

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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences Biologiques
Option : Microbiologie en Secteur Biomédical et Vétérinaire



Réf :

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

MASTER

Thème

Etude du portage fécale des souches de bacilles
à Gram négatif résistantes aux carbapénèmes
isolées à partir d'animaux sauvages

Présenté par : *ALLOUACHE Miriame et BELKEBLA Nadia*

Soutenu le: **15 juin 2016**

Devant le jury composé de :

Mr. TOUATI Abdelaziz	Professeur	Président
Mr. DJOUDI Farhat	MCB	Encadreur
Mlle. BELHAMICHE Nabila	MAA	Examinatrice
Mr. ABANE Lahlal	Conservateur principal	Invité

Année universitaire : 2015/2016

Remerciements

Nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance à notre Promoteur **Mr. A TOUATI** ainsi qu'à notre Co-promotrice **Melle. T BACHIRI**. Nous les remercions de nous avoir encadré, orienté, aidé et conseillé.

Nos remerciements vont aussi aux membres du jury pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous remercierons également les personnes citées ci-dessous pour nous avoir aidé à réaliser notre travail :

Mr ABANE : Conservateur principal de la conservation de Bejaia.

Mr MOUKHTARI : Chef de la circonscription d'EL-KSEUR.

Mr BENSLIMAN : Chef de bureau de protection de la circonscription
d'EL-KSEUR.

Mr AIT CHEKDID : Chef de circonscription de SOUK-EL-TENINE.

Mr SAHEL: Chef de bureau de protection de la circonscription de SOUK- EL-TENINE.

Mr OUALI : brigadier de la circonscription de SOUK-EL-TENINE.

Mr ACHMOUKH : Chef de la circonscription d'AKBOU.

Mr FINICHE et Mr Ait MEKOURTA : brigadiers de la circonscription d'AKBOU.

Mme SEMSAR : Chef de district de TOUDJA.

Mr DJOUAD : Chef de district d'EL-KSEUR.

Mr CHABAN : Brigadier de la circonscription d'EL KSEUR.

Mr Sadat, Mr Remini, Mr Zennad et Mr Sai : Brigadiers de la circonscription d'Adekar

Mr ALLOUACHE : membre de l'association des chasseurs de FENAIA.

Enfin un grand merci à **Melle. A MAIRI** pour son aide et ses conseils.

Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail qui est le fruit de ma profonde
reconnaissance à*

*Mes parents qui voulaient tant me voir réussir que dieu les garde et les
protège*

Ma sœur : SAHRA

Mes deux frères : KAMEL et YANIS

Mes deux familles : ALLOUACHE et SEMSAR

MIRIAME

Dédicaces

Rien n'est aussi beau à offrir que le fruit d'un labeur qu'on dédie du cœur à ceux qu'on aime et qu'on remercie en exprimant la gratitude et la reconnaissance durant toute notre existence.

Je dédie ce mémoire :

A mes très chers parents qui m'ont guidée durant les moments les plus pénibles de ce long chemin, ma mère qui a été à mes côtés et ma soutenue durant toute ma vie, et mon père qui a sacrifié toute sa vie afin de me voir devenir ce que je suis, merci mes parents.

A mon cher frère, mes chères sœurs.

A toute ma famille sans exception.

A mon cher époux,

A ma meilleur copine Miriame ainsi que toute sa famille.

A mes meilleurs amis et à tous ceux qui me sont chère.

NADIA

Liste des Abréviations

- AMC** : Amoxicilline-clavulanate
- AMX** : Amoxicilline
- AN** : Acide nalidixique
- ATM** : Aztréonam
- BLSE** : Bêta-Lactamase à Spectre Etendu
- C3G** : Céphalosporines de troisième génération
- C4G** : Céphalosporines de quatrième génération
- CAZ** : Ceftazidime
- CMY** : Cephamicinase
- CN** : Gentamycine
- CTAB** : Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
- CTX** : Céfotaxime
- CTX-M** : Cefotaximase-Munich
- DD-test** : Double Disc synergie test
- EPC** : Entérobactérie Productrice de Carbapénèmase
- ETP** : Ertapénème
- EUCAST** : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
- FEP** : Céfépime
- IMP** : Imipénème
- KPC** : *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase
- MBL** : Métallo- β -lactamases
- NDM** : New Delhi Metallo- β -lactamases
- OXA** : Oxacillinase
- SEC** : Seconde
- SHV** : Sulfhydryl Variable
- TET** : Tétracycline
- TEM** : Temoniera
- TIC** : Ticarcilline

Sommaire

Liste des figures

Introduction	1
---------------------------	---

Matériel et méthodes

1. Prélèvements.....	4
2. Isolement et identification.....	4
3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques.....	6
4. Recherche de la production de β -lactamases à spectre étendu.....	7
5. Recherche de la production carbapénèmases.....	8
6. Analyse statistique.....	9

Résultats

1. Résultats des prélèvements.....	10
2. Souches bactériennes.....	10
3. Sensibilité des souches aux antibiotiques.....	11
4. Analyse des phénotypes de résistance.....	12
5. Portage fécal des souches d'entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu et productrice de carbapénèmases.....	14

Discussion et conclusion	15
---------------------------------------	----

Références bibliographiques

Liste des figures

Figure 1 : Carte des différents sites de prélèvements.....	5
Figure 2 : Répartition des souches d'entérobactéries isolées selon le type d'animal.....	11
Figure 3 : Taux de résistance des souches d'entérobactéries aux β -lactamines (à gauche) et aux autres familles d'antibiotiques (à droite).....	12
Figure 4 : Image d'un DD-test positif sur gélose Mueller-Hinton pour la souche B054.....	12
Figure 5 : Image d'un test de Hodge positif sur gélose Mueller-Hinton pour les souches B043 et B044.....	13
Figure 6 : Image du Carba NP test modifié pour les souches B043, B044 et B063.....	13

Introduction

Les β -lactamines demeurent à l'heure actuelle les molécules les plus utilisées dans le traitement des infections bactériennes. Cette famille, qui regroupe une grande variété de molécules est caractérisée par un large spectre d'activité antibactérienne associé à une action bactéricide ce qui explique l'importance de leur utilisation, depuis plus de 60 ans. Ce succès a été accompagné d'une utilisation souvent excessive et a contribué à l'apparition de la résistance parmi les principales espèces bactériennes d'intérêt médical, ce qui a érodé notre capacité à traiter efficacement les maladies infectieuses. Dès lors, s'est engagée une course permanente entre l'évolution des bactéries résistantes d'une part, et le développement de nouvelles molécules, d'autre part (Vasoo et *al.*, 2015).

En effet, ces dix dernières années, les scientifiques ont constaté une importante augmentation de la résistance aux antibiotiques en particulier chez les entérobactéries. Ces bactéries font partie de la flore microbienne intestinale de l'être humain et des animaux, mais ils sont également d'importants pathogènes opportunistes responsables de maladies graves et sont parmi les causes les plus importantes d'infections nosocomiales et communautaires (Ronald, 2002).

L'émergence des entérobactéries résistantes aux β -lactamines à large spectre est le plus souvent le résultat d'un mécanisme de résistance en deux temps qui associe d'abord la sélection des bactéries commensales résistantes puis le transfert horizontal de cette résistance entre diverses espèces bactériennes dont certaines peuvent être pathogènes (Skurnik et Andremont, 2006). Le mécanisme de résistance le plus important est lié à la production de β -lactamases de type β -lactamase à spectre étendu (BLSE). Ces dernières ont émergé durant les années 80 et représentent une menace mondiale pour la santé humaine et sont non seulement isolées du milieu hospitalier, communautaire et vétérinaire, mais elles ont également diffusé dans

Introduction

d'autres niches comme les animaux sauvages, eaux usées, végétaux et autres sources (Ben said et *al.*, 2015).

Les BLSE sont des enzymes transférables qui coexistent souvent avec d'autres déterminants de la résistance aux antibiotiques. Elles peuvent être associées à des transposons et à des intégrons et augmentent l'enrichissement potentiel des bactéries multi-résistantes pour de multiples agents antimicrobiens ainsi que la diffusion des déterminants de la résistance parmi les espèces bactériennes (Poeta et *al.*,2009). Une véritable pandémie mondiale est maintenant observée avec la diffusion préférentielle des BLSE de type CTX-M (Philippon, 2013).

Dans l'évolution et la propagation des entérobactéries résistantes, les entérobactéries productrices de carbapénèmases (EPC) représentent une nouvelle menace, car elles ont surmonté la dernière ligne de défense en antibiothérapie. Les carbapénèmes sont de puissants antibiotiques qui sont utilisés pour traiter des infections graves en milieu hospitalier. Trois classes de carbapénèmases ont été retrouvées chez les entérobactéries: les carbapénèmases de classe A (KPC), les carbapénèmases de classe D, dont l'enzyme OXA-48 qui est la seule actuellement décrite chez les entérobactéries et les carbapénèmases de classe B (VIM, IMP, NDM) (Carrer, 2010). Ces enzymes sont le plus souvent portées sur des structures plasmidiques et sont principalement responsables d'infections nosocomiales et communautaires. Toutefois, les souches d'EPC ont été également rapportées dans d'autres écosystèmes incluant : aliment de bétail (Fisher et *al.*, 2013), eaux usées (Caller et *al.*,2013), animaux de compagnie (Stolle et *al.*,2013 ;Yousfi et *al.*,2015), animaux d'élevage (Poirel et *al.*,2012) et la faune sauvage (Fisher et *al.*,2013; Villa et *al.*,2015).

Introduction

Habituellement, la faune sauvage n'est pas exposée aux antibiotiques utilisés en cliniques (Martinez,2009) mais actuellement, y a un nombre important de voies d'expositions qui pourraient entraîner la résistance chez la faune sauvage (Santos et *al.*,2013). Ainsi, la convergence entre les habitats, le contact des animaux sauvage avec d'autres animaux domestiques ou avec les humains à conduit à une augmentation de l'échange des déterminants génétiques de la résistance entre leurs micro-biotes (Sousa et *al.*,2014).

La dissémination des BLSE chez les animaux sauvages ont été observées au niveau mondial. Néanmoins, les rapports publiés sur les CTX-M sont les plus répondu avec une prédominance de CTX-M-1, CTX-M-9 et CTX-M-15. Une distribution moins large que celles des CTX-M a été également rapportée pour les BLSE appartenant au groupe SHV et TEM (Guenther et *al.*,2011). Cependant les rares études publiées sur les EPC chez la faune sauvage n'ont identifié que des carbapénèmases de type NDM-1 et de type IMI-like chez les oiseaux sauvages (Fisher et *al.*,2013; Dolejska et *al.*,2015). Par conséquent les animaux sauvages peuvent constituer un réservoir de bactéries résistantes pouvant être transmises à l'Homme (Radhouani et *al.*,2014).

En Algérie, la majorité des BLSE et des EPC rapportés ont été identifiés dans des isolats cliniques mais également dans le lait (Yiaici et *al.*,2016), l'eau de mer (Djahmi et *al.*,2014), œufs (Mezhoud et *al.*,2016), poissons (Brahmi et *al.*,2015) et animaux de compagnies (Yousfi et *al.*,2015).

L'objectif de notre étude est la détermination de la prévalence des EBLSE et EPC chez quelques animaux sauvages dans la wilaya de Bejaia.

Matériel et méthodes

1. Prélèvements

Des prélèvements fécaux ont été effectués durant la période de janvier à avril 2016 à partir de différentes espèces d'animaux sauvages (chacal, sanglier, singe magot et cigogne) au niveau de quelques communes de la willaya de Bejaia (figure1).

Ces prélèvements fécaux ont été recueillis dans la majorité des cas par écouvillonnage le matin sur des selles fraîches ainsi que des prélèvements rectaux. Les selles fraîches ont été identifiées par des agents forestiers (en collaboration avec les différentes structures de la conservation des forêts de la willaya de Bejaia). Quant aux prélèvements rectaux, ils ont été réalisés sur des sangliers par des chasseurs lors d'une battue (association des chasseurs de la commune de Fenaia).

Les échantillons collectés ont été acheminés dans une glacière à 4°C, au laboratoire d'écologie microbienne de l'université de Bejaia pour être analysés.

2. Isolement et identification

Les écouvillons ont été pré-enrichit dans 1ml de bouillon nutritif (Fluka, USA) incubé pendant une heure à 37°C. Ensuite, 40µl du bouillon de pré-enrichissement ont été introduits dans 160µl de bouillon nutritif additionnés d'une part de céfotaxime (1µg/ml) et de vancomycine (32µg/ml) pour la recherche de souches EBLSE et d'autre part d'ertapénème (0.5µg/ml) et de vancomycine (32µg/ml) pour la recherche des souches d'EPC. Après incubation à 37°C pendant 18 à 24h, deux géloses de Mac Conkey (Conda, Espagne) additionnées respectivement de céfotaxime (1µg/ml) et d'ertapénème (0.5µg/ml) + vancomycine (32µg/ml) ont été

Matériel et méthodes

ensemencées avec 200µl de bouillon d'enrichissement. Après 24h d'incubation à 37°C, 2 à 3 colonies morphologiquement différentes ont été ré-isolées sur gélose Mac Conkey. L'identification des souches d'entérobactéries a été réalisée par l'emploi des galeries API20E (Bio-Mérieux, France).

3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité des souches aux antibiotiques a été déterminée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller Hinton (Conda, Espagne) selon les recommandations du Comité Européen de l'antibiogramme (<http://www.eucast.org>). Les antibiotiques testés (Oxoid, Angleterre) sont donnés dans le tableau I.

L'interprétation des résultats a été faite selon les recommandations de l'EUCAST, 2016.

Matériel et méthodes

Tableau I : Antibiotiques testés.

Antibiotiques	Abréviation	Charge du disque (µg)	Famille	Diamètres Critiques (EUCAST, 2016).	
				S≥	R<
Amoxicilline+ clavulanate	AMC	20+10	β-lactamines	19	19
Ticarcilline	TIC	75		23	23
Céftazidime	CAZ	30		22	19
Céfotaxime	CTX	30		20	17
Céfépime	FEP	30		24	21
Aztréonam	ATM	30		24	21
Imipénème	IMP	10		22	16
Meropénème	MEM	10		22	16
Ertapénème	ETP	10		25	22
Tétracycline	TET	30		Tétracyclines	19
Acide nalidixique	NAL	30	Quinolones	19	14
Gentamicine	GEN	10	Aminosides	17	14

4. Recherche de la production de β-Lactamases à Spectre Etendu

La production d'une BLSE a été détectée par le DD-test qui consiste à déposer des disques de céftazidime (30µg), céfotaxime (30µg), céfépime (30µg) et d'aztréonam (30µg) sont déposés à une distance de 20 mm (centre à centre) d'un disque d'amoxicilline-clavulanate (20/10 µg). La présence d'une BLSE se traduit par l'apparition d'une image de synergie entre les disques de céfotaxime, céfépime ou d'aztréonam et le disque d'amoxicilline-clavulanate (Jarlier et *al.*, 1988).

Matériel et méthodes

5. Recherche de la production de carbapénémases

5.1. Test de Hodge

Un disque de méropénème (10µg/ml) à été appliqué au centre d'une gélose Mueller Hinton préalablement ensemencée par une souche sensible (*Escherichia coli* ATCC25922, collection du laboratoire d'écologie microbienne de l'université Bejaia). Ensuite, les souches à tester ont été ensemencées sur la gélose sous forme de stries déposées à partir du disque de méropénème jusqu'à la périphérie de la boîte en présence d'un témoin positif (*E.coli* OXA-48) et d'un autre négatif (*Escherichia coli* ATCC25922). Après 24h d'incubation à 37°C, le test de Hodge a été interprété comme positif par la présence d'une distorsion de la zone d'inhibition autour du disque de méropénème (Muneeza et al.,2016).

5.2. Carba NP test modifié

Une ose calibrée de colonies bactériennes a été suspendue dans 200µl de tampon de lyse CTAB à 0.02%, puis vortexée pendant 1 à 2 minutes. Ensuite le lysat bactérien a été transférée dans 2 tubes Eppendorf "A" et "B" (100µl dans chaque tube). En plus de la souche test, un témoin négatif (*Escherichia coli* ATCC25922) et un témoin positif (*E.coli* NDM-5) ont été également testés. On Ajoute 100µl de la solution A dans le tube "A" et 100µl de la solution A+imipénème 6mg/ml dans le tube "B".On vortexe pendant 5sec et on incube à 37°C pendant un maximum de 2h.

L'activité carbapénémase a été révélée par le virage de couleur (du rouge vers l'orange/jaune) due à l'acidification du milieu par l'hydrolyse de l'imipénème dans le tube "B", tandis que la couleur du tube "A " reste inchangée (Bakour et al.,2015).

Solution A : Solution contenant le rouge de phénol (2ml de la solution à 0.05% poids/volume dans 16.6ml d'eau distillée), additionnée de Zn SO4 à 0.1 mM (pH=7.5).

Matériel et méthodes

5.3. Recherche de la production de métallo- β -lactamase

➤ Méthode des disques combinés

Deux disques d'imipénème (IMP, 10 μ g) ont été disposés séparément sur une boîte de Mueller Hinton préalablement ensemencée avec la souche à tester, puis 5 μ L d'EDTA (0.5 M, pH 8) ont été ajoutés à un des disques. Après incubation à 37°C pendant 24h, les souches dont le diamètre d'inhibition autour du disque IMP-EDTA est supérieur à celui obtenu avec les disques d'EDTA et d'IMP seuls d'au moins 6mm ont été considérées comme des souches productrices de M β L (Yong et *al.*, 2002).

➤ Recherche de synergie

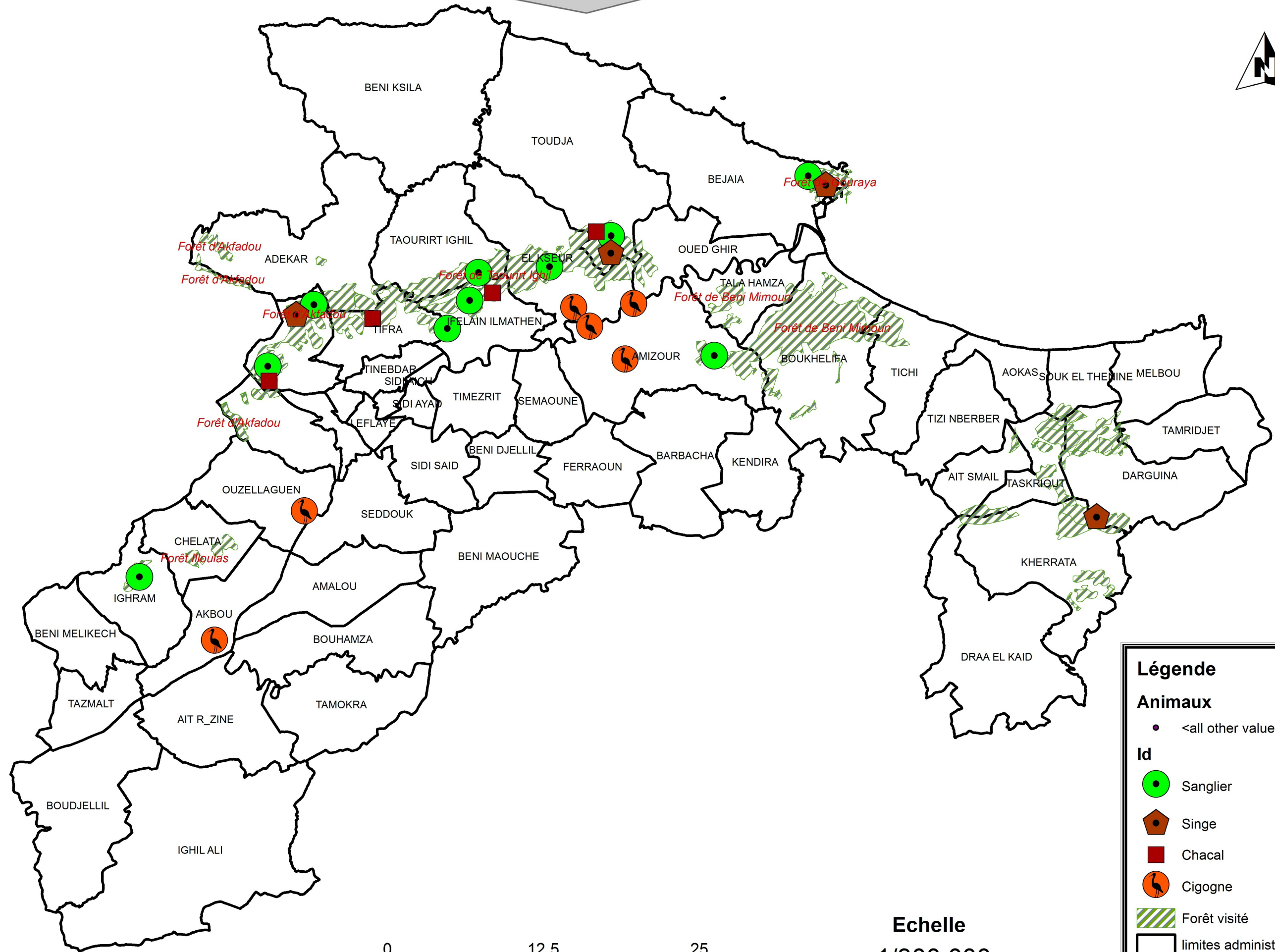
Un DD-test a été réalisé avec un disque d'imipénème (10 μ g) déposé à 15mm d'un disque vierge imbibé de 10 μ l de solution d'EDTA à 0,5 M, pH 8.

La présence d'une M β L a été détectée par visualisation d'une image de synergie entre le disque d'imipénème et celui d'EDTA (Jeong et *al.*, 2006).

6. Analyse statistique

Deux tests statistiques ont été utilisés pour comparer les résultats obtenus, le test Khi-deux et le test exact de Fisher. Les différences sont considérées significatives pour une *P-valeur* inférieure ou égale à 0.05 (*P-valeur* \leq 0.05).

Sites des prélèvements effectués dans la wilaya de Béjaïa









Echelle
1/300 000

Légende

Animaux

- <all other values>

Id

-  Sanglier
-  Singe
-  Chacal
-  Cigogne
-  Forêt visité
-  limites administratives

Résultats

1. Résultats des prélèvements

Un total de 291 échantillons fécaux ont été prélevés à partir de différents animaux sauvages incluant la cigogne (n=98), le singe magot (n=86), le sanglier (n=77) et le chacal (n=30) (Tableau II). Les matières fécales des cigognes ont été prélevées dans des zones urbaines alors que celles provenant des mammifères sauvages ont été collectées dans deux environnements forestiers différents. Les forêts d'Akbou, Toudja et Gorge de Kharatta se caractérisent par la présence de plusieurs décharges communales. Le Parc Nationale du Gouraya possède une forte activité touristique. Alors que la forêt d'Akfadou, étendue boisée, est caractérisée par l'absence de décharges et d'activité humaine.

Tableau II : Répartition des prélèvements par animal et par commune dans la willaya de Bejaia.

Animal Region	Chacal	Singe magot	Sanglier	Cigogne	Total
Akbou	04	00	13	16	33
Ighezer Amekrane	00	00	00	08	08
El kseur	00	03	14	54	71
Fenaia	00	00	04	00	04
Amizour	00	00	01	19	20
Akfadou	13	04	16	00	33
Toudja	13	05	22	00	40
Bejaia	00	31	08	00	39
Kharrata	00	43	00	00	43
Total	30	86	77	98	291

2. Souches bactériennes

Un total de 32 souches d'entérobactéries ont été isolées sur gélose Mac Conkey additionnée de céfotaxime et 3 souches sur gélose Mac Conkey additionnée d'ertapénème. L'identification des souches par galeries API 20E a montré qu'*E.coli* est l'espèce la plus fréquemment isolée avec un taux de 77.14%

Résultats

(27 /35), suivie de *K.pneumoniae* et *K.oxytoca* avec des taux de 20 % (7 /35) et 2.86% (1/35) respectivement. Les souches d'*E.coli* ont été isolées chez la cigogne (n=12), le sanglier (n=8), le chacal (n=4) et le singe magot (n=3). Pour le genre *Klebsiella*, 6 souches de *K. pneumoniae* ont été isolées chez la cigogne contre une souche chez le sanglier, et seulement une souche de *K.oxytoca* a été isolée chez le sanglier (figure 2).

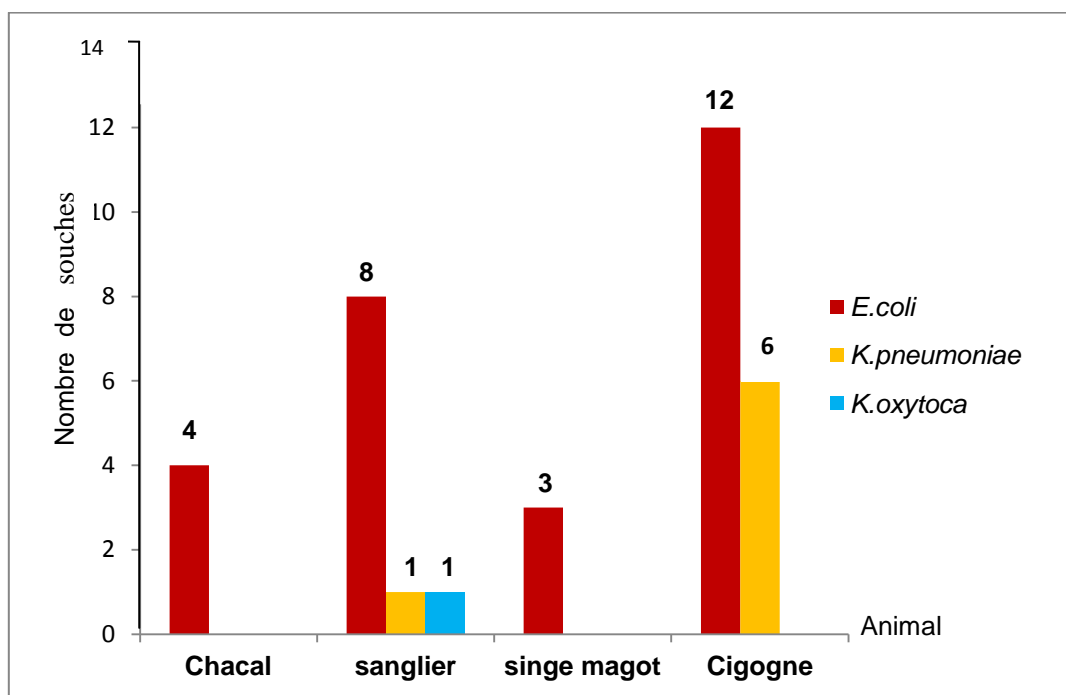


Figure 2: Répartition des souches d'entérobactéries isolées selon le type d'animal.

3. Sensibilité des souches aux antibiotiques

D'après la figure 3, on observe des taux de résistances variables aux différentes β -lactamines testées allant de 2.85% pour le méropénème à 100% pour la ticarcilline. Aucune résistance n'a été observée pour l'imipénème, alors qu'un taux de 8.57% a été enregistré pour l'ertapénème. Concernant les taux de résistances aux autres familles d'antibiotiques, des taux de 58.88%, 75% et 87.5% ont été enregistrés respectivement pour la gentamycine, acide nalidixique et tétracycline.

Résultats

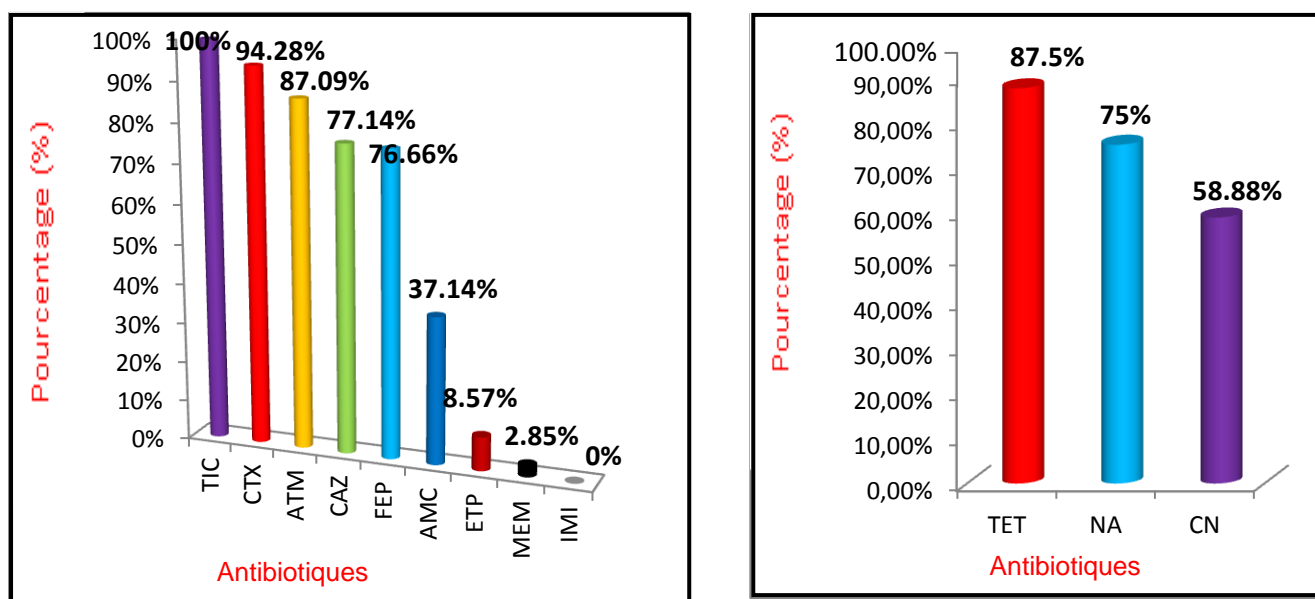


Figure 3 : Taux de résistance des souches d'entérobactéries aux β -lactamines (à gauche) et aux autres familles d'antibiotiques (à droite).

4. Analyse des phénotypes de résistance

L'image de synergie a été observée pour les 32 souches d'entérobactéries isolées sur gélose Mac Conkey additionnée de céfotaxime indiquant ainsi la production probable d'une BLSE chez ces souches (figure 4).

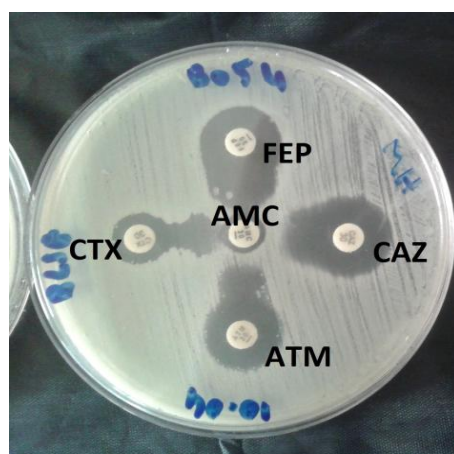


Figure 4 : Image d'un DD-test positif sur gélose Mueller-Hinton pour la souche B054.

Le test de Hodge (figure 5) et le carba NP test modifié (figure 6) ont été positifs pour les 3 souches d'entérobactéries résistantes à l'ertapénème, indiquant ainsi une

Résultats

production probable d'une carbapénémase chez ces souches. Cette dernière n'est pas inhibée par l'EDTA indiquant l'absence d'une métallo- β -lactamase (MBL).



Figure 5: Image d'un test de Hodge positif sur gélose Mueller-Hinton pour les souches B043 et B044.

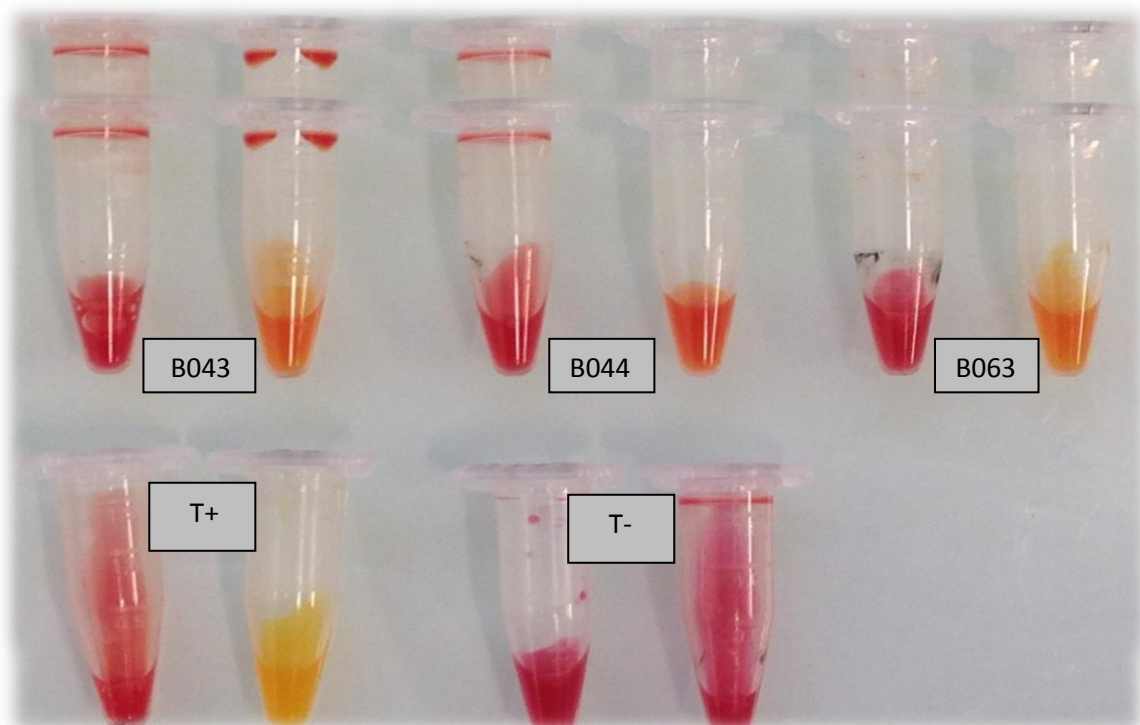


Figure 6 : Image du Carba NP test modifié pour les souches B043, B044 et B063.

Résultats

On note que les 3 souches d'entérobactéries productrices de carbapénèmases sont probablement de type OXA-48, du fait de leur sensibilité aux C3G et C4G et leur résistance à l'ertapénème.

5. Portage fécal des souches de BLSE et d'EPC

Le taux de portage fécal total des souches d'entérobactéries productrices de BLSE est de 11% (32/291), dont un taux de 18.37% (18/98) chez la cigogne, 13.33% (4/30) chez le chacal, 9.09% (7/77) chez le sanglier et 3.49% (3/86) chez le singe magot.

Pour les souches d'EPC, un taux de portage total de 1.03% (3/291) a été observé pour tous les animaux. Cependant ces 3 souches ont été isolées uniquement chez le sanglier donnant ainsi une prévalence de 3.90% (3/77) chez cet animal.

Le test Exact de Fisher montre une différence significative entre les taux de portage des souches EBLSE et le type d'animal (P-valeur = 0.002).

De même, le test khi-deux conclut la présence d'une différence significative entre les taux de portage des EBLSE isolées des mammifères sauvages et celle isolées des oiseaux sauvages (P-valeur = 0.001).

Discussion et conclusion

Avec le nouveau millénaire, le nombre d'études décrivant les souches d'entérobactéries multi-résistantes chez les animaux sauvages ont augmenté de manière significative (Guenther et *al.*,2010). Cependant, la détection de souches productrices de BLSE chez la faune sauvage remonte seulement à 2006 (Costa et *al.*,2006). Depuis plusieurs rapports ont été publiés (Costa et *al.*,2008 ; Poeta et *al.*, 2008 ; Literak et *al.*,2009; Bonnedahl et *al.*.,2010). Concernant les EPC, uniquement 4 articles ont été rapportés dans la base de données PubMed (Fisher et *al.*,2013; Guerra et *al.*,2014; Villa et *al.*,2015 et Dolejska et *al.*,2015).

En Algérie, un seul rapport sur les E BLSE provenant d'animaux sauvages a été publié (Brahmi et *al.*,2015). Pour les carbapénèmes les mêmes auteurs ont rapporté deux souches d'*Acinetobacter baumannii* productrices d'OXA-23 isolées du poisson (Brahmi et *al.*,2016).

Nos résultats ont montré que les souches isolées présentent un phénotype multi-résistant incluant une résistance aux C3G (85.71%), C4G (74.19%), aminosides (58.88%), quinolones (75%) et tétracycline (87.5%) même si, a priori ces animaux ne sont pas sensés être en contact direct avec les antibiotiques.

Les premières BLSE isolées des animaux sauvages ont été observées chez les oiseaux sauvages (Costa et *al.*,2006). Ces souches ont été également isolées chez d'autres mammifères sauvages comme le cerf (Guenther et *al.*,2011; Alonso et *al.*,2016), sanglier (Poeta et *al.*,2009 ; Literak et *al.*,2009) et le singe (Wang et *al.*,2012). De même, les premières souches productrices d'EPC chez les animaux sauvages ont été également isolées chez des oiseaux sauvages (Fisher et *al.*,2013).

Discussion et conclusion

Dans notre étude, nous avons enregistré un taux de portage fécal d'EBLSE de 3.48% chez le singe et de 9.09% chez le sanglier, ces taux sont inférieurs à ceux rapportés par Bouhrour et Bouiche l'année précédente avec des taux de 12.85% et 42.85% respectivement chez le singe et le sanglier (Bouhrour et Bouiche,2015). En revanche nos résultats sont similaires à ceux rapportés par Poeta et *al.*,2009 chez le sanglier au Portugal et sont inférieurs aux 32% rapportés par Wang et *al.*,2012 chez le singe. Egalement des taux de 13.33% et 18.36% ont été enregistrés respectivement chez le chacal et la cigogne. Cependant Bouhrour et Bouiche n'ont isolé aucune souche d'EPC (Bouhrour et Bouiche,2015). L'isolement de souches d'EPC chez le sanglier est une première au monde. Un taux de 3.9% a été enregistré durant notre étude, celui-ci est nettement inférieur aux 72% rapporté par Dolejska et *al.*,2015 chez les mouettes.

Le niveau de résistance observé chez les animaux sauvages et le nombre croissant de rapports peuvent indiquer que la résistance chez la faune sauvage semble bien en corrélation avec le degré d'association avec l'activité humaine (Skurnik et *al.*, 2006; Allen et *al.*, 2010). Cependant dans notre étude 94.28% des souches résistantes ont été isolées dans des forêts à proximité de décharges communales et de zones urbaine contre 5.72% isolées dans une forêt caractérisée par l'absence d'activité humaine.

Néanmoins, plusieurs études rapportent que l'apparition de souches résistantes ne se limite pas à des zones avec un impact anthropique (Lovine et *al.*,2015), mais il semblerait que d'autres voies seraient envisageables. D'une part l'influence du comportement migratoire des oiseaux sauvages, qui peuvent agir comme des épandeurs de la résistance aux antibiotiques avec un potentiel de

Discussion et conclusion

propagation intercontinentale de la résistance (Bonnedahl et Jarhult,2014) et d'autre part l'omniprésence de l'influence humaine dans diverses niches écologiques (Guenther et *al.*,2011).

La proximité des territoires occupés par les animaux sauvages des zones urbaines, des espaces verts et des décharges, suggèrent que ces animaux auraient une plus grande proportion de bactéries résistantes aux antibiotiques que ceux qui vivent loin des activités humaines (Cahill et *al.*,2012). Egalement l'empiétement des forêts et les visites quotidiennes par les chercheurs et les touristes augmentent les niveaux de contact entre les humains et la faune sauvage (Benavides et *al.*,2012). Une autre hypothèse est envisageable, le fumier des animaux domestiques qui pâturent pourrait constituer un réservoir de bactéries résistantes pour les animaux sauvages (Martinez,2009). De plus, il a été noté qu'au Portugal la présence de souches résistantes chez le loup ibérique est probablement dû à la colonisation de l'intestin des loups avec des souches résistantes hébergées par leurs proies, tels que le sanglier, le singe et le cerf (Romeu et *al.*, 2012). Un autre facteur de risque pour l'acquisition de souches résistantes peut être représenté par les eaux de surface contaminées (Romeu et *al.*,2012).

En conclusion, il semblerait que les bactéries multi-résistantes soient largement distribuées dans différents écosystèmes. Bien que les animaux sauvages ne sont pas en contact naturel avec des antibiotiques, ces animaux peuvent être colonisés par des bactéries résistantes et peuvent être considérées comme un réservoir de souches d'entérobactéries multi-résistantes productrices de BLSE et d'EPC. Ainsi, ces derniers peuvent jouer un rôle d'épandeurs dans la diffusion généralisée de gènes de résistance aux antibiotiques. Celle-ci est devenue une menace majeure pour la santé humaine et animale partout dans le monde. Par

Discussion et conclusion

conséquent, il est important d'analyser l'épidémiologie et les mécanismes d'émergence et de la propagation de la résistance aux antimicrobiens en raison de l'importance croissante des maladies zoonotiques. Egalement d'autres études devraient être effectuées pour mieux comprendre le rôle de ces animaux dans la propagation de la résistance.

En perspective, les résultats obtenus au cours de notre étude restent préliminaires et certains points méritent d'être exploités et mis en évidence :

- Etudier l'évolution des facteurs qui contribuent à la propagation des mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les animaux sauvages
- Etudier d'une façon approfondie la résistance aux antibiotiques dans différents habitats naturels
- Evaluer l'impact de la contamination microbienne d'origine humaine dans la forêt
- Suivre de près l'influence du comportement migratoire des oiseaux sauvages sur la résistance aux antibiotiques

Références bibliographiques

Allen HK , Donato J , Wang H , Cloud-Hansen KA , Davies J et Handelsman J. (2010). Call of the wild : antibiotic genes in natural environments. *Nat Rev microbiol* .**8**, 251-259.

Alonso CA, González-Barriob D, Tenorioa C, Ruiz-Fonsb F et Torresa C. (2016). Antimicrobial resistance in faecal *Escherichia coli* isolates from farmed deer and wild small mammals. Detection of a multiresistant E. coli producing extended-spectrum beta-lactamase. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **45**,34–39.

Bakour S, Garcia V, Loucif L, Brunel J-M, Gharout-Sait A, Touati A et Rolain J-M. (2015). Rapid identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* using a modified Carba NP test *New Microbes New Infect.* **7**, 89–93.

Benavides JA, Godreuil S, Bodenham R, Ratiarison S, Devos C, Petretto M, Raymond M et Escobar-Paramo P. (2012). No evidence for transmission of antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains from humans to Wild Western Lowland Gorillas in Iopé National park, Gabon. *Appl Environ Microbiol* .**78**, 4281–4287.

Ben Said L , Jouini a , Klibi N , Dziri R, Alonso CA, Boudabous A , Ben Slama K et Torres C. (2015). Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia. *Int J Food Microbiol.* **203**, 86–92.

Bonnedahl J, Drobní P, Johansson A, Hernandez J, Melhus A, Stedt J, Olsen B et Drobní M. (2010). Characterization, and comparison, of human clinical and black-headed gull (*Larus ridibundus*) extended-spectrum beta-lactamase-producing bacterial isolates from Kalmar, on the southeast coast of Sweden. *J Antimicrob Chemother.* **65**,1939-44.

Bonnedahl J et Järhult JD. (2014). Antibiotic resistance in wild birds. *Upsa J Med Scie.***119**,113-6.

Bouhrour N, Bouiche C. (2015). Caractérisation des phénotypes de résistance aux β -lactamines des souches d'entérobactéries isolées à partir d'animaux sauvages. Mémoire de fin de cycle.

Brahmi S, Dunyach-Rémy C, Touati A et Lavigne JP. (2015). CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone O25b-ST131 isolated from wild fish in Mediterranean Sea. *Clin Microbiol Infect.***2**, 18-20.

Brahmi S, Touati A, Cadière A, Djahmi N, Pantel A, Sotto A, Lavigne JP et Dunyach-Remy C. (2016). First Description of Two Sequence Type 2 *Acinetobacter baumannii* Isolates Carrying OXA-23 Carbapenemase in Pagellus acarne Fished from the Mediterranean Sea near Bejaia, Algeria. *Antimicrob Agents Chemother.* **60**,2513-5.

Références bibliographiques

Cahill S, Llimona F, Cabaneros L et Calomardo F. (2012). Characteristics of wild boar (*Sus scrofa*) habituation to urban areas in the Collserola Natural Park (Barcelona) and comparison with other locations. *Anim Biodiv Conser.* **35**,221-233.

Carrër A, Poirel L, Yilmaz M, Akan O A, Feriha C, Cuzon G, Matar G, Honderlick P et Nordmann P. (2010). Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicro Agents Chemother.* **54**,1369-1373.

Costa D, Poeta P, Sáenz Y, Vinué L, Rojo-Bezares B, Jouini A, Zarazaga M, Rodrigues J et Torres C. (2006). Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. *J Antimicrob Chemother.* **58**,1311-2.

Costa D, Poeta P, Sáenz Y, Vinué L, Coelho AC, Matos M, Rojo-Bezares B, Rodrigues J et Torres C. (2008). Mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates recovered from wild animals. *Microb Drug Resist.* **14**,71-7.

Djahmi N, Dunyach-Remy C, Pantel A, Dekhil M, Sotto A et JP. (2014). Epidemiology of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean Countries. *Biomed Res Int.* 305784.

Dolejska M, Masarikova M, Dobiasova H, Jamborova I, Karpiskova R, Havlicek M, Carlile N, Priddel D, Cizek A et Literak I. (2015). High prevalence of Salmonella and IMP-4-producing *Enterobacteriaceae* in the silver gull on Five Islands, Australia. *J Antimicrob Chemother.* **10**,109.

EUCAST. (2000, 2016). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing . Sur le lien (<http://www.eucast.org>).

Fischer J, Schmoger S, Jahn S, Helmuth R et Guerra B. (2013). NDM-1 carbapenemase-producing *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Corvallis isolated from a wild bird in Germany. *J Antimicrob Chemother.* **68**,2954-2956.

Guenther S, Grobbel M, Beutlich J, Bethe A, Friedrich ND, Goedecke A, Lübke-Becker A, Guerra B, Wieler LH et Ewers C. (2010). CTX-M-15-type extended-spectrum beta-lactamases-producing *Escherichia coli* from wild birds in Germany. *Environ Microb Rep.* **2**,641-5.

Guenther S, Ewers C et Wieler LH. (2011). Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *E. coli* in Wildlife, yet Another Form of Environmental Pollution? *Front Microbiol.* **2**,246.

Guerra B, Fischer J et 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**, 290-7.

Références bibliographiques

Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G et Philippon A. (1998). Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis.* **10**, 867-78.

Jeong SH, Bae IK, Park KO, An YJ, Sohn SG, Jang SJ, Sung KH, Yang KS, Lee K, Young D et Lee SH. (2006). Outbreaks of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing carbapenemases in Korea. *JMicrobiol.* **44**, 423-31.

Literak I, Dolejska M, Radimersky T, Klimes J, Friedman M, Aarestrup FM, Hasman H et Cizek A. (2009). Antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars. *J Appl Microbiol.* **108**,1702-11.

Iovine RDO, Dejuste C, Miranda F, Filoni C, BuenoMG et De Carvalho VM. (2015). Isolation of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. from free-ranging wild animals. *Braz J Microbiol.* **46**,1257–1263.

Martinez JL, Baquero F et Alvarez-Ortega C.(2009). Ecology and evolution of antibiotic resistance. *Environ Microbiol Rep.* **1**,469-76.

Mezhoud H, Chantziaras I, Iguer-Ouada M, Moula N, Garmyn A, Martel A, Touati A, Smet A, Haesebrouck F et Boyen F. (2016). Presence of antimicrobial resistance in coliform bacteria from hatching broiler eggs with emphasis on ESBL/AmpC-producing bacteria. *Avian Pathol.* **24**,1-30.

Muneeza A, Hassan E, Aizza et Hamdan. (2016). Phenotypic Detection of Metallo-Beta-Lactamases in Carbapenem Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolated from Pediatric Patients in Pakistan. *Pathog.* 8603964.

Philippon A.(2013). Les bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu (BLSE). *Extended-spectrum beta-lactamases.* *IBS.* **28**,287-296.

Poeta P, Radhouani H, Igrejas G, Gonçalves A, Carvalho C, Rodrigues J, Vinué L, Somalo S et Torres C. (2008). Sea gulls of the Berlengas natural reserve of Portugal as carriers of fecal *Escherichia coli* harboring CTX-M and TEM extended-spectrum beta-lactamases. *Appli Environ Microbiol.* **74**,7439-41.

Poeta P, Radhouani H, Pinto L, Martinho A, Rego V, Rodrigues R, Gonçalves A, Rodrigues J, Estepa V, Torres C et Igrejas G. (2009). Wild boars as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of different phylogenetic groups. *J Basic Microbiol.* **49**, 584–588.

Poirel L, Berçot B, Millemann Y, Bonnin RA, Pannaux G et Nordmann P. (2012). Carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp. in Cattle, France. *Emerg Infect Dis.* **18**, 523–525.

Références bibliographiques

Radhouani H, Sliva N, Poeta P, Torres C, Corraei S et Igrejas G. (2014). Potential impact of antimicrobial resistance in wildlife, environment and human health. *FronMicrobiol.* **5**, 23.

Robin F, Gibold F et Bonnet R. (2012). Résistances naturelles et acquises aux β -lactamines chez les entérobactéries : comment les identifier en pratique quotidienne. *RFL.* **2012**, 47-58.

Romeus S, Ferreira C, Gonçalves J, Álvares F, Rio-Maior H, Roque S, Brandão R et Da Costa PM. (2012). Occurrence of virulence genes in multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from Iberian wolves (*Canis lupus signatus*) in Portugal. *Eur J Wild Res.* **58**:677–684.

Ronald A. (2002). The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *Am J Med.* **113**, 14-9.

Santos T, Silva N, Igrejas G, Rodrigues P, Micael J, Rodrigues T, Resendes R, Gonçalves A, Marinho C, Gonçalves D, Cunha R et Poeta P. (2013) Dissemination of antibiotic resistant *Enterococcus spp.* and *Escherichia coli* from wild birds of Azores Archipelago. *Anaerobe.* **24**, 25-31.

Skurnik D et Andremont A. (2006). Antibiothérapie sélectionnante : de la théorie à la pratique. *Reanimation* **15**, 198-204.

Sousa M, Gonçalves A, Silva N, Serra R, Alcaide E, Zorrilla I, Torres C, Caniça M, Igrejas G et Poeta P. (2014). Acquired antibiotic resistance among wild animals: the case of Iberian Lynx (*Lynx pardinus*). *vet Q.* **34**, 105-12.

Stolle I, Prenger-Berninghoff E, Stamm I, Scheufen S, Hassdenteufel E, Guenther S, Bethe A, Pfeifer Y et Ewers C. (2013). Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in dogs. *J Antimicrobi Chemother.* **68**, 2802–2808.

Vasoo S, MBBS, MRCP, Jason N. Barreto, PharmD, Pritish K et Tosh, MD. (2015). Emerging Issues in Gram-Negative Bacterial Resistance: An Update for the Practicing Clinician. *MFMER.* **90**, 395-403.

Wang Y, He T, Han J, Wang J, Foley SL, Yang G, Wan S, Shen J et Wu C. (2012). Prevalence of ESBLs and PMQR genes in fecal *Escherichia coli* isolated from the non-human primates in six zoos in China. *Vet Microbiol.* **159**, 53-9.

Yaici L, Haenni M, Saras E, Boudehouche W, Touati A, Madec JY. (2016). blaNDM-5-carrying IncX3 plasmid in *Escherichia coli* ST1284 isolated from raw milk collected in a dairy farm in Algeria. *J Antimicrob Chemother.*

Yousfi M, Mairi A, Bakour S, Touati A, Hassissen L, Hadjadj Let Rolain JM. First report of NDM-5-producing *Escherichia coli* ST1284 isolated from dog in Bejaia, Algeria. (2015). *New Microbes New Infect.* **10**, 17-8.

Références bibliographiques

Yousfi M, Mairi A, Touati A, Hassissene L, Brasme L, Guillard T et De Champs C.(2016). Extended spectrum β -lactamase and plasmid mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* fecal isolates from healthy companion animals in Algeria. J Infect Chemother.

Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM et Chong Y. (2002). Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *pseudomonas spp* ans *Acinetobacter SPP*. J Clin Microbiol. **40**, 3798 - 801.

Villa L , Guerra B Schmogger S Fischer J Helmuth R, Zong Z, García-Fernández A et Carattoli A. (2015).IncA/C Plasmid Carrying *bla*NDM-1, *bla*CMY-16, and *fosA3* in a *Salmonella enterica* Serovar Corvallis Strain Isolated from a Migratory Wild Bird in Germany. Antimicrob Agents Chemother.**59**,6597–6600.

Résumé

L'objectif de notre étude est d'évaluer le taux de portage des souches d'entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu et productrice de carbapénèmases isolées d'animaux sauvages provenant de différentes communes de la willaya de Bejaia.

Des échantillons de matières fécales (n=291) prélevés à partir du chacal, singe magot, sanglier et cigogne ont été analysés après isolement sur milieux sélectifs, les souches ont été identifiées par une galerie API 20 E.

Au total, 32 souches productrices de BLSE et 3 souches productrices d'EPC ont été isolées donnant des taux de portage de 11% et de 1.03% respectivement. La résistance des souches à la tétracycline a été de 87% suivie de 58.88% pour l'acide nalidixique et enfin de 58.88% pour la gentamycine.

Les animaux sauvages peuvent être des réservoirs de souches résistantes aux antibiotiques y compris les BLSE et les EPC. Celles-ci, pouvant constituer ainsi un sérieux problème pour la santé humaine.

Mots-clés : Animaux sauvages, Entérobactéries, BLSE, EPC, Algérie.

Abstract

The objective of our study was to evaluate the carriage rate of ESBL and CPE strains isolated from wildlife from different regions in Bejaia.

Fecal samples (n = 291) were from jackal, monkey ape, wild boar and stork and were analysed. After isolation on selective agar, the strains were identified by API 20E.

A total of 32 ESBL-producing strains and 3 carbapenems producing strains were obtained giving carriage rates of 11% and 1.03 % respectively. The resistance rate of tetracycline was 87 %, and 58.88 % to nalidixic acid and 58.88 % gentamicin.

Wild animals can act as reservoirs for resistant strain including ESBL and CPE. They may well constitute a serious problem from human health.

Key-words : Wildlife, Enterobacteriaceae, ESBLs, CPE, Algeria.