



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Larbi Tébessa-Tébessa-

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Département : des sciences de la nature et de la vie

MEMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Science Biologie

Option : Qualité des produits et sécurité alimentaire

Thème :

Prévalence et Anti bio-résistance des souches
d'*Escherichia coli* isolées du lait cru

Présenté par :

Melle GAFFAF Hadjer

M. GHRJEB mahdi

Devant le Jury :

M. GHRISSI B

Dr. BELBEL Z

Mme. BENHADJ.M

M.A.A Université de Tébessa

M.C.B Université de Tébessa

M.A.A Université de Tébessa

Président

Promotrice

Examinatrice

Date de soutenance : 25 mai 2017

Note :16.....Mention :.....excellent.....

2017/2018



Remerciements

Louange à Dieu ﷻ le clément, le miséricordieux, qui nous a donné le courage et la patience de mener à bien ce travail.

Nous tenons en tout premier lieu à exprimer notre profonde gratitude à notre promoteur Dr. BELBEL ZINEB qui nous a guidés pour la réalisation de ce travail, ces conseils et ces encouragements.

Nous présentons nos remerciements aux membres de jury Mr GHRISSI BILLEL et Me BENHADJ MABROUKA qui ont accepté d' examinatrice et juger notre travail.

A tous les enseignements et le personnel de LA FACULTÉ SCIENCE EXACTES ET DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE .

Un grand merci pour lespropriétaire de fermes et de leur travailleurs dans la wilaya de Tebessa qui nous ont facilité les prélèvements .

Nous Tenons à présenter tous nos respects au technicien de laboratoire de LA QUALITE DES PRODUIT ET SECURITE ALIMENTAIRE pour tous ses conseils pratiques et son aide.

On exprime nos sincère remerciements à l' encontre de nos parents qui nous on enseigné la patience, le sacrifice et qui ont toujours été là pour nous.

Nous remercions nos familles pour leur compréhension et leurs patiences, ainsi que leur soutien continuel.

Enfin à Tous ceux qui ont contribué de près ou de loin.

DEDICACE

Au Terme de son achèvement, je dédie ce travail à :

A ma très chère mère NEDJMA

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices consentis que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

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

Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond Amour.

Puisse Dieu le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, langue vie et bonheur.

A mon cher père MOHAME D

Qui est fière et qui trouve ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit.

Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.

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

Que Dieu le tout puissant soit à vos cotés et vous accorde une meilleure Santé.

A mes soeurs

En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous.

Je vous dédie ce travail avec tous mes voeux de bonheur et De santé.

A mes frères pour tous les merveilleux moments passés ensemble.

*A celle qui a toujours été à mes cotés dans les moments difficiles, avec
A mon promoteur Dr. BELBEL ZINEB, merci pour votre disponibilité,
conseils et soutien.*

HADJER

DEDICACE

*Au terme de ce travail, je tiens à exprimer ma profonde gratitude et
me sincères expression d'amour et de respect.*

*A mon chère mère, affable, honorable ; tu représentes le symbole de la
beauté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du
dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager.*

*A mon chère père, rien au monde ne vaut les efforts fournis jours et
nuits pour mon éducation et mon bien être.*

*A mes chère frères et sœurs je vous dédie se travaille avec tous mes
vœux de bonheur, de réussite et de santé.*

*A la mémoire de mon grand père et ma grande mère pour leur effort
pour suivre le bon chemin dans ma vie et mes études.*

*Je dédie cet modeste travaille en témoignage de mon profond amour et
d'expression de mon affection a tous ceux qui on participé a réaliser ce
travail.*

MAHDI

Sommaire

Introduction.....	
Chapitre 1 : Etude de l'espèce Escherichia coli.....	Erreur ! Signet non défini.
I- Généralité :.....	Erreur ! Signet non défini.
I-1 Position Taxonomique :.....	Erreur ! Signet non défini.
I-2 Habitat :.....	Erreur ! Signet non défini.
II- 1 Caractères bactériologiques :.....	Erreur ! Signet non défini.
II-2 Caractères culturaux:.....	Erreur ! Signet non défini.
II-3 Caractèresbiochimiques:.....	Erreur ! Signet non défini.
II-4 Caractères antigéniques et sérologie :.....	Erreur ! Signet non défini.
III- Pouvoir pathogène d'E coli :.....	Erreur ! Signet non défini.
III-1 E coli entéropathogène (EPEC) :.....	Erreur ! Signet non défini.
III-2 E coli entéro-toxinogènes (ETEC) :.....	Erreur ! Signet non défini.
III-3 E coli entérohémorragiques (EHEC) :.....	Erreur ! Signet non défini.
III-4 E coli entéro-aggrégatifs (EAggEC) :.....	Erreur ! Signet non défini.
III-5 E coli à adhérence diffuse (DAEC) :.....	Erreur ! Signet non défini.
III-6 E coli entero-invasifs (EIEC) :.....	Erreur ! Signet non défini.
Chapitre II: RESISTANCE DES E.COLI AUX ANTIBIOTIQUES.....	Erreur ! Signet non défini.
1. Généralités.....	Erreur ! Signet non défini.
2. Types de résistance :.....	Erreur ! Signet non défini.
2. La résistance naturelle :.....	Erreur ! Signet non défini.
2.2. La résistance acquise :.....	Erreur ! Signet non défini.
3-Supports génétiques de la résistance :.....	Erreur ! Signet non défini.
4-les bêtalactamines :.....	Erreur ! Signet non défini.
4.1 mécanismes de résistances.....	Erreur ! Signet non défini.
4.1.1. Bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) :.....	Erreur ! Signet non défini.
4.1.2 Les carbapénèmes :.....	Erreur ! Signet non défini.
5. Les Aminosides :.....	Erreur ! Signet non défini.
5.1 Mécanismes de résistance.....	Erreur ! Signet non défini.
6. Les Quinolones:.....	Erreur ! Signet non défini.

6.1. Mécanismes de résistance :	Erreur ! Signet non défini.
Chapitre III : Généralité sur le lait.....	Erreur ! Signet non défini.
1. Définition du lait	Erreur ! Signet non défini.
2. Lait de vache :	Erreur ! Signet non défini.
3. Lait de chèvre :	Erreur ! Signet non défini.
4. MICROBIOLOGIE DU LAIT CRU :	Erreur ! Signet non défini.
4.1 Flore originelle.....	Erreur ! Signet non défini.
4.2 Flore de contamination.....	Erreur ! Signet non défini.
4.3 Contrôle bactériologique du lait cru.....	Erreur ! Signet non défini.
4.4 Flore mésophile aérobie totale.....	Erreur ! Signet non défini.
4.5 Les germes responsables des défauts de fabrication	Erreur ! Signet non défini.
4.5.1 Flore psychrotrophe.....	Erreur ! Signet non défini.
4.5.2 Flore thermorésistante	Erreur ! Signet non défini.
4.6 Les marqueurs ou bactéries témoins de contamination fécale.....	Erreur ! Signet non défini.
4.6.1 Coliformes	Erreur ! Signet non défini.
4.6.2 Streptocoques fécaux.....	Erreur ! Signet non défini.
4.7 Flore pathogène.....	Erreur ! Signet non défini.
1. Cadre de l'étude	Erreur ! Signet non défini.
2. Région d'étude	Erreur ! Signet non défini.
3. Matériel et méthodes :	Erreur ! Signet non défini.
3-1 Echantillonnage :	Erreur ! Signet non défini.
3-2 Contrôle de qualité microbiologique	Erreur ! Signet non défini.
3-2-1 Dénombrement des coliformes totaux.....	Erreur ! Signet non défini.
Méthode.....	Erreur ! Signet non défini.
Interprétation des résultats :	Erreur ! Signet non défini.
3-2-4 Réisolement.....	Erreur ! Signet non défini.
3-2-2 Coloration de Gram	Erreur ! Signet non défini.
Interpretation de résultats.....	Erreur ! Signet non défini.
3-2-3 L'identification des isolats par la galerie API 20 E (BioMérieux, Meylan, France) :	Erreur ! Signet non défini.
Méthode.....	Erreur ! Signet non défini.
Interpretation de résultats.....	Erreur ! Signet non défini.
3-3 Détermination de la sensibilité aux antibiotiques.....	Erreur ! Signet non défini.

Méthode utilisé	Erreur ! Signet non défini.
Interpretation de résultats	Erreur ! Signet non défini.
3-4 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par E.test.....	Erreur ! Signet non défini.
Signet non défini.	
Méthode.....	Erreur ! Signet non défini.
Interpretation de résultats	Erreur ! Signet non défini.
4. Résultat.....	Erreur ! Signet non défini.
4-1 Contrôle de la qualité microbiologique.....	Erreur ! Signet non défini.
4-1-1Dénombrement des coliformes totaux.....	Erreur ! Signet non défini.
4-1-2 Étude morphologiques	Erreur ! Signet non défini.
A/ L'aspect macroscopique.....	Erreur ! Signet non défini.
B/L'aspect microscopique.....	Erreur ! Signet non défini.
4-1-3 Identification par la galerie API20E.....	Erreur ! Signet non défini.
4-3 Sensibilité aux antibiotiques.....	Erreur ! Signet non défini.
4-4 Détermination des Concentration minimales inhibitrices (CMI) des souches par E.test	Erreur ! Signet non défini.
Discussion	Erreur ! Signet non défini.
Conclusion.....	Erreur ! Signet non défini.

Résumé

La résistance aux antimicrobiens par des bactéries provenant de denrées alimentaires d'origine animale est une préoccupation pour la santé publique, L'objectif de notre étude était d'évaluer la qualité microbiologique du lait cru de vaches et de chèvre dans la région de Tébessa et de déterminer la prévalence de la résistance aux antibiotiques des souches d'*Escherichia coli* isolées du lait cru.

Un total de 75 échantillons a été prélevé par la traite manuelle et du lait cru vendu en vrac dans la période de février à l'avril 2017 à partir du lait cru de vaches et lait de chèvre de plusieurs lieux d'élevage à la région de Tébessa comprenant 22 échantillons chèvres et 53 échantillons de lait cru de vaches.

D'abord un control de qualité microbiologique par recherche de coliforme a été effectué pour l'ensemble des échantillons du lait cru. Ensuite, une identification biochimique par Api 20E a été réalisée pour les boites Mac conkey qui ont généré une culture caractéristique à *E. coli*. En outre un test de sensibilité aux antibiotiques par un antibiogramme comprenant 11 antibiotiques a été effectué pour les souches identifiées en tant que *E.coli*. Finalement, une détermination des concentrations minimales inhibitrices pour les souches d'*E coli* résistantes a été réalisée dans le but de l'évaluation du niveau aux principales familles d'antibiotiques (bétalactamines, aminosides, quinolones et sulfamides).

Les résultats issus de cette étude ont montré un niveau de résistance élevée à la majorité des antibiotiques testés avec de fortes concentrations minimales inhibitrices en particulier les bétalactamines : avec une prévalence de production de bétalactamase à spectre étendu BLSE de 52,63%. Par ailleurs, notre étude a signalé la première détection de production de carbapenemase par une souche d'*E coli* isolée du lait cru.

Finalement, nos résultats ont montré le risque de consommation lait cru contenant des bactéries viables multirésistantes. En définitive, cette étude souligne la nécessité de surveillance des vendeurs du lait cru.

Mots clés :

Escherichia coli, lait cru, résistance aux antibiotiques, BLSE, carbapenemase, CMIs.

ملخص :

المضادات الميكروبية بواسطة بكتيريا ناتجة عن مواد غذائية ذات أصل حيواني هي اشغال للصحة العمومية. ان هدف الدراسة هو تقييم الجودة الميكروبيولوجية لحليب البقر وحليب الماعز الطازج على مستوى منطقة تبسة وتقدير مقاومة المضادات الحيوية لسلاسل البكتيريا القولونية معزولة في الحليب الطازج. تم اقتطاع 75 عينة من الحليب الطبيعي الطازج المباع على حاله خلال فترة شهر فيفري 2017 ابتداء من حليب البقر والماعز الطازج على مستوى عدة أماكن لتربية الحيوان بتبسة ضمت 22 عينة (حليب ماعز طازج) و 53 عينة (حليب بقر طازج).

بداية تمت المراقبة النوعية الميكروبية بالبحث عن بكتيريا القولون على مستوى كل العينات وبعدها تم التعرف البيو كيميائي بواسطة Api20e لعلب Mac KonKey والذين شكلوا أجيالا ذات خاصية بكيريا القولون بالإضافة الى كشف الحساسية للمضادات الحيوية بواسطة جهاز الكاشف للمضادات الحيوية. يضم 11 مضادا حيويا للسلاسل بكتيريا القولون.

وأخيرا تم تحديد التراكيز الدنيا المنتظمة لسلاسل بكتيريا القولون المقاومة. تمت من اجل تقييم مستوى اهم عائلات المضادات الحيوية (aminosides،βétalactamines، quinolones et sulfamides).

النتائج المنبثقة عن هاته الدراسة بينت مستوى مقاومة عال في معظم المضادات الحيوية المجربة مع تراكيز دنيا عالية خاصة βétalactamase مع مؤشر انتاج βétalactamase في مجال BLSE 53% وبالموازاة الدراسة اشارت الى تبيان انتاج carbapenemase بواسطة سلالة بكتيريا القولون المعزولة في الحليب الطازج.

وأخيرا النتائج المحصل عليها بينت خطر استهلاك الحليب الطازج والمحتوي على بكتيريا حيوية مقاومة وعليه وجب مراقبة بائعي الحليب الطازج.

البحث كلمات

القولونية. carbapenemase، ESBL، المقاومة الحيوية للمضادات الخام، الحليب، لتركيز الأدنى المثبط،

Résumé:

The resistance to antibiotics by bacteria that originates from animal food stuff poses a concern to public health

The goal of our study was to evaluate the microbiological quality of both cows and goats unpasteurised milk in the region of Tébessa and to determine the prevalence of antibacterial resistance for the strain of *E-coli* isolated from the unpasteurised milk

A total of 75 samples were taken from unpasteurised milk sold in bulk on the market from February to April 2017

From any different farms in the area counting 22 samples of goat milk and 53 of cow milk.

First a microbiological control by searching for coliforms was conducted on the samples collected earlier

Then a biochemical identification using the Api 20E Wap carried out for the mac-conekey cultures that presented similar characteristics as those of *E-coli*

After that a sensibility test to antibiotics using an antibiogram with 11 antibiotics was implemented for the strains identified as *E-coli*

Finally a determination of minimal inhibitory concentrations for the resistant strains of *E-coli* was done for the level evaluation for the principal families of antibiotics

The results stemming from this study show a high level of resistance for the majority of antibiotics tested with high minimal inhibitory concentrations in particular the beta-lactams with a beta-lactamase production prevalence of 53% on extended spectrum

Also our study signaled the first detection of carbapenemase production by a strain of *E-coli* isolated from unpasteurised milk.

Finally our results showed the risks of unpasteurised milk consumption that contraindicates multi-resistant bacteria, which underlines the necessity of keeping surveillance on unpasteurised milk salesmen

Keywords:

Escherichia coli, raw milk, antibiotic resistance, ESBL, carbapenemase, CMIs.

Liste Des Figures :

Figure 01: Limites administratives da la wilaya de Té bess (Anonyme, 2016).	17
Figure n02: prélèvement des échantillons	18
Figure n03: Aspect de la galerie API 20 E après l'inoculation d'une souche à tester avant incubation	21
Figure n04 : Antibiogramme	22
Figure n05 : bandelette E.test appliquée sur gélose Mueller Hintonensemencée.	24
Figure n06 : image montrant l'aspect des colonies obtenu après ensemencement du lait sur le milieu Mac conkey (souche n19)	25
Figure n07 : Repiquage d'une colonie isolée à partir la souche n°19	26
Figure n08: les caractères biochimiques après incubation montrent que la souche 19 isolée a partir lait de vache est <i>Escherichia coli</i>	27
Figure n09: Distribution les souches selon l'espèce	27
Figure n10 : Sensibilité aux antibiotiques des 21 souches cliniques de <i>E.coli</i> aux 11 antibiotiques testés.	28
Figure n11 : Image d'antibiogramme de la souche <i>E.coli</i> 19	29

Liste Des Tableaux :

Tableau 01: Antibiotiques testés	23
---	-----------

Liste des abreviations

%	Pourcentage
g	gramme
ml	millilitre
E.coli	Escheicha coli
BLSE	B-lactamases à spectre étendu
CMI	Concentration minimales inhibitrice
ST	Thermostables
LT	Thermolabiles
EPEC	E.coli entéro-pathogène
ETEC	E.coli entéro-toxinogènes
EHEC	E.coli entéro-hémorragiques
EAEC	E.coli entéro-aggrégatifs
DAEC	E.coli à adherence diffuse
EIEC	E.coli entéro-invasifs
ATB	antibiotique
MH	Miller Hinton
VP	Glucose+pyruvate
LDC	Lysine
ODC	Ornithine
ADH	Arginie
URE	Urée
H2S	Thiosulfate de sodium

Introduction

L'Algérie est le premier consommateur de lait au Maghreb, avec près de trois milliards de litres par an (23). Cet aliment occupe une place prépondérante dans la ration alimentaire des algériens, il apporte la plus grande part des protéines d'origine animale. Acteur clé de l'industrie agroalimentaire, La production du lait de vache se heurte souvent au problème de gestion de la qualité qui pénalise tant les producteurs que les transformateurs.

Les conditions d'hygiène au niveau des fermes et tout le long du circuit de la production jusqu'à l'arrivée du lait à la laiterie, comportent autant des sources de contaminations à maîtriser afin de préserver la qualité hygiénique du lait (10).

Les souches d'*Escherichia coli* se trouvent dans le tractus gastro-intestinal de nombreux animaux à sang chaud, y compris les humains, où elles jouent généralement le rôle des bactéries commensales. Cependant, par acquisition et combinaison de facteurs de virulence et de résistance aux antibiotiques, ces souches commensales normalement inoffensives peuvent devenir des agents pathogènes très adaptés capables de causer une variété de maladies, de la gastro-entérite à des infections extra-intestinales (37).

Les antibiotiques sont des médicaments utilisés pour traiter et prévenir les infections bactériennes. La résistance survient lorsque les bactéries évoluent en réponse à l'utilisation de ces médicaments. Ce sont les bactéries, et non les êtres humains ou les animaux, qui deviennent résistantes. Elles peuvent alors provoquer chez l'homme ou l'animal des infections plus difficiles à traiter que celles dues à des bactéries non résistantes.

La résistance aux antibiotiques entraîne une augmentation des dépenses médicales, une prolongation des hospitalisations et une hausse de la mortalité (47).

Récemment, il a été prouvé que des gènes de résistances des bacilles à Gram négatif ont été transmis via la chaîne alimentaire à l'homme. L'augmentation et la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif, représente un problème majeur de santé publique. Les infections causées par ces bactéries multirésistantes conduisent à l'augmentation des coûts des soins, à des hospitalisations prolongées, à des échecs thérapeutiques et à un taux élevé de morbidité et de mortalité (07). Au cours des années, la résistance aux céphalosporines chez les membres des entérobactéries a augmenté principalement en raison de la propagation des β -lactamases à spectre étendu (ESBL).

A cause de l'innocuité des aliments, il est impératif de déterminer la qualité bactériologique du lait cru destinée à la consommation humaine, Par ailleurs, il a été prouvé que des gènes de

résistances des souches d'*Escherichia coli* ont été transmises à la microflore humaine via l'alimentation.

C'est dans ce contexte général que nous avons été menés à entreprendre ce travail afin de mettre en évidence de la qualité microbiologique du lait cru de vaches et de chèvre dans la région de Tébessa, d'évaluer la résistance aux antibiotiques des souches d'*E.coli* isolées du lait cru, de déterminer la prévalence des souches d'*E coli* productrices de BLSE et d'estimer le degré de résistance aux principales familles d'antibiotiques utilisés dans le traitement des infections à Enterobacteriaceae par la détermination des concentrations minimales inhibitrice (CMI).

Ce manuscrit s'articule autour de 4 parties :

La première partie portera principalement sur la revue de la littérature concernant l'étude bactériologique de l'espèce *Escherichia coli*, les différents mécanismes et les données épidémiologiques de sa résistance aux antibiotiques. La deuxième partie présentera le matériel et les méthodes expérimentales utilisées. La troisième partie portera sur l'ensemble des résultats obtenus et aux discussions qui en découlent. Nous terminerons ce travail par une quatrième partie qui sera consacrée à la conclusion.

Partie
Bibliographique

Chapitre 1 : Etude de l'espèce *Escherichia coli*

I- Généralité :

E. coli a été mise en cause pour la première fois dans l'étiologie de l'entérite infantile lorsque Théodore Escherich isola ces micro-organismes lors de cas de diarrhée de nourrissons en 1885. Durant les années 1920 et 1930, plusieurs chercheurs essayèrent d'identifier les types spécifiques d'*E. coli* responsables des entéropathies, mais aucun progrès significatif ne fut réalisé jusqu'à la mise au point par Kauffmann, dans les années 1940, d'un schéma de sérotypes précis (51).

Escherichia coli est considéré comme un hôte normal de la microflore bactérienne du tractus digestif de l'homme ainsi que de celle de nombreux animaux à sang chaud. Elle représente près de 80% de la microflore aérobie. A ce titre *Escherichia coli*, et plus largement les coliformes thermotolérants, sont recherchés dans les aliments comme indicateurs de contamination fécale ; leur présence fournit ainsi une indication sur une éventuelle contamination de l'aliment par des bactéries pathogènes d'origine digestive (*Salmonella typhimurium*, *E.coli O157 :H7*) (51).

En outre, bien que la majorité des souches de *E.coli* soient commensales banales, certaines d'entre elles sont pathogènes et connues des médecins comme étant à l'origine de pathologies intestinales ou extra-intestinales (37).

I-1 Position Taxonomique :(11)

Selon la deuxième édition de *Bergey's Manual of systematic bacteriology* la position taxonomique de *Escherichia coli* est :

Domaine : *Bacteria*

Division : *Proteobacteria*

Classe *Gammaproteobacteria*

Ordre : *Enterobacteriales*

Famille : *Enterobacteriaceae*

Genre : *Escherichia*

Espèce : *Escherichiacoli*

I-2 Habitat : (15)

Les entérobactéries sont présentes dans de nombreux écosystèmes, en particulier l'intestin qui leur a donné son nom mais aussi dans l'environnement (eau, sol...). Elles peuvent être saprophytes, commensales ou pathogènes. Le cas d'*E.coli* est typique puisque cette bactérie est retrouvée dans les eaux souvent en provenance d'une contamination fécale, dans l'intestin.

II- Caractères microbiologiques :

II- 1 Caractères bactériologiques :

Escherichia coli est un bacille à coloration de Gram négatif, non sporulé, anaérobies facultatifs et qui ne possèdent pas d'oxydase, parfois capsulé, assez grand (1-1.5 x 2-6µm), mobile à ciliature péritriche (05).

II-2 Caractères cultureux:

La plupart des souches se multiplient rapidement sur milieux gélosés ordinaires ou sélectifs, donnant en 18 à 24 heures des colonies d'environ 2 mm de diamètre avec un aspect caractéristique (rond, plat en « scarabée » et à bord régulier) (05).

II-3 Caractères biochimiques:

A- Les souches typiques d'*E.coli*, non exigeant, catalase+, oxydase-, réduit les nitrates en nitrites et fermentant le glucose avec production de gaz en général. *E.coli* est aussi lactose+, produit de l'indole à partir du tryptophane, n'utilise pas le citrate de Simmons comme seule source de carbone, VP-, LDC+, ODC+ (50% des souches), ADH-.

B- Souches atypiques d'*E.coli* : Certaines souches d'*E.coli* ne possèdent pas toutes les caractéristiques habituelles. Certaines souches forment des colonies naines (déficiência métabolique) certaines sont Indol-, lactose-, immobiles, il existe une variété muqueuse (importante capsule polysaccharidique).

-Certaines souches sont H₂S+ (associé à une résistance à la tétracycline), d'autres sont uréase+ (05).

II-4 Caractères antigéniques et sérologie : (21)

➤ De l'antigène O ou somatique :

Cet antigène est localisé au niveau de la paroi bactérienne de nature lipopolysaccharidique, il est en fait l'endotoxine bactérienne. A cet antigène O correspond une agglutination O.

Il existe environ 180 antigènes O différents. Au moyen d'immun sérum spécifique de ces antigènes O, il est possible de classer sérologiquement l'*E.coli*.

➤ De l'antigène K ou capsulaire :

De nature polysaccharidique, ils entourent les antigènes O et se présentent sous deux types de structures :

-La première, capsulaire lorsqu'ils constituent une capsule visible au microscope.

-La seconde, d'enveloppe quand ils ne sont pas visibles au microscope et masquent les antigènes somatiques, si bien qu'ils inhibent l'agglutinabilité O des bactéries par les sérums de diagnostic des *Escherichia coli* préparés sur lapin.

Environ 80 antigènes K ou antigènes d'enveloppe différents ont été reconnus.

➤ De l'antigène H ou flagellaire :

Il n'existe que chez les bactéries mobiles, donc pourvues de flagelle. A cet antigène H correspond une agglutination H faite d'agglutinats floconneux, lâches et facilement dissociés par agitation. Les bactéries sont agglutinées par leurs flagelles. On en connaît 56 types. Les antigènes O, k, H sont à la base d'un schéma de diagnostic antigénique, notamment pour le diagnostic différentiel, ils permettent d'établir le sérotype et de détecter les souches d'*Escherichia coli* responsables de pathologies.

III- Pouvoir pathogène d'*E. coli*:

La majorité de souches d'*E. coli* soient commensales mais d'entre elles sont associées à des pathologies intestinales ou extra-intestinales très diverses chez l'homme. Comme la plupart des pathogènes des muqueuses, les souches d'*E. coli* pathogènes utilisent une stratégie d'infection dont les points clés sont la colonisation des muqueuses, éventuellement l'invasion des cellules, la multiplication, l'évasion des défenses de l'hôte et les dommages à l'hôte. La détermination des combinaisons de propriétés particulières associées à la virulence d'une souche, les modes d'infection et les signes cliniques de l'infection, constitue un moyen de typage d'*E. coli*, que l'on désigne sous le néologisme de pathotype ou pathovar.

III-1 *E. coli* entéro-pathogène (EPEC) :

Ces souches étaient responsables, dans les années 50, de diarrhées infantiles graves ou toxiques survenant par épidémies dans les crèches ou des maternités. Ces souches encore appelées *E. coli* G.E.I (des gastro-entérites infantiles) sont plus rarement rencontrées aujourd'hui, elles sont alors isolées de cas sporadiques.

III-2 *E. coli* entéro-toxinogènes (ETEC) :

Leur pouvoir pathogène est dû principalement à la sécrétion de toxines thermostables (ST) et/ou thermolabiles (LT). Elles sont responsables de diarrhées très liquides survenant dans les pays en développement. Ces diarrhées s'observent aussi chez les voyageurs « Turista ». Elles sont souvent épidémiques chez les enfants de ces pays.

III-3 *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) :

Ces souches ont été décrites en Amérique du Nord, au Japon et en Europe. Elles sont responsables d'épidémies de diarrhées aqueuses puis hémorragiques (colite hémorragique). Elles appartiennent à quelques sérotypes particuliers (O157:H7, mais aussi O103:H2, O26:H11, O111:H38). Les EHEC sont capables de produire une ou plusieurs cytotoxines appelées verotoxines capables de tuer *in vitro* les cellules Véro (cellule rénale du singe vert africain) par inhibition de la synthèse protéique. Les toxines sont appelées également Shiga-Like-Toxin en raison de leurs similitudes avec la toxine de *Shigella dysenteriae* type 1. Deux types de verotoxines existent STX1, STX2 avec plusieurs variants de STX2. STX2 serait mille fois plus cytotoxique sur les cellules endothéliales rénales humaines que STX1. L'homologie entre STX1 et STX2 varie de 50 à 60% avec des régions de faibles ou de très hautes homologies. Ces souches sont aussi responsables de syndromes hémolytique-urémique (SHU) chez l'enfant ou à un Purpura Thrombotique Thrombocytopénique (PTT) chez l'adulte.

III-4 *E coli* entéro-aggrégatifs (EAggEC) :

Les EAEC sont une catégorie de souches pathogènes associés, à des diarrhées aqueuses pouvant évoluer vers des formes persistantes. Ils élaborent entérotoxine thermostables (EASTI) et une entérotoxine thermolabile.

III-5 *E coli* à adhérence diffuse (DAEC) :

Les DAEC sont une toute nouvelle catégorie de souches associées à des diarrhées aqueuses aiguës ou persistantes survenant surtout chez les enfants (plus particulièrement ceux âgés de 2 à 6 ans).

III-6 *E coli* entero-invasifs (EIEC) :

Les EIEC sont responsables de diarrhées aqueuses qui, dans de rares cas, vont évoluer vers une dysenterie suggérant que leur pouvoir pathogène est similaire a celui des *Shigella* sp.

Chapitre II: RESISTANCE DES E.COLI AUX ANTIBIOTIQUES

1. Généralités

Les antibiotiques ont été très efficaces pour le traitement de nombreuses maladies infectieuses humaines, qui par le passé étaient fatales, sont aujourd'hui généralement traitées par les antibiotiques. Cependant, un problème a surgi après leur usage généralisé. L'utilisation intensive de la pénicilline comme agent chimio-thérapeutique a conduit à l'évolution de souches bactériennes pathogènes qui sont devenues insensibles au médicament. Ainsi, un micro-organisme est dit résistant lorsque, pour l'une des raisons évoquées, il est capable de se développer en présence d'un taux d'antibiotique significativement plus élevé que le taux habituel. La notion de résistance clinique, est corrélative d'un échec thérapeutique ; elle n'a qu'une signification arbitraire, par rapport au malade ; elle n'a aucun sens à l'échelle microorganisme (30).

2. Types de résistance :

Les bactéries deviennent résistantes aux antimicrobiens par différentes manières, quelques micro-organismes sont naturellement résistants mais d'autres, ont une résistance acquise.

2. La résistance naturelle :

Certaines espèces présentent une résistance naturelle ou intrinsèque à une ou plusieurs antibiotiques. Dans ce cas, la résistance à un antibiotique donné concerne toutes les souches d'une même espèce ou d'un même genre bactérien. Les informations qui codent ce comportement habituel d'une souche font partie du patrimoine génétique de l'espèce. La résistance naturelle est un phénomène connu, constant, transmissible à la descendance au cours des divisions successives, définie par le spectre d'activité. Il est donc possible de prévoir l'inefficacité d'une molécule vis-à-vis de la bactérie identifiée et d'en éviter l'emploi.

2.2. La résistance acquise :

Certaines souches, au sein d'une espèce naturellement sensible à l'ATB, deviennent résistantes. Ce phénomène de résistance acquise est imprévisible et évolutif, observé in vivo et in vitro pour la plupart des bactéries et des ATB connus. Il rend nécessaire la réalisation de l'antibiogramme pour évaluer in vitro la sensibilité des souches aux ATB et adapter une thérapeutique en utilisant les substances efficaces.

3-Supports génétiques de la résistance : (45, 53)

Le comportement « anormal » de la bactérie vis-à-vis de l'antibiotique correspond à une modification d'un caractère acquis soit par mutation chromosomique soit par acquisition de gènes étrangers portés par des éléments mobiles transférables, plasmides et transposons présents chez d'autres espèces.

4-les bêta-lactamines : (45, 53)

Les β -lactamines bloquent l'enzyme catalysant la réaction de transpeptidation qui forme les ponts du peptidoglycane complet. La formation de peptidoglycane complet est inhibée ce qui conduit à une lyse osmotique. Donc les β -lactamines ne sont actives que pendant la croissance bactérienne car elles inhibent la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane. A la surface externe de la membrane cytoplasmique, elles se lient spécifiquement au site actif des enzymes, les protéines liant les pénicillines (PLP)

4.1 mécanismes de résistances

La résistance résulte de gènes résistants aux antibiotiques et bon nombre de ceux-ci peuvent être échangés entre les bactéries. Ces gènes hydrolysent des antibiotiques (par exemple des β -lactamases à spectre étendu, des AmpC β -lactamases, carbapénémases), évitent le ciblage antibiotique (par exemple vanA muté et mecA Gènes), empêchent la perméabilité aux antibiotiques (par exemple déficit en porines), ou excrètent des gènes intracellulaires (par exemple pompe d'efflux actif)

4.1.1. Bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) :

La production de BLSE est le principal mécanisme de résistance aux antibiotiques chez les *Enterobacteriaceae*. Les organismes capables d'exprimer ces enzymes, sont souvent résistantes aux médicaments multiples (MDR). Les BLSE confèrent une résistance bactérienne aux pénicillines, les céphalosporines de troisième génération et l'aztréonam, mais pas les céphamycines et les carbapénèmes, et sont généralement inhibées par les dits inhibiteurs de β -lactamase « classiques » tels que l'acide clavulanique, tazobactam et sulbactam, respectivement.

4.1.2 Les carbapénémases : (45, 53)

Chez les entérobactéries, deux mécanismes de résistance aux carbapénèmes sont connus depuis les années 1980. L'un combine l'hyperproduction d'une céphalosporinase à celle de la perte d'une porine. L'autre consiste en la production d'une carbapénémase de classe A en position chromosomique, donc non transférable entre espèces. La dernière évolution identifiée depuis peu est beaucoup plus inquiétante car elle est liée à la découverte de carbapénémases

plasmidiques, permettant un transfert inter-espèces et une dissémination rapide.

5. Les Aminosides : (45, 53)

Aminosides ou les Aminoglycosides, forment une famille d'ATB dont les molécules sont reliées par des liaisons glycosidiques. L'aminoside le mieux connu est probablement la streptomycine découverte en 1944. On y a encore recouru comme traitement de relais contre tuberculose, mais à l'accroissement rapide de la résistance de cet ATB et ses effets toxiques sérieux ont fortement diminué son utilité. Ils comprennent streptomycine et gentamycine, qui perturbent les premières étapes de la synthèse des protéines en modifiant la conformation de la sous-unité 30S du ribosome procaryote. Il en résulte des erreurs de lecture du code génétique des ARNm. Ils font partie des premiers antibiotiques à présenter une activité notable contre les bactéries à Gram négatif.

5.1 Mécanismes de résistance: plusieurs mécanismes de résistances d'E.coli aux aminosides peuvent exister :

- Défaut de pénétration de l'ATB
- Modification de la cible ribosomale
- Synthèse d'enzymes inactivant les antibiotiques
- La méthylation de l'ARN 16S

6. Les Quinolones: (45, 53)

Sont les ATB synthétiques possédant un noyau 4-quinolone. Ce sont des agents antimicrobiens importants qui inhibent la synthèse des acides nucléiques. On les utilise de plus en plus pour traiter une grande variété d'infection. Les quinolones agissent en inhibant l'ADN gyrase bactériennes et la topo-isomérase II. L'inhibition d'ADN gyrase perturbe la réplication et la réparation de l'ADN. Les fluoroquinolones inhibent aussi topo-isomérase II, une autre enzyme qui démêle l'ADN pendant la réplication.

6.1. Mécanismes de résistance :

La capacité des bactéries à devenir résistantes aux quinolones est variable. La résistance aux quinolones est exclusivement liée à des mutations chromosomiques :

- Mutation sur les gènes codant pour les topo-isomérases, entraînant une perte d'affinité de l'enzyme pour la quinolone
- Diminution de la pénétration de l'ATB dans la bactérie (elle concerne les bactéries à Gram négatif, pour lesquelles on note la disparition de porines).

Augmentation du transport actif de l'ATB hors de la bactérie ; ce mécanisme se rencontre aussi bien chez les bactéries à Gram négatif que chez les bactéries à Gram positif.

Chapitre III : Généralité sur le lait

1. Définition du lait

Le lait a été défini en 1908, au cours du Congrès International de la Répression des Fraudes à Genève comme étant :

« Le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Le lait doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir de colostrum».

Le *Codex Alimentarius* en 1999, le définit comme étant la sécrétion mammaire normale d'animaux de traite obtenue à partir d'une ou plusieurs traites, sans rien y ajouter ou en soustraire, destiné à la consommation comme lait liquide ou à un traitement ultérieur.

Selon Deforges et *al.* en 1999, le lait cru est un lait non chauffé au-delà de 40°C ni soumis à un traitement non thermique d'effet équivalent notamment du point de vue de la réduction de la concentration en micro-organismes.

2. Lait de vache :

Le lait de vache est un liquide opaque de couleur blanche, plus au moins jaunâtre selon la teneur de la matière grasse en beta carotène. Sa saveur est douce et son odeur faible.

Le lait de vache de part sa richesse en matière azotée, en calcium et en vitamines offre un intérêt alimentaire exceptionnel.

Les proportions des différents composants du lait de vache varient quelque peu selon les espèces de mammifères et parmi ces espèces selon leur race.

3. Lait de chèvre :

Le lait de chèvre est caractérisé par sa couleur blanche due à l'absence de beta carotène, contrairement au lait de vache. Le lait de chèvre se digère plus facilement que le lait de vache et il est donc recommandé pour les bébés et les personnes qui supportent mal ce dernier. De plus il est naturellement homogénéisé car il est dépourvu d'une protéine, l'agglutinine.

4. MICROBIOLOGIE DU LAIT CRU : (27)

Le lait contient un nombre variable de cellules ; celles-ci correspondent à la fois à des constituants normaux comme les globules blancs, mais également à des éléments d'origine exogène que sont la plupart des microorganismes contaminants.

4.1 Flore originelle

Le lait contient peu de microorganismes lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain (moins de 10³ germes/ml). A sa sortie du pis, il est pratiquement stérile et est protégé par des substances inhibitrices appelées la cténines à activité limitée dans le temps (une heure environ après la traite).

La flore originelle des produits laitiers se définit comme l'ensemble des microorganismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis, les genres dominants sont essentiellement des mésophiles. Il s'agit de microcoques, mais aussi streptocoques lactiques et lactobacilles.

4.2 Flore de contamination

Cette flore est l'ensemble des microorganismes contaminant le lait, de la récolte jusqu'à la consommation. Elle peut se composer d'une flore d'altération, qui causera des défauts sensoriels ou qui réduira la durée de conservation des produits, et d'une flore pathogène dangereuse du point de vue sanitaire.

4.3 Contrôle bactériologique du lait cru

L'appréciation de la qualité bactériologique du lait cru consiste en la recherche des germes pathogènes, des germes utiles et des germes nuisible à la conservation. Ces micro-organismes peuvent proliférer dans le lait qui constitue un excellent milieu de culture. Selon l'intérêt de l'étude, on oriente donc notre recherche. Dans ce cas précis, on s'intéresse aux germes pathogènes et aux germes indésirables qui génèrent des problèmes de transformation fromagère et qui peuvent être gênants pour le consommateur.

4.4 Flore mésophile aérobie totale

La flore mésophile aérobie totale est constituée d'un ensemble de microorganismes variés correspondant aux germes banaux de contamination. Son dénombrement reflète la qualité microbiologique générale du lait cru et permet de suivre son évolution au cours de sa transformation. Ainsi le nombre de germes totaux pourra donner une indication de l'état de fraîcheur ou de décomposition (altération) du lait.

Des valeurs élevées n'indiquent pas nécessairement la présence de pathogènes, aussi des valeurs basses peuvent accompagner la présence de pathogènes à des niveaux dangereux.

4.5 Les germes responsables des défauts de fabrication

Il s'agit principalement de psychrotrophes et de thermorésistants. Ces deux types de germes entraînent des défauts organoleptiques, des problèmes de protéolyse (dégradation des protéines) responsables de la baisse du rendement fromager et de la lipolyse.

4.5.1 Flore psychrotrophe

La conservation du lait au froid aboutit à une sélection des germes psychrotrophes capables de se multiplier à des températures égales ou inférieures à 7°C. Ces germes proviennent du sol, des eaux ou des fourrages.

4.5.2 Flore thermorésistante

Un certain nombre de bactéries sont capables de résister aux traitements thermiques usuels utilisés dans le but d'assainir ou de conserver le lait. Elles sont dites thermorésistantes. Leur développement ultérieur peut altérer les produits et, parfois, être dangereux pour la santé.

4.6 Les marqueurs ou bactéries témoins de contamination fécale

Certaines bactéries ou groupes bactériens mis en évidence peuvent être considérés comme témoins de contamination d'origine fécale et indiquent la présence possible de germe pathogène. Parmi eux, nous avons :

4.6.1 Coliformes

Les coliformes sont des entérobactéries (bacilles Gram-, asporulés, glucose+, oxydase-, nitrate réductase+, aérobies anaérobies facultatifs) qui fermentent le lactose avec production de gaz. Il s'agit d'un groupe disparate non défini sur le plan taxonomique qui comprend les genres *Escherichia* (avec espèces *coli*, *intermedium*, *freudii*), *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Klebsiella*. Leur développement est freiné par l'abaissement du pH et leur croissance stoppée lorsque le pH est inférieur à 4,5. Ils sont peu résistants à la chaleur.

Les coliformes se répartissent en deux groupes distincts :

- les non fécaux dont l'origine est l'environnement général des vaches, ils sont détectés dès 30°C.
- les fécaux dont l'origine essentielle est le tube digestif, qui sont plus thermotolérants (détectés à 44°C). *Escherichia coli* fait partie de ce dernier groupe.

Dans le domaine de la microbiologie des denrées alimentaires, *E. coli* sert en général d'indicateur de contaminations fécales : elle se développe à une température de 44°C, et produit de l'indole. En fabrication fromagère, on rencontre les colibactéries surtout en tant qu'agent causal du défaut «mille trous». Ceci pouvant être dû soit à une contamination

excessive du lait, soit à un stockage du lait à une température trop élevée ou encore à une mauvaise acidification due à la présence de substances inhibitrices.

Le contrôle d'*E. coli* s'effectue au cours du processus de fabrication. Pour les fromages à pâte mi-dure, le contrôle se fait dans le fromage avant saumurage. En ce qui concerne les fromages au lait cru ou partiellement thermisés, le contrôle s'effectue dans le fromage après saumurage et pour les fromages à pâte molle au lait thermisé ou pasteurisé, il se fait sur produit fini avant commercialisation.

4.6.2 Streptocoques fécaux

Les streptocoques fécaux (*Enterococcus* ou streptocoques du groupe D) sont des commensaux de l'intestin. *Enterococcus faecalis* et *E. faecium* sont les deux espèces le plus souvent identifiées chez l'humain.

4.7 Flore pathogène

L'origine des contaminations par les bactéries pathogènes varie en fonction de la nature du produit et de son mode de production et de transformation.

La contamination du lait et des produits laitiers par les germes pathogènes peut être d'origine endogène, et elle fait, alors, suite à une excrétion mammaire de l'animal malade ; elle peut aussi être d'origine exogène, il s'agit alors d'un contact direct avec des troupeaux infectés ou d'un apport de l'environnement (eaux, personnel).

Partie
Expérimentale

1. Cadre de l'étude

L'étude a concerné 75 échantillons de lait cru de vaches et de chèvres collectées durant une période de 3 mois (de février à avril 2017) à partir de plusieurs lieux d'élevages de la wilaya de Tébessa et à partir de lait destiné à la consommation.

Les échantillons de lait cru ont été analysés au laboratoire de Microbiologie du département de Biologie Appliquée l'Université Larbi Tébessi –Tébessa.

2. Région d'étude

La wilaya de Tébessa se situe au Nord-Est de l'Algérie avec une superficie de 13.878 km², C'est une zone qui regroupe un vaste étendu steppique de notre pays. Limité au nord par la Wilaya de Souk-ahras, au sud par la Wilaya d'El Oued, l'Ouest par la Wilaya d'Oum Elbouaghi et à l'est par la Tunisie sur 300km de frontière (Anonyme, 2016), (Fig.01).



Figure 01: Limites administratives da la wilaya de Tébessa (Anonyme, 2016).

 : Lieu de prélevement du lait cru (la wilaya de Tebessa et la daira de Cheria)

La wilaya de Tébessa englobe 28 communes, dont dix frontalières, encadrées par douze Dairates.

3. Matériel et méthodes :

Le matériel utilisé sera au cours des techniques suivantes

3-1 Echantillonnage :

Le total de 75 échantillons a été prélevé par la traite manuelle dans la période de février à l'avril 2017.

Cela a été fait à partir du lait cru de vaches et lait de chèvre de plusieurs lieux d'élevage Différentes avec 71 échantillons: 22 échantillons chèvres et 53 échantillons vaches ;et à partir de laiterie destiné à la consommation avec 4 échantillons lait de vaches.

Avant de faire les prélèvements, nous avons respecté certaines conditions d'asepsie pour éviter que le lait soit contaminé par des germes provenant de la peau de la mamelle ou de l'environnement.

Pour réussir un prélèvement de bonne qualité, nous avons désinfecté les mains de l'opérateur et à l'aide de coton trempé dans de l'eau de javel diluée, nettoyé le mamelon de chaque glande mammaire.

Les premiers jets de lait étaient observés et jetés a fin de nettoyer le canal galactophore de tous les débris qui auraient pu rentrer dans le pis par voie ascendante. Les laits prélevés correspondent aux laits d'une seule traite, celle du matin.

A la fin, nous avons veillé à ce que l'ouverture les flacons stérilisés au préalable ne touche pas le bout du pis au moment de prélever le lait, nous avons également étiqueté chaque flacon avec des étiquettes portant le numéro de l'animal, l'espèce, le lieu de prélèvement et la date.

Les prélèvements ont été par la suite placés dans des glacières isothermiques (4°C) et acheminés immédiatement sous une chaîne de froid au laboratoire Microbiologie à l'université Larbi Tébessa de Tébessa. Dans le but de rechercher une éventuelle présence d'E. coli.



Figure n02: prélèvement des échantillons

3-2 Contrôle de qualité microbiologique

3-2-1 Dénombrement des coliformes totaux

Les coliformes sont des micro-organismes d'altération. Leur présence indique une faute hygiénique relevant d'une mauvaise qualité du lait.

Méthode

- Un millilitre de la dilution mère (10⁻¹) est prélevé aseptiquement à l'aide d'une pipette et introduit dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile.
- Préparer les boîtes de culture de milieu Mac conkey à proximité du bec Bunsen ainsi que les flacons et les tubes contenant l'échantillon à prélever.
- Passer l'anse à la flamme, la laisser refroidir et avec l'autre main entrouvrir la boîte de culture et ouvrir le tube qui contient la suspension bactérienne.
- Prélever une goutte de suspension de lait cru avec Pipettes stériles de 0.1ml et déposer l'échantillon en laissant traîner l'extrémité stries (ensemencement).
- Procéder de la même façon pour les autres boîtes de cultures.
- Placer la boîte à l'étuve et incubés pendant 24 heures à 37°C. posée à l'envers c'est à dire sur le couvercle.

Interprétation des résultats :

Après la période d'incubation, sortir et ranger les boîtes de Pétri par ordre de numéro d'échantillon. L'observation des membranes s'effectue le plus tôt possible après leur sortie de l'incubateur.

- résultat positif si présence Les coliformes (formation de colonies sur les milieux de Mac Conkey) qui réussissent à pousser sur ce milieu sont rose-rouge (lactose positif).
- résultat négatif si absence Les coliformes (aucune pousse).

3-2-4 Repiquage

Après le dénombrement, on a fait un repiquage pour chacun boîte qui contient les coliformes (colonies isolées rose et lactose+) sur milieux Max conkey a fin d'obtenir des cultures pures ce qui est soumis à l'antibiogramme.

A l'aide d'une anse de platine, prendre une colonie isolée de 1-2 mm de diamètre à partir de la boîte du dénombrement des coliformes et ensemencement sur la gélose de Mac conkey en surface, les colonies sont incubatées à 37C° pendant 24h.

3-2-2 Coloration de Gram

- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre.
- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène.
- Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes.
- Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée.
- Couvrir de lugol pendant 30 secondes.
- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.
- Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool - acétone en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette.
- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.
- Couvrir avec de la fuschine pendant 15 secondes.
- Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes.
- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement.

Interprétation de résultats

Les cellules Gram+ absorbent la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.

3-2-3 L'identification des isolats par la galerie API 20 E (Bio Mérieux, Meylan, France) :

La galerie API 20E compte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée.

Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du tableau d'identification.

Méthode

- Préparation de la galerie : Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide, ensuite Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.
- Préparation de l'inoculum : Faire une suspension bactérienne
- Inoculation de la galerie : pipeté la suspension par la pipette pasteur
- Remplir les tubes et les cupules des tests avec la suspension bactérienne.

- Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Refermer la boîte d'incubation et la placer à 37°C pendant 18 à 24 heures.

Interprétation de résultats

Après incubation, les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de trois réactifs **Kovacs**, **Vp1** et **Vp2** (**kovacs** pour Ind, **Vp1** et **Vp2** pour Vp) et la lecture est effectuée par l'utilisation du logiciel Bacterial Identification Program (Emanuel et al., 2009).



Figure n03: Aspect de la galerie API 20 E après l'inoculation d'une souche à tester avant incubation

3-3 Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

Le test de sensibilité des souches identifiées en étant E.coli vis-à-vis 11 antibiotiques (tableau 01) a été déterminé par la méthode de diffusion sur gélose Mueller Hinton (MH) selon les recommandations du Comité Français de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM).

Méthode utilisée

- A partir d'une culture pure de 24 heures, prélever à l'aide d'une pipette pasteur la colonie.
- Décharger la pipette dans tube d'eau physiologie.
- Homogénéiser la suspension bactérienne par la Vortex.
- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension, et éliminer l'excédent en pressant l'écouvillon sur la paroi du tube.
- ensemencer en stries sur toute la surface gélosée d'une boîte de Mueller Hinton à trois.
- reprises en faisant tourner la boîte et l'écouvillon de 60° après chaque application.
- Appliquer les disques d'antibiotiques à l'aide d'une pince stérile. Il ne faut pas mettre plus de 6 disques dans une boîte de pétri.

Interpretation de résultats

Après incubation à 37C° pendant 24h, des zones d'inhibitions sont observées autour des disques, La lecture des résultats consistait à mesurer le diamètre de la zone d'inhibition de croissance), La résistance et la sensibilité a été évalué selon la méthode de CASFM (2015).

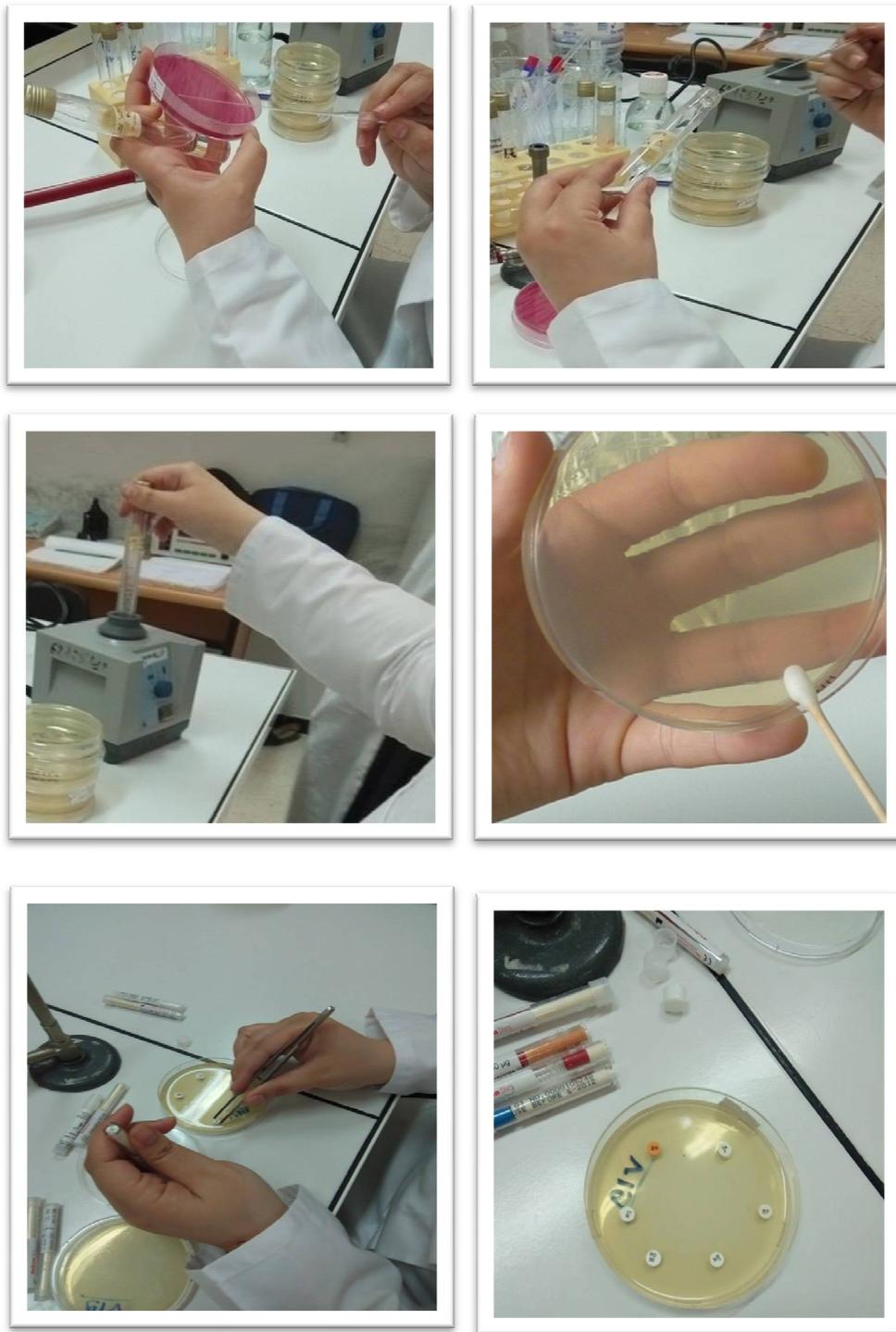


Figure n04 : Antibiogramme

Tableau 01: Antibiotiques testés

Antibiotiques	Abréviation	Charge du disque	Famille	
Ceftriaxone	CRO	30µg	Céphalosporine 3 ^{ème} génération	β- lactamines
Céfaloine	CF	30µg	Céphalosporine 1 ^{ère} génération	
Imipénème	IPM	10µg	Carbapénème	
Ertapénème	ETP	10µg		
Aztréonam	ATM	30µg	Monobactame	
Ampicilline	AM	10µg	Aminopénicilline	
Amoxicilline+acide clavulanique	AMC	25µg/10µg	Aminopénicilline	
Ciprofloxacine	CIP	05µg	Quinolone	
Amikacine	AK	30µg	Aminosides	
Triméthoprim- sulfaméthoxazole	SXT	1,25µg/23,75µg	Sulfamides	
Colistine	CT	50µg	Polymyxines	

3-4 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par E.test

Les CMI ont été déterminées pour les souches résistantes aux antibiotiques afin de déterminer le degré de résistance, En utilisant les bandelettes E.test des principales familles d'antibiotiques (β-lactamines, aminosides, quinolones, et sulfamides) selon les recommandations de la CA-SFM.

Méthode

Le principe de la CMI par E-test est basé sur la combinaison des deux concepts : dilution et diffusion. Le système E-test consiste en une bande en plastique, non poreuse, calibrée par un gradient préétabli de concentration d'antibiotiques, couvrant 15 dilutions pour déterminer la CMI en µg/ml d'une souche testée en milieu gélosé. Le gradient couvre une rangée de concentrations allant de 0,016 à 256 µg/ml ou 0,002 à 32 µg/ml selon l'antibiotique.

L'inoculum a été préparé en réalisant une suspension de colonies obtenues d'une culture pure de 18 à 24 heures, dans de l'eau physiologique. L'ensemencement a été effectué par écouvillonnage sur la gélose Mueller Hinton. Lorsqu'une bandelette E.test est appliquée sur une boîte de gélose ensemencée, l'antibiotique est immédiatement libéré de la surface du support et se dépose sur la surface de la gélose. Un gradient continu et exponentiel de concentrations en antibiotique se crée juste en dessous du support.

Interpretation de résultats

Après 18 à 24 heures d'incubation, ce qui rend la croissance bactérienne visible. Une ellipse d'inhibition symétrique, axée sur le support, se forme. Les bords de l'ellipse d'inhibition indiquent la valeur de CMI, exprimée en $\mu\text{g/ml}$.



Figure n05 : bandelette E.test appliquée sur gélose Mueller Hinton ensemencée.

4. Résultat

4-1 Contrôle de la qualité microbiologique

4-1-1 Dénombrement des coliformes totaux

Les résultats du contrôle de la qualité microbiologique du lait cru a révélé que 21 échantillons sur l'ensemble (75 échantillons) étaient de culture positive (plus de 5 colonies caractéristiques d'E coli).

Le résultat de la recherche des coliformes à montré que :

- 54(76.06%) était de bonne qualité et 21 (23.94%) était de mauvaise qualité hygiénique.
- parmi l'ensemble des échantillons(53) de lait de vaches analysés, 20 était de mauvaise qualité soit 37.73%.
- parmi l'ensemble des échantillons (22) de lait de chèvres analysés, un seul échantillon était de mauvaise qualité soit 4.54%.
- sur l'ensemble des prélèvements du lait de la traite (71 échantillons), 17 était mauvaise qualité.
- sur l'ensemble des prélèvements des laits crus destinés à la consommation des 4 échantillons de vaches, les 4 cultures étaient de mauvaise qualité soit 100%.

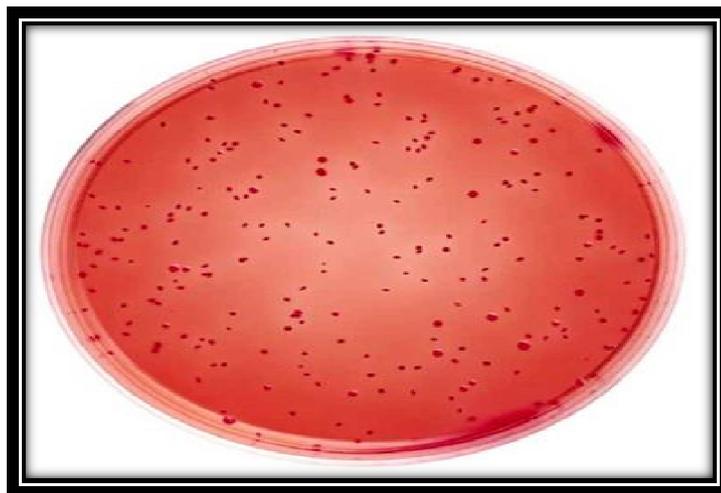


Figure n06 : image montrant l'aspect des colonies obtenues après ensemencement du lait sur le milieu MacConkey (souche n19)

4-1-2 Étude morphologiques

A/ L'aspect macroscopique

Différents caractères culturels ont été observés après 24 heures d'incubation à 37°C sur le milieu MacConkey, ces colonies sont apparues avec une couleur rosâtre (lactose+) et d'un pourtour régulier.

B/L'aspect microscopique

L'observation microscopique a révélé que les colonies isolées sont des coccobacilles Gram négatif de petite taille, de forme circulaire, et d'un pourtour régulier.



Figure n07 : Repiquage d'une colonie isolée à partir la souche n°19

4-1-3 Identification par la galerie API20E

Après incubation, nous avons obtenu les résultats suivant avec la galerie API20E :

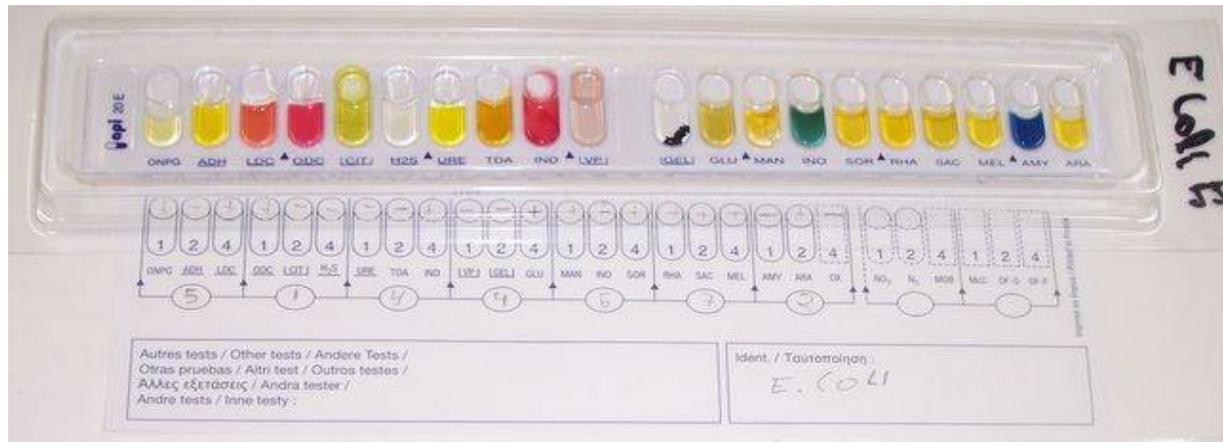


Figure n08: les caractères biochimiques après incubation montrent que la souche 19 isolée a partir lait de vache est *Escherichia coli*

Le signe (+) signifie que la réaction du test a été positive.

Le signe (-) signifie que la réaction du test a été négative.

A partir les différents caractères biochimique décrite par API20E, il ressort que les 21 souches bactériennes isolées du lait cru :

- Il y a 19 souches isolées du lait cru de vache est *Escherichia coli*, soit 90,47%
- une seule souche isolée du lait cru de vache est *Enterobacter cloacae*, soit 4,76%
- et une seule souche isolée du lait cru de chèvre est *klebsiella pneumoniae*, soit 4,76%

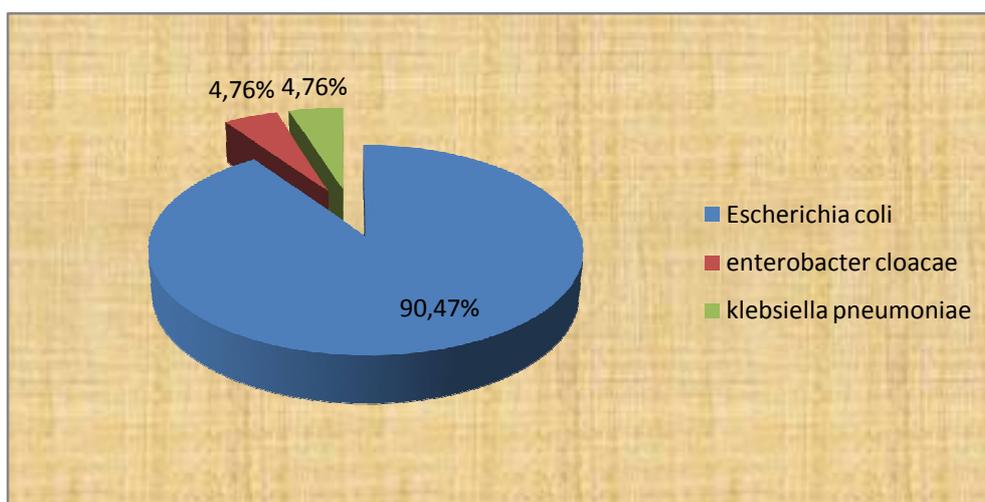


Figure n09: Distribution les souches selon l'espèce

4-3 Sensibilité aux antibiotiques

Les résultats de l'antibiogramme sont illustrés dans la figure 08 et la figure 09.

En analysant les profils de résistance aux antibiotiques des 19 souches de *E.coli* étudiées, on note une résistance très élevée vis-à-vis des β -lactamines: Les souches des *Escherichia coli* isolées du lait cru étaient toutes résistantes à l'ampicilline (100%), une résistance de 68,42% aux céphalosporines de première génération, et de 52,63% aux céphalosporines de 3ème génération ce qui indique notre prévalence de production de Bétalactamases à spectre étendu BLSE. Par ailleurs, notre étude révèle une première détection en Algérie d'une souche d'*E coli* isolée du lait cru qui produit une Carbapenemase avec un phénotype du gène OXA-48

Concernant les quinolones, on observe une faible résistance pour la Ciprofloxacine de 15,78%, Par ailleurs, vis-à-vis des aminosides pour l'Amikacine et quant aux Triméthoprime-Sulfaméthoxazoles une faible résistance soit 10,52%. Cependant, la colistine reste active sur tous les souches étudiées (100% de sensibilité).

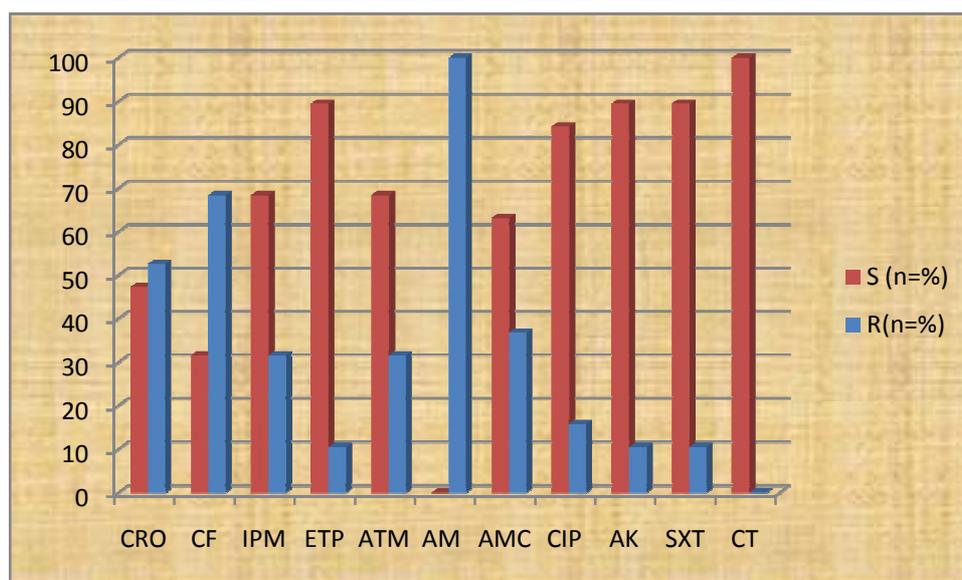


Figure n10 : Sensibilité aux antibiotiques des 21 souches cliniques de *E.coli* aux 11 antibiotiques testés.

R : résistant, **S** : sensible.

CRO:Ceftriaxone,CF:Céfalotine , IPM:Imipénème, ETP:Ertapénème, ATM:Aztréonam, AM: Ampicilline, AMC: Amoxicilline + acide clavulanique, CIP: Ciprofloxacine, AK:Amikacine, SXT: Triméthoprime-sulfaméthoxazole, CT: Colistine.

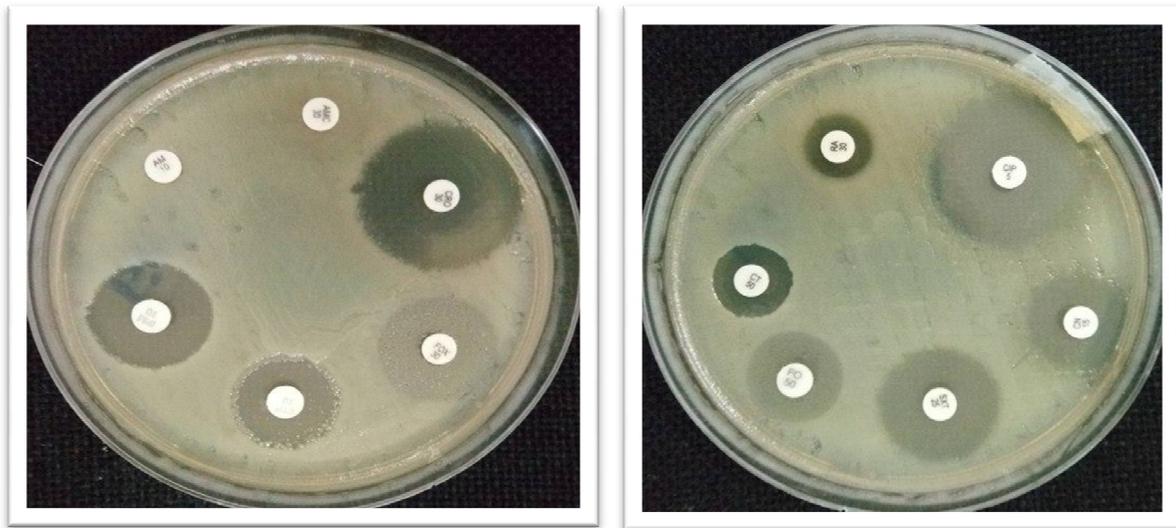


Figure n11 : Image d'antibiogramme de la souche *E.coli* 19

4-4 Détermination des Concentration minimales inhibitrices (CMI) des souches par E.test

Les 19 souches d'E coli ont montré toutes un niveau de résistance très élevé à tous les β -lactamines .Les CMI de la Ceftriaxone étaient rangées de 1,0 à 64 $\mu\text{g/ml}$, La résistance des souches aux aminosides et aux quinolones était également remarquable: 02 (10.52%) souches sont résistantes à l'Amikacine avec des CMI allant de 19 à 25 $\mu\text{g/ml}$ et 3 souches de résistance (15,78%) à la Ciprofloxacine avec des CMI ragées de 4 à >16 $\mu\text{g/ml}$. Finalement, 2 (10.52%) des souches étaient résistantes aux Triméthoprime- Sulfaméthoxazole avec des CMI qui varient entre 47 et 94 $\mu\text{g/ml}$.

Discussion

Les membres de la famille des *Enterobacteriaceae* ont été impliqués dans de nombreux problèmes de sécurité et de détérioration (02).

Les *Enterobacteriaceae* peuvent entrer dans la chaîne laitière et causer la dégradation des protéines ou des lipides, provoquant une détérioration qui contribue à des pertes économiques.

En outre, certaines *Enterobacteriaceae* ont émergé comme agents pathogènes opportunistes potentiels en raison de l'acquisition (via le transfert horizontal de gènes parmi différentes souches ou espèces bactériennes) de virulence et de résistance aux antibiotiques portés sur la génétique mobile tels que des plasmides, des transposons et des bactériophages (02).

Escherichia coli n'est pas seulement considéré comme un contaminant fécal de lait mais aussi un indicateur de mauvaise hygiène et d'hygiène pratiques pendant la traite et la manutention ultérieure.

L'objectif de notre étude était d'évaluer la qualité microbiologique du lait cru de vaches et de chèvre dans la région de Tébesa et de déterminer la prévalence de la résistance aux antibiotiques des souches d'*Escherichia coli* isolées du lait cru.

Un total de 71 échantillons a été prélevé par la traite manuelle dans la période de février à l'avril 2017 à partir du lait cru de vaches et lait de chèvre de plusieurs lieux d'élevage comprenant 22 échantillons chèvres et 53 échantillons de lait cru de vaches. Par ailleurs, 4 échantillons ont été prélevés à partir de lait cru de vaches vendu en vrac destiné à la consommation directe.

Les résultats de l'évaluation de la qualité microbiologique par la recherche des coliformes des échantillons du lait cru ont montré que 21 échantillons sur l'ensemble (75 échantillons) ont généré une culture sur MacConkey donc ils étaient de mauvaise qualité soit une fréquence de 28%.

Parmi ces 21 échantillons de mauvaise qualité 19 étaient identifiés comme des souches *Escherichia coli* une souche *Klebsiella pneumoniae* et une autre *Enterobacter cloacae*.

La fréquence d'isolement de l'espèce *E. coli* par rapport aux autres coliformes dans l'ensemble des échantillons qui étaient de mauvaise qualité est de 90.47 % (19/21).

Les résultats obtenus dans cette étude ont montré que l'espèce *E. coli* a été isolée et identifiée à partir des échantillons de lait et examinés provenant de la traite d'une fréquence de 26.76% (19/71) et de la totalité des échantillons isolés du lait en vrac destiné aux consommateurs soit une fréquence de 100% (4/4).

Dans cette étude, *E.coli* a été confirmée dans 35,85% (19/53) de lait de vache cru; Il s'agit d'un taux d'isolement élevé par rapport à 9,6% (5/52) ce qui a été signalé au Nigeria (17). Cependant, le pourcentage d'échantillons de lait de vache crus positifs avec *E.coli* dans d'autres études était de 17,4% en Iran (27), 12% en Brésil (26), et de 10% en Tanzanie (39), 2% à Ogun State Nigeria (17), et 1,4% en Turquie (42).

En Algérie, il est commun et largement pratiqué de fabriquer des produits laitiers à partir de lait cru. L'isolement d'*E.coli* provenant du lait examiné dans cette étude pourrait être associé à des maladies humaines suite à leur consommation. Cependant, il n'est pas possible de lier nos résultats à l'un des cas d'intoxication alimentaire survenu en Algérie en raison du manque de documentation appropriée de ces cas.

Dans notre étude aucune souche d'*E coli* n'a été identifiée à partir du lait de chèvre. Un seul échantillon de lait de chèvre était contaminé par l'espèce *Klebsiella pneumoniae*.

Nos données ont révélé qu'aucun des échantillons de lait cru de chèvre n'était positif pour *E.coli*, C'est au contraire d'une autre étude où l'incidence de l'*E.coli* dans le lait de chèvre était de 0,7% (3/460) dans les échantillons prélevés en Grèce (44).

Tous les 19 *E. coli* Les isolats ont affiché une résistance à une large gamme d'antimicrobiens, qu'on utilise 11 antibiotiques pour chaque souche étudiée.

Les résultats de cette étude ont montré une résistance très élevée vis-à-vis de l'Ampicilline à hauteur de 100%, de 68,42% au Céfalotine, de 52,63% au Ceftriaxone, de 36,84% au Amoxicilline + acide clavulanique, de 31,57% au Imipénèm et Aztréonam, de 15,78% au Ciprofloxacine et une faible résistance à la Ertapénème, Amikacine et Triméthoprime-sulfaméthoxazole soit 10,52%. En revanche, toutes les souches (100%) étaient sensibles à la Colistine. on observe une sensibilités assez marquée pour l'Ertapénème, Amikacine et Triméthoprime-Sulfaméthoxazole de 89,47% suivi par 84,21% pour la Ciprofloxacine, 68,42% pour l'Imipénème et l'Aztréonam, 63,17% pour l'Amoxicilline + acide clavulanique, 47,36% pour la Ceftriaxone, et une sensibilité à la Céfalotine soit 31,57%.

Nos résultat sont proches de ceux obtenus par TAZBEW et al, 2012, mais s'éloignent des résultats rapportés par HAMDAN et al, 2011 à l'hôpital d'Elkhartoum (soudan) à 100% résistantes à l'Ampicilline, à l'Amoxicilline + acide clavulanique, et la Céfalotine; mais l'Impinème, le Ciprofloxacine, l'Amikacine et la colistine ont une excellente activité car les souches y sont sensibles à 100%. Au Sao Paulo la résistance à un ou plusieurs agents antimicrobiens a été observée chez 22 (14,7%) des isolats d'*E. coli* détectés sur le total de 150 échantillons. Le type dominant de résistance était l'ampicilline détectée de manière identique

chez 20 (13,3%) isolés, suivis de la Ciprofloxacine dans 10 (6,6%) de chaque isolat. Vingt-deux isolats d'*E.coli* ont provoqué 18 types différents de résistance aux antibiotiques aux agents utilisés dans cette étude. Aucun des isolats n'a été trouvé résistant à l'Imipénem, et à la Colisistine (28). Études à travers le monde sur *E.coli* de différents les sources ont également identifié une forte résistance aux agents antimicrobien Céphalothine (41, 38). Au Bangladesh Dans le cas d'*Escherichia coli*, 100% des isolats ont montré une sensibilité contre le Triméthoprime-Sulfométhoxazole et l'Imipenem, 86% à la Ceftriaxone (48).

On a détecté une prévalence de production de Bétalactamase à spectre étendu BLSE de 52,63%. Par ailleurs, notre étude a signalé la première détection de production de carbapenemase par une souche d'*E.coli* isolée du lait cru en Algérie. Un traitement de dernier choix pour traiter les infections à d'*E.coli*.

Mais une autre étude n'a détecté aucun isolat producteur d'ESBL dans le lait à partir de 100 différentes fermes laitières suisses. Une très faible fréquence d'ESBL (0,7%) en Le lait de la République tchèque (43, 12).

Des troupeaux de laiterie allemande ont montré que les bactéries productrices d'ESBL Sont assez fréquents dans les excréments de vaches (12, 40).

Nous concluons donc que la contamination du lait avec des organismes 'BLSE a probablement eu lieu par la contamination fécale. La fréquence relativement élevée de production de BLSE *Enterobacteriaceae* dans le lait du réservoir en vrac n'est pas inattendu, compte tenu de L'utilisation extensive de céphalosporines chez les bovins laitiers (40).

Notre étude démontre Que ce lait cru peut également contenir des *Enterobacteriaceae* productifs de BLSE viables, Augmentant le risque de propagation de la résistance aux antibiotiques La consommation de lait cru présente un danger pour la santé. Ventes de ferme de Le lait cru devrait être reconsidéré car il ne contribue pas seulement à La propagation de bactéries pathogènes, mais aussi un vecteur de propagation d'antibiotiques la résistance (12, 40).

Les principales causes de contamination microbienne du lait sont attribuables à la traite des pis infectés des vaches, pratiques de traite mécaniques non hygiéniques, équipement impur ou mauvaises pratiques de lavage et stockage inapproprié conditions. Le lait cru doit être correctement pasteurisé, de sorte que le lait reste exempt de microbes pathogènes (12).

Une température de réfrigération appropriée devrait également être maintenue pour éviter toute contamination indésirable (12).

Finalement, cette étude met en évidence la mauvaise qualité microbiologique et hygiénique du lait cru bovin et caprin. Ainsi l'exploration du lait cru de vache et chèvre nécessite de passer obligatoirement par le contrôle de sa qualité microbiologiques et sanitaire afin d'assurer une transformation technologique approprié et d'avoir des produits finie de bon qualité nutritionnelle et hygiénique.

Conclusion

Les résultats de cette étude contribuent à notre compréhension de l'apparition, de la distribution et du sort de la résistance aux antibiotiques dans les aliments. Ce qui restreint considérablement le choix thérapeutique disponible dans le traitement de ces infections sévères d'autant plus que des gènes de résistance à d'autres antibiotiques. Notre étude a révélé un niveau de résistance élevée à la majorité des antibiotiques testés avec de fortes concentrations minimales inhibitrices en particulier les bêtalactamines : avec une prévalence de production de bêtalactamase à spectre étendu BLSE de 52,63%. Par ailleurs, notre étude a signalé la première détection de production de carbapénemase par une souche d'*E. coli* isolée du lait cru.

Finalement, L'observation globale de cette étude a clairement indiqué que l'utilisation indiscriminée de différents types d'antibiotiques pour le traitement des maladies animales a certainement déclenché l'émergence d'organismes *E. coli* multirésistants qui sont définitivement une menace potentielle pour la santé humaine et animale de cette région.

En définitive, Il est nécessaire de minimiser la contaminations du lait par des bactéries multirésistantes en suivant les bonnes pratiques d'hygiène dans les exploitations suivi par la formation et l'orientation des propriétaires de fermes et de leurs travailleurs.

Références
Bibliographique

1-ANTIMICROBIAL DRUG RESISTANCE IN STRAINS OF *Escherichia coli* ISOLATED FROM FOOD SOURCES. RevInst Med Trop Sao Paulo. 2014 Jul-Aug; 56(4): 341–346.

2-Baylis, C., M. Uyttendaele, H. Joosten, and A. Davies. 2011. The Enterobacteriaceae and their significance to the food industry. ILSI Europe, Brussels, Belgium. www.ils.eu.

3-Blanco, J., M. Blanco, J. E. Blanco, A. Mora, M. P. Alonso, E. A. González, and M. I. Bernárdez 2007, posting date. O:H Serotypes of human verocytotoxigenic *E. coli* (VTEC). Laboratorio de Referencia de *E. coli* (LREC), Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Campus de Lugo, Spain. [Online.].

4-Brisabois A., Lafarge V., Brouillard A., de Buyser M.L., Collette C., Garin-Bastuji B. et Thorel M.F. (1997). Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers: situation en France et en Europe. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 16 (1). pp: 452-471.

5-CARBONNELLE B., DENIS F., MARMONIER A., PINON G et VARGUES R. (1987). Bactériologie Médicale : Techniques usuelles. S.I.M.E.P. S. A., Paris, p 121-137; 146-155.

6-Erskine, R., R. Walker, C. Bolin, P. Bartlett, and D. White. 2002.Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. J. Dairy Sci. 85:1111–1118.

7-European Food Safety Authority (EFSA), 2007. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006. EFSA J. 130 1–352.

8-FAYE B., LOISEAU G. Sources de contamination dans les filières laitières et exemples de démarches qualité. In : Gestion de la sécurité des aliments dans les pays en développement, Actes de l'atelier international, Montpellier, 11-13 décembre 2000, 2000, 11-13.

9-FIGARELLA .J, LEYRAL.G et TERRET .M, 2007. Microbiologie générale et appliquée DELGRAVE EDITION. France. P 102,104, 106, 107,108

10-Fraser, M. E., M. Fujinaga, M. M. Cherney, A. R. Melton-Celsa, E. M. Twiddy, A. D. O'Brien, and M. N. James. 2004. Structure of shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. J Biol Chem 279:27511-7.

11-Freter, R., H. Brickner, J. Fekete, M. M. Vickerman, and K. E. Carey. 1983., Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. T. Mobley. 2004.

12-Friese, A., Schulz, J., Laube, H., von Salviati, C., Hartung, J., Roesler, U., 2013. Faecal occurrence and emissions of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (laMRSA) and ESbL/AmpC-producing *E. coli* from animal farms in Germany. Berl.Munch. Tierarztl. Wochenschr. 126, 175–180.

13-GAUDY.C et BUXERAUD.J ,2005.Antibiotiques : pharmacologie et thérapeutique, ELSEVIER, Paris .P 14,23, 24

14-Ghebrn, H. 1988. Contamination à l'étude du pouvoir pathogène de *Escherichia coli*. Mémoire de maîtrise en sciences vétérinaires en microbiologie, Nantes.

15-Greatorex, J. s., et G.M. thorne. 1994. Humoral immune responses to Shiga-like toxins and *Escherichia coli* OM57 lipopolysaccharide in hemolytic-uremic syndrome patients and healthy subjects. J. Clin. Microbiol. 32 : 1172-1178.

16-GUEZLANE-TEBIBEL. N, KAHLOUCHE .B, ATHMANI-GUEMOURI .S, 2010.Microbiologie .Office des publications universitaires. P 70,74, 93,95, 115, 124

17-Ivbade A, Ojo O.E, Dipeolu M.A. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 in milk and milk products in Ogun State, Nigeria. Vet. Ital. 2014;50:185–191. [PubMed]

18-Jerse, A. E., J. Yu, B. D. Tall, and J. B. Kaper. 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. Proc Natl Acad Sci U S A 87:7839-7843.

19-Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. Mobley. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol 2:123-140.

20-Karmali, M. A., M. Petric, C. Lim, P. C. Fleming, G. S. Arbus, and H. Lior. 1985. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. J Infect Dis 151:775-782.

21-Kauffmann, F. 1947. The serology of the *E. coli* group. J Immunol 57:71-100.

22-King, N., R. Lake, P. Cressey, and A. Hudson. 2007. Risk profile: Shiga-toxin producing *Escherichia coli* in raw milk. MPI Technical Paper No: 2014/14. Ministry for Primary

Industries. New Zealand Food Safety Authority (NZFSA) and the Ministry of Agriculture and Forestry (MAF).

23-KIRAT S. Les conditions d'émergence d'un système d'élevage spécialisé en engraissement et ses conséquences sur la redynamisation de l'exploitation agricole et la filière des viandes rouges bovines : cas de la Wilaya de Jijel en Algérie. (Thèse pour l'obtention du titre de Master en Science). Institut agronomique méditerranéen : Montpellier, 2007, 139 p.

24-LeJeune, J. T., T. E. Besser, and D. D. Hancock. 2001. Cattle water troughs as reservoirs of *Escherichia coli* O157. *Appl Environ Microbiol* **67**:3053-3057.).

25-Levine, M.M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea : enterotoxigenic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* **155** : 377-389.

26-Lira W.M, Macedo C, Marin J.M. The incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle with mastitis in Brazil. *J. Appl. Microbiol.* **2004**;97:861–866. [PubMed].

27-Mohammadi P, Abiri R, Rezaei M, Salmanzadeh-Ahrabi S. Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from raw milk in Kermanshah, Iran. *Iran. J. Microbiol.* **2013**;5:233–238. [PMC free article] [PubMed].

28-Mohammed Uddin Rasheed,(1) Nooruddin Thajuddin,(2) Parveez Ahamed,(2) Zelalem Teklemariam,(3) and Kaiser Jamil(1). ANTIMICROBIAL DRUG RESISTANCE IN STRAINS OF *Escherichia coli* ISOLATED FROM FOOD SOURCES. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* **2014** Jul-Aug; 56(4): 341–346.

29-MADIGAN.M et MARTINKO. J ,2007. Biologie de Micro-organismes. Université Carbondale de l'Illinois du sud .11e édition. P 702,705, 711,860, 862.

30-MEYER. A, DEIANA. J et BERNARD.A ,2004. Cours de microbiologie générale, DOIN ÉDITEURS, 2e édition, France. P257

31-Milon, A., E. Oswald, and J. De Rycke. 1999. Rabbit EPEC: a model for the study of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Vet Res* **30**:203-219

32-Montet, M.P. 2009. Consommation des aliments par les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) en France, et importance de l'acido-résistance des souches. Thèse. Ecole pratique des hautes études. 72p.

33-Nataro, J. P., and J. B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 11:142-201.

34-PERRY.J, STALEY.J et LORY.S, 2002. Microbiologie. Édition par Sinauer Associates .États-Unis. P 160,163, 164,165

35-Pohl, p. 1993. Les souches pathogènes d'*Escherichia coli*, histoire et classification. An. Méd. Vété. 137 : 325-333.

36-PRESCOTT, HARLEY et KLEIN, 2007 .Microbiologie .2e édition française. P 806, 807 ,813, 819

37-Rendon, M. A., Z. Saldana, A. L. Erdem, V. Monteiro-Neto, A. Vazquez, J. B. Kaper, J. L. Puente, and J. A. Giron. 2007. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. Proc Natl Acad Sci U S A 104:10637-42.

38-Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Hebert, E.S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hargrett, P. A. Blake, and M. L. Cohen. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N Engl J Med 308:681-685.

38-Sayah, R. S., J. B. Kaneene, Y. Johnson, and R. Miller. 2005. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic and wild-animal fecal samples, human septicemia, and surface water. Appl. Environ. Microbiol. 71:1394–1404.

39-Schoder D, Maichin A, Lema B, Laffa J. Microbiological quality of milk in Tanzania: From Maasai stable to African consumer table. J. Food Prot. 2013;76:1908–1915. [PubMed].

40-Schmid, A., Hörmansdorfer, S., Messelhäusser, U., Käsbohrer, A., Sauter-Louis, C., Mansfeld, R., 2013. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* on Bavarian dairy and beef cattle farms. Appl. Environ. Microbiol. 79, 3027–3032., WHO, W. H. O. 1980. *Escherichia coli* diarrhoea. Bulletin of the World Health Organization 58:23-36.

41-Schroeder, C. M., J. Meng, S. Zhao, C. DebRoy, J. Torcolini, C. Zhao, P. F. McDermott, D. D. Wagner, R. D. Walker, and D. G. White. 2002. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O26, O103, O111, O128, and O145 from animals and humans. Emerg. Infect. Dis. 8:1409–1414.

- 42-Seker E, Yardimci H. First isolation of Escherichia coli O157: H7 from faecal and milk specimens from Anatolian water buffaloes (Bubalus bubalis) in Turkey. J. S. Afr. Vet. Assoc. 2008;79(4):167–170. [PubMed]**
- 43-Skočková, A., Bogdanovičová, K., Koláčková, I., Karpíšková, R., 2015. Antimicrobial-resistant and extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli in raw cow's milk. J. Food Prot. 78, 72–77.**
- 44-Solomakos N, Govaris A, Angelidis A.S, Pournaras S, Burriel A.R, Kritas S.K, Papageorgiou D.K. Occurrence, virulence genes and antibiotic resistance of Escherichia coli O157 isolated from raw bovine, caprine and ovine milk in Greece. Food Microbiol. 2009;26:865–871. [PubMed]**
- 45-Soto, S. M., Martín, M. C., and Mendoza, M. C. . 2003. Distinctive human and swine strains of Salmonella enterica serotype Wien carry large self-transferable R-plasmids. A plasmid contains a class 1-qacE Δ 1-sul1 integron with the dfrA1-aadA1a cassette configuration. Food microbiology 20:9–16.**
- 46-TALBERT.M, WILLOQUET.G et GERVAIS.R ,2009. Pharmacologie clinique, Wolters Kluwer France. P 641, 648,655**
- 47-Törneke, K., Torren-Edo, J., Grave, K., Mackay, D.K., 2015. The management of risk arising from the use of antimicrobial agents in veterinary medicine in EU/EEA countries - a review. J. Vet. Pharmacol. Ther. 38, 519–528.)**
- 48-U. T. Tasnim and M. T. Islam. PATHOGENIC AND DRUG RESISTANT BACTERIA IN RAW MILK OF JESSORE CITY: A POTENTIAL FOOD SAFETY 49-THREAT. Department of Microbiology, Jessore University of Science and Technology, Jessore 7408, Bangladesh. Bangl. J. Vet. Med. (2015). 13 (1): 71-78.**
- 50-VAUBOURDOLLE.M, 2007. Infectiologie 3e édition. Wolters Kluwer SA.P 347,348.**
- 51-WHO, W. H. O. 1980. Escherichia coli diarrhoea. Bulletin of the World Health Organization 58:23-36.**

52-Yusha'u M, Umar MI, Suleiman K. Indigenous commercial drinks as potential sources of extended spectrum β -lactamases (ESBLs) producing organisms in Kano, Nigeria. *Int J Biomed Health Sci.* 2010;6:103–8.).

53-Zapun, A., C. Contreras-Martel, and T. Vernet. 2008. Penicillin-binding proteins and betalactam resistance. *FEMS Microbiol Rev* **32**:361-85.

Annexes

Milieux de culture

Eau physiologique

Chlorure de sodium	8,5g
Peptone	0,5g
Eau distillée	1000ml

Ph=7. autoclavage : 120°C pendant 20 minutes

Gélose nutritive

Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2g
Peptone	5g
Chlorure de sodium	5g
Agar	15g

Ph=7,4. autoclavage : 120°C pendant 20 minutes

Gélose Mac Conkey

Pour 1 litre de milieu

Tryptone	17,0g
Peptone pepsique de viande	3,0g
D-Sorbitol	10,0g
Sels biliaires n°3	1,5g
Chlorure de sodium	5,0g
Rouge neutre	30,0g
Cristal violet	1,0g
Agar agar	13,5g

Ph final à 25°C : 7,1. autoclaver 15 minutes à 120°C.

Muller Hinton

Infusion de viande de bœuf déshydratée	6,0g
Hydrolysate acide de caséine	17,5g
Amidon de maïse	1,5g
Agar agar	10,5g

Ph=7,4. autoclaver 15 minutes à 121°C.



Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

Recommandations 2015

Coordonnateur :

François JEHL
Hôpitaux Universitaires de Strasbourg
Tél : 03 69 55 14 54 (Hôp.) ;
03 68 85 37 81 (Fac.)
E-mail : jehl@unistra.fr ;
francois.jehl@chru-strasbourg.fr

Secrétaire :

Gérard LINA
CHU de Lyon
Tél : 04 78 86 44 93 (Hôp.) ;
04 78 77 86 57 (Fac.)
E-mail : gerard.lina@univ-lyon1.fr

Membres :

Richard BONNET, Jean-Pierre BRU, François CARON,
Vincent CATTOIR, Hubert CHARDON,
Patrice COURVALIN, Luc DUBREUIL,
Vincent JARLIER, Thierry LAMBERT, Agnès LEFORT,
Audrey MERENS, Marie-Hélène NICOLAS-CHANOINE,
Patrick PLESIAT, Marie-Cécile PLOY,
Claude-James SOUSSY, Emmanuelle VARON,
Philippe WEBER.



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Larbi Tébessi - Tébessa
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Déclaration sur l'honneur de non-plagiat

(à joindre obligatoirement au mémoire, remplie et signée)

Je soussigné(e),

Nom, Prénom : **G. HRIEB MANNI**

Régulièrement inscrit(e) en Master au département : **Biologie appliquée**

N° de carte d'étudiant : **2010/4017783**

Année universitaire : **2016/2017**

Domaine : **SNV**

Filière : **Biologie**

Spécialité : **Qualité des produits et sécurité alimentaire**

Intitulé du mémoire : **Prévalence et antibiorésistance des souches d'Escherichia coli isolées du lait cru.**

Atteste que mon mémoire est un travail original et que toutes les sources utilisées ont été indiquées dans leur totalité. Je certifie également que je n'ai ni recopié ni utilisé des idées ou des formulations tirées d'un ouvrage, article ou mémoire, en version imprimée ou électronique, sans mentionner précisément leur origine et que les citations intégrales sont signalées entre guillemets

Sanctions en cas de plagiat prouvé :

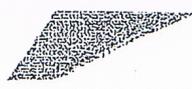
L'étudiant sera convoqué devant le conseil de discipline, les sanctions prévues selon la gravité du plagiat sont :

- L'annulation du mémoire avec possibilité de le refaire sur un sujet différent ;
- L'exclusion d'une année du master ;
- L'exclusion définitive.

Fait à Tébessa, le **25/05/2017**

Signature de l'étudiant(e) :





REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Larbi Tébessi - Tébessa
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Déclaration sur l'honneur de non-plagiat

(à joindre obligatoirement au mémoire, remplie et signée)

Je soussigné(e),

Nom, Prénom : Gaffaf Hadjer

Régulièrement inscrit(e) en Master au département : Biologie appliquée

N° de carte d'étudiant : 2011 / 4017703

Année universitaire : 2016 - 2017

Domaine : S.N.V

Filière : Biologie

Spécialité : Qualité des produits et sécurité alimentaire

Intitulé du mémoire : Prévalance et antibiorésistance des souches
d'Escherichia coli isolées du lait cru

Atteste que mon mémoire est un travail original et que toutes les sources utilisées ont été indiquées dans leur totalité. Je certifie également que je n'ai ni recopié ni utilisé des idées ou des formulations tirées d'un ouvrage, article ou mémoire, en version imprimée ou électronique, sans mentionner précisément leur origine et que les citations intégrales sont signalées entre guillemets

Sanctions en cas de plagiat prouvé :

L'étudiant sera convoqué devant le conseil de discipline, les sanctions prévues selon la gravité du plagiat sont :

- L'annulation du mémoire avec possibilité de le refaire sur un sujet différent ;
- L'exclusion d'une année du master ;
- L'exclusion définitive.

Fait à Tébessa, le 25-05-2017

Signature de l'étudiant(e) :

Handwritten notes:
C.N.
294129
D 30.03.2017