



République Algérienne Démocratique et populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Echahid Cheikh Larbi Tébessi- Tébessa



Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : Biologie Appliquée

Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Option: Microbiologie Appliquée

**Identification biochimique et évaluation de
la résistance aux antibiotiques
d'entérobactéries isolées de viande de
poulet**

Présenté par : BERRAIS Kaouthar

MAHFOUDI Ikram

Devant le jury :

Dr Ferhi S.	MCA	Université de Tébessa	Présidente
Dr Azizi N.	MAA	Université de Tébessa	Examinatrice
Pr Debabza M.	Pr	Université de Tébessa	Promotrice
Pr Mechai A.	Pr	Université de Tébessa	Co promoteur

Date de soutenance : 09 Juin 2024

Dédicace

Je tiens à dédier cet humble travail à :

*À l'âme absente qui est toujours présente dans mon cœur,
ma tante et ma seconde mère, qui m'a toujours encouragé,
que Dieu ait pitié d'elle.*

*A ma très chère maman LOUIZA REZGUI
tu as toujours été pour moi un exemple de la mère
respectueuse, honnête, de la personne méticuleuse, je tiens à
honorer la femme que tu es. Grâce à toi Mama j'ai appris le
sens du travail et de responsabilité.
Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le
respect que j'ai toujours eu pour toi.*

*A mon cher papa SALAH MAHFOUDI
Pour ton sacrifice, ton amour, ta tendresse, ta confiance en
moi. Ton soutien et ta prière tout au long de mes études.*

*A mon frère, Mohammed Ibrahim et A ma chère sœur Safa
Pour leurs indéfectibles soutiens et leurs patiences infinies*

*A mon cher zrouba et sa mère
Qui m'a aidé et m'a supporté dans les moments difficiles.*

*A ma chère binôme Kaouthar pour son soutien moral et sa
patience tout au long du processus. Merci pour tous vos
efforts.*

A tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment.

Ikram

Dédicace

Je dédie ce mémoire.

*A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour,
leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de
mes études Mille merci pour*

L'encouragement, la patience, la tendresse

Que Dieu vous accorde santé, longévité et bonheur.

*A mes chers frères, Pour leur appui et leur encouragement,
J'espère que la vie vous réservera le meilleur.*

*A mon binôme qui a veillé que ce travail soit à la hauteur.
Merci pour tous les*

*moments qui ont fait ces années de belles années, je vous
souhaite toute la joie du monde. Ikram*

*A toute ma famille pour leur soutien tout au long
de mon parcours universitaire*

A mes chères collègues et amis

de section microbiologie 2019/2024

kaouthar

Remerciements

Nous remercions en premier lieu ALLAH Tout - Puissant qui nous a donné la santé, le courage et la patience pour terminer ce travail.

Nous tenons aussi à exprimer nos remerciements les plus sincères à notre promotrice Pr. Debabza Manel, pour avoir accepté de diriger ce travail, pour ses précieux conseils, ses suggestions sur la rédaction de ce mémoire, sa gentillesse ainsi que la confiance qu'elle nous a témoignée tout au long de cette étude.

Nous remercions chaleureusement, notre Co-encadreur de mémoire Pr. Mechai Abdelbasset pour ses judicieux conseils, son soutien, sa patience, et sa disponibilité.

Nos remerciements vont également aux membres de jury d'avoir accepté de juger ce mémoire Dr. Farhi Salma, et Dr. Azizi Nassima et porter un jugement critique et judicieux sur ce dernier.

Nous remercions aussi les Techniciennes du laboratoire qui nous ont prêté main forte au cours de la réalisation de notre travail, en particulier Melle Boualleg Asma pour sa gentillesse.

Nous n'oublierons pas de remercier les Enseignants de la spécialité Microbiologie appliquée de l'Université Echahid Cheikh Larbi Tebessi-Tébessa

Résumé

L'usage non maîtrisé des antibiotiques au cours des dernières années en médecine humaine et vétérinaire a conduit à une évolution rapide de l'antibiorésistance, qui est devenue aujourd'hui un enjeu de santé publique majeur. Cette étude a pour objectif d'isoler et d'identifier des entérobactéries à partir de viande de poulet et d'évaluer leur résistance aux antibiotiques.

31 échantillons de viande de poulet ont été prélevés dans quatre communes de Tébessa : Tébessa, Cheria, Hammamet et Bir Dhab. Les entérobactéries ont été isolées sur gélose Mac-Conkey additionnée de céfotaxime et d'imipénème, puis identifiées par la galerie Api 20 E. L'antibiogramme des souches a été réalisé par la méthode des disques.

On a identifié 50 isolats comme entérobactéries, appartenant aux espèces : *Escherichia coli* (64 %), *Proteus mirabilis* (8%), *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii* et *Salmonella choleraesuis* (6% chacune), *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri/farmeri*, *Enterobacter cloacae*, *Yersinia frederiksenii/intermedia* et *Raoultella ornithinolytica* (2% chacune).

Les résultats de l'antibiogramme ont montré des résistances à différentes familles d'antibiotiques, notamment les β -lactamines, les fluoroquinolones et les triméthoprim-sulfamides, pour lesquels des taux de résistance élevés ont été observés : ampicilline (90%), pipéracilline (80%), ticarcilline (78%) céfépime (70%), oflaxacine (82%), ciprofloxacine (60%) et triméthoprim-sulfaméthoxazole (66%). Cependant, de faibles taux de résistance ont été notés pour les aminosides (4%), les furanes (8%) et l'imipénème (16%). De plus, le taux des souches multirésistantes était significatif (66%).

Notre étude a montré que la viande de poulet peut être une source d'entérobactéries résistantes aux antibiotiques, qui peuvent être transmises aux humains via la chaîne alimentaire, provoquant de graves problèmes de santé publique et de sécurité alimentaire.

Mot clés : viande de poulet, entérobactéries, antibiorésistance, multirésistance, élevage avicole.

Abstract

The uncontrolled use of antibiotics in human and veterinary medicine in recent years has led to a rapid development of antibiotic resistance, which has today become a major public health issue. The aim of this study is to isolate and identify enterobacteria from chicken meat, and to assess their antibiotic resistance.

31 chicken meat samples were taken from four communes in Tébessa: Tébessa, Cheria, Hammamet and Bir Dhab. Enterobacteriaceae were isolated on Mac Conkey agar supplemented with cefotaxime and imipenem, then identified by the API 20 E system. Antibiotic susceptibility testing of the strains was carried out using the disc method.

Fifty isolates were identified as enterobacteria, belonging to the following species: *Escherichia coli* (64%), *Proteus mirabilis* (8%), *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii* and *Salmonella choleraesuis* (6% each), *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri/farmeri*, *Enterobacter cloacae*, *Yersinia frederiksenii/intermedia* and *Raoultella ornithinolytica* (2% each).

Antibiotic susceptibility testing results showed resistance to different families of antibiotics, including β -lactams, fluoroquinolones and trimethoprim-sulfonamides, for which high resistance rates were observed: ampicillin (90%), piperacillin (80%), ticarcillin (78%), cefepime (70%), ofloxacin (82%), ciprofloxacin (60%) and trimethoprim-sulfamethoxazole (66%). However, low rates of resistance were noted for aminoglycosides (4%), furans (8%) and imipenem (16%). Moreover, the rate of multi-resistant strains was significant (66%).

Our study showed that chicken meat can be a source of antibiotic-resistant Enterobacteriaceae, which can be transmitted to humans through the food chain, causing serious public health and food safety problems.

Key words: chicken meat, enterobacteria, antibiotic resistance, multidrug resistance, poultry farming.

ملخص

ادى الاستخدام غير المنضبط للمضادات الحيوية في السنوات الاخيرة في الطب البشري و الطب البيطري الى تطور سريع في مقاومة المضادات الحيوية التي اصبحت مشكلة كبرى للصحة العامة. تهدف هذه الدراسة الى عزل البكتيريا المعوية للحوم الدجاج و التعرف عليها و تقييم مقاومتها للمضادات الحيوية.

تم اخذ 31 عينة من لحوم الدجاج من اربعة بلديات بولاية تبسة: تبسة الشريعة الحمامات بئر الذهب. تم عزل البكتيريا المعوية على وسط الزرع Mac Conkey المضاف اليه السيفوتاكسيم و الايمينيم ثم تم التعرف عليها بواسطة نظام Api20E. وتم اختبار الحساسية للمضادات الحيوية للسلاسل باستخدام طريقة الاقراص.

تم التعرف على خمسين عزلة على انها بكتيريا معوية تنتمي الى الانواع التالية:

Morganella morganii ، *Klebsiella oxytoca* ، (8%) ، *Proteus mirabilis* ، (64%) ، *Escherichia coli* ، (6%) لكل منهم) ، *Citrobacter freundii* ، *Citrobacter farmer/koseri* ، *Salmonella choleraesuis* ، *Yersinia frederiksenii/intermedia* ، *Enterobacter cloacae* (2% لكل منهم).

اظهرت النتائج اختبار الحساسية للمضادات الحيوية وجود مقاومة لعائلات من المضادات الحيوية ابرزها الأمبيسيلين (90%) والبيبيراسيلين (80%) والتيكارسيلين (78%) والسيفيبيم (70%) والأوفلاكساسين (82%) والسبيروفلوكساسين (60%) والتريميثوبريم-سلفاميثوكسازول (66%) حيث سجلت معدلات مقاومة ضدها. ومع ذلك، لوحظت معدلات مقاومة منخفضة للأمينوغليكوزيدات (4%) والفيورانان (8%) والإيمينيبيم (16%) اضافة الى ذلك كانت نسبة السلاسل المقاومة عالية (66%).

اظهرت دراستنا ان لحم الدجاج يمكن ان يكون مصدر البكتيريا المعوية المقاومة للمضادات الحيوية و التي يمكن ان تنتقل الى الانسان عبر السلسلة الغذائية مما يسبب مشاكل خطيرة على الصحة العامة و سلامة الاغذية.

الكلمات المفتاحية: لحم الدجاج. البكتيريا المعوية، مقاومة المضادات الحيوية، المقاومة المتعددة، تربية الدواجن.

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau N°	Tableau	Page
01	Composition chimique de viande de poulet.	02
02	Principaux caractères biochimiques de certaines entérobactéries.	05
03	Liste des antibiotiques testés.	28
04	Description des différents aspects culturels.	29
05	Résultats de l'identification biochimique par l'API 20E.	32
06	Effectifs et pourcentages des souches selon l'espèce.	38
07	Résultats de l'antibiogramme des souches d'enterobactéries isolées.	41

Liste des figures

Liste des figures

Figure N°	Titre	Page
01	Mécanismes d'action des antibiotiques	7
02	Echantillon de blanc de poulet	12
03	Etape du pré-enrichissement	14
04	Préparation de la gélose Mac Conkey	15
05	Préparation des solutions d'antibiotiques	16
06	Préparation de la gélose Mac Conkey + CTX	17
07	Préparation de la gélose Mac Conkey + IMP	18
08	Isolements sélectifs	19
09	Purification sur milieu Mac Conkey	19
10	Conservation sur GN inclinée	20
11	Galerie API 20 E	21
12	Galerie API 20 E après lecture	22
13	Préparation de l'inoculum	24
14	Ensemencement de la gélose MH	25
15	Disposition des disques d'antibiotiques	26
16	Dépôt des disques	26
17	Aspect cultural (A) sur gélose Mac Conkey	29
18	Aspect cultural (B) sur gélose Mac Conkey	30
19	Aspect cultural (C) sur gélose Mac Conkey	30
20	Aspects microscopiques après coloration de Gram	31

Liste des figures

21	API 20E de la souche S4 (<i>E.coli 1</i>)	36
22	API 20E de la souche S5 (<i>Morganella morganii</i>)	36
23	API 20E de la souche S12 (<i>Proteus mirabilis</i>)	36
24	API20E de la souche S16 (<i>E.coli 1</i>)	36
25	API 20E de la souche S19 (<i>Klebsiella oxytoca</i>)	36
26	API 20E de la souche S25 (<i>E.coli 1</i>)	36
27	API20E de la souche S31 (<i>Salmonella choleraesuis ssp arizonae</i>)	37
28	API20E de la souche S32 (<i>Citrobacter freundii</i>)	37
29	API20E de la souche S33 (<i>Yersinia frederiksenii/intermedia</i>)	37
30	Répartition des souches en fonction de l'espèce	38
31	Antibiogramme de la souche S5 (<i>Morganella morganii</i>)	46
32	Antibiogramme de la souche S32 (<i>Citrobacter freundii</i>)	46
33	Antibiogramme de la souche S37 (<i>Escherichia coli</i>)	46
34	Antibiogramme de la souche S45 (<i>Escherichia coli</i>)	47
35	Sensibilité aux antibiotiques des souches isolées.	47
36	Sensibilité aux antibiotiques des souches d' <i>E.coli</i> isolées.	48

Liste des annexes

Liste des annexes

Annexe N°	Titre	Page
01	Dates et lieux de prélèvement des échantillons	51
02	Composition (g/ l) et préparation des Milieux de culture	53
03	Coloration de Gram	55
04	Guide de lecture de la galerie miniaturisée API 20 ^E	57
05	Préparation de l'étalon de turbidité McFarland 0,5	58

Liste des abréviations

Liste des abréviations

% : Pourcentage.
β-lactamines : Béta- lactamines.
°C : Degré Celsius.
ADH : Arginine dihydrolase.
ADN : Acide désoxyribonucléique.
AK : Amikacine.
AMX : Amoxicilline.
AMY : Amygdaline.
Api 20E : Analytical profile index 20E (E= Entérobactéries).
ATB : Antibiotiques.
BGN : Bacille à Gram négatif.
BLSE : bêta-lactamases à spectre élargi.
C1 : Colonie type 1.
C3G : Céphalosporines de troisième génération.
CA-SFM : Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.
CAZ : Ceftazidime.
CIP : Ciprofloxacine.
CIT : Citrate.
CL : Céfalexine.
COT : Co-trimoxazole.

Liste des abréviations

CTX : Céfotaxime.
MR : multirésistance.
<i>E. coli</i> : <i>Escherichia coli</i> .
ERC : Entérobactéries résistantes aux carbapénèmes.
ERC3G : Entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération.
G : Gramme.
GEL : Gélatinase.
GEN : Gentamicine.
GLU : Glucose.
GN : Gélose nutritive.
Gram - : Gram négatif.
Gram + : Gram positif.
h : heure.
H₂S : hydrogène sulfuré.
I : Intermédiaire.
IND : Indole.
INO : Inositol.
L : Litre.
LDC : Lysine décarboxylase.
MAN : Mannitol.

Liste des abréviations

MC: Mac Conkey.
MEL: Melibiose.
Mg: Milli gramme.
MH: Mueller-Hinton.
ml: millilitre.
NIT: Nitrate réductase.
NO₂: Nitrate réductase.
ODC: Ornithine décarboxylase.
ONPG: Orthonitrophényl-bêta-D-galactopyranoside.
µl: Microlitre.

Table des matières

Table des matières :

Dédicaces.....	I
Remerciements.....	II
Résumé	III
Abstract.....	IV
ملخص.....	V
Liste des tableaux.....	VII
Liste des figures.....	VIII
Liste des annexes	X
Liste des abréviations	XI

Table des matières

Introduction.....	1
--------------------------	----------

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1. Viande de poulet :	2
I.1.1 Définition et composition :	2
I.1.2 Contamination par les entérobactéries :.....	2
I.2 Entérobactéries	3
I.2.1 Définition :.....	3
I.2.2 Habitat :	3
I.2.3 Types d'entérobactéries :	3
I.2.3.1 Entérobactéries commensales :	3
I.2.3.2 Entérobactéries pathogènes strictes :	3
I.2.3.3 Entérobactéries pathogènes opportunistes :.....	4
I.2.4 Caractères bactériologiques :.....	4
I.2.4.1 Caractères morphologiques :	4
I.2.4.2 Caractères cultureux :.....	4
I.2.4.3 Caractères biochimiques :.....	4

Table des matières

I.2.4.4 Caractères antigéniques :	5
I.3. Généralités sur les antibiotiques :	6
I.3.1 Modes d'action des antibiotiques :	6
I.3.2. Antibiotiques utilisés en élevage avicole :	8
I.4. Résistance aux antibiotiques :	8
I.4.1 Principaux mécanismes de résistance :	8
I.4.2. Résistance des entérobactéries aux antibiotiques.....	9
I.4.2.1. Résistance aux bêta-lactamines	9
I.4.2.2. Résistance aux aminosides :	10
I.4.2.3. Résistance aux quinolones :	10
I.4.3 Multi-résistance :	10

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1. Objectifs.....	12
II.2. Cadre de l'étude	12
II.3. Échantillonnage	12
II.4. Isolement des entérobactéries résistantes aux antibiotiques.....	13
II.4.1 Principe :	13
II.4.2 Protocole	13
II.5. Antibiogramme :	23
II.5.1. Définition :	23
II.5.2. Principe :	23
II.5.3. Technique :	23

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Examen macroscopique.....	51
III.2. Examen microscopique.....	Erreur ! Signet non défini.
III.3. Identification biochimique	Erreur ! Signet non défini.
III.4. Répartition des souches d'entérobactéries selon l'espèce	Erreur ! Signet non défini.

Table des matières

III.5. Résistance aux antibiotiques	Erreur ! Signet non défini.
III.5.1. Résultats de l'antibiogramme	Erreur ! Signet non défini.
III.5.2. Taux des souches résistantes, sensibles et intermédiaires.....	45
III.5.3. Taux de résistance des souches d' <i>E.coli</i>...	Erreur ! Signet non défini.
III.5.4. Souches multirésistantes.....	Erreur ! Signet non défini.
Conclusion générale	Erreur ! Signet non défini.
Références bibliographique :.....	53
Annexes :.....	51

Introduction

Introduction

Introduction

La découverte des antibiotiques a été l'une des avancées thérapeutiques les plus importantes du vingtième siècle ; leur utilisation a réduit de façon considérable le taux de morbidité et de mortalité lié aux maladies infectieuses, mais elle a été à l'origine d'une forte antibiorésistance touchant de plus en plus d'espèces et un nombre d'antibiotiques de plus en plus grand (**Gassama, 2004**).

Dans le système d'élevage semi-industriel de poulets de chair et de poulets pondeuses, une grande diversité d'antibiotiques est utilisée dans de nombreux pays, principalement d'antibiotiques par voie orale en prophylaxie ou pour le traitement de maladies infectieuses ou dans l'alimentation animale pour favoriser la croissance et la productivité (**Barka, 2021**). Cependant, leur utilisation continue a conduit à la sélection des germes résistants avec pour conséquences, d'une part, une recrudescence des infections chez les poules, une augmentation du taux de mortalité et une réduction de la productivité, et d'autre part, un risque de transfert de cette résistance à l'homme (**Léopold, 2009**).

Par ailleurs, avec un prix inférieur à celui de la viande rouge, la volaille est la viande la plus consommée en Algérie. Cependant, elle peut être contaminée par divers microorganismes tels que les entérobactéries, dont la plupart sont connues pour être responsables de maladies d'origine alimentaire et de problèmes de santé publique, ainsi que de l'altération d'une variété d'aliments (**Barka, 2021**). L'antibiorésistance est un réel problème en médecine vétérinaire avec un impact majeur en termes de santé publique (**Acar et al., 2001**).

Dans ce contexte, notre étude consiste à isoler des entérobactéries de la viande de poulet commercialisée à Tébessa, à les identifier et à évaluer leur résistance vis à vis des antibiotiques.

Notre manuscrit est divisé en trois principaux chapitres, le premier aborde une synthèse bibliographique à propos de la viande de poulet, des entérobactéries, des antibiotiques et de l'antibiorésistance. Le deuxième concerne le matériel utilisé et les méthodes suivies dans les différentes étapes de prélèvement, isolement, identification et antibiogramme. Le troisième chapitre rapportera les résultats obtenus avec leurs interprétations suivis de discussions qui les associent. Enfin, nous clôturerons par une conclusion générale et quelques perspectives.

Chapitre I :
Synthèse bibliographique

I.1. Viande de poulet :

I.1.1 Définition et composition :

La viande de poulet est considérée comme de la viande provenant de coqs ou de jeunes poules abattus entre 5 et 16 semaines. Le poids approximatif des pièces entières est généralement de 1 à 3 kilos. La viande de poulet est riche en protéines et faible en gras. De plus, elle apporte des vitamines et minéraux intéressants (**Tableau 01**). Elle est classée comme un type de viande maigre, mais pour cela, il est essentiel et conseillé de retirer la peau (**Vilarrasa, 2022**).

Tableau 01 : Composition chimique de viande de poulet (**Benabdelmoumene, 2016**).

Pour 100 g de viande	Eau (g)	Protéines (g)	Lipides (g)	Cholestérol (mg)
Cuisse, viande et peau, crues	70	17	14,8	90
Cuisse, viande et peau, rôties	59	26	14,2	122
Viande et peau, crues	69	18	11,6	80
Viande et peau, rôties	66	26	6,2	90

I.1.2 Contamination par les entérobactéries :

Le poulet est caractérisé comme étant la principale viande consommée par une grande majorité de la population mondiale. Par ailleurs, elle est considérée comme le foyer majeur de certaines bactéries et elle est en conséquence, parmi les denrées les plus sensibles en termes de contamination.

La contamination par *E. coli*, à titre d'indication se fait généralement par contact direct ou indirect lié aux différentes étapes de production à savoir la période d'élevage, au cours du transport, dans l'abattoir et enfin au cours de la conservation.

A l'abattoir, la contamination des carcasses diminue après l'opération de l'échaudage, par contre la dissémination des entérobactéries peut se produire lors des processus de plumaison et d'éviscération. (**Guergueb, 2022**).

Les procédés d'abattage et de transformation des viandes de poulet peuvent engendrer la contamination des produits. Le transfert des bactéries à la surface de la viande lors de l'abattage de l'animal favorise la propagation à toute la viande et peut contribuer au moment

de la manipulation à la contamination (McGill, 2012). De ce fait, la viande de poulet pourrait être une véritable source des entérobactéries comme *E.coli* dont la contamination cause des infections chez les consommateurs (Radio-Canada, 2012).

I.2 Entérobactéries

I.2.1 Définition :

Les entérobactéries, constituent l'un des plus importants ordres bactériens et regroupent 9 familles. Ces microorganismes présentent des caractéristiques biochimiques et morphologiques communes telles qu'une coloration de Gram négative, la capacité à croître à la fois en aérobie et en anaérobie. Ces bactéries métabolisent les sucres par fermentation avec production de gaz. Elles sont également capables de réduire les nitrates en nitrites. La plupart sont mobiles grâce à une ciliature péritriche, et d'autres, moins nombreuses, sont immobiles (Oueslati, 2019).

I.2.2 Habitat :

Les entérobactéries sont couramment trouvées dans le tractus gastro-intestinal des humains et des animaux, où elles font partie de la flore intestinale normale. Elles peuvent également être trouvées dans l'environnement, notamment dans les eaux usées, les sols et les aliments contaminés. Les entérobactéries peuvent se transmettre par contact direct avec des personnes ou des animaux infectés (Futura-sciences, 2024).

I.2.3 Types d'entérobactéries :

I.2.3.1 Entérobactéries commensales :

Il s'agit des principales bactéries présentes à l'état normal dans le tube digestif, c'est le cas des : *Escherichia coli* et *Proteus* (Morin, 2001).

I.2.3.2 Entérobactéries pathogènes strictes :

Elles possèdent des facteurs de virulence spécifique responsables de la sévérité de la pathologie (Oueslati, 2019). C'est le cas de *Salmonella* ou de *Shigella*, ces bactéries causent des maladies digestives dues à un défaut d'hygiène (un aliment souillé) (Morin, 2001).

I.2.3.3 Entérobactéries pathogènes opportunistes :

Leur pouvoir pathogène est insuffisant pour permettre le développement spontané d'une pathologie chez un individu sain, mais elles peuvent induire différentes pathologies chez des individus immunodéprimés, tel que *Klebsiella*, *Enterobacter* et *Serratia* qui sont responsables des infections urinaires (Oueslati, 2019).

I.2.4 Caractères bactériologiques :**I.2.4.1 Caractères morphologiques :**

Les entérobactéries sont polymorphes de taille variant de 2 à 3 µm de long sur 0,4 à 0,6 µm de large, il existe des espèces mobiles et autres immobiles, quelques-unes possèdent une capsule visible au microscope et la plupart des espèces pathogènes pour l'homme possèdent des fimbriae ou pili qui sont des facteurs d'adhésion (Gadou, 2019).

I.2.4.2 Caractères cultureux :

A l'exception de certaines bactéries exigeantes qui nécessitent pour leur croissance un ou plusieurs facteurs de croissance, les entérobactéries sont des aéro-anaérobies facultatives qui se développent facilement sur des milieux de culture ordinaires. La température optimale de croissance est habituellement à 37°C pendant au moins 24 heures d'incubation. (Elbouamri, 2017). Sur les milieux gélosés, les entérobactéries donnent des colonies habituellement lisses, brillantes, de structure homogène ; en milieu liquide, elles occasionnent un trouble uniforme du bouillon (Gadou, 2019).

I.2.4.3 Caractères biochimiques :

La distinction entre les genres et les espèces se fait par l'étude des caractères biochimiques. Les entérobactéries possèdent de nombreux caractères biochimiques distinctifs parmi lesquels, la capacité d'utiliser le citrate comme seule source de carbone, la production d'uréase, la production d'indole et la fermentation des sucres (glucose, saccharose...) (Tableau 02) (Gadou, 2019).

Les caractères d'identification biochimique sont recherchés par des galeries d'identification Api 20E, une galerie mise au point pour les entérobactéries (Zitoun, 2022).

Tableau 02 : Principaux caractères biochimiques de certaines entérobactéries (**Decoster et Lahieu, 2006**).

	<i>E.coli</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Klebseilla</i>	<i>Serratia</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>
ONPG	+	+	+	+	+	-	+/-
Urée	-	-	+	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	+	+	+	-	-
H₂S	-	+/-	-	-	-	+	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	-	+	-	-
Indole	+	-	+/-	-	-	-	+/-
Citrate	-	+	+	+	+	+/-	-

ONPG : Ortho NitroPhényl Galactoside, **VP** : Voges Proskauer, **TDA** : Tryptophane désaminase, **H₂S** : Hydrogène sulfureux.

I.2.4.4 Caractères antigéniques :

Les entérobactéries possèdent différents types d'antigènes dont les principaux sont :

- **Antigènes O** : antigènes de la paroi bactérienne de nature lipopolysaccharidique et thermostable à 100°C ; la base de différenciation des différents sérotypes, ils sont présents chez toutes les entérobactéries.
- **Antigènes H** : spécifiques pour les entérobactéries mobiles, ils sont thermolabiles (se détruisent à 100°C).
- **Antigènes K** : antigènes de l'enveloppe de nature polysaccharidique, ils sont solubles et thermolabiles (**Elbouamri, 2017**).

I.3. Généralités sur les antibiotiques :

La découverte des antibiotiques a été l'une des grandes avancées médicales du 20^{ème} siècle. Associés à la vaccination, ils ont notamment contribué à réduire les grandes épidémies, en particulier dans les pays occidentaux (**Walsh, 2003**) Ces molécules permettent de bloquer la croissance des bactéries ou de les détruire. Dans le premier cas elles sont appelées bactériostatiques, dans le deuxième cas bactéricide (**Courvalin, 2008**).

La plupart des antibiotiques sont produits de façon naturelle par des microorganismes pour réguler leur croissance, ou lorsqu'ils sont soumis à des conditions particulières, mais, ils peuvent être des produits de synthèse (**Waglechner, 2017**).

Les propriétés bactériostatiques ou bactéricides des antibiotiques proviennent de leur capacité à bloquer une étape d'un mécanisme essentiel à la multiplication ou à la survie des bactéries. Pour cela, ils visent une cible spécifique de la cellule bactérienne, présentant ainsi une toxicité sélective, c'est-à-dire, qu'aux doses utilisées, ils n'affectent que certaines bactéries et non pas l'hôte infecté (**Opatowski, 2020**).

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères: l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action.

I.3.1 Modes d'action des antibiotiques :

Les antibiotiques peuvent agir sur :

- **La paroi bactérienne** : certains antibiotiques bloquent la synthèse d'éléments de la paroi bactérienne, dont le rôle est de maintenir la pression osmotique et protéger la bactérie du monde extérieur. La paroi de la cellule est alors fragilisée, et la lyse bactérienne survient. Ce blocage confère une activité bactéricide. Ce mécanisme entre en jeu pour les bêta-lactamines, comme les pénicillines ou les céphalosporines, la fosfomycine, ou encore les glycopeptides, comme la vancomycine.

- **La membrane interne** : d'autres agissent sur l'intégrité de la membrane plasmique de la bactérie, qui permet de retenir les éléments nécessaires à sa survie dans le cytoplasme, et de maintenir un gradient chimiosmotique. Les antibiotiques peuvent agir sur cette membrane de deux façons : en désorganisant sa structure, ou en formant

un canal dans la membrane, entraînant la fuite des composés cellulaires. On retrouve ce procédé chez les polymyxines par exemple.

- **La synthèse protéique :** certains antibiotiques inhibent la synthèse des protéines, essentielle à la survie de la cellule. L'antibiotique pénètre dans la cellule, et bloque le ribosome bactérien, structure du cytoplasme nécessaire à la synthèse des protéines. De nombreux antibiotiques fréquemment utilisés ont pour cible le ribosome, comme les aminosides, les cyclines ou les macrolides.

 - **Le génome bactérien :** les antibiotiques peuvent aussi bloquer la réplication de l'ADN bactérien ou la transcription de l'ADN en ARN, suivant différents mécanismes. Pour cela, ils doivent pénétrer dans la cellule et interrompre un élément de la chaîne de réplication. Ce processus concerne les quinolones ou la rifamycine.
- (Figure 01) (Opatowski, 2020).

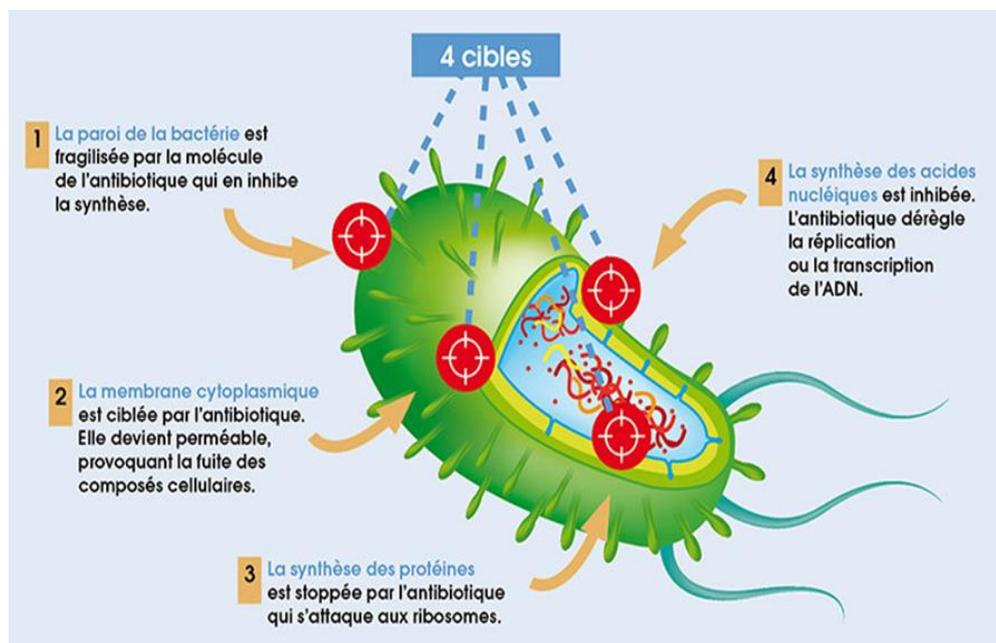


Figure 01 : Mécanismes d'action des antibiotiques [4]

I.3.2. Antibiotiques utilisés en élevage avicole :

Les antibiotiques utilisés en médecine humaine et vétérinaire appartiennent à différentes familles et sous-familles, communes à l'homme et à l'animal ; à l'exception de quelques sous-familles utilisées exclusivement en médecine humaine et d'une sous-famille propre à la médecine vétérinaire (sous-famille des pleuromutilines, macrolides apparentés) (**Anonymous, 2006**). Aucun antibiotique appartenant aux céphalosporines ou aux phénicolés n'est autorisé pour les volailles.

- Les β -lactamines sont utilisées pour des usages généraux : infections pulmonaires, infections digestives.
- Les macrolides ont un spectre d'activité étroit, ils sont notamment indiqués dans les infections pulmonaires à Gram positif ainsi que les mycoplasmoses respiratoires fréquentes en élevage de volailles.
- Les sulfamides sont indiqués dans des usages généraux comme les infections pulmonaires et les colibacilloses.
- Les tétracyclines sont les plus employées pour le traitement d'infections respiratoires ou digestives.
- Les quinolones et fluoroquinolones sont indiquées dans les infections digestives et pulmonaires.

I.4. Résistance aux antibiotiques :

I.4.1. Principaux mécanismes de résistance :

- **Béta lactamines** : la résistance est essentiellement due à la synthèse de béta lactamases (pénicillinases / céphalosporinases qui inactivent l'antibiotique). Pour les bacilles à Gram négatif, il existe en plus une diminution de la perméabilité par modification des porines.
- **Tétracyclines** : le mécanisme le plus fréquent est le blocage de l'efflux mais aussi la diminution de l'affinité de la cible ribosomale.
- **Quinolones** : la résistance est liée à des mutations de l'ADN gyrase ou des modifications de perméabilité à l'ATB.
- **Aminosides** : les aminosides doivent pénétrer à l'intérieur de la cellule par diffusion passive et active. Certaines bactéries sont imperméables à la pénétration passive des aminosides.

L'association aux bêtalactamines qui agissent en détruisant la paroi cellulaire va être synergique en permettant leur entrée dans la cellule.

Les bactéries acquièrent la capacité d'inactiver l'antibiotique par adénylation, acétylation ou phosphorylation.

- **Sulfamides** : la résistance est liée à une modification de la perméabilité de la bactérie ou à une modification de structure de la dihydroptéroate synthétase.

I.4.2. Résistance des entérobactéries aux antibiotiques :

La résistance des entérobactéries aux antibiotiques est variable en fonction de l'espèce (résistance naturelle) et de la souche (résistance acquise). La résistance peut toucher toutes les familles d'antibiotiques habituellement actives sur les entérobactéries. Elle résulte des quatre mécanismes précédemment cités.

I.4.2.1. Résistance aux bêtalactamines :

a) Résistance naturelle :

Les entérobactéries produisent naturellement diverses bêta-lactamases, ce qui permet de les classer en quatre groupes phénotypiques de résistance :

- **Groupe 1**: phénotype « sensible » d'espèces dépourvues de gène de bêta-lactamase.
- **Groupe 2**: phénotype « sensible » d'espèces produisant naturellement une céphalosporinase de classe C.
- **Groupe 3** : phénotype « pénicillinase de bas niveau ».
- **Groupe 4** : phénotype « céphalosporinase de bas niveau » (**Goro, 2020**).

b) Résistance acquise :

A la résistance naturelle aux bêta-lactamines, peuvent s'ajouter un ou plusieurs mécanismes de résistance acquise. La résistance acquise par production de bêta-lactamase est le mécanisme prépondérant. Cependant, la fréquence des autres mécanismes de résistance, souvent exprimés à bas niveau, pourrait être sous-estimée faute d'études épidémiologiques. (**Goro, 2020**).

I.4.2.2. Résistance aux aminosides :

Les différents genres composant la famille des entérobactéries sont naturellement sensibles aux aminosides à l'exception de *Providencia* et un grand nombre de *Serratia marcescens*. L'inactivation enzymatique des aminosides est le mécanisme de la résistance acquise le plus fréquent. Le second mécanisme est l'imperméabilité cellulaire qui est moins souvent observée chez les entérobactéries. Elle entraîne le plus souvent une résistance croisée aux différents aminosides. Le troisième aspect de la résistance acquise est l'altération de cible ribosomale par mutation chromosomique qui est encore plus rare chez les entérobactéries (**Bonnet, 2012**).

I.4.2.3. Résistance aux quinolones :

Les entérobactéries sont sensibles aux quinolones classiques (acide nalidixique, acide pipémidique etc.) et aux fluoroquinolones (péfloxacin, ofloxacin etc.). Néanmoins, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont plus ou moins bonnes selon l'espèce d'entérobactéries et les différentes quinolones. La résistance acquise aux quinolones, dont le support génétique est exclusivement chromosomique (mutations), est due à deux mécanismes qui peuvent être associés : altération de la cible et/ou diminution de la perméabilité. Il est important de constater que, dans la plupart des cas, la résistance à l'acide nalidixique s'accompagne d'une résistance aux autres quinolones (**Goro, 2020**).

I.4.3 Multi-résistance :

Les bactéries sont dites multi-résistantes lorsqu'à la suite d'une accumulation de résistances naturelles et acquises, elles ne sont sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques. Elles sont alors résistantes à plusieurs antibiotiques ou classes pharmacologiques d'antibiotiques. Deux phénomènes contribuent à la multi-résistance aux antibiotiques : la résistance croisée et la co-résistance. Parfois, la résistance à un antibiotique confère de la résistance à un autre antibiotique, et c'est ce que l'on appelle la résistance croisée (**Carle, 2009**).

La résistance croisée correspond à la résistance à tous les membres d'une classe d'antibiotiques due à un seul mécanisme de résistance (**Courvalin, 2008**). Dans la co-résistance, plusieurs mécanismes de résistance sont associés chez la même bactérie, parfois stabilisés par intégration dans le chromosome. Chacun confère (par résistance croisée) la résistance à une classe d'antibiotiques, ce qui entraîne un large phénotype résistant de la

bactérie hôte. Là encore, la conséquence de cette organisation génétique est la co-sélection. Dans ce cas, une classe d'antibiotiques à laquelle la bactérie est résistante pourra sélectionner la résistance à des classes d'antibiotiques non reliées (**Courvalin, 2008**).

Chapitre II :

Matériel et méthodes

II.1. Objectifs

Les objectifs de ce travail sont :

- Isolement des entérobactéries à partir de viande de poulet.
- Identification biochimique des isolats.
- Evaluation de la résistance aux antibiotiques d'entérobactéries isolées.

II.2. Cadre de l'étude

Notre étude a été effectuée au niveau du laboratoire de microbiologie, département de biologie appliquée, université Echahid Cheikh Larbi Tebessi-Tébessa, durant une période de trois mois allant du 12 Février jusqu'au 16 Mai 2024.

II.3. Échantillonnage

Ce travail a porté sur l'analyse de 31 échantillons de blanc de poulet, qui ont été prélevés de façon aléatoire à partir de différents points de vente dans 4 communes : Tébessa, Cheria, Hammamet et Bir Dhab (**Annexe 01**). On a prélevé des échantillons de 100 g de blanc de poulet dans des conditions aseptiques. Chaque échantillon a été conditionné dans un sac plastique stérile unitaire, soigneusement scellé et étiqueté. On a noté sur le sac : le numéro de l'échantillon, la date et le lieu de prélèvement (**Figure 02**). Les échantillons collectés ont été transportés rapidement dans une glacière (**Figure 02**) entre + 2 °C et + 8 °C jusqu'à l'analyse bactériologique qui doit être réalisée dans les 48 heures après l'échantillonnage.



Figure 02 : Echantillon de blanc de poulet (photos personnelles)

II.4. Isolement des entérobactéries résistantes aux antibiotiques

II.4.1. Principe :

L'isolement a été réalisé selon la méthode de référence ANSES/LMV/18/01- Version 01 Février 2018 de l'agence nationale de sécurité alimentaire alimentation, environnement, travail. Cette méthode est utilisée pour la recherche sélective des *E. coli* producteurs de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE), AmpC (céphalosporinases) et de carbapénèmases dans les viandes fraîches prélevées à la distribution. Il s'agit d'une méthode applicable pour isoler également d'autres entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération (ERC3G) et aux carbapénèmes.

Cette méthode a pour principe l'utilisation de milieux additionnés d'antibiotiques permettant l'isolement sélectif des ERC3G ou aux carbapénèmes. Elle comporte cinq étapes :

- ❖ pré-enrichissement non sélectif;
- ❖ isolement sélectif;
- ❖ purification;
- ❖ conservation;
- ❖ identification.

II.4.2 Protocole

a) Pré-enrichissement (Figure 03)

- Peser aseptiquement 10g de viande de poulet à partir des prises d'essai homogènes réalisées en surface et au cœur de la viande à analyser, en utilisant un couteau stérile pour chaque échantillon.
- Transférer cette quantité dans un contenant stérile (un bocal en verre stérile et étiqueté), puis ajouter 90 ml de tryptone sel (**Annexe 02**).
- Incuber à 37 °C pendant 18 à 22 heures.



Figure 03 : Etape du pré-enrichissement (photos personnelles)

❖ Préparation du milieu de culture additionné des antibiotiques :

La gélose Mac Conkey (**Annexe 02**) est un milieu de culture solide, sélectif et différentiel, spécifiquement conçu pour favoriser la croissance des bacilles Gram-négatifs non exigeants, en particulier les membres de la famille des entérobactéries. De plus, elle permet de mieux distinguer les bacilles Gram-négatifs en évaluant leur capacité à métaboliser le lactose :

- Les bactéries fermentatrices de lactose donnent des colonies rouges ou roses.
- Les bactéries non-fermentaires du lactose donnent des colonies incolores.

La gélose Mac Conkey est préparée, puis additionnée de l'antibiotique juste avant son utilisation. Elle est additionnée du céfotaxime (CTX), une céphalosporine de troisième génération, à une concentration finale de 1mg/L et de l'imipénème (IMP), un carbapénème, à une concentration finale de 2mg/L, pour l'isolement des ERC3G et des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes (ERC) respectivement.

❖ Préparation de la gélose Mac Conkey (Figure 04)

- Suspender 25 grammes du milieu déshydraté dans 500 ml d'eau distillée dans un bécher.
- Bien mélanger et dissoudre en chauffant avec agitation fréquente.
- Faire bouillir jusqu'à dissolution complète.
- Répartir le milieu dans des flacons à raison de 100ml par flacon.

- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Refroidir à 47°

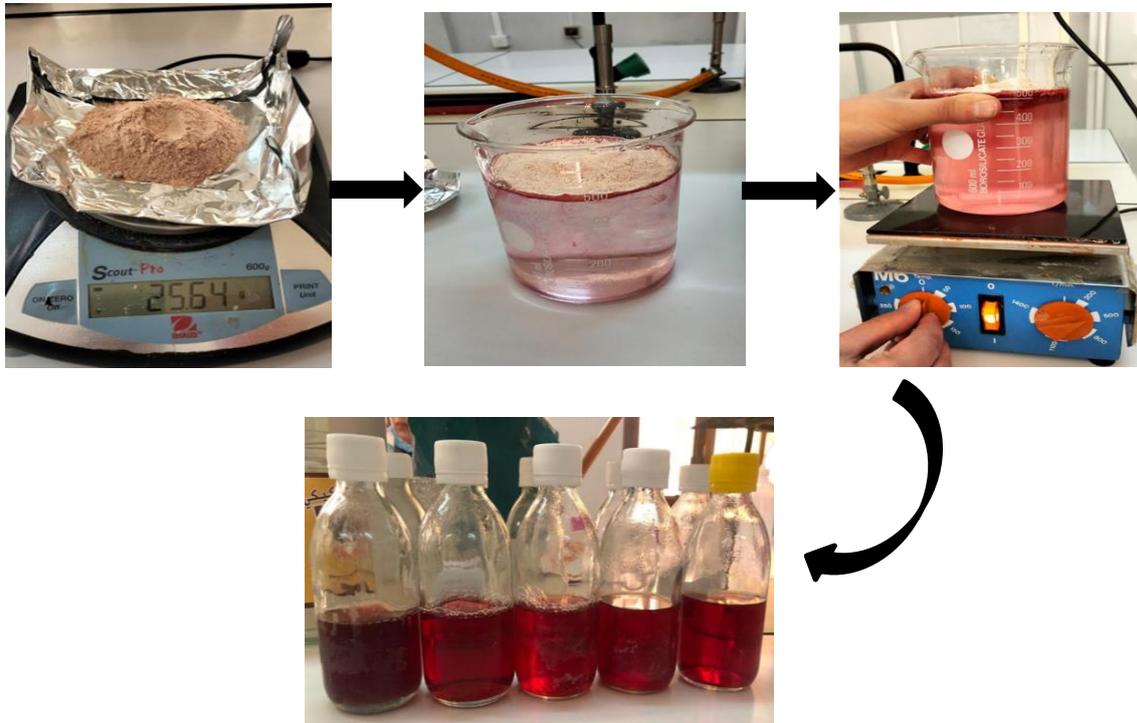


Figure 04 : Préparation de la gélose Mac Conkey (photos personnelles)

❖ **Préparation des solutions d'antibiotiques (Figure 05)**

- Peser dans un petit morceau d'aluminium 20 mg de l'antibiotique céfotaxime en poudre (Ayataxim ®) et 20 mg de l'antibiotique imipénème (Samipenem ®) dans un autre morceau d'aluminium.
- Transférer les quantités pesées dans deux tubes stériles, contenant 10 ml d'eau distillée stérile, étiquetés CTX et IMP respectivement.

Bien mélanger et mettre au réfrigérateur.

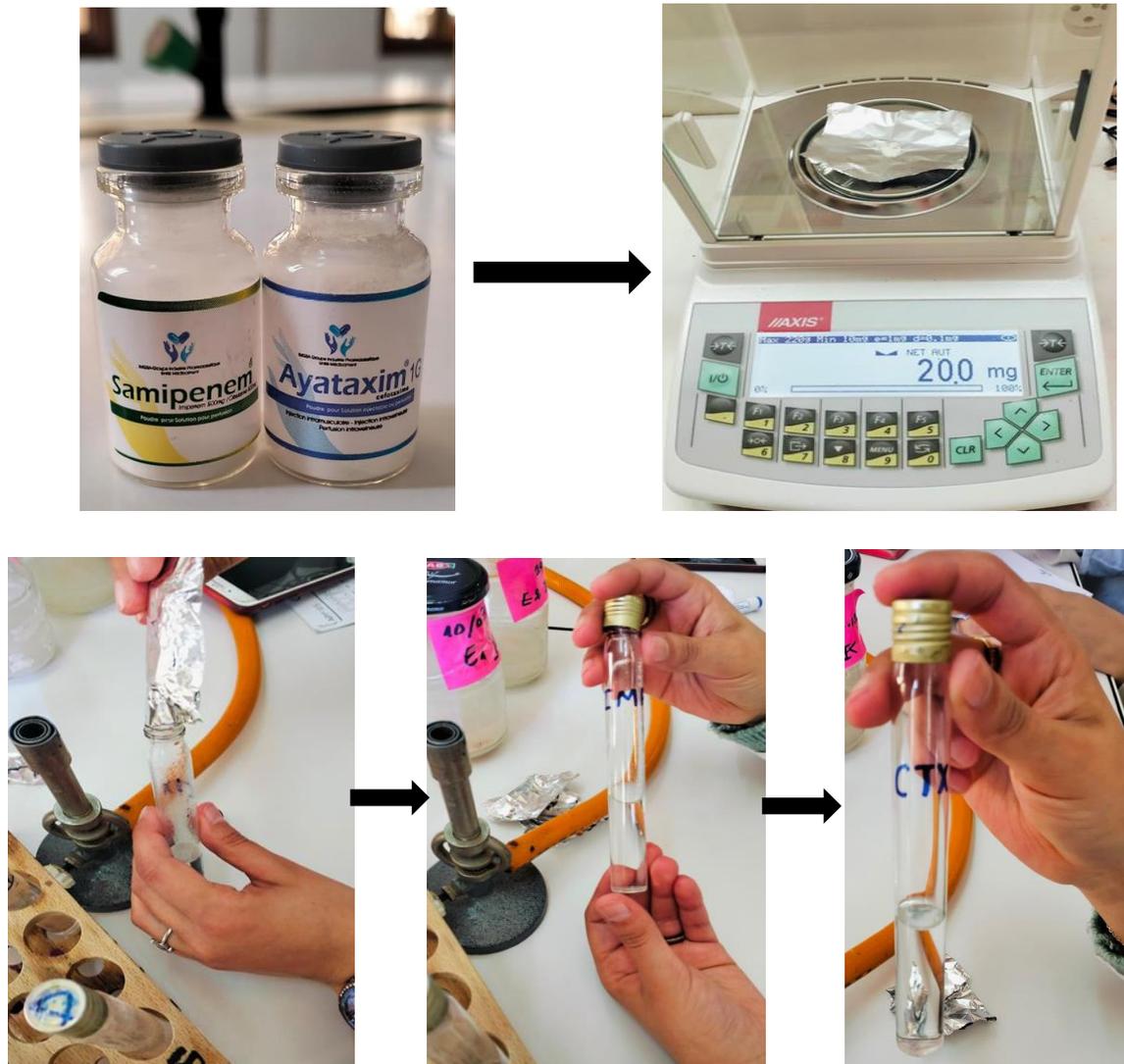


Figure 05 : Préparation des solutions d'antibiotiques (photos personnelles)

❖ **Addition des antibiotiques à la gélose**

- Ajouter 50 μ l de la solution CTX préalablement préparée à 100 ml de gélose Mac Conkey pour avoir le milieu Mac Conkey + CTX à 1mg/L (**Figure 06**).
- Ajouter 100 μ l de la solution IMP préalablement préparée à 100 ml de gélose Mac Conkey pour avoir le milieu Mac Conkey + IMP à 2mg/L (**Figure 07**).
- Mélanger lentement pour éviter la formation de mousse.

Couler les milieux dans des boites de Pétri sur lesquelles est noté le nom de l'antibiotique correspondant (CTX ou IMP) et laisser se solidifier.

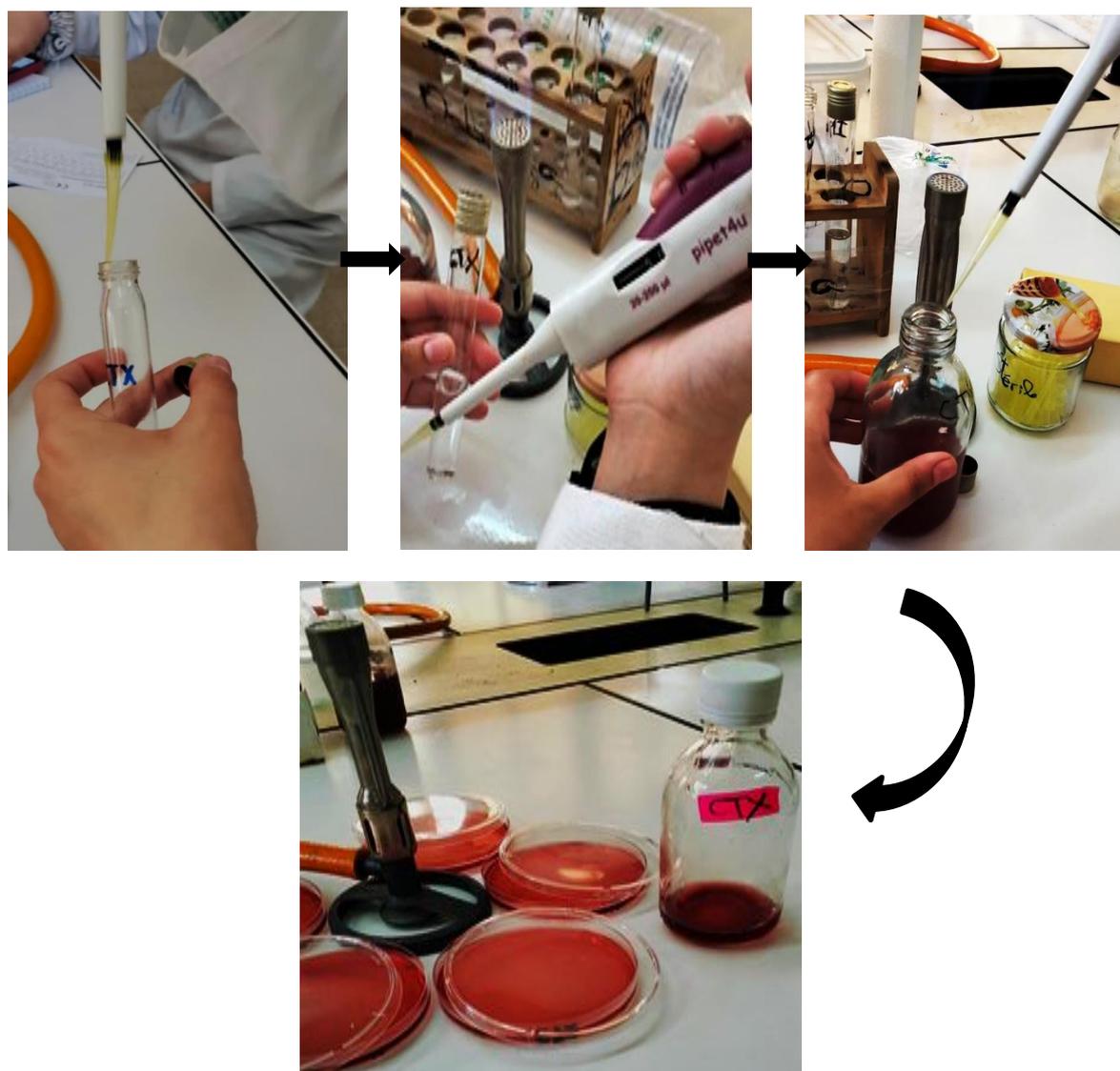


Figure 06 : Préparation de la gélose Mac Conkey + CTX (photos personnelles)

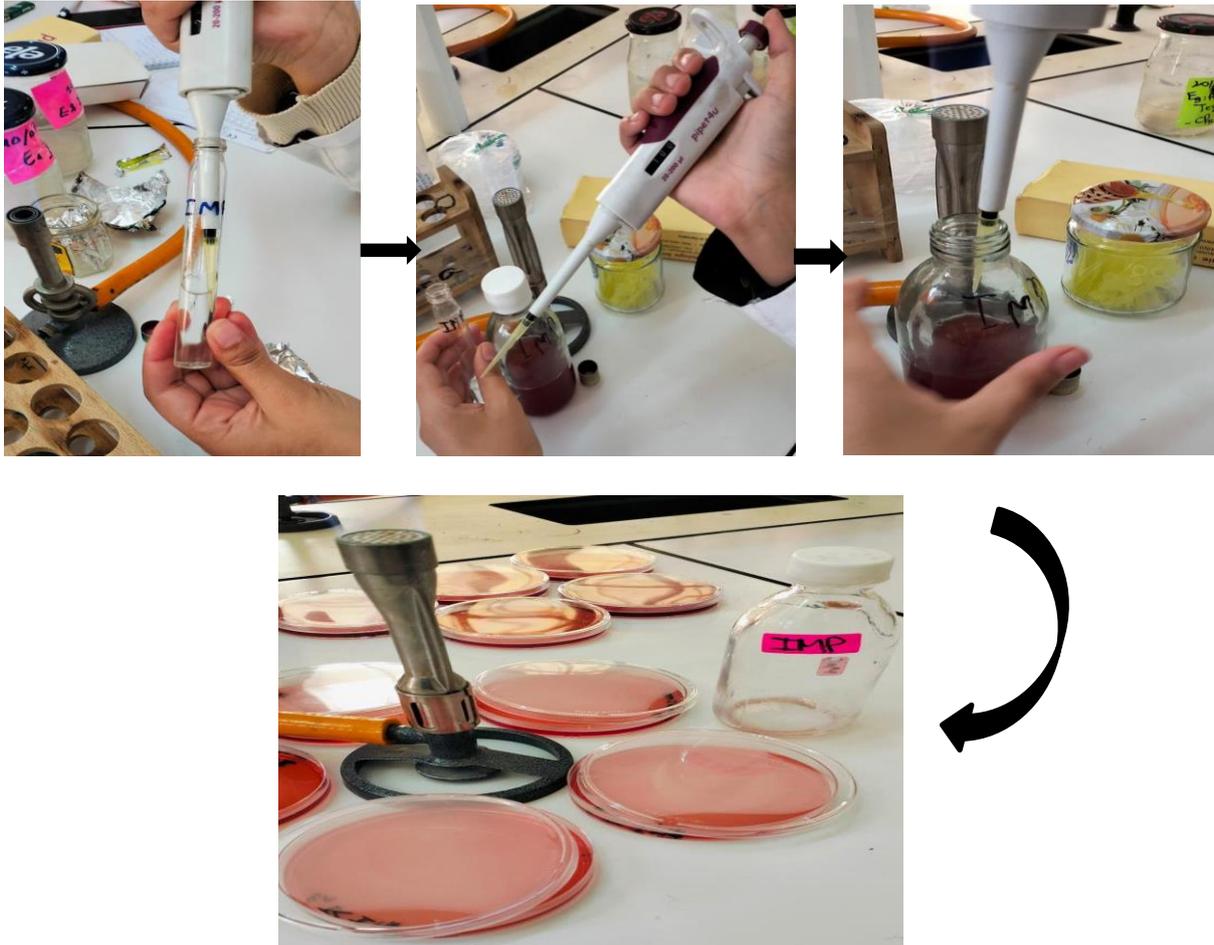


Figure 07 : Préparation de la gélose Mac Conkey + IMP (photos personnelles)

B) Isolements sélectifs :

❖ Isolement des ERC3G :

Homogénéiser le flacon de pré-enrichissement. Prélever un ôse de 10 μ l et étaler sur un seul cadran d'une boîte de Mac Conkey + CTX. A partir de ce premier étalement, procéder à deux étalements supplémentaires en reprenant le même ôse afin d'obtenir des colonies isolées (**Figure 08**). Incuber à 37 °C pendant 24 à 48 heures.

❖ Isolement des ERC :

Exécuter de la même manière pour l'isolement des ERC sur Mac Conkey + IMP. Chaque échantillon est ensemencé sur les deux milieux sélectifs à raison d'une boîte par échantillon.

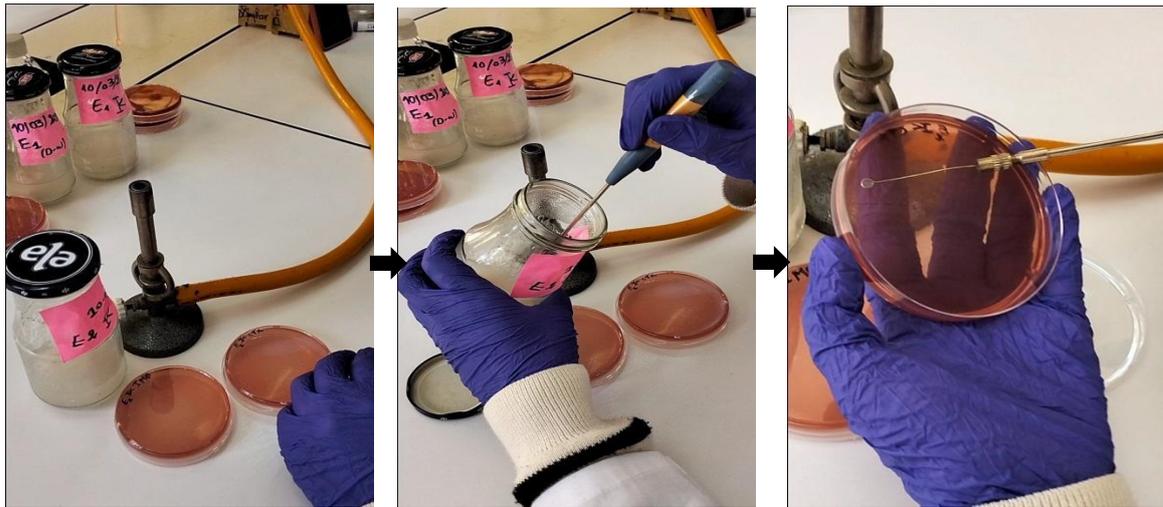


Figure 08 : Isolements sélectifs (photos personnelles)

Coloration de Gram :

Après incubation, choisir des colonies bien isolées et qui présentent un aspect caractéristique des entérobactéries et faire la coloration de Gram (**Annexe 3**) pour bien préciser qu'il s'agit des bacilles à Gram négatif.

c) Purification :

Une colonie pour chaque morphologie observée sur milieu Mac Conkey + CTX/IMP est repiquée sur une nouvelle boîte du même milieu pour obtenir une culture pure, puis incubée pendant 24h à 37°C (**Figure 09**). Les colonies obtenues après incubation sont examinées macroscopiquement et microscopiquement pour vérifier si elles présentent les mêmes aspects que leurs précédentes du premier isolement.

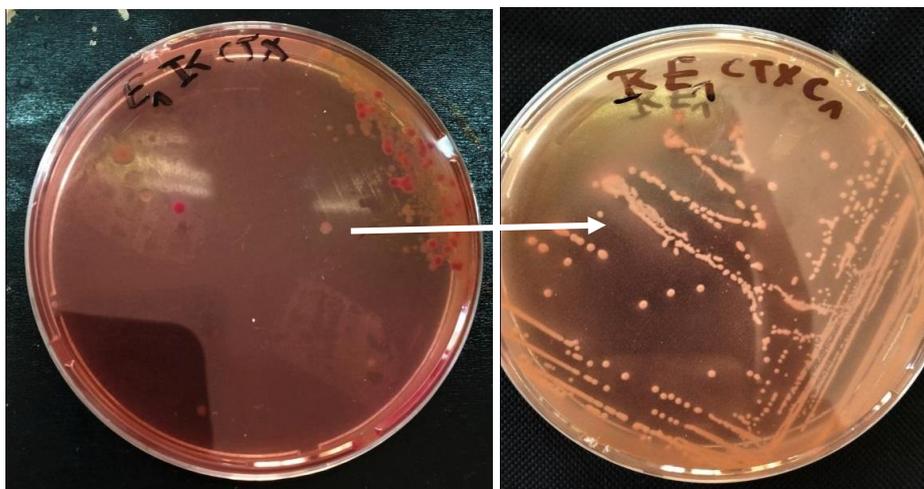


Figure 09 : Purification sur milieu Mac Conkey (photos personnelles)

d) Conservation (Figure 10) :

- Repiquer chaque isolat pur sur gélose nutritive (GN) inclinée (**Annexe 2**) par ensemencement en stries serrées.
- Incuber 24 heures à 37 °C.

Conserver les tubes au réfrigérateur ou à température ambiante en position verticale en notant sur le tube le code de l'isolat et la date de conservation.

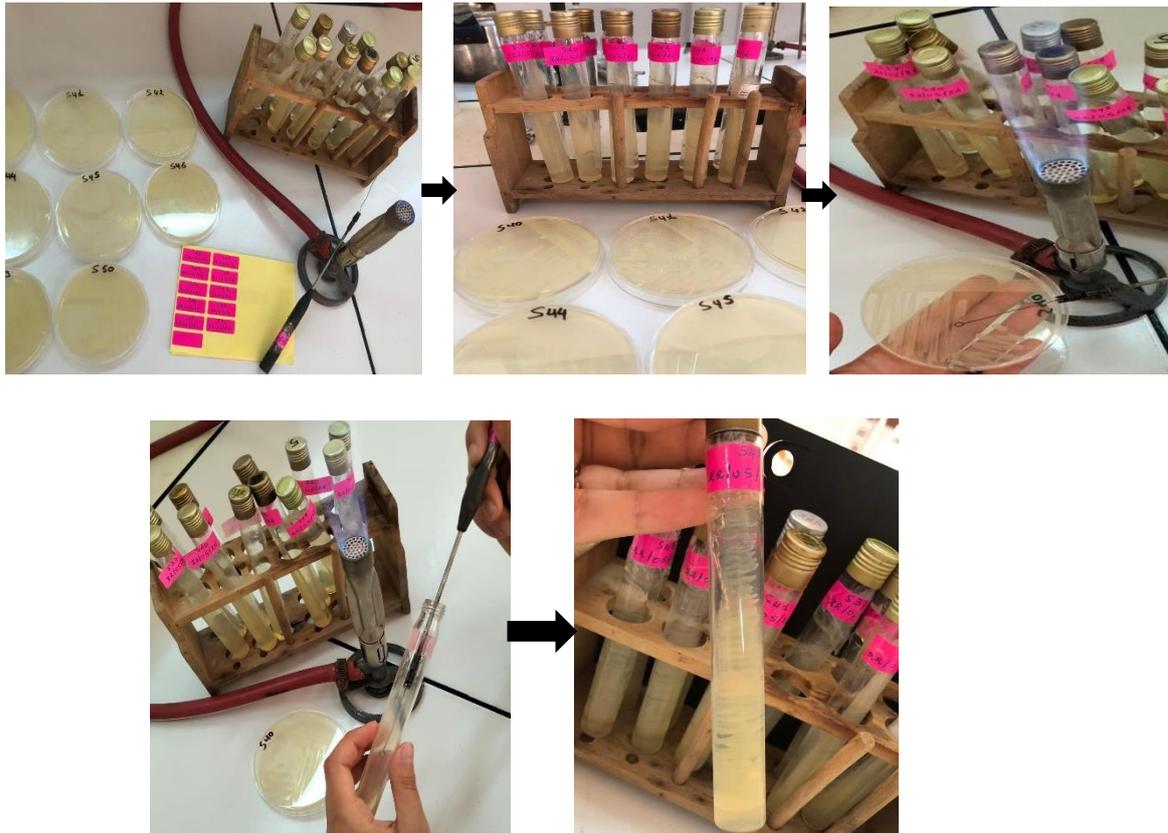


Figure 10 : Conservation sur GN inclinée (photos personnelles)

e) Identification :

L'identification des isolats conservés a été réalisé par la galerie API 20E. L'utilisation et la lecture de la galerie Api 20E, ce sont faites en suivant les instructions des notices Api 20 E de Biomérieux, France.

❖ Principe :

La galerie API 20 E (20 caractères pour les entérobactéries) est une galerie miniaturisée et standardisée de tests biochimiques, exploitable avec des bases de données d'identification complètes (**Becker et al., 2013**).

La galerie se présente sous la forme d'une série de petits tubes, chaque tube contient un substrat déshydraté défini et avec lequel les micro-organismes réagissent différemment. Les réactions produites pendant la période d'incubation des galeries se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs (Ndoutamia *et al.*, 2014).



Figure 11 : Galerie API 20 E (photo personnelle)

❖ **Technique :**

➤ **Préparation d'une culture jeune :**

Repiquer sur GN en boîte, chaque isolat conservé et incuber pendant 24 h à 37° C, afin d'obtenir une culture jeune idéalement prête à l'identification.

➤ **Préparation de la galerie :**

Le fond et le couvercle d'une boîte d'incubation ont été réunis, 5 ml d'eau distillée ont été distribués dans les alvéoles du fond de la boîte pour créer une atmosphère humide et la galerie a été déposée stérilement dans la boîte.

➤ **Préparation d'inoculum :**

A l'aide d'une anse de platine, des colonies homogènes et bien isolées ont été prélevées à partir de la culture jeune sur GN. Réaliser une suspension bactérienne dense en homogénéisant soigneusement les colonies prélevées, dans 5 ml d'eau physiologique stérile.

➤ **Inoculation de Galerie :**

A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, les micro-tubes de la galerie ont été remplis par la suspension bactérienne à analyser (pour éviter la formation des bulles au fond des tubes, la pipette est posée sur le côté de la cupule et la boîte d'incubation doit être légèrement inclinée vers l'avant) :

- Pour les tests CIT, VP et GEL, le tube et la cupule sont remplis.
- Pour les tests : ADH, LDC, ODC, H₂S, URE, la cupule est remplie par l'huile de vaseline stérile pour la création de l'anaérobiose.

- Pour les autres tests, seuls les tubes sont remplis (et non les cupules).

La boîte d'incubation est ensuite fermée et placée dans l'étuve à 37°C pendant 24 h.

❖ **Lecture :**

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture (**Annexe 04**).

- Si le nombre de tests positifs avant ajout des réactifs (y compris le test GLU) est inférieur à trois, réincuber la galerie 24 heures (plus ou moins 2 heures) de plus sans rajouter les réactifs.
- Si trois tests ou plus (test GLU + ou -) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs.

Remarque : le test de la recherche de production d'indole doit être réalisé en dernier, car cette réaction libère des gaz qui risquent d'altérer l'interprétation d'autres tests de la galerie. Ne pas remettre le couvercle d'incubation après l'ajout du réactif.

- **Test TDA :** ajouter une goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive.
- **Test VP :** ajouter une goutte des réactifs VP1 et VP2. Attendre 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive. Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative.
- **Test NO₂ :** ajouter 2 gouttes de réactifs NIT1 et NIT2 dans le tube GLU. Attendre 2 à 3 mn. Une coloration rouge indique une réaction positive. Une réaction négative (coloration jaune) peut être due à la production d'azote, ajouter 2 à 3 mg de la poudre de Zinc dans la cupule GLU. Après 5 minutes, un tube resté jaune indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Si la cupule est rose-rouge, la réaction est négative, les nitrates encore présents dans le tube ont été réduits en nitrites par le Zinc.
- **Test IND :** ajouter une goutte de réactif de Kovacs, attendre 2 minutes. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.



Figure 12 : Galerie API 20 E après lecture (photo personnelle)

❖ Interprétation

L'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification (feuille Excel pour l'identification microbienne).

II.5. Antibiogramme :

II.5.1. Définition :

Antibiogramme, est un test in vitro qui détermine la sensibilité ou la résistance des bactéries à des antibiotiques spécifiques. Ce test permet au clinicien de prescrire un traitement efficace sur une infection bactérienne.

II.5.2. Principe :

Le principe de l'antibiogramme repose sur l'évaluation de la capacité des antibiotiques à inhiber la croissance des bactéries ou à les tuer.

La méthode utilisée dans notre travail est la méthode de diffusion sur milieu gélosé (méthode des disques) basée sur les principes suivants :

- Un inoculum standardisé de bactéries (le plus souvent 0.5 McFerland) est ensemencé sur la surface d'une boîte de gélose Mueller Hinton (MH). (annexe 02)
- Différents disques d'antibiotiques sont placés sur la gélose.
- Après une nuit d'incubation, le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré autour de chaque disque.
- En se référant aux tableaux des normes du Clinical and Laboratory Standards Institute (**CLSI**) ou du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (**CA-SF**).

II.5.3. Technique :

On a utilisé une gamme de 18 antibiotiques choisis, parmi la liste standard et la liste complémentaire selon les recommandations du (**CA-SFM, 2023**).

❖ Préparation du milieu

La gélose MH doit être coulée à une épaisseur de $4 \text{ mm} \pm 0.5 \text{ mm}$ (approximativement 25 ml pour une boîte de Pétri de 90 mm de diamètre).

❖ Préparation de l'inoculum

Une suspension bactérienne est préparée à partir d'une culture jeune de 18-24 heures sur GN en prélevant au moins trois colonies, en les émulsionnant dans 5 ml d'eau physiologique stérile. Bien homogénéiser la suspension bactérienne. Ajuster son opacité par comparaison à l'étalon de turbidité 0,5 McFarland (**Figure 13**) préparé selon le protocole décrit en **Annexe 5**. La suspension bactérienne standardisée doit être équivalente à une DO de 0,08 à 0,1 soit 0,5 Mac Farland. Cela correspond à une culture pure à peine confluite de 10^6 à 10^8 UFC/ml.

Il faut noter que l'ensemencement sur gélose MH doit être réalisé dans les 15min qui suivent la préparation de l'inoculum.

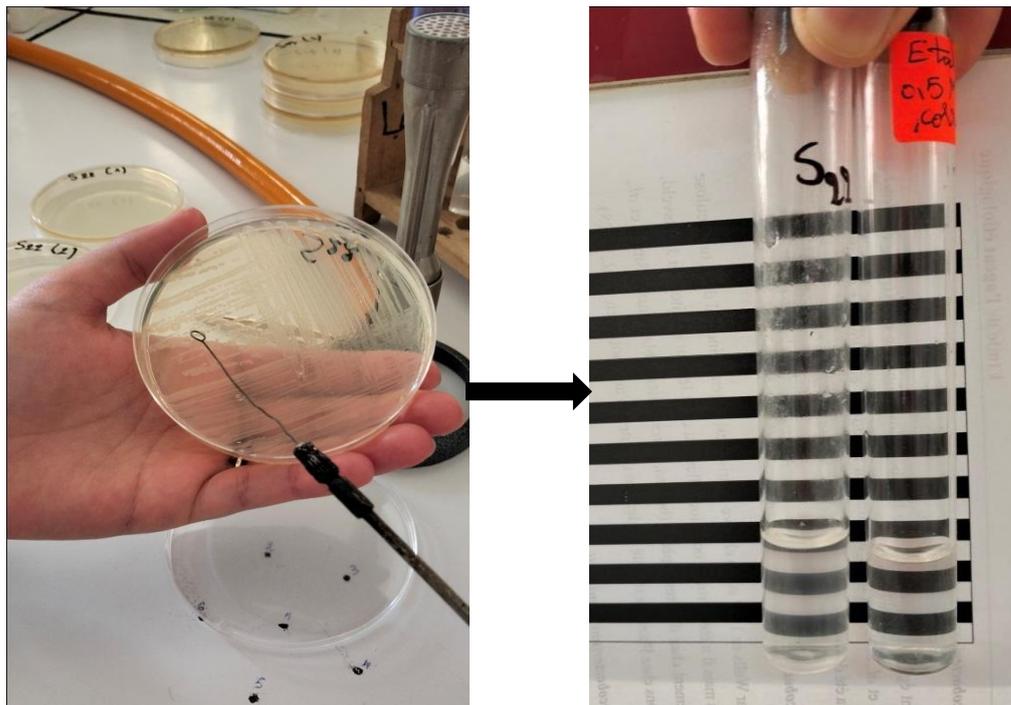


Figure 13 : Préparation de l'inoculum (Photos personnelles)

❖ Ensemencement de la gélose

- Plonger un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne et égoutter le sur les parois du tube pour éliminer l'excès de liquide.

- Ensemencer les boîtes de MH en stries serrées (3 boîtes pour chaque souche), en frottant l'écouvillon sur sa surface et en tournant la boîte 3 fois à 60° afin d'assurer une bonne distribution de l'inoculum. (**Figure14**)

- Les boîtes sont laissées sur pailleasse pour séchage.

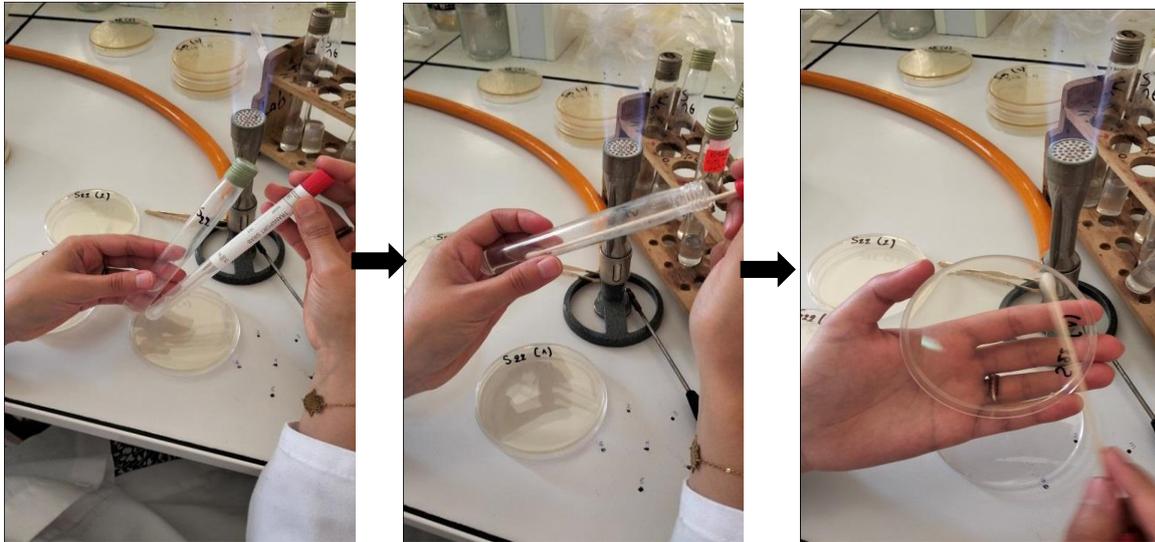


Figure 14 : Ensemencement de la gélose MH (photos personnelles)

❖ Dépôt des disques et incubation

Les disques sont déposés soigneusement à l'aide d'une pince stérile à plat sans déplacement (car la diffusion des antibiotiques est très rapide) a raison de 6 disques par boîte (**Figure 15**) et appuyés légèrement, à la surface du milieu MH séché ; avec une distance minimale de 15 mm séparant le disque périphérique du bord de la boîte et une distance minimale de 30 mm séparant chaque disque des autres. (**Figure 16**) Les boîtes sont incubées pendant 18-24 h à 37° C (couvercle en haut).

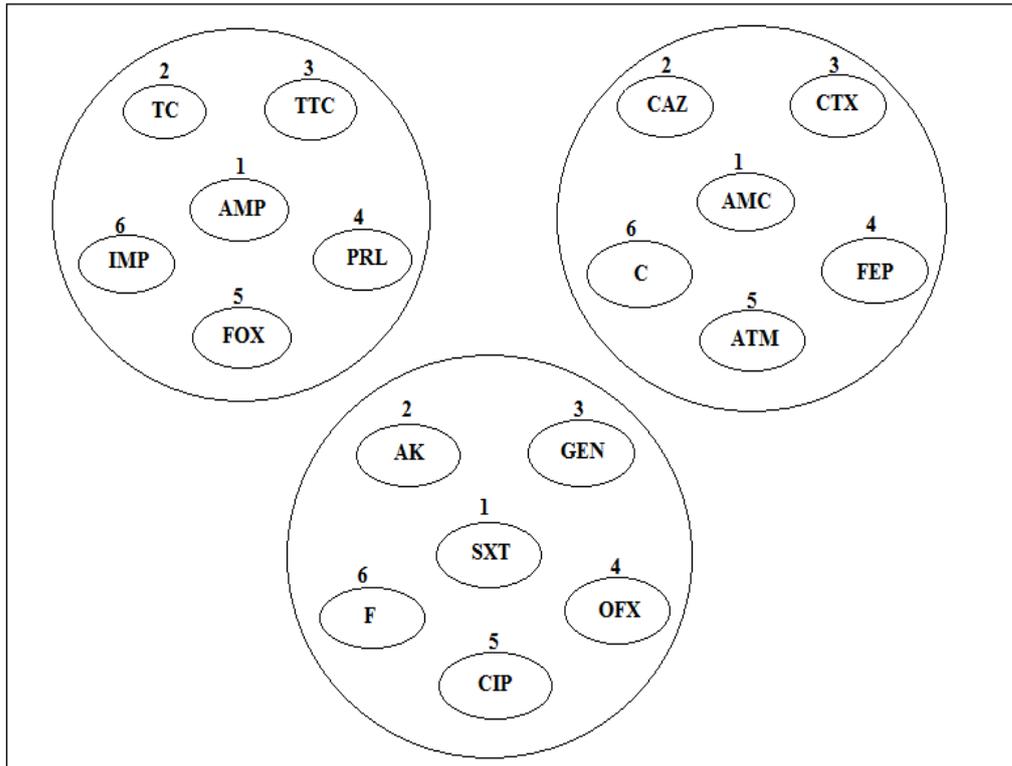


Figure 15 : Disposition des disques d'antibiotiques

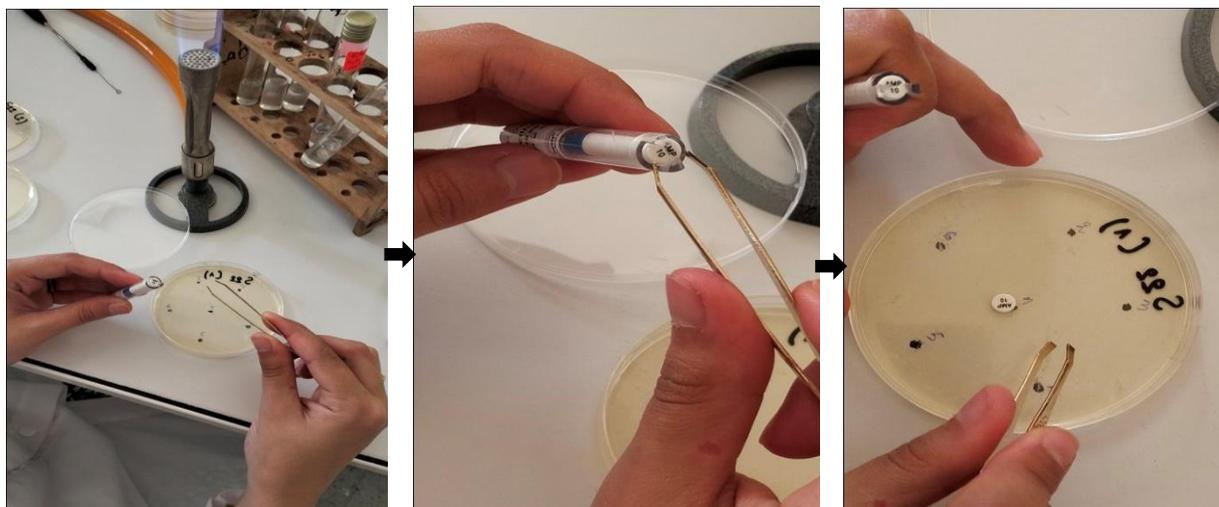


Figure 16 : Dépôt des disques (photos personnelles)

❖ Lecture et interprétation :

Après incubation, examiner les boîtes et procéder à la mesure et la catégorisation pour toute boîte présentant une culture confluyente, répartie sur toute la surface de la gélose de façon délimitant des zones d'inhibition circulaires. Les diamètres des zones d'inhibition (dont les bordures sont lues à l'œil nu) sont mesurés en mm avec une règle. L'interprétation est effectuée par référence au (**Tableau 03**) des diamètres critiques (**CA-SFM, 2023**), après comparaison entre les diamètres mesurés et ceux recommandés, le phénotype est alors détecté:

- Si le diamètre de la zone d'inhibition est $\geq D$: la souche est dite sensible (S).
- Si le diamètre de la zone d'inhibition est $< d$: la souche est dite résistante (R).
- Si $d \leq$ diamètre de la zone d'inhibition $< D$: la souche est dite intermédiaire (I).

Pour les antibiotiques CTX, CAZ et F, l'interprétation a été faite selon les recommandations de (**CLSI, 2023**) correspondant aux charges des disques disponibles.

Tableau 03 : Liste des antibiotiques testés (CA-SFM, 2023 ; CLSI, 2023)

Famille	Antibiotiques	Sigle	Charge de disque	Diamètres critiques			
				S ≥ D	I	R < d	
Bêta-lactamines	Pénicillines	Ampicilline	AMP	10µg	≥14	/	<14
	Carboxypénicillines	Ticarcilline	TC	75µg	≥23	/	<23
	Clavams	Ticarcilline-acide clavulanique	TTC	75-10µg	≥23	23 > ≥20	<20
		Amoxicilline/acide clavulanique	AMC	20-10µg	≥19	/	<19
	Pénames	Pipéracilline	PRL	30µg	≥20	/	<20
	Céphamycines	Céfoxitine	FOX	30µg	≥18	/	<18
	Carbapénèmes	Imipénème	IMP	10µg	≥22	22 > ≥19	<19
	Clavams	Amoxicilline/acide clavulanique	AMC	20-10µg	≥19	/	<19
	Céphalosporines	Ceftazidime	CAZ	30µg	≥21	18-20	≤17
		Céfotaxime	CTX	30µg	≥26	23-25	≤22
		Céfépime	FEP	30µg	≥27	27 > ≥24	<24
	Monobactames	Aztréonam	ATM	30µg	≥26	26 > ≥21	<21
	Phénicol	Chloramphénicol	C	30µg	≥17	/	<17
Triméthoprime-sulfamides	Triméthoprime-sulfaméthoxazole	SXT	1.25-23.75µg	≥14	14 > ≥11	<11	
Aminosides	Amikacine	AK	30µg	≥18	/	<18	
	Gentamicine	GEN	10µg	≥17	/	<17	
Fluoroquinolones	Oflaxacine	OFX	5µg	≥24	24 > ≥22	<22	
	Ciprofloxacine	CIP	5µg	≥25	25 > ≥22	<22	
Furanes	Nitrofurantoïne	F	300µg	≥17	15-16	≤14	

Chapitre III :

Résultats et discussion

III.1. Examen macroscopique

Notre travail a porté sur l'isolement des ERC3G sur gélose Mac-Conkey + CTX à 1mg/L et des ERC sur gélose Mac-Conkey + IMP à 2mg/L, à partir de 31 échantillons de viande de poulet prélevés dans quatre communes de Tébessa : Tébessa, Cheria, Hammamet et Bir Dhab.

Selon les principaux caractères cultureux des colonies obtenues (couleur, forme et taille), on distingue trois aspects cultureux, dont la description est détaillée dans le (tableau 05). Quelques photos démonstratives de ces aspects sont présentées dans les figures 17-19.

Tableau 04 : Description des différents aspects cultureux

Aspect	Couleur	Forme	Elévation	Consistance	Contour	Taille
(A)	Transparente	Ronde	Aplatie	Muqueuse	Régulier sans anneau	Petite
(B)	Rose foncé	Ronde	Bombée	crémeuse	Régulier sans anneau	Moyenne
(C)	Rose claire	Ronde	Bombée	crémeuse	Régulier	Petite

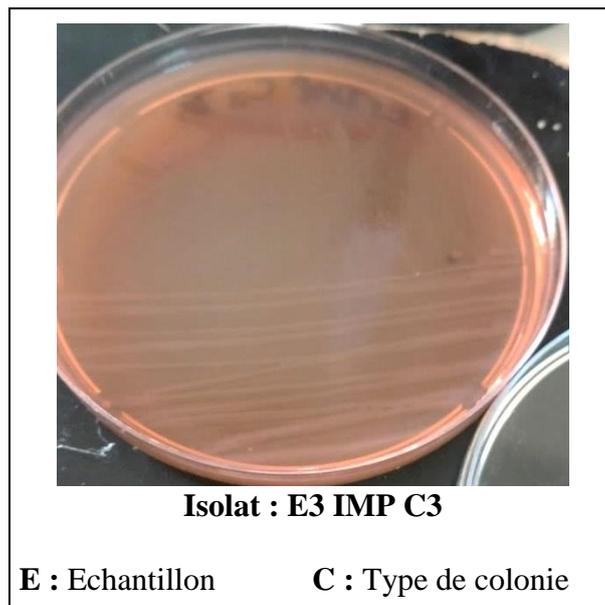


Figure 17 : Aspect cultural (A) sur gélose Mac Conkey (photos personnelles)

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Aboubacar, M ., Goro, A. (2020). Diplôme d'Etat ; Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées à Bamako de janvier 2020 à juin ; soutenue le 12 / 06 /2021.

Acar, J., Rostel, B. (2001). Antimicrobial resistance: an overview. Rev. Sci. Tech.; 20(3) : 797-810.

Afssa. (2006). Impact de l'usage des antibiotiques sur la résistance chez l'animal. Dans : Afssa, Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine.

Allag, H. (2023/2024). Antibiotique II. Fac MedPharm. 4eme année pharmacie.

Amalia, A. (2020). Analysis of Escherichia coli O157:H7 contamination in chicken meat sold in traditional markets in Makassar, Indonesia. <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/575/1/012026>

Anonymous. (2006). Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2005, AFSSA-Ministère de l'agriculture.

Arif, H. (2017). Risk of Transmission of Antimicrobial Resistant *Escherichia coli* from Commercial Broiler and Free-Range Retail Chicken in India. <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2017.02120/full>

B

Barka, M ., Anntar S ., Benamar, A . (2021). Antimicrobial resistance patterns and transferable traits in Enterobacteriaceae isolates from poultry in Tlemcen, Algeria.

Barka. (2021). Profils de résistance aux antimicrobiens et caractères transférables des isolats D'entérobactéries provenant de volailles à Tlemcen, Algérie.

Becker, B., Cooper, M. A. (2013). Aminoglycoside antibiotics in the 21st century. *ACS chemical biology*, 8(1), 105-115. <https://doi.org/10.1021/cb3005116>

Références bibliographiques

Bedekelabou. (2021). Antibiotic resistance of enterobacteria (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. and *Salmonella* spp) isolated from healthy poultry and pig farms in peri-urban area of Lome, Togo André P. BEDEKELABOU.

Benabdelmoumene, D. (2016). Qualités nutritionnelles et organoleptiques des viandes et des œufs de volailles locales. Influence du sexe et des génotypes. Thèse de Doctorat : Sciences Agronomiques : le Lundi 06 Juin.

bin Tian. (2020). Prevalence and characterization of *Morganella morganii* in beef cattle from Sichuan Province, China. <https://assets-eu.researchsquare.com/files/rs-24929/v1/7904c8c9-efa3-4988-8378-b65bc3bb8539.pdf?c=1637242791>

Bonnet, R. (2012). Bêta-lactamine et Entérobactérie Dans : AntibioGramme. 3 - ème ESKA. Pais ; 165-88 p.

C

CA SFM. (2023). Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie Recommandations 2023 V.1.0 juin 24.

Carle, S. (2009). La résistance aux antibiotiques : Un enjeu de santé publique important ! Pharmacuel, 42.

Cattoen, C. (2015). Persistance du portage de bactéries multirésistantes après la réanimation.

Centre universitaire de santé McGill. (2021). https://cusm.ca/newsroom/article/infections_27/09/2021.

Chauvin C, Clement C, Bruneau M, Pommeret D. Time-patterns of antibiotic exposure in poultry production--a Markov chains exploratory study of nature and consequences. *Prev Vet Med* 2007 ; 80 : 230-40.

CLSI. (2023). Clinical and Laboratory Standards Institute; 2023.

Courvalin, P. (2008). Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance. *J Intern Med* ;264 :4–16.

D

Decoster, A., Lahieu, J. (2006). Cours de Bactériologie : Les entérobactéries. <http://anne.decoster.free.fr/bgn/enterob.html>. (Accès le mars 15, 2016).

Références bibliographiques

Domínguez, C. (2002). Prévalence de *Salmonella* et *Campylobacter* dans la viande de poulet vendue au détail en Espagne. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160501006389?via%3Dihub>

E

El bouamri, M. (2017). THESE de doctorat ; Etude epidémio- moléculaire des entérobactéries productrices β lactamases a spectre élargi au Chu de Marrakech le 12 Juillet.

Ewen, S., Fedorka-Cray, P. (2002). Antimicrobial use and resistance in animals. *Clinical Infectious Diseases*, 34: S93-S106.

G

Gadou, V. (2019). Thèse Présentée pour l'obtention du Titre de Docteur de L'Université Félix Houphouet Boigny; Epidémiologie moléculaire des entérobactéries productrices de β lactamase spectre élargi résistantes aux aminosides et aux fluoroquinolones dans le district D'abidjan, Cote D'ivoire ; Le 29/03/2019.

Gassama, A. (2004). Etude du rôle des intégrons dans la multi résistance aux antibiotiques des bactéries entomopathogènes isolées en Afrique Sub-saharienne, thèse de doctorat, Université de Limoges, France, 97 p.

Gladys. (2014). Contamination par *Salmonella* et *Escherichia coli* de la viande de volaille provenant d'une usine de transformation et de marchés de détail à Ibadan, dans l'État d'Oyo, au Nigéria. <https://springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/2193-1801-3-139>

Goucem, R. (2016). Maître-Assistant en Pathologie aviaire, Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger.

Guergueb, N. (2022). Impact des pratiques hygieniques d'abattage et de vente sur la contamination microbienne des viandes de volailles dans la region de biskra. Thèse de doctorat.

J

Jamaluddin. (2018). Detection of *Proteus mirabilis* as foodborne disease bacteria in carcass of broiler chickens (*Gallus domesticus*).

<file:///C:/Users/kaouthar/Downloads/4386-Article%20Text-9438-1-10-20180626.pdf>

L

Léopold, T., Kemgang, S., Carl, M. (2009). Impact de l'utilisation des antibiotiques sur la sensibilité des bactéries pathogènes de poules dans la ville de Ngaoundéré.

Léopold. (2009). Impact de l'utilisation des antibiotiques sur la sensibilité des bactéries pathogènes de poules dans la ville de Ngaoundéré.
<http://www.ajol.info/browse-journals.php>

M

Mabel Kamweli Aworh. (2023). *Escherichia coli* résistant aux quinolones à l'interface entre l'homme, la volaille et leur environnement commun : un risque potentiel pour la santé publique.

Masudur, R. (2020). Isolement et caractérisation moléculaire d' *Escherichia coli* multirésistant à partir de la viande de poulet. | <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78367-2>

Muylaert, A., Mainil, J. (2013). Résistance bactériennes aux antibiotiques, les mécanismes et leur " contagiosité". In *Annales de Médecine vétérinaire* (Vol. 156, pp. 109-123). ULg-Université de Liège.

Nacib, M., Brai, S. (2019). Evaluation de la résistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries isolées des viandes de volaille.

Ndoutamia, G., Bessimbaye, N., Kerah-Hinzoumbe, C., Yandai, F. H., Sangare, L., Traore, A. S., ... & Barro, N. (2014). Profil de résistance des agents étiologiques des diarrhées isolés au Tchad. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 8(6), 2452-2461.
<https://doi.org/10.4314/ijbcs.v8i6.8>

Nordmann, P. (2010). Résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 950-9.

Références bibliographiques

Opatwski, M. (2020). Résistance bactérienne aux antibiotiques, apport du système national des données de santé thèse de doctorat de l'université paris-Saclay.

Oueslati, S. (2019). Thèse présentée ; Caractérisation moléculaire et biochimique des carbapénèmes les plus répandues chez les Entérobactéries associées à des infections sévères en vue de développer de nouveaux inhibiteurs, le 2 Décembre 2019, par Saoussen Oueslati.

R

Radio Canada. (2012). Le 15 février
<https://ici.radiocanada.ca/nouvelle/550084/bacterie-ecoli-volaille>.

S

Schwarz, S., Chaslus-Dancla, E. (2001). Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research*, 32 : 201-225.

V

Vilarrasa, A. (2022). <https://amelioretasante.com/viande-de-poulet-proprietes-et-avantages/> Rédigé et vérifié par la nutritionniste dernière mise à jour : 10 août, 2022.

W

Waglechner, N. (2017). Wright GD. Antibiotic resistance: It's bad, but why isn't it worse? *BMC Biol*;15.

Walsh, C. (2003). *Antibiotics: actions, origins, resistance.* Asm Press.

Wan-Qing Ma. (2022). Contamination de *Proteus mirabilis* hébergeant divers gènes de résistance aux antimicrobiens cliniquement importants dans la viande vendue au détail et les produits aquatiques provenant des marchés alimentaires en Chine.
<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2022.1086800/full>

Weiss, K. (2002). La résistance bactérienne : la nouvelle guerre froide. *Le médecin du québec*, 37(3), 41-49.

Références bibliographiques

Y

Yang, J. (2022). Complexe *Klebsiella oxytoca* : mise à jour sur la taxonomie, la résistance aux antimicrobiens et la virulence.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8635272/>

Yves, M. (2001). Article est extrait de l'ouvrage « Larousse Médical » (2001).

Z

Zitoun, S. (2021-2022). Cours de microbiologiques facultés de Médecine de Constantine.

Site web

Site 01 : [https:// www. information- dentaire. fr/ formations / evitons-l- abus-d- antibiotiques %E2 %80 %89/](https://www.information-dentaire.fr/formations/evitons-l-abus-d-antibiotiques-%E2%80%89/).

Site 02 : <https://www.futura-sciences.com> .(2024). futura-sciences le 7 Mars.

Annexes

Annexe 01 : Dates et lieux de prélèvement des échantillons

Date de prélèvement	Numéro de l'échantillon	Lieu de prélèvement
09 Mars 2024	E1	Point de vente 1, Route de Tébessa, Cheria
	E2	Point de vente 2, Cité Ali Mehani, Tébessa
	E3	Point de vente 3, Route de Constantine, Tébessa
10 Mars 2024	E4	Point de vente 4, Boucherie Sehailia Fouad Bir Dhab
16 Mars 2024	E5	Point de vente 1, Boucherie poulet du Darman, Cheria
	E6	Point de vente 2, Boucherie Touha cité Skanska, Tébessa
	E7	Point de vente 3, Boucherie Merah, Cheria
	E8	Point de vente 4, Centre-ville, Hammamet
	E9	Point de vente 5, Boucherie Sehailia Djaballah, Bir Dhab
15 Avril 2024	E10	Point de vente 6, Centre-ville, Hammamet
	E11	Point de vente 1, Boucherie cité EL Nour, Cheria
	E12	Point de vente 2, Cité Larocade Tébessa
	E13	Point de vente 3, Boucherie cité EL Nasr, Cheria
	E14	Point de vente 4, Route d'Annaba, Tébessa
	E15	Point de vente 5, Boucherie du quartier universitaire, Tébessa
E16	Point de vente 6, Centre-ville, Hammamet	

Suite de l'annexe 01

Date de prélèvement	Numéro de l'échantillon	Lieu de prélèvement
20 Avril 2024	E17	Point de vente 1, Route de Tazbent, Cheria
	E18	Point de vente 2, Cité Ex SNTV, Tébessa
	E19	Point de vente 3, Cité EL-Ouiam02, Tébessa
	E20	Point de vente 4, Cité Larmout, Tébessa
	E21	Point de vente 5, Quartier El-Ouiam 02, Tébessa
	E22	Point de vente 6, Route de Tazbint, Cheria
	E23	Point de vente 7, Centre-ville, Cheria
	E24	Point de vente 8, Route de Dalaa, Cheria
28 Avril 2024	E25	Point de vente 1, Route de Tébessa, Cheria
	E26	Point de vente 2, marché, Cheria
28 Avril 2024	E27	Point de vente 1, Route de Tébessa, Cheria
	E28	Point de vente 3, marché, Cheria
	E29	Point de vente 4, marché, Cheria
	E30	Point de vente 5, Centre-ville, Hammamet
	E31	Point de vente 6, Centre-ville, Hammamet

Annexe 02 : Composition (g/ l) et préparation des Milieux de culture

1) Tryptone-sel :

Tryptone	1 g
NaCl	8.5g

Mettre en solution 8,5 g de NaCl et 1g de Tryptone dans 1 litre d'eau distillée. Agiter lentement jusqu'à dissolution complète. Répartir en tubes ou en flacons. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 à 20 minutes.

2) Gélose de Mac Conkey :

Digestion peptique de tissus animaux	20 g
Sels biliaires	1,5 g
Cristal violet	0,001 g
Lactose	10 g
Rouge neutre	0,05 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar agar	15 g
pH final	7 ± 0,1 à 25°C

Suspendre 51,55 grammes dans 1000 ml d'eau distillée. Porter à ébullition pour dissoudre complètement le milieu. Stériliser par autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

3) Gélose nutritive :

Peptone	5 g
Extrait de viande	3 g
Agar agar	12 g
pH final	7,0 ± 0,2 à 25°C

Dissoudre 20 g dans 1000ml d'eau déminéralisée. Faire chauffer dans de l'eau bouillante et agiter fréquemment jusqu'à dissolution complète. Autoclaver pendant 15 minutes à 121°).

Pour préparer une GN inclinée, procéder de la même façon, puis répartir en tubes à raison de 7 ml par tube et stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes. Laisser solidifier sur une surface froide en position oblique en créant une pente plus ou moins longue.

4) Gélose de Mueller-Hinton :

Peptone	17,5 g
Extrait de viande	2 g
Amidon	1,5 g
Calcium	0,02 à 0,025
Magnésium	0,01 à 0,0125
Agar agar	15 g
pH final	7,4 ± 0,2 à 25°C

Dissoudre 38 g dans 1000ml d'eau distillée. Faire chauffer dans de l'eau bouillante et agiter fréquemment jusqu'à dissolution complète. Autoclaver pendant 15 minutes à 121°C.

Annexe 03 : Coloration de Gram

Principe :

La coloration de Gram est la plus utilisée en bactériologie pour étudier la classification des bactéries. Elle nous renseigne sur : le type Gram + ou Gram -, la forme des bactéries, la taille et le mode de regroupement.

Ce processus permet de séparer la plupart des bactéries en 2 groupes par rapport à la proportion de peptidoglycanes contenue dans les membranes :

- les bactéries à Gram positif qui sont riches en peptidoglycanes et pauvres en lipides;
- les bactéries à Gram négatif qui sont pauvres en peptidoglycanes et plus riches en lipides.

Protocole :

a) Préparation de frottis :

- On réalise un frottis sur une lame de microscope à partir d'une suspension bactérienne : on agite la suspension afin de l'homogénéiser et d'éviter d'avoir un culot au fond du tube. à l'aide d'une anse que l'on aura préalablement stérilisé, on prélève un peu de la solution bactérienne en plongeant le fil de platine de l'anse dans le tube à essai.
- On dépose ensuite ce prélèvement au milieu sur la lame en faisant des rotations jusqu'à séchage.
- On procède à la fixation du frottis (on passe directement 3 fois la lame dans la flamme du bec Bunsen).

b) Coloration :

• La coloration au violet de Gentiane (colorant basique) :

La lame est treuvverte pendant 1 à 2 minutes (en fonction de la concentration) par le violet de Gentiane puis rincer à l'eau. Toutes les bactéries sont colorées en violet.

• Mordançage au lugol (solution iodo-iodurée) : (Cette étape permet de stabiliser la coloration violette).

La lame est recouverte par le lugol pendant 1 minute ; Rincer à l'eau.

• Décoloration à l'alcool :

L'alcool est versé goutte à goutte sur la lame inclinée obliquement pendant 5 à 10 secondes. Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer sous un filet d'eau (L'alcool pénètre dans la bactérie).

La coloration au violet de Gentiane disparaît (les bactéries décolorées sont des bactéries Gram -).

Si l'alcool ne traverse pas la paroi, on est en présence de bactéries Gram+.

- **Contre coloration avec de la Fuchsine ou de la Safranine :**

La lame est recouverte pendant 1 à 2 minutes dans le colorant de Fuchsine, rincer doucement à l'eau. Les bactéries Gram (-) sont colorées en rose.

Sécher la lame par papier buvard puis examiner au microscope au grossissement x100.

Annexes

Annexe 04 : Guide de lecture de la galerie miniaturisée API 20 E.

Microtube	Substrat	Caractère recherché	Lecture directe ou indirecte (Test si nécessaire)	Résultat +	Résultat -
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	β -galactosidase	Lecture directe		
ADH LDC ODH	Arginine Lysine Ornithine	Arginine dihydrolase Lysine décarboxylase Ornithine décarboxylase	Lecture directe		
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Lecture directe		
URE	Urée	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fer		
IND	Tryptophane	Production d'indole	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs		
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d' α -naphthol		
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Lecture directe		
GLU à ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe		
NO ₂ / N ₂	Nitrates (NO ₃)	Nitrate réductase	Lecture indirecte dans la cupule GLU Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de la poudre zinc en cas de résultat négatif		

Annexe 05 : Préparation de l'étalon de turbidité McFarland 0,5

(CA-SFM, 2023)

- 1) Ajouter 0,5 ml d'une solution à 0,048 mol/L de BaCl₂ (1,175 % p/v BaCl₂ 2H₂O) à 99,5 ml d'une solution à 0,18 mol/L (0,36 N) de H₂SO₄ (1 % v/v) et agiter vigoureusement.
- 2) Vérifier la densité de la suspension à l'aide d'un spectrophotomètre. L'absorbance à 625 nm doit être comprise entre 0,08 et 0,13.
- 3) Distribuer la suspension dans des tubes de même taille que ceux utilisés pour ajuster l'inoculum. Sceller les tubes.
- 4) Une fois scellés, conserver ces tubes à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- 5) Avant usage, mélanger vigoureusement le tube à l'aide d'un vortex.
- 6) Renouveler l'étalon ou vérifier son absorbance après 6 mois de conservation.
- 7) Il convient de vérifier les étalons achetés dans le commerce en s'assurant que l'absorbance se situe dans les limites fixées.