

République Algérienne Démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université Abderrahmane Mira
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de microbiologie

Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie
Moléculaire et Médicale

Thème

*Evaluation de la contamination des
végétaux issus du marché par des souches
d'entérobactéries résistantes
aux β -lactamines*

Présenté par :

M^{lle} BOUKHEDAMI Safia.

Devant le jury composé de :

Président : M^r Kati D-E.

Promoteur : M^r TOUATI A.

Examineur 1 : M^{me} Yanat B.

Examineur 2 : M^{me} Tafoukt R.

Promotion 2013 /2014

Remerciements

Mes remerciements s'adressent à mon promoteur Pr. A. TOUATI et à ma co-promotrice Mme ZEKAR F. pour avoir dirigé ce travail.

Je remercie également les membres du jury pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens aussi à remercier toute l'équipe du Pr. A. TOUATI pour leurs conseils, aides et disponibilité.

Dédicaces

« Louange à Allah pour m'avoir donné le courage de réaliser ce travail »

Ce travail est dédié tout d'abord à mes parents qui m'ont apporté tout leur amour, soutiens et compréhension.

A mes frères adorés Abderrahmane Amine et Abdelghani Rayane.

A ma sœur chérie Nyno.

A toutes ma famille, mes grands-parents, mes oncles et leur femmes, mes tantes et leur maris et mes supers cousins et cousines.

A mes amis : Sarah, Fazia, Lola, Fahima et toutes les autres pour votre soutiens

A Mr TOUATI et Ferial

A toute la promotion des « MMM » 2014

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Introduction.....1

Materiels et méthodes

I-Isolements des souches4

I-1.Prélèvements.....4

I-2. Isolement des entérobactéries6

I-3. Isolements de *Salmonella*6

II-Identification des souches7

III-Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques7

IV- Détermination des phénotypes de résistance aux β -lactamines.....8

Résultats

I-Souches bactériennes11

II- Etude de la sensibilité aux antibiotiques.....11

III- Détermination des phénotypes de résistance aux β -lactamines..... 14

Discussion et Conclusion.....15

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

ADH : Arginine-**D**ihydrolase
AMC : **A**moxicilline-**C**lavulanate
Amp C : Céphalosporinase de classe C
AMY : **A**mygdaline
ARA : **A**rabinose
ATM : Aztréonam
BLSE : β -lactamase à spectre étendu
C1G : Céphalosporine de première génération
C2G : Céphalosporine de deuxième génération
C3G : Céphalosporine de troisième génération
CAZ : Céftazidime
COT : Cotrimoxazole
CTX : Céfotaxime
CTX-M : Céfotaximase-**M**unich
DD-test : **D**ouble **D**isc **T**est
EDTA : Acide Ethylène **D**iamine **T**étra **A**cétique
ERT : ertapéneme
GEL : **G**élatine
GLU : Glucose
H₂S : Sulfure di-**H**ydrogène
IND : Indole
INO : **I**nositol
LDC : Lysine-**D**écarboxylase
Man : Mannitol
MEL : **M**élobiose
NAL : Acide **n**alidixique
ODC : Ornithine-**D**écarboxylase
ONPG : **O**rthonitrophényl-**D**-**G**alactopyranoside
RHA : Rhamnose
SAC : **S**accharose
SOR : Sorbitole
TDA : Tryptophane-**D**ésaminase
TOB : Tobramycine
TR : Triméthoprime
TSI : Triple Sugar **I**ron
URE : Urée
VP : Voges **P**roskauer

Liste des figures

Figure 01 : Représentation schématique des flux de bactéries résistantes et des antibiotiques entre les différents environnements.....	2
Figure 02 : Disposition des disques d'antibiotiques.....	9
Figure 03 : Test de Hodge modifié pour la détection de carbapénémase.....	10
Figure 04 Représentation schématique du test d'inhibition à l'EDTA.	10
Figure 05 : Résultats de la galerie API 20E de <i>Citrobacter freundii</i>	11
Figure 06 : Taux de résistance des souches isolées aux antibiotiques testés.....	12
Figure 07 : Image de l'Hodge test positif pour la souche <i>Enterobacter cloacae</i>	14

Introduction

Les aliments sont à l'origine de plusieurs maladies en raison des agents pathogènes qu'ils peuvent contenir dont les principaux sont *Escherichia coli* et *Salmonella*. En effet, les maladies diarrhéiques tuent environ 1,9 millions de personnes par an dans le monde. Cette situation considérée comme un problème majeur de santé publique touche approximativement un tiers de la population des pays développés (Hassanain *et al.*, 2013). Les Fruits et légumes frais peu transformés représentent une part importante de l'alimentation humaine (Warning et Datta, 2013). Ces derniers contaminés par des bactéries pathogènes sont de plus en plus incriminés dans des maladies et engendrent l'augmentation des taux de mortalité et morbidité et des pertes financières sont importantes (Skočková *et al.*, 2013).

Les entérobactéries sont retrouvés dans les intestins des animaux et des êtres humains aussi bien que dans le sol, l'eau, les fruits et légumes (Becker *et al.*, 2009). Les membres de cette famille ne sont pas à négliger du point de vue médical car certains d'entre eux sont à l'origine d'épidémies citons : l'épidémie d'*Escherichia coli* O157:H7 due à l'ingestion d'épinards contaminés en 2006 aux Etats-Unis et qui a engendré 3 morts et 102 hospitalisations et l'épidémie de *Salmonella* due à la consommation de graines de luzerne germées contaminées et qui a causé 125 cas d'infection entre 2010 et 2011 (Warning et Datta, 2013).

Les espèces d'Entérobactéries résistantes aux antibiotiques retrouvées le plus souvent sur la surface des légumes sont les espèces du genre *Enterobacter*, *Pantoea*, *Klebsiella* et *Salmonella*. Le fait que des bactéries résistantes aux antibiotiques d'origines animales peuvent se propager et persister dans la phyllosphère pose un problème majeur de santé publique (Fernández Fuentes *et al.*, 2014).

Les hypothèses de la contamination de ces végétaux sont diverses, dont la plus importante est leur capacité de persister dans le sol ou le fumier (Pourcher *et al.*, 2014). L'eau d'irrigation peut aussi être une importante source de contamination car les micro-organismes s'y trouvant sont introduits directement dans les tissus de la plante. (Warriner *et al.*, 2009). A côté de toutes ces sources, les fruits et légumes peuvent se contaminer tout au long des étapes de leur transport de la ferme jusqu'au marché, a commencé par l'hygiène des travailleurs lors de la récolte, les conditions de transport et le libre choix laisser aux clients qui peuvent être aussi des porteurs de bactéries résistantes (Taban et Halkman, 2011)

La transmission des mécanismes de résistance par le transfert de gènes de résistance a entraîné la diffusion des bactéries résistantes aux antibiotiques chez l'Homme, l'animal et l'environnement comme indiqué dans la figure 01, les bactéries vont d'un compartiment à

l'autre par différents moyens comme les eaux usées, les déchets divers contaminés pas les bactéries résistantes, l'Homme est contaminé par les aliments d'origine végétale ou animale (Blaak *et al.*, 2014).

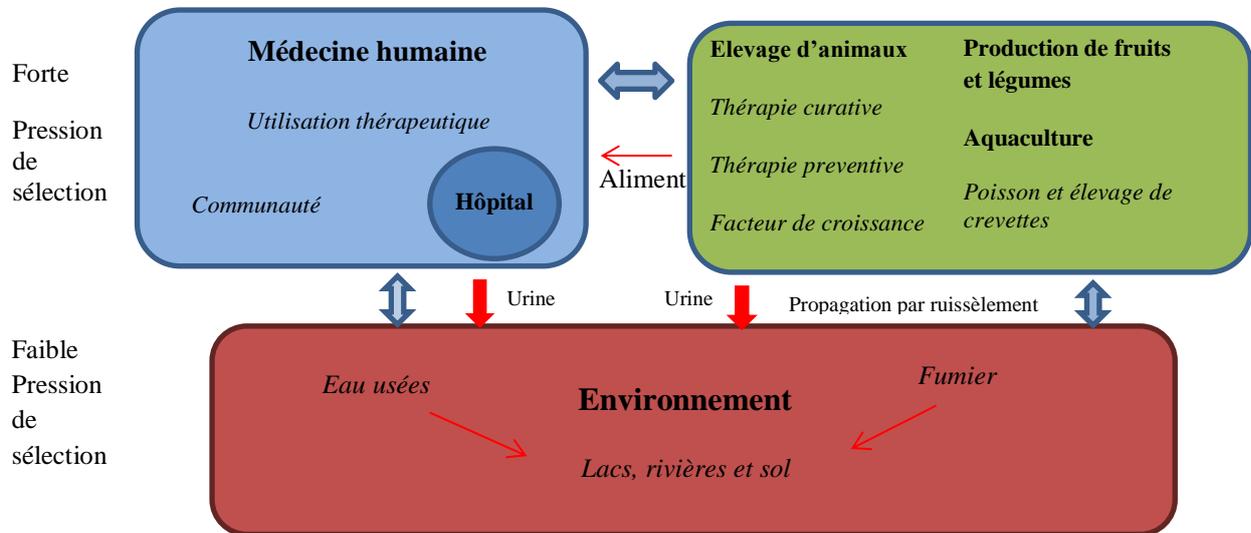


Fig. 01 : Représentation schématique des flux de bactéries résistantes et des antibiotiques entre les différents environnements. Les flèches bleues et rouges représentent respectivement les bactéries résistantes et les antibiotiques. (Andersson et Diarmaid, 2012).

La résistance aux antibiotiques peut être naturelle ou acquise et la transmission des gènes de résistance peut se faire verticalement ou horizontalement par différents mécanismes parmi eux la conjugaison, la transformation et la transduction (Alanis, 2005).

Selon la résistance naturelle aux β -lactamines chez les espèces d'entérobactéries

La famille des entérobactéries a acquis une résistance aux céphalosporines de troisième génération. Cette résistance est souvent due à la production d'une β -lactamase à spectre étendu (BLSE) ou d'une β -lactamase de type AmpC (Little *et al.*, 2012). Ces β -lactamases confèrent une résistance à toutes les β -lactamines. De plus, les gènes codants pour ces enzymes sont souvent localisés sur des supports plasmidiques qui véhiculent d'autres gènes de résistance à d'autres familles d'antibiotiques comme les aminosides et les quinolones peuvent être contenus sur le même plasmide (Alanis, 2005).

La recherche effectuée sur PubMed en utilisant les mots clés suivants : Enterobacteriaceae resistance, fruits, vegetables a donné des articles ayant étudié la contamination des végétaux par *Enterobacter sakazakii* et le mécanisme de son attachement aux surfaces des fruits et légumes (Beuchat et al., 2009) , Van Overbeek et al., (2014) dans le même contexte que le précédant sauf que l'étude s'est élargie sur la familles des entérobactéries et l'étude des gènes qui confère l'adaptation de la phytosphère, une troisième étude effectuée par Viswanathan et Kaur (2001) a consisté à évaluer la prévalence des bactéries aérobies dans les fruits et légumes. Skočková et al. (2013) ont étudié la contamination des végétaux par des *E.coli* en République tchèque et sa résistance à différentes familles d'antibiotiques. Une étude en Arabie saoudite a été réalisée par Hassan et al. (2011) dans l'objectif de l'évaluation de la charge bactérienne des fruits et légumes et l'étude de leur sensibilité aux antibiotiques. Sur tous les résultats obtenus sur pubmed, l'étude rapporté par Boehme et al. (2004) est celle qui se rapproche de notre étude. Cette recherche bibliographique montre le manque d'études effectuée et focalisé sur les entérobactéries résistantes aux antibiotiques contaminants les végétaux.

Une grande attention a été accordée au rôle des aliments d'origine animale dans l'acquisition et la persistance de la résistance aux antibiotiques chez l'Homme. Les végétaux ont été sous-estimés quant à la diffusion de bactéries résistantes. Cependant les épidémies dues à l'ingestion de fruits et légumes ont incité à la recherche des bactéries pathogènes dans (Bezanson et al., 2008)

L'objectif de notre travail est d'évaluer la contamination des végétaux par les souches d'entérobactéries résistantes aux β -lactamines et la caractérisation de leur phénotypes de résistances aux β -lactamines suivant les étapes cci-dissous :

- Isolement des souches à partir de fruits et légumes récoltés du marché ;
- Identification des souches ;
- Etude de la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées ;
- Détermination des phénotypes de résistance aux β -lactamines.

Matériel
et
Méthodes

I-Isolement des souches

I-1.Prélèvements

Les fruits et légumes provenant des marchés de la région de Bejaia sont choisis aléatoirement et recueillis dans des sacs stériles puis acheminer directement au laboratoire.

Tableau I, II et III : Informations sur le type d'échantillon, leurs origines et la date de prélèvements.

Tableau I : Les fruits et légumes ont été prélevé au niveau du Marché de Bejaia le 06/01/2014.

Vendeur	Type d'échantillon	Nombre d'échantillon	Origine
N°01	Tomates/Poivrons	1	Sahara
N°02	Navet/Salade/Pomme/carotte/tomate/Betterave/ Fenouil	1	Alger/Tipaza/Tipaza/ Médea/Ain Dafla/ Alger/Alger
N°03	Fenouil/Carotte/Navet	1	Akbou
N°04	Date	1	Biskra
N°05	Navet/Pomme/Salade	1	Sahara/Blida
N°06	Poivrons/Piments/Salade/tomate	1	Biskra
N°07	Cèleri/Menthe/Salade/Persil	1	Biskra
N°08	Carotte/Poivron/Piment	1	Sahara
N°09	Tomate/Poivron	1	Oued Souf
N°10	Menthe/Persil	1	Biskra
N°11	Tomate/Piment/Poivron	1	Sahara
N°12	Salade	1	Sahara
N°13	Fenouil/Carotte/Salade	1	Khmis El Khachna
N°14	Pomme	1	Alger
N°15	Carotte/Salade/Fenouil	1	Alger
N°16	Piment/Piment kabyle	1	Beskra
N°17	Date	1	Tolga

Matériel et méthodes

N°18	Persil	1	
N°19	Pomme	1	
N°20	Betterave	1	Sétif

Tableau II : Les fruits et légumes ont été prélevés au niveau du Marché Edimco-Bejaia le 03/02/2014.

Vendeur	Type d'échantillon	Nombre d'échantillon	Origine
N°01	Piment/Tomate	1	Sahara
N°02	Carotte	1	
N°03	Pomme	1	Tiarete
N°04	Pomme rouge	1	Médéa
N°05	Betterave/Carotte/Fenouil	1	Alger/Ain Dafla/Ain Dafla
N°06	Carotte/Tomate/Salade/Fenouil	1	Alger/Sahara/Ain Dafla/Alger
N°07	Pomme	1	Blida
N°08	Tomate/Poivron/Piment	1	Biskra
N°09	Salade/Concombre	1	Sahara
N°10	Carotte	1	Boussaada
N°11	Tomate	1	Biskra
N°12	Poivron/Piment/Tomate	1	Biskra
N°13	Tomate/Salade	1	Sahara
N°14	Poivron/Piment/Salade	1	Biskra
N°15	Piment/Poivron	1	Biskra
N°16	Fenouil/Carotte/Salade/Tomate/Carotte	1	Alger/Alger/Alger/Alger/Oued Souf
N°17	Tomate/ Céleri	1	Tolga-Beskra
N°18	Piment/ Concombre	1	Biskra

Tableau III : Les fruits et légumes ont été prélevés chez un vendeur à Bejaia le 11/02/2014.

Vendeur	Type d'échantillon	Nombre d'échantillon	Origine
Vt	Poivron/Piment/Persil/Tomate/Celeri	1	Biskra
Vt	Betterave/Salade/Pomme	1	Alger
Vt	Pomme verte/Pomme rouge	1	Etranger
Vt	Concombre/Carotte	1	Inconnue

I-2. Prés-enrichissement :

Dans le sac contenant le fruit ou légume est ajouté 100 ml d'eau peptonée tamponnée (EPT), puis on agite pendant 1 à 2 minutes. Ceci est effectué pour la tomate, le poivron, le piment, l'orange, la pomme et les carottes. Ensuite, les suspensions sont récupérées dans des flacons et mit à 37 °C pendant 18 heures (Campos *et al.*, 2013).

Pour le persil, la menthe, le céleri, le fenouil et la laitue, trois feuilles de chaque légume sont déposées dans un sac stérile avec 100 ml d'EPT puis mit à 37°C pendant 18 heures.

I-3. Isolement des entérobactéries et enrichissement des *Salmonella* :

- L'isolement des entérobactéries s'effectue sur une gélose MacConkey additionnée de 4 µg/ml de ceftazidime. L'ensemencement se fait en prélevant 100µl de l'EPT ensemencé auparavant et de l'étaler à l'aide d'une pipette Pasteur en forme de râteau puis incubé à 37°C pendant 24 heures (Campos *et al.*, 2013).
- Pour l'enrichissement en vue de la recherche des *Salmonella*, 1 ml de la suspension d'EPT est mis dans 9 ml de bouillon Rappaport Vassiliadis et incubé à 41,5°C pendant 24 à 48 heures.

I-4. Isolement à partir du bouillon Rappaport Vassiliadis:

Après 24 heures d'incubation et s'il y a virage de la couleur du milieu Rappaport Vassiliadis du bleu vers un bleu vert ou jaune, 10 µl de la suspension est ensemencé en stries sur une gélose Hektoen à 37°C pendant 24 heures. Si le bouillon n'as pas viré vers le vert la durée d'incubation est prolongée à 48 heures (Micallef *et al.*, 2012).

Un repiquage des souches obtenues est effectuées afin de purifier les souches qui ont des aspects macroscopiques différents et d'établir une identification et d'autres tests de sensibilité aux antibiotiques.

II-Identification des souches

L'identification des souches est réalisée par galerie API 20E (BioMérieux). Les étapes de l'ensemencement sont les suivantes :

- A partir d'une culture pure, on prépare une suspension bactérienne dans 5 ml d'eau physiologique.
- On réunit fond et couvercle d'une boîte d'incubation et on répartit environ 5 ml d'eau distillé dans les alvéoles pour éviter que le milieu ne dessèche, puis on place la galerie dans la boîte d'incubation.
- On remplit les microtubes avec la suspension bactérienne, pour les tests CIT, VP et GEL on remplit en plus des microtubes les cupules.
- De l'huile de paraffine est ajoutée aux tests ADH, LDC, H₂S et URE.
- On remet le couvercle de la boîte d'incubation et on incube à 37°C pendant 18 à 24 heures.
- La lecture de la galerie peut se faire si trois tests sont positifs, on note sur la fiche des résultats toutes les réactions spontanées puis on ajoute les réactifs aux tests de TDA, VP et indole. S'il y a moins de trois tests positifs, la période d'incubation est prolongée jusqu'à 48 heures.
- On note aussi sur la fiche le 21^{ème} test qui est l'oxydase.
- Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois, en additionnant les chiffres de chaque groupe on obtient 7 chiffres qui constitue un code, lorsque le 21^{ème} test est positif on lui attribue le chiffre 4.
- L'identification est obtenue en introduisant le code dans une base de données ou les résultats des réactions dans un logiciel d'identification Apident.

III-Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques des souches d'*Entérobactéries* a été étudiée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller-Hinton selon les recommandations du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). La méthode

d'ensemencement se fait avec un écouvillon à partir d'une suspension bactérienne issue d'une culture pure. L'incubation se fait à 37°C pendant 18 à 24 heures. Les antibiotiques testés sont donnés dans le tableau N°I.

Tableau II : Listes des antibiotiques testés.

Antibiotique	Abréviations	Charge (µg)	Résistant	Sensible
Amoxicilline-clavulanate	AMC	20/10	≤ 13	≥ 18
Ceftazidime	CAZ	30	≤ 17	≥ 21
Cefotaxime	CTX	30	≤ 22	≥ 26
Cefepime	FEP	30	≤ 14	≥ 18
Aztreonam	ATM	30	≤ 17	≥ 21
Cefoxitine	FOX	30	≤ 14	≥ 18
Ertapeneme	ETP	10	≤ 18	≥ 22
Imipeneme	IMP	10	≤ 19	≥ 23
Tobramycine	TOB	10	≤ 12	≥ 15
Amikacine	AK	30	≤ 14	≥ 17
Tetracycline	TET	30	≤ 11	≥ 15
Trimethoprim- sulfamethoxazole	SXT	1.25/23.75	≤ 15	≥ 10
Acide nalidixique	NAL	30	≤ 13	≥ 19
Ciprofloxacine	CIP	5	≤15	≥ 21

IV- Détermination des phénotypes de résistance aux β-lactamines

❖ Test de synergie (DD-test)

La production d'une BLSE a été détectée par l'épreuve de synergie qui consiste à placer des disques de ceftazidime, cefotaxime, céfépime et aztreonam (30µg chacun) à une distance de 20 mm (centre à centre) d'un disque d'amoxicilline/clavulanate (AMC) (20/10 µg). La présence d'une BLSE se traduit par l'apparition d'une synergie entre le disque de l'AMC et les quatre autres disques (Jarlier et *al.*, 1988).



Figure 02 : Disposition des disques d'antibiotiques pour le DD-test.

❖ Test de Hodge modifié

La détection de la production de carbapénémase a été effectuée par le test de Hodge. Des boîtes de Pétri contenant la gélose MacConkey additionnée de 100 µg/ml ZnSO₄ sont ensemencées avec une souche d'*Escherichia coli* ATCC 25922. Un disque d'ertapénème contenant 10 µl de cloxacilline est déposé au milieu de la boîte. Les souches à tester sont ensemencées sous formes de stries déposés à partir du disque d'ertapénème jusqu'à la périphérie de la boîte en présence d'un témoin positif *Klebsiella pneumoniae* ATCC 1087 et d'un autre négatif *E. coli* ATCC 25922. Le test de Hodge est interprété comme positif par la présence d'une distorsion de la zone d'inhibition à l'intersection entre une strie et la culture d'*E.coli* (Lee *et al.*, 2010).

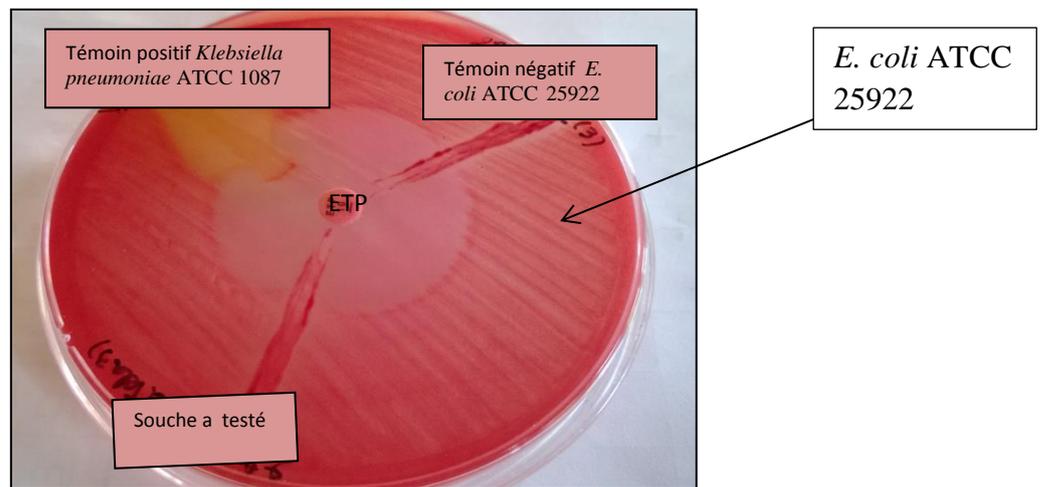


Figure 03 : Test de Hodge modifié pour la détection de carbapénemases.

❖ Test d'inhibition à l'EDTA

Les diamètres des zones d'inhibition autour des disques d'ERT et d'ERT+ 5 μ l EDTA (0.5M, pH8) sont mesurés et comparés entre eux. Les souches dont le diamètre d'inhibition autour du disque ERT+EDTA est supérieur à celui obtenu avec le disque d'ERT seul d'au moins 6 mm sont considérées comme productrice de metallo- β -lactamase (Young et *al.*, 2002).

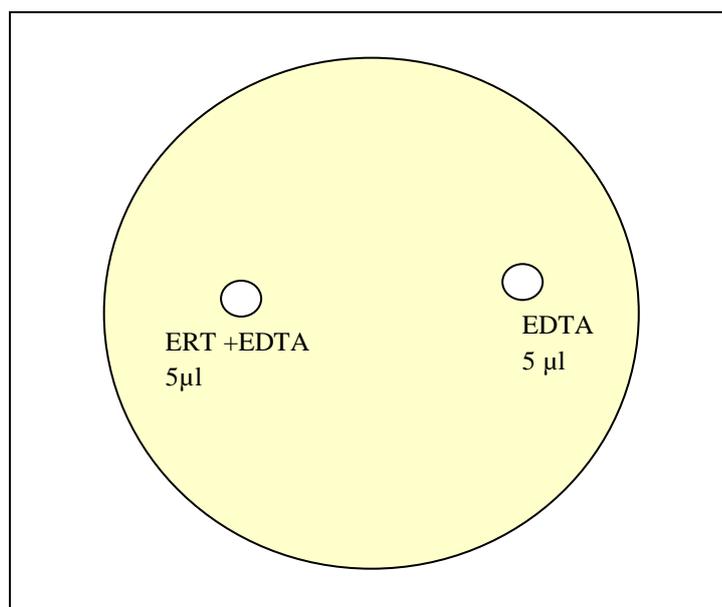


Figure 04 : Représentation schématique du test d'inhibition à l'EDTA.

Résultats

I-Souches isolées

Au cours de notre études 98 échantillons de fruits et légumes achetés au niveau des marchés ont été analysés incluant des échantillons incluant des tomates (n=14), laitues (n=13), piments (n=12), carottes (n=11), pommes (n=10), poivrons (n=10), fenouils (n=7), betteraves (n=4), persil (n=4), navets (n=3), Menthe (n=2), date (n=2), cèleri (n=3) et concombre (n=3).

A partir de ces 98 échantillons, 10 souches d'*Entérobactéries* ont été isolées sur gélose MacConkey additionnée de 4µg/ml de ceftazidime et identifiées par galeries API 20E (Figure 05). Les souches identifiées sont par ordre de fréquence : *Enterobacter cloacae* (n=3), *Enterobacter sakazakii* (n=1), *Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae* (n=2), *Klebsiella pneumoniae subsp ozaenae* (n=2) et *Citrobacter freundii* (n=2).

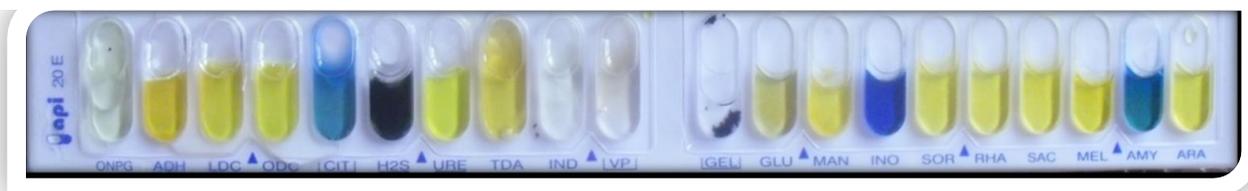


Figure (05) : Résultats de la galerie API 20E de *Citrobacter freundii*.

II- Etude de la sensibilité aux antibiotiques

Les dix souches isolées sont résistantes à l'amoxicilline/ acide clavulanique, cefotaxime et ceftazidime. Elles sont toutes résistantes à la ceftoxitine à l'exception d'une souche de *Klebsiella pneumoniae*, sept souches ont été retrouvé résistantes à l'ERT.

Toutes les souches sont sensibles à la FEP, CIP et AK (Figure 06).

Les résultats de la sensibilité des souches aux antibiotiques sont donnés dans le tableau II.

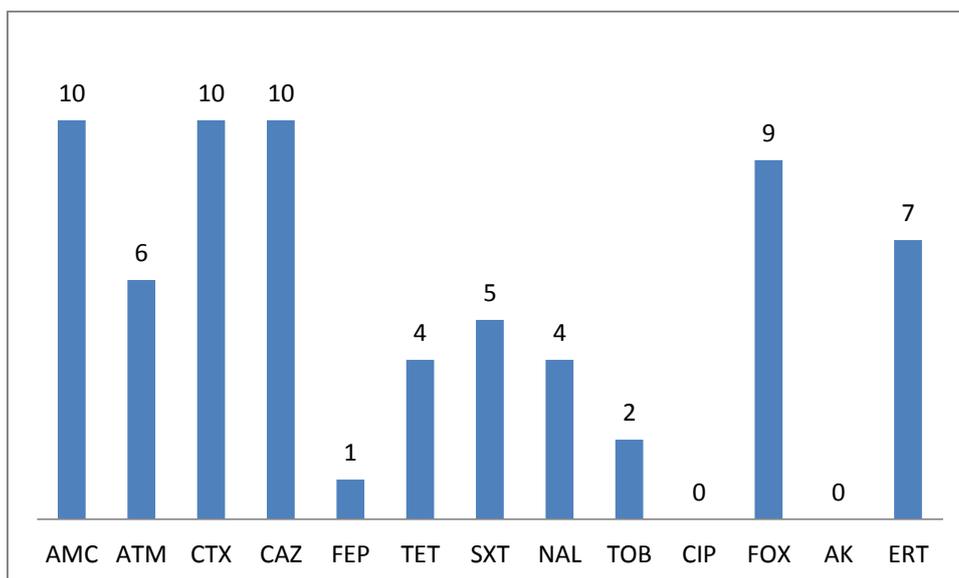


Figure (06) : Taux de résistance des souches isolées aux antibiotiques testés.

Tableau II: Tableau d'identification et des antibiogrammes des souches isolées

CODE	AMC	ATM	CTX	CAZ	FEP	TET	SXT	NAL	TOB	CIP	FOX	AK	ERT	Synergie	Hodge test	EDTA	Identification (%)
A	6 (R)	21 (S)	15,5 (R)	8 (R)	29,5 (S)	25 (S)	31 (S)	17,5 (I)	20 (S)	37 (S)	6 (R)	25 (S)	18 (R)	-	-	/	<i>Enterobacter cloacae</i> 97.2
T	6 (R)	17 (R)	6 (R)	6 (R)	26 (S)	6 (R)	6 (R)	18 (I)	21 (S)	34 (S)	6 (R)	24,5 (S)	15,5 (R)	-	-	/	<i>Enterobacter cloacae</i> 97.5
J	6 (R)	22 (S)	13 (R)	14 (R)	32 (S)	23 (S)	28 (S)	27 (S)	15,5 (S)	38 (S)	6 (R)	23 (S)	19 (I)	-	/	/	<i>Enterobacter sakazakii</i> 75.3
R	7,5 (R)	13,5 (R)	13,5 (R)	15,5 (R)	23,5 (S)	21,5 (S)	21,5 (S)	20 (S)	17,5 (S)	27,5 (S)	8,5 (R)	22 (S)	16,5 (R)	-	+	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
Q	6 (R)	18 (I)	13 (R)	7,5 (R)	27,5 (S)	25,5 (S)	31 (S)	25 (S)	15 (S)	31 (S)	6 (R)	23 (S)	26 (S)	-	-	/	<i>Citrobacter freundii</i> 99.9
D	6 (R)	18,5 (I)	7 (R)	6 (R)	29 (S)	6 (R)	6 (R)	19 (S)	19 (S)	27,5 (S)	6 (R)	28 (S)	26,5 (S)	-	/	/	<i>Citrobacter freundii</i> 99.1
V	6 (R)	26 (S)	13,5 (R)	14,5 (R)	31 (S)	24,5 (S)	34 (S)	23 (S)	19,5 (S)	38 (S)	6 (R)	24 (S)	14 (R)	-	-	/	<i>KP. Spp ozaenae</i> 74.5
W	6 (R)	9,5 (R)	6 (R)	6 (R)	20,5 (S)	6 (S)	6 (R)	15,5 (I)	14,5 (I)	26 (S)	6 (R)	22 (S)	15 (R)	-	-	/	<i>KP. Spp ozaenae</i> 100
B	6 (R)	23 (S)	20,5 (R)	15 (R)	30 (S)	6 (R)	6 (R)	14,5 (I)	16 (S)	23 (S)	6 (R)	21 (S)	19,5 (I)	-	-	/	<i>K.P.spp pneumoniae</i> 98.7
U	6 (R)	10 (R)	6 (R)	9 (R)	17,5 (I)	6 (R)	6 (R)	20 (S)	6 (R)	29,5 (S)	21 (S)	21 (S)	23,5 (S)	-	-	/	<i>KP. Spp pneumoniae</i>

NT: non testé, *K.P ssp pneumoniae*: *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae*.

III- Détermination des phénotypes de résistance

✓ Test de synergie

Le DD-test est négatif pour toutes les souches.

✓ Hodge test

Le Hodge test est positif pour la souche (R) d'*Enterobacter cloacae*.

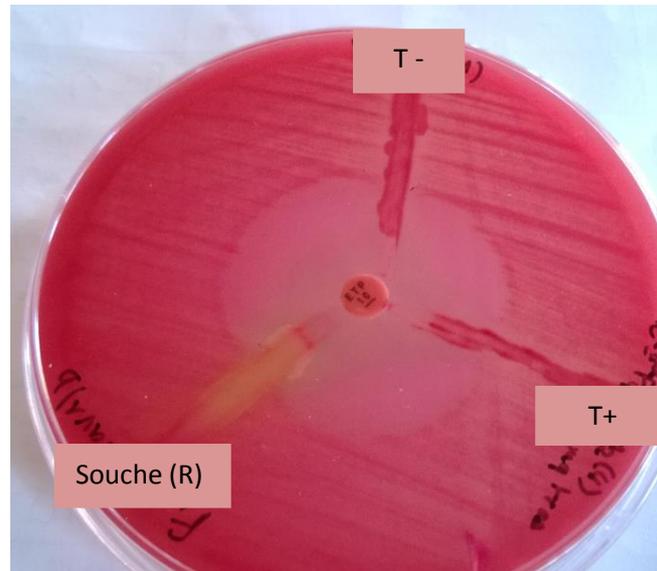


Figure (07) : Image de l'Hodge test positif pour la souche d'*Enterobacter cloacae*.

✓ Test à l'EDTA

Le test à l'EDTA est négatif pour la souche (R).

Discussion
et
Conclusion

Sur les deux décennies passées, la résistance chez les entérobactéries a émergé de façons spectaculaires (Fernández Fuentes *et al*, 2014). Différents vecteurs peuvent faire circuler les bactéries résistantes aux antibiotiques ce qui fait qu'elles sont retrouvées dans les fruits et légumes (Warning *et al.*, 2012). Les entérobactéries tels que *K.pneumoniae*, *E.cloacae* sont des bactéries fécales le fait de les trouver sur la surface des végétaux peut supposer que ces derniers ont été contaminés par la matière fécale des animaux au cours du processus de fertilisation du sol, tout comme elles peuvent issue du sol ou de l'eau d'irrigation (Veldman *et al.*, 2014).

Si l'on compare nos résultats a ceux de Bendaoud et Metrouh (2013) le taux de *K.pneumoniae* isolées est de 60.86% alors que dans notre travail est a été de 40% cette différence peut être expliqué par le fait est que les prélèvements ont été effectué en été en ce qui concerne Bendaoud et Metrouh alors que notre étude c'est déroulé en hiver. Sachant que les entérobactéries sont des bactéries mésophiles. En comparant toujours avec la même étude le taux d'Enterobacter est de 2% contre 40% dans la nôtre. En ce qui concerne *Citrobacter freundii* il est plus élevé dans les travaux de Bendaoud et Metrouh avec un taux de 30% alors que dans notre étude il est de 20%. Plusieurs facteurs peuvent influencer la différence d'isolement des entérobactéries en termes d'espèces et en termes de taux car à côté des périodes de prélèvements la résistance aux antibiotiques joue un rôle puisque le milieu d'isolement est additionné de ceftazidime.

Cette étude montre une importante présence des entérobactéries résistantes aux β -lactamines se trouvant sur les fruits et légumes. Le risque majeur qui peut être rencontré dans l'ingestion de ces végétaux crus est la dissémination des gènes de résistances, entre autre les β -lactamases. Lors de la présence dans les intestins, les entérobactéries ingérées avec les végétaux crus peuvent transférer leurs gènes de résistances aux bactéries commensales qui sont aussi des germes opportunistes (Blaak *et al.*, 2013). Les résultats de notre étude sont en corrélation avec ceux de Blaak *et al.* (2013) qui rapporte l'isolement des espèces d'Enterobacter et Citrobacter productrices d'une AmpC constitutive déreprimée.

Dans notre étude l'agent sélectif utilisé dans les milieux d'isollements est la ceftazidime, selon Blaak *et al.* (2014) cet antibiotique réduit significativement la croissance des non-entérobactéries, a comparé au cefotaxime, cependant la ceftazidime inhibe la croissance des entérobactéries de l'environnement productrices de BLSE par exemple les plus précoces

comme CTX-M-1. Ceci pourrait justifier qu'aucune entérobactérie productrice de BLSE n'as était isolé dans notre travail.

Aucun article n'a été trouvé sur l'isolement de souches productrices de carbapénemases provenant des végétaux, cependant Nordmann et Carrer (2010) rapportent que les premières carbapénemases ont été retrouvées chez les espèces du genre *Enterobacter* d'origine environnementale ceci pourrait suggérer que la souche d'*Enterobacter cloacae* isolé provient du sol.

Les travaux de Falomir et al. (2010) rapportent un faible pourcentage de résistance au cefotaxime soit 2.83%, seulement 0.94% de souches sont résistantes à la ceftazidime, alors que dans notre étude toutes les souches résistent à l'amoxicilline/acide clavulanique, aux céphalosporines de troisième génération et 70% résistent à la cefoxitine.

Peu d'étude rapporte la résistance des *Citrobacter freundii* se trouvant sur la surface des végétaux mais leur présence a été citée par Falomir et al. (2010) *Citrobacter freundii* fait partie du groupe 3 des *Entérobactéries*, cette espèce possède une céphalosporinase inducible de bas niveau AmpC résistante aux inhibiteurs de β -lactamases comme l'acide clavulanique. Selon son profil de résistance elle pourrait être productrice d'une céphalosporinase.

Malgré les épidémies causées par les entérobactéries, la sensibilisation et les points de contrôle des fruits et légumes ne sont pas suffisamment mis au point et les méthodes de destruction de ces bactéries ne s'avèrent pas efficaces même dans les pays développés.

L'étude que nous avons menée montre que les entérobactéries sont non seulement présentes dans les végétaux mais portent des déterminants de la résistance qui pourraient être la cause d'épidémies comme déjà décrit. Cette propagation de bactéries multirésistantes devient un vrai problème de santé publique. C'est pour cela qu'il faut renforcer les mesures d'hygiène et établir des points de contrôles des aliments frais. En perspectives cette étude est préliminaire et nécessite d'être complétée par :

- ✓ Une étude des bactéries contaminant les végétaux sur un plus large échantillonnage.
- ✓ Une étude moléculaire des gènes de résistance portés par les bactéries contaminant les fruits et légumes.
- ✓ L'étude épidémiologique des souches afin de trouver la source de contamination.

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

Andersson A. et Diarmaid H. (2012). Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. Drug Resistance Updates. Volume 15. 162-172.

Alanis A-J. (2005). Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? Archive of medical research. Volume 36 issue 6. 697-705.

Becker B., Weiss C., Holzapfel H-W. (2009). An evaluation of the use of three phenotypic test systems for biochemical identification of Enterobacteriaceae and Pseudomonadaceae. Food Control. Volume 20.815-821.

Beuchat L-R., Kim H., Gurtler J-B., Lin L-C., Ryu J-H., Richards J-M. (2009) *Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation. International journal of food microbiology. Volume 136. Issue 2. 204-213.

Bezanson G-S., MacInnis R., Potter G., Hughes T. (2008) Presence and potential for horizontal transfer of antibiotic resistance in oxidase-positive bacteria populating raw salad vegetables. International Journal of Food Microbiology. Volume 127. 37-42.

Blaak H., Van Hoek A., Veenman C., Van Leeuwen A., Lynch G., Overbeek W., Husman A. (2014) .Extended spectrum β -lactamase- and constitutively AmpC-producing Enterobacteriaceae on fresh produce and in the agricultural environment. International Journal of Food Microbiology. Volume 168-169. 8-16.

Boehme S, Werner G, Klare I, Reissbrodt R, Witte W. (2004). Occurrence of antibiotic-resistant enterobacteria in agricultural foodstuffs. Mol Nutr Food Res Volume 48. 522-531.

Campos J., Mourao J., Pestana N., Peixe L., Novais C., Antunes P. (2013). Microbiological quality of ready to eat salads : An underestimated vehicle of bacteria and clinically relevant antibiotic resistance genes, International journal of food microbiology. Volume 13. 4.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2012).

Fernández Fuentes M-A., Morente E-A., Abriouel H., Pulido R-P., Gálvez A. (2014) Antimicrobial resistance determinants in antibiotic and biocide-resistant gram-negative bacteria from organic food. Food Control. Volume 37. 9-14.

Harwalkar A., Sataraddi J., Gupta S., Yoganand R., Rao A., Srinivasa H. (2013) The detection of ESBL-producing *Escherichia coli* in patients with symptomatic urinary tract

infections using different diffusion methods in a rural setting. *Journal of Infection and Public Health*. Volume 6. 108-114.

Hassan SA., Altalhi AD., Gherbawy YA., El-Deeb BA. (2011). Bacterial load of fresh vegetables and their resistance to the currently used antibiotics in Saudi Arabia. *Foodborne pathogen disease*. Volume 8. N° 9.

Hassanain NA., Hassanain MA., Ahmed WM., Shapaan RM., Barakat AM. et El Fadaly HAM. (2013). Importance to public health from foodborne pathogens. *World Journal of Medical Sciences*. Volume 9. N°4. 208-222.

Jarlier V., Nicolas M-H., Fournier G-F., Philippon A. (1988). Extended-broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to new β -lactam agents in enterobacteriaceae: hospital prevalent and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 10, 867-878.

Koffi-Wevry R. et Gohou G. (2012). Hygiène des aliments et développement soutenable: impact du monde invisible (microscopique) sur la réduction de la pauvreté. Université D'abobo-adjamé. P. 14-15.

Little M-L., Qinc X., Zerra D-M., Weissmana S-J. (2012). Molecular diversity in mechanisms of carbapenem resistance in paediatric Enterobacteriaceae. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Volume 39. 52-57.

Micallef S-A., Rosenberg R-E., Ashish G., Kleinfelter L., Boyer Marc S., Laughlin C., Estrin A., Ewing L., Junia J-G., Hanes Darcy E., Kothary M-H., Bend T., Razek J-H., Joseph S-W, Sapkota A. (2012). Occurrence and antibiotic resistance of multiple Salmonella serotypes recovered from water, sediment and soil on mid-atlantic tomato farms. *Environmental research*. Volume 114. 31-39.

Pourcher A-M., Jadas-Hécart A., Cotinet P., Dabert P., Ziebal C., Le Rouxa S., Moraruf R., Heddadj D., Kempf I. (2014). Effect of land application of manure from enrofloxacin-treated chickens on ciprofloxacin resistance of Enterobacteriaceae in soil. *Science of the Total Environment*. Volume 482-483. 269-275.

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*. Volume 2012. Issue 445. 47-58.

Skočková A., Karpíšková R., Koláčková I., Cupáková S. (2013). Characteristics of *Escherichia coli* from raw vegetables at a retail market in the Czech Republic. *International Journal of Food Microbiology*. Volume 167. 196-201.

Taban B-M. et Halkma A-K. (2011). Do leafy green vegetables and their ready-to eat (RET) salads carry a risk of foodborn pathogens? *Anaerobe*. Volume 17, 286-287.

Van Overbeek LS, Van Doorn J, Wichers JH, Van Amerongen A, Van Roermund HJ, Willemsen PT. (2014). The arable ecosystem as battleground for emergence of new human pathogens. *Front Microbiol*. Volume 5. 104 .

Veldman K., Kant A., Dierikx C., Van Essen-Zandbergen A., Wit B., Mevius D. (2014). Enterobacteriaceae resistant to third-generation cephalosporins and quinolones in fresh culinary herbs imported from Southeast Asia. *International Journal of Food Microbiology*. Volume 177. 72-77.

Viswanathan P. et Kaur R. (2001). Prevalence and growth of pathogens on salad vegetables, fruits and sprouts. *Int J Hyg Environ Health* Volume 203. Issue 3. 205-213.

Warning A. et Datta A-K., (2013). Interdisciplinary engineering approaches to study how pathogenic bacteria interact with fresh produce. *Journal of Food Engineering*. Volume 114. 426-448.

Warriner K., Huber A., Namvar A., Fan W., Dunfield K. (2009). Recent Advances in the microbial safety of fresh fruits and vegetables. *Advances in food and nutrition research*. Volume 57 ISSN. 1043-4526.

Annexes

Annexes

Composition des milieux de culture en g pour 1L d'eau distillée

Eau peptone tamponnée

Peptone.....	10
Chlorure de sodium.....	05
Di sodium hydrogenophosphate.....	09
Potassium dihydrogenophosphate.....	1,5
PH=7,2 (+/-0,2)	

Rappaport Vassiliadis(Fluka)

Peptone de soja.....	4,5
Chlorure de sodium.....	7,2
Phosphate monopotassium.....	1,26
Phosphate dipotassium.....	0,18
Chlorure de magnésium.....	13,58
Vert de malachite.....	0,036
PH=5,2(+/-0,2)	

Mueller Hinton (HIMIDIA)

Infusion de viande de boeuf.....	300
Hydrolysate de caséine.....	17,5
Amidon.....	1,5
Agar.....	17
PH=7,3 (+/-0,1)	

Hektoen (Conda)

Peptone de viande.....	12
Lactose.....	12
Saccharose.....	12
Chlorure de sodium.....	5
Thiosulfate de sodium.....	5
Extrait de levure.....	3
Citrate d'ammonium ferrique.....	15
Sels biliaire N°3.....	9
Salicine.....	2
Acide fuchsin.....	0,1
bleu de bromothymol.....	0,064
Agar.....	14
PH=7,5(+/-0,2)	

Eau physiologique

Chlorure de sodium.....9

PH=7(+/-0,2)

Solution de thiosulfate de sodium

Thiosulfate de sodium.....0,02

TSI (Triple Sugar Iron)

Extrait de viande de boeuf.....03

Extrait de levure.....03

Peptone trypsine (peptic digest of animal tissue).....20

Chlorure de sodium.....05

Citrate ferrique.....0,3

Lactose.....10

Glucose.....01

Saccharose.....10

Thiosulfate de sodium, 5H₂O.....0,3

Rouge de phénol.....0,024

Agar.....12

pH=7,4

Réactifs utilisés

Réactif de Kovacs

Alcool amylique ou
isoamylique.....150ml

P.diméthylaminobenzaldehyde.....10g

Acide chlorhydrique concentré.....50ml

Réactif de Voges-Proskauer (VPI)

α Naphtol.....6G

Alcool éthylique à 90°.....100ml

Réactif de Voges-Proskauer (VPII)

NaOH4N

Résumé :

L'objectif de notre travail est d'évaluer la contamination des fruits et légumes par les *Entérobactéries* résistantes aux β -lactamines. 98 échantillons de fruits et légumes provenant du marché ont été effectués. Une gélose Mac Conkey additionnée de 4 $\mu\text{g/ml}$ de ceftazidime a servi pour l'isolement. L'identification des souches a été réalisée par galeries API 20E. 13 antibiotiques ont été utilisés pour tester la sensibilité des souches. 10 souches d'*Entérobactéries* résistantes à la ceftazidime ont été identifiées dont 04 *Enterobacter ssp*, 04 *Klebsiella pneumoniae* et 02 *Citrobacter freundii*. Une souche d'*Enterobacter ssp* produit probablement une carbapénémase. Aucune n'est productrice de BLSE ou probablement masquée par une céphalosporinase.

La diffusion des bactéries résistantes dans les fruits et légumes incite à l'augmentation des mesures de sécurité et de contrôles réguliers des fruits et légumes.

Mots clés : Végétaux, *Entérobactéries*, résistance, β -lactamine.

Summary:

The aim of our study was to evaluate the contamination of fruits and vegetables by Enterobacteriaceae resistant to β -lactams. 98 samples of fruits and vegetables from the market it was made. Mac Conkey agar supplemented with 4 mg / ml of ceftazidime was used for isolation. The identification of the strains was performed by API 20E galleries. 13 antibiotics were used to test the sensitivity of the strains. 10 strains of Enterobacteriaceae resistant to ceftazidime were identified including 04 *Enterobacter ssp*, *Klebsiella pneumoniae* 04 and 02 *Citrobacter freundii*. A strain of *Enterobacter ssp* probably produces a carbapenemase. Neither is producing ESBL or possibly masked by a cephalosporinase.

Dissemination of resistant bacteria in the fruits and vegetables encourages increased security measures and regular checks of fruit and vegetables

Keywords: Plants, *Enterobacteriaceae*, resistance, β -lactam.