires

Discussion

La résistance aux antibiotiques représente un problème de santé global important et complexe. La consommation mondiale d'antibiotiques a augmenté de près de 40% au cours de la dernière décennie. En dehors des applications fondamentales en milieu clinique, de très grandes quantités d'antibiotiques sont utilisées dans l'agriculture et l'industrie alimentaire (Purohit et *al.*, 2017).

Les bactéries résistantes aux antibiotiques se trouvant dans un environnement donné peuvent être transmises à d'autres bactéries dans un autre environnement *via* la chaîne alimentaire et l'eau (Mahmudur et *al.*, 2015). Plusieurs études ont montré que l'utilisation d'antibiotiques chez les animaux contribuait à la sélection de la résistance aux antibiotiques et pose des risques pour l'Homme en raison de la transmission des bactéries zoonotiques résistantes *via* la chaîne alimentaire et le transfert indirect de gènes de résistance des animaux à l'Homme (Madec, 2013).

La richesse de la viande rouge, la viande du poulet et abats en eau et en protéines de haute valeur biologique fait d'elles un aliment indispensable pour une alimentation équilibrée. Cependant, ces mêmes raisons la rendent un terrain favorable à la prolifération microbienne. Une grande partie des germes contaminant les carcasses suite aux différentes étapes de l'abattage. Ce sont des germes d'altération qui provoquent la putréfaction de la viande. Par ailleurs, la présence de germes pathogènes responsables des toxico-infections alimentaires est possible. Elle est souvent liée à des défauts d'hygiène et de conservation (Christaine Joffin et *al.*, 2010)

L'objectif principal de notre étude est l'isolement et l'identification des bactéries résistantes aux Céphalosporine de troisième génération (C3G) et/ou aux carbapénèmes dans certaines denrées alimentaires de différents commerces de la région de Bejaia. La motivation principale de notre étude est que la présence de ces bactéries pathogènes dans les denrées alimentaires constitue une autre origine de dissémination des bactéries résistantes aux antibiotiques.

Le mécanisme le plus fréquemment incriminé dans la résistance aux C3G étant la production des β -lactamase de type BLSE. Récemment, des études sur les caractéristiques et la prévalence des BGN productrices de BLSE chez les animaux ont augmenté dans différents pays du monde (Smet et *al.*, 2010, Ohnishi et *al.*, 2013, Timofte et *al.*, 2014, Skočková et *al.*, 2015, Sudarwanto et *al.*, 2015, Odenthal et *al.*, 2016). En Algérie, des études réalisées chez la

Discussion

volaille (Belmahdi et *al.*, 2016), les œuf de poulet de chair (Mezhoud et *al.*, 2016), poisson (Brahmi et *al.*, 2015), sandwich (Yaici et *al.*, 2017) ont rapporté la présence de ces enzyme BLSE.

Au cours de notre étude nous avons analysé 138 échantillons, nous avons isolé 6 souches productrices de BLSE chez le poulet (abats et carcasses). Des résultats similaire ont été rapportés en Egypte par (H.M et *al.*, 2015) En plus, l'étude faite Mezhoud et *al.*, 2015 ou ils ont détecté cette enzyme dans appareil reproducteur du poulet de chair (Mezhoud et *al.*, 2015). En Algérie, on cite d'abord le travail de Meguenni et al en 2012 ont rapporté la présence de BLSE de type CTX-M-15 chez les souches *E.coli* isolées dans différents poulet d'élevage de la région centre Algérien. (Belmahdi et *al.*, 2016) ont rapporté aussi la production de BLSE de type SHV-12 chez d'isolats d'origine aviaire.

Le microbiote des animaux pourrait servir de réservoir des gènes de BLSE et ou les gènes de résistance codant pour AmpC, qui peuvent être transmis à l'Homme (Huijbers et *al.*, 2014). Certaines études ont alarmé la large présence de BLSE chez les bactéries d'une grande diversité d'animaux et de produits alimentaires dans différents pays (Machado et *al.*, 2008).

Les carbapénèmes sont utilisés depuis plus de 30 ans dans la prévention et le traitement des infections causées par BGN produisant des BLSE et AmpC. Cependant, ces dernières années, plusieurs études dans le monde ont rapporté la présence des bactéries productrices de carbapénémases chez les animaux et l'environnement (Fischer, 2013; Guerra et *al.*, 2014; Woodford et *al.*, 2014., Wang et *al.*, 2012 ;H.M et al., 2015; Zhang et *al.*, 2015). Récemment, en Algérie, plus précisément à Bejaia ces enzymes ont été détectées dans le milieu environnementale aquatique (Tafoukt et *al.*, 2017), animaux sauvages (Bachiri et *al.*, 2016), animaux compagnes (Yousfi et *al.*, 2016), et dans différents produits alimentaires: lait (Yaici et *al.*, 2016), végétaux (Touati et *al.*, 2017).

Cette étude nous a permet d'isolé (18) souches probablement productrices de carbapénémases ont été isolé a partir des différent denrées alimentaire dont 7 souches sont isolées du poulet, 2 souches isolées de la merguez et 7 souches du lait et 2 isoless de la viande. Plusieurs études ont signalé la présence des bactéries productrices de carbapénémases chez des animaux, les denrées alimentaires (lait ,poulet ,bétail), (Fischer, 2013; Poirel et *al.*, 2012; Yaici et *al.*, 2016) .

Discussion

Pour l'échantillon merguez nous avons isolés 2 souches BLSE et 4 souches productrices d'une carbapénémase, mais nous n'avons pas pu faire une comparaison car aucun article n'a été trouvé dans la littérature.

Concernant le lait, nous avons isolé 2 souches BLSE et 7 souches productrices de carbapénémases. Une étude similaire a été réalisée en 2017 en Algérie par Gaffaf et Ghrieb. Ces derniers ont montré la présence des souches BLSE et carbapénémases dans le lait cru (Gaffaf and Ghrieb, 2017). La présence des carbapénémases de type NDM dans le lait cru a été rapportée par Yaici en 2016 en Algérie (Yaici et *al.*, 2016b).

Les données concernant la prévalence de BGN en Algérie dans les aliments sont très limitées et la détermination de sa présence dans le lait et viande peut fournir une indication sur les risques sanitaires associés à la consommation de ces produits.

La distribution globale des antibiotiques causent la résistance aux bactéries commensales dans les poulets et viande sains nourris avec une alimentation anarchique et avec une concentration d'antibiotique non respectée (Moussa et *al.*, 2007; Dewulf et *al.*, 2013). Au niveau de la wilaya de Bejaia, les pénicillines sont très largement utilisées dans les fermes pour soigner les animaux malades (bovins, ovins ou caprins), mais aussi comme des antibiotiques prophylactiques dans l'élevage de volaille. Les souches résistantes aux pénicillines peuvent avoir des résistances croisées aux autres β -lactamines incluant les céphalosporines et les carbapénèmes (Belmahdi et *al.*, 2016).

Au cours de notre étude nous avons analysé 138 échantillons de différentes denrées alimentaires au niveau de la wilaya de Bejaia. Cette étude comporte certaines limitations. Tout d'abord, la zone géographique est limitée. Deuxièmement le nombre d'échantillon analysé pour chaque type d'aliments est faible. Mais cela n'empêche pas que les résultats offrent des informations importantes concernant la contamination de divers aliments par les bacilles à Gram négatif résistantes aux β -lactamines.

Conclusion et perspective

En conclusion, il semblerait que les bactéries multi-résistantes soient largement distribuées dans différents écosystèmes. L'usage abusif des antibiotiques non seulement en médecine humaine, mais aussi en médecine vétérinaire ou même dans l'agriculture, pourrait exercer une pression de sélection sur les micro-organismes, qu'est le principal facteur épidémiologique responsable de l'émergence de la résistance. Ceci est devenu une menace majeure pour la santé humaine dans le monde. Il est rapporté que l'utilisation d'antibiotique dans la production primaire agricole est considérée comme la cause principale de sélection de l'antibiorésistance chez des bactéries susceptibles de se retrouver ensuite sur les denrées alimentaire, cette résistance peut être transférée aux animaux de compagnie et à l'Homme *via* la chaîne alimentaire.

Au cours de notre étude, nous avons isolé 14 souches BLSE et 18 souches probablement productrices de carbapénémase.

La détection de ces souches résistantes aux antibiotiques dans les denrées alimentaires peut être une source de préoccupation, cela pourraient avoir un impact sur la santé publique. Il est donc recommandé par conséquent de faire un usage optimal raisonnable des antibiotiques dans le but de réduire l'antibiorésistance.

En perspectives, ces résultats restent préliminaires et nécessitent d'être approfondis par :

- Un échantillonnage plus large et sur une période plus importante,
- Une enquête préliminaire suffisante incluant les antibiotiques utilisés dans les élevages d'animaux.
- Les techniques de biologie moléculaire pour la caractérisation des gènes de résistance et le typage des souches.

Références bibliographiques

- Ambler, R.P. (1980).** The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 289, 321–331.
- Andremont, A. (2000).** [Consequences of antibiotic therapy to the intestinal ecosystem]. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* 19, 395–402.
- Belmahdi, M., Bakour, S., Bayssari, C.A., Touati, A., and Rolain, J.-M. (2016).** Molecular characterisation of extended-spectrum β -lactamase- and plasmid AmpC-producing *Escherichia coli* strains isolated from broilers in Béjaïa, Algeria. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 6, 108–112.
- Bogaard, V.D., E, A., London, N., Driessen, C., and Stobberingh, E.E. (2001).** Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J. Antimicrob. Chemother.* 47, 763–771.
- Bouyahya, A., Bakri, Y., and Et-Touy, A. (2017).** Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries | SpringerLink.
- Brahmi, S., Dunyach-Rémy, C., Touati, A., and Lavigne, J.-P. (2015).** CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone O25b-ST131 isolated from wild fish in Mediterranean Sea. *Clin. Microbiol. Infect.* 21, e18–e20.
- Bush, K., and Jacoby, G.A. (2010).** Updated functional classification of beta-lactamases., Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 969–976.
- Bush, K., Jacoby, G.A., and Medeiros, A.A. (1995).** A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1211–1233.
- Carle, S. (2009).** La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important ! *Pharmactuel* 42.
- Cavallo, J.-D., Fabre, R., Jehl, F., Rapp, C., and Garrabé, E. (2004).** Bêtalactamines. *EMC - Mal. Infect.* 1, 129–202.
- Fischer (2013).** *Escherichia coli* producing VIM-1 carbapenemase isolated on a pig farm | *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* | Oxford Academic.
- Gaffaf, H., and Ghrieb, M. (2017).** Prévalence et Anti bio-résistance des souches d'*Escherichia coli* isolées du lait cru. Thesis.
- Giraud-Morin, C., & Fosse, T. (2008).** l'évolution récente et caractérisation des entérobactéries productrices de BLSE au CHU de Nice (2005-2007). *Pathologie Biologie*, 56(7–8), 417–423
- Guerra, B., Fischer, J., and Helmuth, R. (2014).** An emerging public health problem: Acquired carbapenemase-producing microorganisms are present in food-producing animals, their environment, companion animals and wild birds. *Vet. Microbiol.* 171, 290–297.

Références bibliographiques

- Hawkey, P.M. (2008).** The growing burden of antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* *62*, i1–i9.
- H.M, A., Reuland, E.A., Wintermans, B.B., Naiemi, N. al, Koek, A., Abdelwahab, A.M., Ammar, A.M., Mohamed, A.A., and Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E. (2015).** Extended-Spectrum β -Lactamases and/or Carbapenemases-Producing Enterobacteriaceae Isolated from Retail Chicken Meat in Zagazig, Egypt. *PLOS ONE* *10*, e0136052.
- Huijbers, P.M.C., Graat, E. a. M., Haenen, A.P.J., Santen, V., G, M., van Essen-Zandbergen, A., Mevius, D.J., van Duijkeren, E., Hoek, V., and M, A.H.A. (2014).** Extended-spectrum and AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli* in broilers and people living and/or working on broiler farms: prevalence, risk factors and molecular characteristics. *J. Antimicrob. Chemother.* *69*, 2669–2675.
- Jarlier, V., Nicolas, M.H., Fournier, G., and Philippon, A. (1988).** Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.* *10*, 867–878.
- Livermore, D.M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G.M., Arlet, G., Ayala, J., Coque, T.M., Kern-Zdanowicz, I., Luzzaro, F., et al. (2007).** CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* *59*, 165–174.
- Ma, D.S.L., Tan, L.T.-H., Chan, K.-G., Yap, W.H., Pusparajah, P., Chuah, L.-H., Ming, L.C., Khan, T.M., Lee, L.-H., and Goh, B.-H. (2018).** Resveratrol—Potential Antibacterial Agent against Foodborne Pathogens. *Front. Pharmacol.* *9*.
- Machado, E., Coque, T.M., Cantón, R., Sousa, C.J., and Peixe, L. (2008).** Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum β -lactamases among Enterobacteriaceae isolates recovered from chickens and swine in Portugal | *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* | Oxford Academic.
- Machado, E., Coque, T.M., Cantón, R., Sousa, J.C., and Peixe, L. (2008).** Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum β -lactamases among Enterobacteriaceae isolates recovered from chickens and swine in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* *62*, 296–302.
- Madec, J.-Y. (2013).** Résistance aux antibiotiques chez l’animal : quel risque pour l’Homme ? *J. Anti-Infect.* *15*, 178–186.
- Mahmudur, R., Rakib, M.M., and Hasan, B. (2015).** Antimicrobial-resistant and ESBL-producing *Escherichia coli* in different ecological niches in Bangladesh. *Infect. Ecol. Epidemiol.* *5*, 26712.
- Mairi, A., Pantel, A., Sotto, A., Lavigne, J.-P., and Touati, A. (2018).** OXA-48-like carbapenemases producing *Enterobacteriaceae* in different niches. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *37*, 587–604.
- Merlino, J., Siarakas, S., Robertson, G.J., Funnell, G.R., Gottlieb, T., and Bradbury, R. (1996).** Evaluation of CHROMagar Orientation for differentiation and presumptive identification of gram-negative bacilli and Enterococcus species. *J. Clin. Microbiol.* *34*, 1788–1793.

Références bibliographiques

- Mezhoud, H., Boyen, F., Touazi, L., Garmyn, A., Moula, N., Smet, A., Haesbrouck, F., Martel, A., Iguer-Ouada, M., and Touati, A. (2015).** Extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* in broiler breeding roosters: Presence in the reproductive tract and effect on sperm motility. *Anim. Reprod. Sci.* *159*, 205–211.
- Mezhoud, H., Chantziaras, I., Iguer-Ouada, M., Moula, N., Garmyn, A., Martel, A., Touati, A., Smet, A., Haesebrouck, F., and Boyen,) F. (2016).** Presence of antimicrobial resistance in coliform bacteria from hatching broiler eggs with emphasis on ESBL/AmpC-producing bacteria. *Avian Pathol.* *45*, 493–500.
- Munita, J.M., and Arias, C.A. (2016).** Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Spectr.* *4*.
- Naas, T., and Nordmann, P. (1994).** Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *91*, 7693–7697.
- Nordmann, P., Mariotte, S., Naas, T., Labia, R., and Nicolas, M.H. (1993).** Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*., Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother. Antimicrob. Agents Chemother.* *37*, 37, 939, 939–946.
- Nordmann, P., Dortet, L., and Poirel, L. (2012).** Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends Mol. Med.* *18*, 263–272.
- perdrix, S. (2015).** Resistance mechanisms in Enterobacteriaceae. - PubMed - NCBI.
- Pierce, V.M., Simner, P.J., Lonsway, D.R., Roe-Carpenter, D.E., Johnson, J.K., Brasso, W.B., Bobenchik, A.M., Lockett, Z.C., Charnot-Katsikas, A., Ferraro, M.J., et al. (2017).** Modified Carbapenem Inactivation Method for Phenotypic Detection of Carbapenemase Production among Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* *55*, 2321–2333.
- Pitout, J.D.D., Le, P.G., Moore, K.L., Church, D.L., and Gregson, D.B. (2010).** Detection of AmpC β -lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Salmonella spp.* and *Proteus mirabilis* in a regional clinical microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* *16*, 165–170.
- Poirel, L., Potron, A., Cuesta, C.D.L., Cleary, T., Nordmann, P., and Munoz-Price, L.S. (2012).** Wild Coastline Birds as Reservoirs of Broad-Spectrum- β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Miami Beach, Florida. *Antimicrob. Agents Chemother.* *56*, 2756–2758.
- Poirel, L., Berçot, B., Millemann, Y., Bonnin, R.A., Pannaux, G., and Nordmann, P. (2012).** Carbapenemase-producing *Acinetobacter spp.* in Cattle, France. *Emerg. Infect. Dis.* *18*, 523–525.
- Purohit, M.R., Chandran, S., Shah, H., Diwan, V., Tamhankar, A.J., and Stålsby Lundborg, C. (2017).** Antibiotic Resistance in an Indian Rural Community: A “One-Health” Observational Study on Commensal Coliform from Humans, Animals, and Water. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* *14*.

Références bibliographiques

- Reuland, E.A., Al, N.N., Raadsen, S.A., Savelkoul, P.H., Kluytmans, J.A., and Vandenbroucke-Grauls, C.M. (2014).** Prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in raw vegetables., Prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in raw vegetables. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 33, 1843, 1843–1846.
- Sefraoui, I.E.K. (2015).** Etude de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau de différents hôpitaux de l'ouest algérien. Thesis.
- Soussy, C.-J. (2007).** Résistance bactérienne aux antibiotiques. In *Les infections urinaires*, (Springer, Paris), pp. 21–46.
- Tafoukt, R., Touati, A., Leangapichart, T., Bakour, S., and Rolain, J.-M. (2017).** Characterization of OXA-48-like-producing Enterobacteriaceae isolated from river water in Algeria. *Water Res.* 120, 185–189.
- Touati, A., Mairi, A., Baloul, Y., Lalaoui, R., Bakour, S., Thighilt, L., Gharout, A., and Rolain, J.M. (2017).** First detection of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 in fresh vegetables from Béjaïa city, Algeria. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 9, 17–18.
- Wang, Y., Wu, C., Zhang, Q., Qi, J., Liu, H., Wang, Y., He, T., Ma, L., Lai, J., Shen, Z., et al. (2012).** Identification of New Delhi Metallo- β -lactamase 1 in *Acinetobacter lwoffii* of Food Animal Origin. *PLOS ONE* 7, e37152.
- Witte, W. (1998).** Medical Consequences of Antibiotic Use in Agriculture. *Science* 279, 996–997.
- Woodford, N., Wareham, D.W., Guerra, B., and Teale, C. (2014).** Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and non-Enterobacteriaceae from animals and the environment: an emerging public health risk of our own making? *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 287–291.
- Woolhouse, M., Ward, M., Bunnik, B. van, and Farrar, J. (2015).** Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *Phil Trans R Soc B* 370, 20140083.
- yaici, lydia, marisa, haenni, and veronique, métayer (2017).** Spread of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in the community through ready-to-eat sandwiches in Algeria - ScienceDirect.
- Yaici, L., Haenni, M., Saras, E., Boudehouche, W., Touati, A., and Madec, J.-Y. (2016).** blaNDM-5-carrying IncX3 plasmid in *Escherichia coli* ST1284 isolated from raw milk collected in a dairy farm in Algeria. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 2671–2672.
- Yaici, L., Haenni, M., Saras, E., Boudehouche, W., Touati, A., and Madec, J.-Y. (2016).** blaNDM-5-carrying IncX3 plasmid in *Escherichia coli* ST1284 isolated from raw milk collected in a dairy farm in Algeria. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 2671–2672.
- Yousfi, M., Touati, A., Mairi, A., Brasme, L., Gharout-Sait, A., Guillard, T., and De Champs, C. (2016).** Emergence of Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Companion Animals in Algeria. *Microb. Drug Resist.* 22, 342–346.
- Zeng, X., and Lin, J. (2013).** Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Front. Microbiol.* 4.

Références bibliographiques

Zhang, Y., Hong, P.-Y., LeChevallier, M.W., and Liu, W.-T. (2015). Phenotypic and Phylogenetic Identification of Coliform Bacteria Obtained Using 12 Coliform Methods Approved by the U.S. Environmental Protection Agency. *Appl. Environ. Microbiol.* *81*, 6012–6023.

Annexes II

Tableau I : Composition des milieux de culture utilisés en g/l

Gélose Muller Hinton	g/l
Hydrolysate acide de caséine	17.5
Infusion de viande	02
Amidon	1.5
Agar	17
PH	7.4 ± 0.2

CHROMagar orientation	g/l
Extrait de levure et peptone	17
Chromogenic mix	01
Agar	15
PH	07

Gélose EMB	g/l
Peptone de viande	10
Lactose	10
Eosine jaunâtre	0,4
Bleu de méthylène	0,067
Phosphate de potassique	02
Agar	13,5
PH	7,4

Citrate de Simmons	g/l
Ammonium dihydrogenophosphate	01
Phosphate dipotassique	01
Chlorure de sodium	05
Citrate de sodium	02
Sulfate de magnésium	0.2
Bleu de bromothymol	0,08
Agar	20
PH	6,6±0,1

Annexes II

Gélose Nutritive	g/l
Peptone de viande	10
Extrait de viande	03
Extrait de levure	03
Chlorure de sodium	05
Agar	18
PH	7,3±0,2

Gélose TSI	g/l
Extraits de viande de bœuf	03
Extraits de levure	03
Peptone	20
Chlorure de sodium	05
Citrate ferrique	0,3
Lactose	10
Saccharose	10
Glucose	01
Thiosulfate de sodium	0,3
Rouge de phénol	10,05
Agar	12
PH	7,4

Bouillon nitraté	g/l
Infusion cerveau-cœur	25
Nitrate de potassium	10
PH	7,2±0,2

Clark et Lubs	g/l
Peptone	05
Glucose 05	05
Phosphate bipotassique	05
PH	07

Réactif de Kovacs	g/l
Alcool amylique au isoamylique 150ml	150ml
Pradiméthylaminobenzaldehyde 10	10
Acide chlorhydrique concentré 50ml	50ml

Annexes II

Rouge de méthyle	g/l
Rouge de méthyle	0.5
Alcool éthylique à 60%	100ml

Eau peptonée	g/l
Peptone exempte d'indole	15 g
Chlorure de sodium	5g
PH	7.2±2

Urée indole	g/l
L-phosphate	3g
Phosphate monopotassique	1g
Chlorure de sodium	5g
Urée	20g
Alcool a 95	10ml
Rouge de phénol	0.025g
PH	7

Coloration de Gram

1. Préparation d'un frottis

En effectuant une fixation simple à l'eau et à la flamme selon les indications:

- Sur une lame, déposer une goutte d'eau stérile
- prélever stérilement les bactéries à partir de la boîte de Pétri à l'aide d'une anse de platine et la déposer sur la lame .
- Puis dissociation de la colonie dans la goutte d'eau ensuite étaler par mouvement de va et vient le frottis doit être homogène
- la fixation se fait par la chaleur : on passe la lame sous la flamme de bec Bunsen environ 3 fois le frottis doit être complètement sec.

2. Coloration du frottis

- inonder le frottis fixé par violet de gentiane et laissé agir pendant 1 min
- incliner légèrement la lame et rincer doucement à l'eau distillée
- inonder doucement le frottis avec lugol et laissé reposer pendant 1min
- incliner et rincer doucement avec de l'eau distillée
- décolorer le frottis par l'alcool / acétone 10 à 15 secondes, incliner la lame et appliquer de l'alcool jusqu'à ce que le liquide soit clair.
- rincer immédiatement avec de l'eau
- inonder le frottis avec la fuchsine (contre-coloration) laisser reposer pendant 1min
- incliner légèrement la lame et rincer doucement à l'eau puis la lame et sécher avec du papier absorbant
- l'observation sous microscope optique à l'huile à immersion (objectif X100)

Résumé

L'objectif de cette étude était l'isolement et l'identification des bactéries multirésistantes aux antibiotiques, de bacille à Gram négatif résistant aux C3G et aux carbapénèmes à partir de différentes denrées alimentaires (viande, lait, poulet, abats, merguez)

Un total de 138 échantillons a été collecté au niveau des commerces et marchés de la wilaya de Bejaïa. Après isolement des souches sur Mac Conkey, leur sensibilité a été testée par la méthode de l'antibiogramme par diffusion sur gélose MH.

Les phénotypes de résistance aux β -lactamines ont été déterminés par l'utilisation des tests phénotypiques y compris DD-test, DD-test avec cloxacilline et tes MCIM.

La caractérisation phénotypique a montré que 14 souches étaient probablement productrices de BLSE et 34 souches productrices d'une AmpC et 18 souches productrices d'une carbapénémase.

Les denrées alimentaires peuvent servir comme réservoir de bactéries multirésistantes.

Mot clés : BGN, BLSE, Carbapénémase, denrées alimentaires, Bejaïa

Summary

The objective of this study was the isolation and identification of antibiotic-resistant bacteria, Gram-negative bacilli resistant to C3G and carbapenems from different foodstuffs (meat, milk, chicken, offal, merguez).

A total of 138 samples were collected at the level of the shops and markets of the wilaya of Bejaïa. After isolation of the strains on Mac Conkey, their sensitivity was tested by the method of the antimicroscopy by diffusion on MH agar.

The β -lactam resistance phenotypes have been determined by the use of phenotypic tests including DD-test, DD-test with cloxacillin and MCIM.

Phenotypic characterization showed that 13 strains were likely producing ESBL and 34 strains producing an AmpC and 16 strains producing a carbapenemase. Foods can be used as a reservoir of multidrug-resistant bacteria.

Key words: BGN, ESBL, Carbapénémase, foodstuffs, Bejaïa