

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 Master en Microbiologie
Moléculaire et Médicale

thème

*Evaluation de la contamination des végétaux par
Salmonella et étude des mécanismes de résistance aux
béta-lactamines des souches isolées dans la région de
Bejaia*

Présenté par

M^{lle} KANDI Malika

M^{lle} HAMMICHE Bania

Devant le jury composé de :

Président : DJOUDI F.

Promoteur : TOUATI A.

Co-promotrice: MESBAH F.

Examineur I: BELMAHDI M.

Examineur II: MOUSSAOUI B.

Promotion 2012/2013

Remerciements

Nous remercions s'adressent à notre promoteur Dr. A. TOUATI, et notre Co-promotrice madame MESBAH. F pour avoir dirigé ce travail.

Aux membres de jurys, Mr .F. DJOUDI, Mr. M. BELMAHDI et Mr. B. MOUSAOUI, pour avoir accepté d'examiné ce travail.

On tient à remercier toute l'équipe du Dr. A. TOUATI pour leurs disponibilités, conseils et aides tout au long de notre travail.

DEDICACE

BISSIMILAHİ RAHMANE RAHİM

Au nom de Dieu, clément et Miséricordieux

❖ *A la mémoire de ma chère mère Rabiai Wassila*

Ta sagesse, ton indulgence, ta générosité et ta disponibilité étaient connues de tous et sont pour moi un modèle à cultiver. Ma joie devait être immense si tu avais assisté à cet événement. Hélas ! Le Seigneur en a décidé autrement. Que ton âme repose en paix et qu'Allah t'accueille dans son paradis. Amen.

❖ *A mon père Abed-el-Madjid*

Ce travail est le fruit de tes souffrances, tes inquiétudes et ton encouragement. Nous prions Allah, le tout Miséricordieux qu'il te donne longue vie pour consommer ta réussite et continuer à nous chérir davantage, ainsi à ma belle mère Farida.

❖ *A mes frères (Aimad et Yacine)*

Je profite de ce moment pour vous dire que je vous aime tous les deux. Que Dieu vous donne longue vie.

❖ *A ma petite sœur Mélina*

Tu es encore petite, que Dieu te donne longue vie. Je veux bien être un exemple idéal et utile pour toi. Je t'aime ma chérie et je t'embrasse très fort.

❖ *A mes grands parents, oncles, tantes, cousins et cousines, je vous remercie pour votre soutien moral et vos encouragements*

❖ *A tous mes amis dont la liste est longue*

Je me souviendrai de votre soutien spontané lors de mes moments de crise. Tout en vous souhaitant bonne chance et beaucoup de courage dans vos vies personnels et professionnelles, Amen.

❖ *A ma très chère amie et partenaire Mika*

Malgré les entraves qu'on a vécues on a peut les surmonter et continuer ensemble. je te remercie pour tout ces moments de tristesse, joie et de folie. de tout cœur je souhaite que notre amitié reste éternelle, surtout ne change rien.

HAMMICHE BANIA

DEDICACE

Je dédie ce travail à :

*A ma Mère **Khereddine Chadia**, image de tendresse et d'amour d'une vie humble et honnête*

*A Mon père **Salah** qui m'a donné un modèle de travailleur infatigable et d'honnêteté exemplaire. Pour tout leur amour, leur sacrifices et leur veille, qu'il me soit permis de leur rendre hommage et de leur exprimer mes adorations et mon éternel amour.*

*A mes chères frangine, **Mani, Silou** et **Rima** ainsi qu'à mon petit frère adoré **Moumou**, qui m'ont toujours aidé à surmonter les difficultés, et qui ont su me faire rire dans les plus dures périodes de ma vie, que ce mémoire soit le témoignage de mon amour et profonde affection.*

J'espère être un bon modèle pour vous et que dieu vous protège.

*A ma tante **Sida** et son mari, Je vous serai éternellement reconnaissante pour votre soutien durant ces longues années. Vous êtes et vous serez toujours dans mon cœur.*

*A ma binôme, amie et sœur **Biba** avec qui j'ai partagé des moments de joie et de tristesse et de folie inoubliable et que malgré tout on a toujours su garder le sourire et aller de l'avant que notre amitié soit éternelle, surtout ne change rien.*

*A mes grands-parents, toute ma famille en particulier à mes tantes **Nouha** et **Aida**, à mes oncles **Azddine** et **Rachid**, à ma cousine **Nabila** ainsi qu'à tata **Noura** pour leur amour et soutien illimité.*

A mes très chers amis (es) qui m'est impossible de citer tous nommément, tant ils sont nombreux. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma gratitude et de ma reconnaissance pour tous les moments passés ensemble.

A toutes ces personnes je dirais que si la vie me donnera une autre chance de tout refaire, je serais sans doute avec vous que je la referais et sur tout sans rien changer.

Kandi Malika

SOMMAIRE

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction.....1

Matériel et méthodes

I- Isolement des souches.....6

I-1) Pré-enrichissement.....6

I-2) Enrichissement sur Rappaport Vassiliadis.....6

I-3) Isolement.....7

II-Identification des souches.....7

III)-Etude de la sensibilité aux antibiotiques.....6

IV)- Détermination des phénotypes de résistance.....8

Résultats

I) Souches bactériennes.....10

II) Etude de la Sensibilité aux antibiotiques12

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

Discussion et Conclusion.....16

Références bibliographique

Annexes

Liste des figures

Figure N°01: Schéma de détermination des phénotypes de résistance.....	09
Figure N°02 : <i>Citrobacter freundii</i> sur galerie API20E.....	10
Figure N°03 : <i>Proteus mirabilis</i> sur galerie API20E.....	10
Figure N°05: DD-test du <i>Citrobacter freundii</i> sur Mueller Hinton seule.....	15
Figure N°06: DD-test de la souche <i>Citrobacter freundii</i> avec cloxacilline.....	15

Liste des abréviations

ADH	:	Arginine-Dihydro lase
AMC	:	Amoxicilline-Clavulanate
Amp C	:	Cé phalosporinase de classe C
AMY	:	Amygdaline
ARA	:	Arabinose
ATM	:	Aztréonam
BLSE	:	β -lactamase à spectre étendu
C	:	Chloramphénicol
C1G	:	Cé phalosporine de première génération
C2G	:	Cé phalosporine de deuxième génération
C3G	:	Cé phalosporine de troisième génération
CAZ	:	Céftazidime
CIT	:	Citrate
Cloxa	:	Cloxacilline
COT	:	Cotrimoxazole
CTX	:	Céfotaxime
CTX-M	:	Céfotaximase-Munich
CZ	:	Céfazoline
DD-test	:	Double Disc Test
GEL	:	Gélatine
GLU	:	Glucose
H2S	:	Sulfure di-Hydrogène
I	:	Intermédiaire
IND	:	Indole
INO	:	Inosétole
LDC	:	Lysine-Décarboxylase
Man	:	Mannitol
MEL	:	Mélobiose
NAL	:	Acide nalidixique
ODC	:	Ornithine-Décarboxylase
ONPG	:	Orthonitrophényl-D-Galactopyranoside
PIP	:	Piperacilline
QNR	:	Quinolone Résistance

Liste des abréviations

R	:	Résistant
RHA	:	Rhamnose
RIF	:	Rifampicine
S	:	Sensible
SAC	:	Saccharose
SHV	:	SulfHydryl Variable
SOR	:	Sorbitole
T3SS	:	Secretion System Type 3
TCC	:	Ticarcilline-Clavulanate
TDA	:	Tryptophane-Désaminase
TEM	:	Temoneira
TIC	:	Ticarcilline
TOB	:	Tobramycine
TR	:	Triméthoprim
TSI	:	Triple Sugar Iron
URE	:	Urée
VP	:	Voges Proskauer

Introduction

Il est estimé que chaque individu est atteint au moins une fois par an de troubles digestifs et que dans un tiers des cas, l'aliment est directement incriminé (Korsak et al., 2004). Cependant les maladies entériques liées à la consommation de produits frais ont considérablement augmenté au cours des dernières décennies, notamment les toxi-infections alimentaires à *Salmonella* sont devenues un problème de santé publique (Golberg et al., 2011)

Le terme salmonellose regroupe toutes les infections causées par les différents sérotypes de *Salmonella* (Virlogeux-Payant et al., 2012). C'est l'une des causes principales de mortalité infantile dans les pays en voie de développement, et constitue la deuxième cause derrière *Campylobacter*, de toxi-infections alimentaires en Europe et la première cause d'hospitalisation et de mortalité d'origine alimentaire (Virlogeux-payant et al., 2012). Ces maladies produisent le plus souvent des symptômes diarrhéiques invasives qui peuvent causer un taux de mortalité élevé en particulier chez les patients immunodéprimés (Douglas et al., 2006).

Les fruits et légumes frais sont de plus en plus reconnus comme des sources d'épidémies à *Salmonella*. Au cours des trois dernières décennies, le nombre d'infections documentées qui sont associées à la consommation de fruits et légumes frais a augmenté. Cette augmentation peut être liée à un changement dans la demande des consommateurs vers une consommation plus importante de fruits et légumes frais, en plus des méthodes agricoles plus intensives dans la production de produits frais (Golberg et al., 2011). Parmi ces épidémies citant comme exemple l'épidémie à *Salmonella* Saint-Paul rapportée par Jungk et al., 2008 qui a atteint 43 états aux Etats-Unis et au Canada, ou 286 personnes ont été hospitalisées et deux morts ont été déclarés entre avril et août 2008. Les aliments incriminés étaient des poivrons et des tomates (Jungk et al., 2008).

Des épidémies ont également été rapportées en Australie et en Finlande suite à la consommation de melons cantaloups et de laitues (Virlogeux-payant et al., 2012).

Les sérovars *S. Typhimurium* et *S. Enteritidis* sont les plus fréquemment incriminés. Ils représentent à eux seuls près de 80% des sérovars isolés chez l'homme (Virlogeux-payant et al., 2012).

Le genre *Salmonella* comporte trois espèces, *Salmonella enterica*, *Salmonella bongori* et *Salmonella subterranean*. L'espèce type *S. enterica*, est en outre classée en six sous-espèces: *enterica* (subsp. I), *arizonae* (subsp. IIIa), *diarizonae* (subsp. IIIb), *houtenae* (subsp. IV), *indica* (subsp. VI) et *salamae* (subsp. II). Appartiennent à plus de 50 sérogroupes basé sur l'antigène O, et à plus de 2500 sérotypes (chacun ayant une combinaison unique d'antigène somatique O et antigènes flagellaire H1 et H2) (Chen et *al.*, 2013).

Les Salmonelles peuvent persister dans le sol ou dans l'eau des étangs et des rivières pendant 4 à 9 mois. Dans les aliments, de 40 jours à 18 mois et dans les duvets (couvoirs) jusqu'à 5 ans. (Lâm et *al.*, 2000).

La contamination des végétaux se fait à partir d'une source environnementale (épandages, ruissellements), animale (fèces d'animaux de rente ou domestiques, insectes) ou humaine (employés) au moment de la culture, de la récolte ou de la manipulation des végétaux avant leur consommation (Beuchat et Ryu, 1997 ; Golberg et *al.*, 2011 ; Virlogeux-payant et *al.*, 2012). Lors de la culture, c'est souvent pendant la fertilisation du sol avec des engrais d'origine animale ou l'irrigation avec des eaux usées contaminées que les bactéries entrent en contact avec la plante. (Horby et *al.*, 2003 ; Golberg et *al.*, 2011 ; Virlogeux-payant et *al.*, 2012).

La plupart du temps, il s'agit d'une contamination de surface. Cependant, des travaux récents montrent que les salmonelles sont capables d'infecter et de se multiplier dans le mésophile de certains végétaux comme la laitue (Kroupitski et *al.*, 2009 ; Schikora et *al.*, 2008 ; Virlogeux-payant et *al.*, 2012). En contrepartie, peu de travaux décrivent à l'heure actuelle les mécanismes d'interactions salmonelle/plantes (Virlogeux -payant et *al.*, 2012).

Les capacités des salmonelles à coloniser les plantes varient en fonction des sérovars, de l'espèce végétale infectée et de la saison (Golberg et *al.* 2011 ; Virlogeux-payant et *al.*, 2012). Les serovars *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* et *S. Senftenberg* adhèrent fortement aux feuilles tandis que les sérotypes *S. Arizona*, ou *S. Heidelberg* n'adhèrent pas (Schikora et *al.*, 2008).

De manière générale lors de l'infection des plantes, l'adhérence des bactéries aux feuilles implique plusieurs structures présentes à la surface des bactéries : certains fimbriae, les lipo-polysaccharides ou encore les flagelles (Barak et *al.*, 2005; Barak et *al.*, 2007 ; Schikora et *al.*, 2008). Les bactéries sont également capables de pénétrer et de se multiplier dans les plantes, l'entrée se fait au niveau des stomates (Kroupitski et *al.*, 2009 ; Golberg et *al.*, 2011). Une fois l'écorce des végétaux franchie, les bactéries se retrouvent alors dans l'espace situé entre cet écorce et les cellules végétales où elles vont pouvoir se multiplier (Schikora et *al.* 2008 ;Kroupitski et *al.*, 2009). Toutefois, deux études décrivent une localisation intracellulaire possible des salmonelles (Schikora et *al.*, 2008; Virlogeux et *al.*, 2012).

Une infection à partir des racines est également possible. Elle peut alors se transmettre à la plante entière. En réponse à l'infection, les plantes mettent en place une réponse immunitaire innée que les salmonelles semblent capables d'inhiber en utilisant leurs appareils de sécrétion, les T3SS. En retour, la plante développe une réponse basée sur des protéines de résistance capable de reconnaître les protéines sécrétées par ces T3SS (Schikora et *al.*, 2011; Virlogeux-payant et *al.*, 2012).

Récemment, il a été montré que *Salmonella* Typhimurium est capable de pénétrer l'épiderme de laitue à travers les stomates dans un processus qui implique une motilité flagellaire et le chimiotactisme (Kroupitski et *al.*, 2009 ; Golberg et *al.*, 2011).

L'infiltration de tomates par *Salmonella* et *Erwinia carotovora* et de laitue, pommes et oranges par *E. coli* O157:H7 ont été décrites. Une fois installées dans ces niches écologiques, les cellules peuvent survivre et proliférer jusqu'à atteindre de fortes proportions au moment de la consommation du produit contaminé. L'infiltration de pathogènes à l'intérieur des tissus des fruits et légumes dépend de la température, de la durée, de la pression et de la nature hydrophobe de la surface du produit (Beuchat ,2002).

Les produits végétaux peuvent être contaminés avec des micro-organismes antibiorésistants au cours de la production primaire via l'irrigation avec de l'eau contaminée (Bergogne-Bérézin, 1997).

L'édition anglaise de 2010 du livre de l'antibiogramme propose une approche phénotypique de la résistance naturelle des entérobactéries aux β -lactamines en sept groupes. A l'origine *Salmonella* appartenait au groupe G1 des entérobactéries en plus de *Escherichia coli*, *Shigella sp* et *Proteus mirabilis*. L'existence d'un gène non exprimé codant pour une céphalosporinase a amené à proposer la division en un groupes G0 incluant *Salmonella sp* et *Proteus mirabilis* ne possédant pas le gène AmpC et celui de G1 incluant *Escherichia coli* et *Shigella* pourvue d'un gène AmpC constitutif (Philippon et Arlet ,2012).

La résistance aux antibiotiques dans les sérotypes de *Salmonella* représente un problème mondial. Les données de surveillance montrent une augmentation évidente de la résistance aux antibiotiques : un taux de 20 à 30% au début des années 1990 et qui a atteint 70% dans certains pays à la fin du siècle (Chen et *al.*, 2013).

Les gènes associés à la multirésistance de *S. Typhimurium* DT104 sont regroupés dans un îlot génomique 1 (SGI1), portant divers groupes de gènes de résistance aux antibiotiques. Un plasmide R conjugatif et aussi impliqué, se dernier confère une résistance à de nombreux antibiotiques, y compris les céphalosporines à large spectre (Chen et *al.*, 2013).

L'émergence de la résistance aux fluoroquinolones chez les salmonelles non typhoïdes est particulièrement préoccupante, car elles constituent les médicaments de choix pour traiter potentiellement les infections à *Salmonella* mortelles causée par des souches résistantes à plusieurs antibiotiques chez l'adulte. La résistance de *Salmonella* aux quinolones était initialement attribué à des mutations ponctuelles dans le gène *gyrA* codant pour la sous-unité A de la gyrase (Van et *al.*, 2012 ; Chen et *al.*, 2013). Actuellement, des résistances plasmidiques des souches de *Salmonella* aux quinolones sont signalées dans différents pays. Différents gènes ont été détectés, incluant la protection de la cible des quinolones par des protéines QNR (QnrA QnrS, QnrB QnrC, QnrD, QnrVC), la modification de certaines fluoroquinolones par une acétyltransférase (AAC (6')-Ib-cr) et les pompes d'efflux actif, QepA ou OqxAB (Van et *al.*, 2012).

Une autre situation préoccupante est l'émergence de la résistance des *Salmonella* non typhoïdes vis à vis du ceftriaxone, Cette résistance est généralement attribuée à la présence

de différentes β -lactamase, comme les β -lactamases à spectre étendus (BLSE) et les AmpC (Lee et *al.*, 2009 ; Chen et *al.*, 2013).

Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) sont principalement associées à des *Enterobacteriaceae*. La première BLSE chez *Salmonella* est décrite pour la première fois en Afrique en 1988. Les BLSE signalées chez les Salmonelles sont majoritairement de type TEM, SHV et CTX-M (Usha et *al.*, 2008).

L'objectif de notre étude est l'évaluation de la contamination des végétaux par les salmonelles et la caractérisation des phénotypes de résistances aux β -lactamines de ces souches. Pour cela nous avons adoptés la méthodologie suivante :

- Isolement des souches à partir des différents légumes obtenues dans les marchés ;
- Identification des souches isolées par galerie API20E ;
- Etude de la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées ;
- Détermination des phénotypes de résistance aux β -lactamines.

Matériel
et
Méthodes

I)-Isolement des souches

Des échantillons de légumes incluant tomate, laitue, fenouil et persil sont acquis au niveau des marchés de la ville de Bejaia et sont acheminés au niveau du laboratoire de microbiologie pour être étudiés.

Les milieux de culture utilisés durant cette étude et leurs compositions sont donnés dans l'annexe N°I.

I-1) Pré-enrichissement

Un pré-enrichissement est réalisé pour tous les échantillons dans de l'eau peptonnée tamponnée selon le protocole suivant.

➤ **Tomate :**

Les surfaces des tomates sont lavées dans des sacs stériles avec 100 ml d'eau peptonnée tamponnée (EPT) tout en agitant pendant 2 min. Les suspensions sont ensuite récupérées dans des flacons et incubées à 37°C pendant 24h.

Ces mêmes tomates sont transférées dans une solution de 2% d'eau de Javel et laissées en contact pendant 2 min. Afin de neutraliser toutes traces du détergent, les tomates sont introduites dans une solution de thiosulfate de sodium pour un premier lavage et ont subi trois autres lavages avec de l'eau distillée stérile. Les tomates ainsi décontaminées sont récupérées dans des sacs stériles contenant 100ml d'eau peptonnée tamponnée et sont pressées jusqu'à obtention d'un jus. L'ensemble des sacs est incubé à 37°C pendant 24h.

➤ **Laitue/Fenouil/ Persil**

Trois feuilles (laitue/fenouil/persil) sont placées dans 100ml d'eau peptonnée tamponnée pendant 2min tout en agitant, Les suspensions d'eau peptonnée sont récupérées dans des flacons qu'on incube à 37°C pendant 24h(Micallef et *al.*, 2012).

I-2) Enrichissement sur Rappaport Vassiliadis

1ml de la suspension de pré-enrichissement estensemencé dans 9ml du bouillon Rappaport Vassiliadis. Les tubes sont ensuite incubés à 41,5°C pendant 24h à 48h (Micallef et *al.*, 2012).

I-3) Isolements

A partir des bouillons d'enrichissement positifs (virage du bleu en un bleu plus clair ou jaune), on ensemence en stries une gélose Hektoen. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h (Micallef et *al.*, 2012).

Après incubation les boîtes sont examinées selon les critères macroscopiques : forme, taille et couleur. Les colonies de *Salmonella* sont vertes à centre noire.

II)-Identification des souches

L'identification des souches est obtenue par l'utilisation des galeries API 20E.

➤ Identification par galerie API20E (Biomérieux)

L'identification des souches retenues a été confirmée par l'emploi d'une galerie API 20E (Biomérieux). On procède comme suit

- On réunit fond et couvercle d'une boîte d'incubation et on répartit environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide et on place la galerie dans la boîte d'incubation.
- On prélève quelques colonies et on prépare une suspension bactérienne.
- On remplit les **tubes et cupules** des tests **CIT**, **VIP** et **GEL** avec la suspension bactérienne et on remplit **uniquement les tubes** (et non les cupules) des autres tests.
- On réalise une anaérobiose dans les tests **ADH, LDC, ODC, H₂S, URE** en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- On referme la boîte d'incubation qu'on incube à 37°C pendant 18 à 24 h.
- Si 3 tests ou plus sont positifs, on note sur la fiche des résultats toutes les réactions spontanées puis on révèle les tests nécessitant l'addition de réactifs (TDA, VP et Indole).
- Le test d'oxydase constitue le 21^{ème} test d'identification à noter sur la fiche des résultats.
- L'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification Apident.
- Si le nombre de tests positifs avant ajout des réactifs est inférieur à 3, on réincube la galerie 24 h de plus sans rajouter les réactifs. Après cette deuxième incubation, on révèle les tests nécessitant l'addition des réactifs.

III)-Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques

La sensibilité des souches aux antibiotiques est déterminée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du Comité Français de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM ,2012).

Les antibiotiques testés sont donnés dans le tableau N°I.

Tableau N°I : antibiotiques testés (HIMIDIA, Inde)

Antibiotiques	Symbole	Charge (µg)	Résistant (R)	Sensible (S)	Familles
Amoxiciline+ clavulanate	AMC	30	<16	≥21	Aminopénicillines
Ticarcilline	TIC	75	<22	≥24	Carboxypénicillines
Ticarcilline+ clavulanate	TCC	75/10	<22	≥24	Carboxypénicillines
Piperacilline	PIP	100	<17	≥21	Acyluréidopénicilline
Céfazoline	CZ	30	<12	≥18	C1G
Céfoxitine	FOX	30	<15	≥22	C2G
Céfotaxime	CTX	30	<23	≥26	C3G
Céftazidime	CAZ	30	<19	≥26	C3G
Aztréonam	ATM	30	<21	≥27	Monobactames
Chloramphénicol	C	30	<23	≥23	Phenicol
Tobramycine	TOB	10	<16	≥18	Aminosides
Trimétoprime	TR	25	<16	≥20	Sulfamides
Acide nalidixique	NAL	30	<15	≥20	Quinolone

IV)- Détermination des phénotypes de résistance

➤ **DD-test sur gélose Mueller Hinton**

La production d'une β-lactamase à spectre étendu (BLSE) est détectée par le DD-test qui consiste à placer des disques de céfotaxime, céftazidime, céfépime et aztréonam à une distance de 20mm (centre à centre) d'un disque d'augmentin. La présence d'une BLSE se

traduit par l'apparition d'une synergie entre les disques de céfotaxime, céftazidime, céfepime et /ou l'aztréonam et le disque d'augmentin (Jarlier et *al* ,1988).

➤ DD-test sur gélose Mueller Hinton additionnée de cloxacilline

Chez les souches productrice de céphalosporinases, le DD-test est réalisé sur une gélose Mueller Hinton additionnée de 250 µg de cloxacilline, afin d'inhiber l'activité céphalosporinase. La comparaison des diamètres d'inhibition entre les boîtes avec et sans cloxacilline et la présence d'une image de synergie indique la présence de BLSE.

Une différence ≥ 6 mm entre les diamètres des zones d'inhibition autour des disques d'antibiotiques sur gélose additionnée de cloxacilline à ceux sur gélose Mueller Hinton seule indique la production d'une céphalosporinase (Touati, 2006).

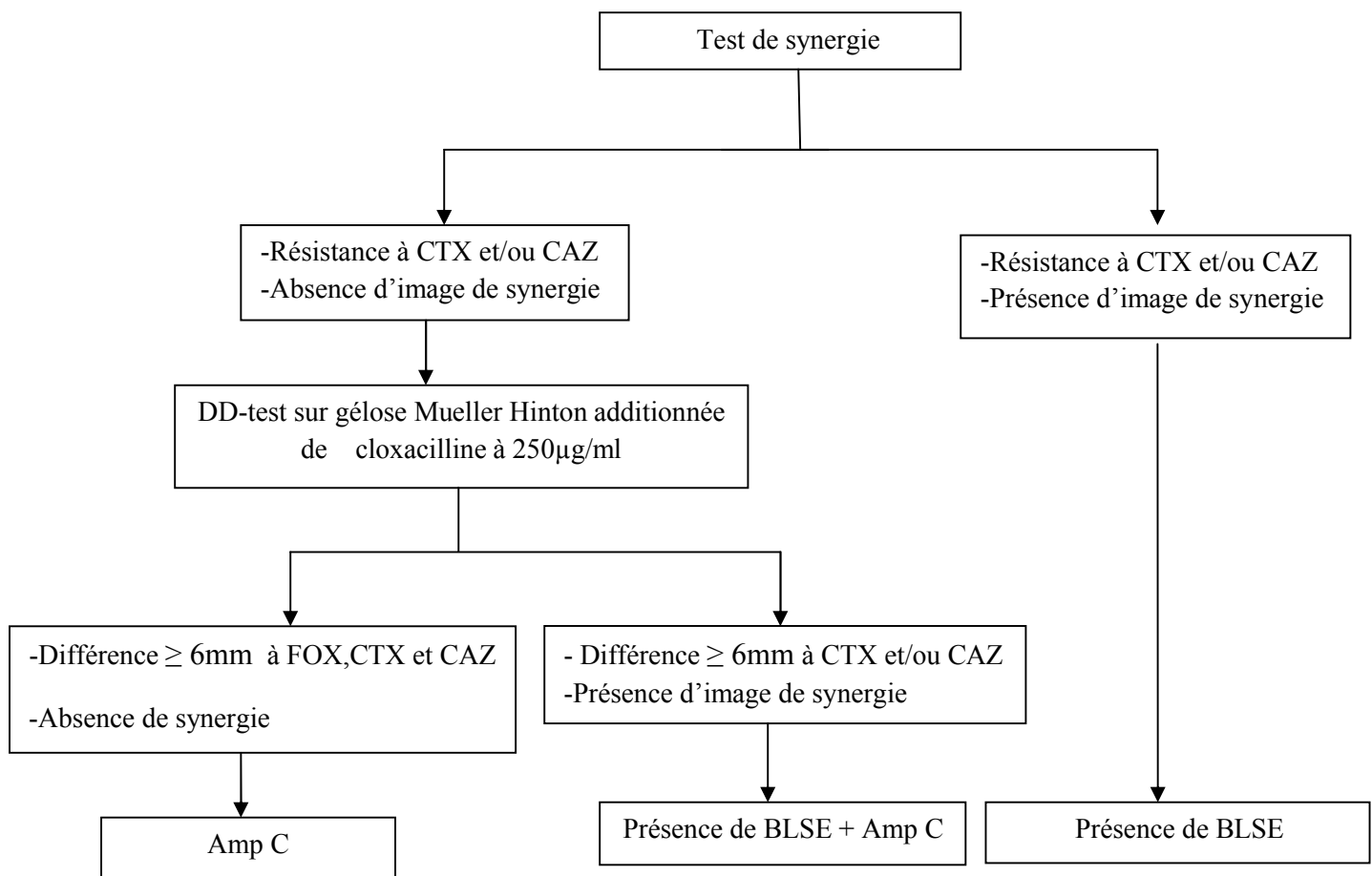


Figure N°01: Schéma de détermination des phénotypes de résistance

Résultats

I)-Souches bactériennes

Au cours de notre étude, 143 échantillons de crudités ont été examinés dont 48 tomates, 47 laitues, 27 fenouils et 21 persils.

Les 17 souches suspectées être des salmonelles ont été identifiées sur la base de l'aspect des colonies sur gélose Hektoen.

L'identification par galerie API20E a révélée que les souches suspectées appartiennent à d'autres espèces d'*Enterobacteriaceae* autre que *Salmonella*. Les résultats de l'identification par galerie API20E sont présentés dans le tableau N°II. 02 espèces ont été identifiées : *Citrobacter freundii* (figure N°02) et *Proteus mirabilis* (figure N°03) avec 09 et 08 souches respectivement.



**Figure N°02 : Résultat d'identification de *Citrobacter freundii* 2 (99,8%)
par galerie API20E**



**Figure N°03 : Résultat d'identification de *Proteus mirabilis* par galerie
API20E**

Tableau II : Résultats de l'identification par galerie API20E

Code	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	Espèces et code	%
T1A	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	<i>Citrobacter freundii 1</i>	98,9
T6G	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Proteus mirabilis 1</i>	100
T2H	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>Citrobacter freundii 2</i>	99,8
S3A	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>Citrobacter freundii 3</i>	99,4
S 3C	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Proteus mirabilis2</i>	100
S1E	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	<i>Citrobacter freundii4</i>	99,7
S2E	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Citrobacter freundii5</i>	63,1
S4E	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>Citrobacter freundii6</i>	98,9
S12F	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>Citrobacter freundii 7</i>	99,6
F2D	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Citrobacter freundii 8</i>	96,9
P3E	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>Citrobacter freundii9</i>	96,4
P4E	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Proteus mirabilis3</i>	100
P5E	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Proteus mirabilis4</i>	100
P6E	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Proteus mirabilis5</i>	100
P1G	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Proteus mirabilis 6</i>	100
P2G	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Proteus mirabilis7</i>	100
P5I	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Proteus Mirabilis8</i>	100

La répartition des souches isolées est comme suit : 07 souches sont isolées du persil (06 souches de *Proteus mirabilis* et 01 souche de *Citrobacter freundii*), 06 souches sont isolées à partir de la laitue, (05 souches de *Citrobacter freundii* et 01 souche de *Proteus mirabilis*), 03 souches sont isolées des tomates (02 souches de *Citrobacter freundii* et 01 souche de *Proteus mirabilis*) et une seule souche de *Citrobacter freundii* isolée du fenouil.

II)-Etude de la sensibilité aux antibiotiques

Les résultats des antibiogrammes effectués sur les 17 souches isolés vis-à-vis des 11 antibiotiques testés et leur interprétation sont donnés dans le tableau N° III. Les taux de résistance à chaque antibiotique testé sont représentés dans la figure N°04.

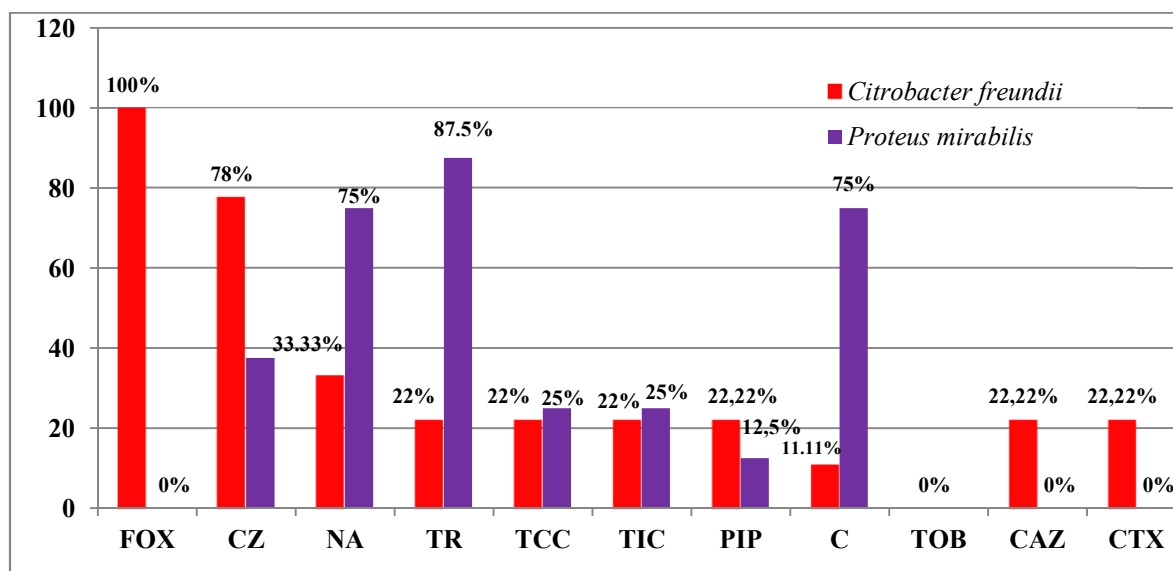


Figure N°04 : Taux de résistance des souches de *C.freundii* et *P.mirabilis* isolées aux antibiotiques testés

➤ *Citrobacter freundii* (C)

Toutes les souches de *Citrobacter freundii* sont résistantes à la céfoxitine, qui est une résistance naturelle, 07/09 souches sont résistantes à la céfazoline (C1G) et 03 souches sont résistantes à l'acide nalidixique. Tandis que 02 souches (C1, C8) sont résistantes à la céfotaxime et à la céftazidime, piperacilline, ticarcilline et à la ticarcilline-clavulanate. 02 souches sont résistantes au triméthoprim et une souche est résistante au chloramphénicol. toute les souches restent sensible à la Tobramycine.

Tableau N°III : Résultats de la sensibilité des souches de *C.freundii* et *P.mirabilis* isolées aux antibiotiques

code	PIP	TCC	TIC	CZ	C	TOB	TR	NA	FOX	CAZ	CTX
<i>Citrobacter freundii</i> 1	14 (R)	8 (R)	10 (R)	6 (R)	31 (S)	30 (S)	26 (S)	26 (S)	6 (R)	6 (R)	9 (R)
<i>Proteus mirabilis</i> 1	26 (S)	27 (S)	27 (S)	13 (I)	15 (R)	25 (S)	6 (R)	9 (R)	23 (S)	26 (S)	33 (S)
<i>Citrobacter freundii</i> 2	23 (S)	26 (S)	26 (S)	13 (I)	27 (S)	24 (S)	26 (S)	21 (S)	6 (R)	27 (S)	32 (S)
<i>Citrobacter freundii</i> 3	28 (S)	29 (S)	30 (S)	8 (R)	31 (S)	30 (S)	27 (S)	20 (S)	6 (R)	24 (S)	28 (S)
<i>Proteus mirabilis</i> 2	27 (S)	29 (S)	29 (S)	16 (I)	14 (R)	28 (S)	6 (R)	6 (R)	21 (S)	29 (S)	30 (S)
<i>Citrobacter freundii</i> 4	26 (S)	25 (S)	24 (S)	23 (S)	33 (S)	30 (S)	25 (S)	23 (S)	6 (R)	26 (S)	35 (S)
<i>Citrobacter freundii</i> 5	25 (S)	26 (S)	26 (S)	15 (I)	22 (I)	27 (S)	14 (R)	6 (R)	6 (R)	24 (S)	30 (S)
<i>Citrobacter freundii</i> 6	25 (S)	26 (S)	27 (S)	15 (I)	27 (S)	25 (S)	25 (S)	21 (S)	6 (R)	26 (S)	29 (S)
<i>Citrobacter freundii</i> 7	28 (S)	30 (S)	31 (S)	16 (I)	28 (S)	27 (S)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	26 (S)	31 (S)
<i>Citrobacter freundii</i> 8	15 (R)	8 (R)	10 (R)	6 (R)	30 (S)	26 (S)	24 (S)	17 (I)	6 (R)	6 (R)	10 (R)
<i>Citrobacter freundii</i> 9	26 (S)	25 (S)	26 (S)	24 (S)	31 (S)	29 (S)	22 (S)	23 (S)	6 (R)	27 (S)	33 (S)
<i>Proteus mirabilis</i> 3	31 (S)	29 (S)	30 (S)	18 (S)	32 (S)	28 (S)	20 (S)	23 (S)	22 (S)	30 (S)	38 (S)
<i>Proteus mirabilis</i> 4	24 (S)	25 (S)	26 (S)	18 (S)	13 (R)	26 (S)	6 (R)	19 (I)	24 (S)	30 (S)	32 (S)
<i>Proteus mirabilis</i> 5	29 (S)	28 (S)	30 (S)	19 (S)	16 (R)	29 (S)	6 (R)	6 (R)	22 (S)	30 (S)	43 (S)
<i>Proteus mirabilis</i> 6	21 (S)	18 (R)	19 (R)	18 (S)	10 (R)	28 (S)	6 (R)	6 (R)	22 (S)	31 (S)	37 (S)
<i>Proteus mirabilis</i> 7	11 (R)	12 (R)	14 (R)	14 (I)	25 (S)	27 (S)	6 (R)	6 (R)	24 (S)	30 (S)	41 (S)
<i>Proteus mirabilis</i> 8	27 (S)	27 (S)	27 (S)	18 (S)	14 (R)	29 (S)	6 (R)	20 (S)	22 (S)	30 (S)	39 (S)

➤ *Proteus mirabilis* (P) :

07/08 des souches de *Proteus mirabilis* sont résistantes au Triméthoprime, 06 souches sont résistantes au chloramphénicol, 03 souches sont résistantes à la céfazoline et 03 souches sont résistantes à l'acide nalidixique. Deux souches sont résistantes à la ticarcilline ainsi qu'à l'association ticarcilline-clavulanate et une souche est résistante à la pipéracilline

Toutes les souches sont sensibles à la Tobramycine, céfoxitine, céfotaxime et céftazidime.

III)-Détermination des phénotypes de résistance aux β -lactamines

Sur les 17 souches d'enterobactéries isolées, seule les souches de *Citrobacter freundii* C1 et C8 sont résistantes au céfotaxime et céftazidime. Aucune image de synergie n'a été observée sur gélose Mueller Hinton par DD-test.

Les deux souches de *Citrobacter freundii* sont testées en présence de la cloxacilline à une concentration de 250 μ g/ml. Les résultats obtenus montrent que la résistance au céfotaxime et céftazidime de ces souches est probablement due à l'hyper-production de leur céphalosporinase chromosomique (tableau IV, figure 5,6).

Tableau N°IV : Résultats du DD-test sur Mueller Hinton +Cloxacilline

		<i>Citrobacter freundii</i> 1	<i>Citrobacter freundii</i> 8
AMC	<i>Sans cloxacilline</i>	8	7
	<i>Avec cloxacilline</i>	17	15
	Différence des diamètres	9	8
ATM	<i>Sans cloxacilline</i>	11	11
	<i>Avec cloxacilline</i>	32	31
	Différence des diamètres	21	20
CAZ	<i>Sans cloxacilline</i>	6	6
	<i>Avec cloxacilline</i>	23	22
	Différence des diamètres	17	16
CTX	<i>Sans cloxacilline</i>	10	10
	<i>Avec cloxacilline</i>	26	25
	Différence des diamètres	16	15



Figure 05: DD-test du *Citrobacter freundii* sur Mueller Hinton seule.



Figure 06: DD-test de la souche *Citrobacter freundii* avec cloxacilline sur gélose Mueller Hinton

Discussion

et

Conclusion

Discussion et Conclusion

Les denrées alimentaires d'origine animale, comme la viande de bœuf, les produits laitiers et la volaille sont souvent impliqués dans les salmonelloses humaines (Korsak et al., 2004). Cependant malgré qu'un nombre croissant d'épidémies associées aux végétaux est rapporté ces dernières années, très peu de fruits et légumes commercialisés semblent être contaminés (Virlogeux-payant et al., 2012).

L'absence de *Salmonella* dans les différentes variétés d'échantillons examinés dans notre étude est probablement due à la période saisonnière. Selon Garcia et al (1987), le dénombrement microbien est plus faible pendant l'hiver mais augmente au cours de l'été en raison de l'utilisation accrue de l'eau d'irrigation contaminée, ainsi que de la température élevée favorisant le développement des micro-organismes (Garcia et al., 1987).

Selon l'étude menée par Golberg et al, l'internalisation des végétaux frais par les Salmonelles varie considérablement tout au long de l'année. Une internalisation élevée est observée surtout dans les mois d'été et une faible ou une absence d'internalisation au cours de la période hivernale. L'internalisation dépend de l'intensité lumineuse, de la température ainsi que de l'humidité (Golberg et al., 2011).

L'utilisation des pesticides dans l'agriculture pourrait être l'une des causes de l'absence des salmonelles dans les échantillons analysés du fait qu'ils sont des facteurs limitant la survie des micro-organismes dans la matière végétale (Mahovic et al., 2013).

Les laitues semblent être particulièrement sensibles et l'été est la saison la plus favorable à la colonisation des végétaux par les salmonelles (Barak et al. 2005; Barak et al. 2007 ; Virlogeux et al 2012). Garcia et al., 1987 ont rapportés un taux de 7,5 % de *Salmonella* dans 9 variétés de légumes. Le sérotype le plus fréquemment isolé est *Salmonella* Thyphimurium (Garcia et al 1987). Golberg et al., 2011, ont montré que parmi les variétés de laitues, la laitue iceberg et roquette ont une incidence d'internalisation plus élevée tandis que l'incidence est faible chez la laitue rouge et la laitue romaine. Cette dernière est la même variété analysée dans notre étude. En contre partie, les auteurs rapportent que le persil et les tomates n'ont montré aucune internalisation (Golberg et al., 2011).

Zhuang et al (1995) ont rapporté que les populations de *Salmonella* sur les tomates sont plus importantes dans le tissu cicatriciel de la tige. Une fois attaché à des fruits de tomate, *Salmonella* peut subir deux sorts, soit elle survit soit elle meurt lentement (Das et al, 2006). Guo et al (2001) ont signalé que les salmonelles peuvent s'attacher aux tomates et

Discussion et Conclusion

rester viables pendant le développement des fruits, servant ainsi de réservoir de contamination des fruits murs. Ils ont conclu que, bien que *Salmonella* est un pathogène humain, elle possède la capacité de survivre sur ou dans des fruits de tomate tout au long de leurs stades de croissance (Guo *et al.*,2001).

Dans l'étude rapportée par Micallef *et al.*, aucune souche de *Salmonella* n'a été détectée dans les échantillons de tomates analysés. Tandis que plusieurs sérotypes ont été identifiés à partir du sol et de l'eau, dont quatre : *S. Braenderup*, *S. Javiana*, *S. Newport* et *S. Typhimurium* ont déjà été impliqués dans des épidémies de *Salmonella* associées à la consommation de tomates. Des résistances aux sulfisoxazole, ampicilline, céfoxitine, amoxicilline / acide clavulanique et à la tétracycline ont été rapportées. Cette étude met en cause l'eau d'irrigation et des sols en tant que réservoirs possibles de *Salmonella* dans les exploitations de tomates (Micallef *et al.*,2012).

Koffi-wevry et Gohou, ont rapporté un taux de 28% de souches de *Citrobacter freundii* isolées à partir des échantillons de tomates et de laitues. Ces résultats sont proches de nos résultats (29,41%). Tandis que la fréquence d'isolement de *Citrobacter freundii* à partir de la surface des tomates dans la même étude est de 31,66%, ce qui est plus élevé que nos résultats (11,76%). (Koffi-wevry et Gohou.,2012).

Citrobacter freundii est classé dans le groupe G3 des entérobactéries, il contient un gène chromosomique codant pour une céphalosporinase inductible de bas niveau (AmpC) (Philippon et Arlet, 2012). Il est naturellement résistant aux aminopénicillines et leurs associations avec les inhibiteurs ainsi qu'à la céfoxitine, et présente une résistance plus aux moins aux céphalosporines de première génération. Les souches sauvages restent sensibles vis-à-vis des carboxypénicillines, leurs association aux inhibiteurs ainsi qu'aux acyluréidopénicillines. Les mutations conduisant à la synthèse constitutive à haut niveau de sa céphalosporinase chromosomique entraînent une résistance à la ticarcilline, association aux inhibiteurs, pipéracilline et aux céphalosporines de troisième génération (Robin *et al.*, 2012).

Dans notre étude, 02 souches de *Citrobacter freundii* résistantes à la ticarcilline, ticarcilline-clavulanate, pipéracilline, aztréonam ainsi qu'à la céftazidime et au céfotaxime ont été isolées. Cette résistance serait due à l'hyperproduction de la céphalosporinase chromosomique.

Discussion et Conclusion

Proteus mirabilis est une espèce qui appartient au groupe G0 des entérobactéries, elle est naturellement sensible à toutes les β -lactamines (Philippon et Arlet., 2012 ; Robin *et al*, 2012). La diminution de la sensibilité de certaines souches de *Proteus mirabilis* vis-à-vis de la ticarcilline, ticarcilline-clavulanate, piperacilline et céfazoline (C1G) est probablement due à l'acquisition d'une pénicillinase de type TEM-1, TEM-2 ou SHV-1 (Robin *et al*, 2012).

Le signalement de toxi-infections alimentaires a augmenté ces dernières années dont la cause principale est l'émergence d'agents pathogènes dans l'environnement. En règle générale, la prévalence et les niveaux de contamination de *Salmonella* sont considérés comme faibles dans les légumes frais. Cependant, malgré qu'un nombre croissant d'épidémies associées aux végétaux soient rapportées, très peu de légumes commercialisés semblent être contaminés. Malgré cette éventualité, le danger potentiel des bactéries pathogènes présentes dans les légumes ne doit pas être sous-estimé, en particulier dans ceux consommés crus ou légèrement cuits. L'inquiétude majeure est due à la résistance aux antibiotiques qui ne cesse d'augmenter vis-à-vis de différentes familles d'antibiotiques, ainsi que les risques élevés liés à la diffusion des gènes de résistance chez les bactéries associées à l'environnement et qui sont transmises à l'homme via la chaîne alimentaire. En outre les résultats rapportés par les différentes recherches effectuées dans ce contexte changent notre perception des risques liés à *Salmonella* et aux autres agents pathogènes et pourraient avoir des conséquences importantes sur les pratiques agricoles et la sécurité sanitaire des aliments dans les années à venir. Il est donc nécessaire de poursuivre les recherches afin d'évaluer la diversité des salmonelles dans l'ensemble de la chaîne alimentaire et de suivre l'évolution dans les différents secteurs. Il faudra continuer à la mise en place des mesures d'hygiène collectives, car *salmonella* est l'une des bactéries qui constitue un réel problème de santé publique.

En perspectives, notre étude est préliminaire, et doit être complétée par :

- Une étude approfondie est nécessaire ou un plus grand nombre d'échantillons avec plus de variétés de légumes doit être analysés.
- Etude de la contamination des légumes en fonction des saisons.
- Etude de la contamination du sol et de l'eau d'irrigation par les souches de salmonelles.
- Etude moléculaire des gènes de résistance des salmonelles.

Références
Bibliographiques

Références Bibliographiques

Barak J, Gorski L, Naraghi-arani P and Charkowski AO. (2005). *Salmonella enterica* virulence genes are required for bacterial attachment to plant tissue. *Appl environ microbiol* **71**, 5685-5691.

Barak J, Jahn C, Gibson D and Charkowski A. (2007). The role of cellulose and o-antigen capsule in the colonization of plants by *salmonella enterica*. *Mol plant microbe interact* **20**, 1083-1091.

Bergogne-bérézin E. (1997). Who or what is the source of antibiotic resistance?. *Journal of medical microbiology* **46** (6), 461-470.

Beuchat LR. (2002). Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and infection*, vol. 4, n° 4, pp. 413-423.

Beuchat LR and Ryu JH. (1997). Produce handling and processing practices. *Emerg infect dis* **3**, 459-465.

Chen Hung-ming AY, wang Yue BY, SU LH C et Chiu Cheng-Hsun. (2013). nontyphoid salmonella infection: microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy. *Pediatrics and neonatology* 1-6.

Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Communiqué 2012.

Das E, Candan G, Rakan G et Alev B. (2006). Effect of controlled atmosphere storage, modified atmosphere packaging and gaseous ozone treatment on the survival of *Salmonella enteritidis* on cherry tomatoes. *Food microbiology* **23**, 430-438.

Douglas Biedenbach J, Toleman M, Timothy Walsh R et Ronald Jones N. (2006). Analysis of salmonella spp with resistance to extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones isolated in North America and latin america: report from the sentry antimicrobial surveillance program (1997-2004). *Diagnostic microbiology and infectious disease* **54**, 13-21.

Garcia-Villanova Ruiz B, Galvez Vargas and Garcia-Villanova R. (1987). Contamination on fresh vegetables during cultivation and marketing. *International Journal of Food Microbiology* **4**, 285-291.

Golberg D, Kroupitski Y, Belausov E, Pinto R et Sela S. (2011). *Salmonella* Typhimurium internalization is variable in leafy vegetables and fresh herbs. *International Journal of Food Microbiology* **145**, 250-257.

Guo X, Chen J, Brackett R et Beuchat L. (2001). Survival of *Salmonella* on and in tomato plants from the time of inoculation at flowering and early stages of fruit development through fruit ripening. *Appl. Environ. Microbiol* **67**, 4760–4764.

Horby P, O'brien S, Adak G, Graham C, Hawker J, Hunter P, Lane C, Lawson A, Mitchell R, Reacher M, Threlfall E, Ward L. (2003). A national outbreak of multi-resistant salmonella enterica serovar typhimurium definitive phage type (DT) 104 associated with consumption of lettuce. *Epidemiology and Infection* **130**, 169–178.

Jarlier V, Nicolas MH, Fournier GF and 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.

Jungk J, Baumbach J and al. (2008). Outbreak of *Salmonella* serotype Saint-Paul infections associated with multiple raw produce items - United States, 2008. *Morbidity and Mortality Weekly Report* **57**, 929-934.

Korsak N, Clinquart A et Daube G. (2004). *Salmonella* spp dans les denrées alimentaires d'origine animale : un réel problème de santé publique ?. Département des sciences des denrées alimentaires faculté de médecine vétérinaire, université de liège, p 185.

Koffi-Nevry R et Gohou G. (2012). Hygiene des aliments et développement soutenable : impact du monde invisible (microscopique) sur la réduction de la pauvreté. Université d'abobo-adjamé, p.14-15.

Kroupitski Y, Golberg D, Belausov E, Pinto R, Swartzberg D, Granot D and Sela S. (2009). Internalization of salmonella enterica in leaves is induced by light and involves chemotaxis and penetration through open stomata. *Appl Environ Microbiol* **75**, 6076-6086.

Lâm D, Carles A, Tripodi J, brugère-picoux et Bodin G. (2000). Etude bactériologique des infections par le genre *Salmonella* chez le canard dans la province de Can Tho (Viet Nam). *Revue Méd. Vét* **151**, **10**, 955-964.

Lee HY, Su LH, Tsai MH, Kim SW, Chang HH, Jung SI et al. (2009) . High rate of reduced susceptibility to ciprofloxacin and ceftriaxone among nontyphoid salmonella clinical isolates in asia. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 2696-9.

Mahovic M, Gu G et Rideout S. (2013). Effects of pesticides on the reduction of plant and human pathogenic bacteria in application water. *J Food Prot.* Apr **76**(4):719-22. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-440.

Micallef Shirley A, Rosenberg Goldstein Rachel E, George Ashish , Kleinfelter Lara, Boyer Marc S, Laughlin Cristina R Mc, Estrin Andrew, Ewing Laura, Jean-Gilles Beaubrun Junia, Hanes Darcy E , Kothary Mahendra H, Tall BenD ,Razeq JafarH, Joseph SamW, Sapkota AmyR. (2012). Occurrenceandantibioticresistanceofmultiple Salmonella serotypes recovered fromwater,sedimentandsoilonmid-Atlantictomatofarms. *Environmental Research* **114** ,31–39.

Philippon A et Arlet G. (2012). Entérobactéries et beta-lactamine : phénotypes de résistance naturelle. *Pathologie biologique* **60**,112-126.

Robin Frédéric. Gibold Lucie et Richard Bonnet. (2012). Résistances naturelles et acquises aux bêta-lactamines chez les entérobactéries: comment les identifier en pratique quotidienne?. L'antibiogramme et son interprétation phénotypique en 2012.

Schikora A, Carreri A, Charpentier E and Hirt H. (2008). The dark side of the salad: salmonella typhimurium over comes the innate immune response of arabidopsis thaliana and shows an endopathogenic lifestyle. *plos one* **3**, 22-79.

Schikora A, Virlogeux-payant I, Bueso E, Garcia AV, Nilau T, Charrier A, Pelletier S, Menanteau P, Baccarini M, Velge P et al. (2011). Conservation of salmonella infection mechanisms in plants and animals. *plos one* **6**, 24-112.

Touati A.(2006). Caractérisation des phénotypes de résistance des entérobactéries aux β -lactamines isolées en milieu hospitalier :cas de deux hopitaux de la wilaya de béjaia [Thèse de doctorat].Béjaia : Université A/MIRA .p 34.

Usha Govinden, Chunderika Mocktar et Prashini Moodley. (2008). Characterization of extended-spectrum β -lactamases in Salmonella spp. at a tertiary hospital in Durban, South Africa. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **62**, 86–91.

Van Thi Thu Hao, Nguyen Hoang Nam Kha, Smooker Peter M et Coloe Peter J. (2012). The antibiotic resistance characteristics of non-typhoidal Salmonella enterica isolated from food-producing animals, retail meat and humans in South East Asia. *International Journal of Food Microbiology* **154**, 98–106.

Virlogeux-Payant I, Lalmanach AC, Beaumont C, Hirt H et Velg P. (2012). Salmonella, de la plante au tube digestif : Des recherches pour élaborer des stratégies de lutte. *Innovations Agronomiques* **24**, 35-48.

Annexes

ANNEXE I

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 dihydrgenophosphate.....	1,5
P ^H =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 bœuf	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 bœuf.....	03
Extrait de levure.....	03
Peptone trypsine (peptic digest of animal tissue).....	20

Annexes

Chlorure de sodium.....	.05
Citrate ferrique.....	.0,3
Lactose.....	.10
Glucose.....	.01
Saccharose.....	.10
Thiosulfate de sodium, 5H ₂ O.....	.0,3
Rouge de phènol.....	.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 étude est l'évaluation de la contamination des végétaux par les souches de *Salmonella* et la caractérisation des phénotypes de résistances aux β -lactamines des isolats. Un total de 143 échantillons à été analysé. L'identification des souches est obtenue par galeries API 20E. La sensibilité est déterminée selon l'antibiogramme standard. Aucune salmonelle n'a été détectée dans notre étude. Les 17 souches identifiées sont 09 *Citrobacter freundii* et 08 *Proteus mirabilis*. Tous les isolats sont sensibles à la tobramycine et les souches de *Proteus mirabilis* sont majoritairement résistantes à l'acide nalidixique, triméthoprim et chloramphénicol. 02 souches de *Citrobacter freundii* sont résistantes à la piperacilline, ticarcilline, ticarcilline-clavulanate, céfazoline et aztréonam ainsi que de la céftazidime et céfotaxime par hyper production de leurs AmpC chromosomique.

Des mesures d'hygiène doivent être mise en place afin de minimisé au maximum les risque liés à la présence des germes pathogènes sur les végétaux surtout du fait de l'émergence de nouvelles résistances aux antibiotiques que peut représenter ces germes.

Mots-clés : *Salmonella*, contamination, végétaux, résistance, β -lactamines.

Abstract

Our study aim to evaluate vegetables contamination by *Salmonella* and characterization of their resistance to β -lactams antibiotic. A total of 143 samples were analyzed. The identification of strains was obtained by API 20E. The susceptibility of strains is tested. No *Salmonella* isolate were detected in our study. The 17 strains identified were 09 *Citrobacter freundii* isolats and 08 *Proteus mirabilis* isolats. All isolates were susceptible to tobramycin and strains of *Proteus mirabilis* are mostly resistant to nalidixic acid, trimethoprim and chloramphenicol. 02 strains of *Citrobacter freundii* were resistant developed to piperacillin, ticarcillin, ticarcillin-clavulanate, aztreonam cefazoline, ceftazidime and céfotaxime by AmpC hyperpoduction. Hygiene measures should be implemented to minimized the risk related to the presence of resistant on plants.

Keyword: *Salmonella*, contamination, vegetables, resistance, β -lactam.