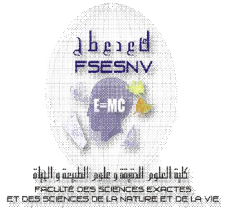




République algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Université de Tébessa

Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie

Département : Biologie appliquée.

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de master.

Domaine : Sciences de la nature et de la vie.

Filière : Sciences biologiques.

Option : Microbiologie appliquée à la sante et à l'environnement.

Thème

Recherche des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi dans les viandes de volaille

Présenté par :

Moussa Nadjette

Moussaoui Fatma Zahra

Devant le jury :

Benhadj. M

MAA Université de Tébessa

Présidente

Debabza. M

MCB Université de Tébessa

Rapporteuse

Chadi. H

MAA Université de Tébessa

Examinatrice

Date de soutenance : 30 Mai 2016

ملخص

تعرف مقاومة البكتيريا المعوية للمضادات الحيوية تطورا عالمي مثير للقلق مع تأثير متزايد للبيتا لاکتاماز ذات الطيف الموسع.

كان الهدف من هذه الدراسة هو البحث عن البكتيريا المعوية المنتجة للبيتا لاکتاماز ذات الطيف الموسع في لحوم الدواجن التي يتم تسويقها في منطقة تبسة.

تظهر النتائج المتحصل عليها تنوعا في البكتيريا المعوية في لحوم الدواجن. وفيما يتعلق بحساسية البكتيريا للمضادات الحيوية فقد وجد أن المضادات الحيوية الأكثر فعالية هي سيفوتاكسيم، السيفتازيديم، أز تريونام، أميكاسين، جنتاميسين و نيتروفورانوين، بينما لوحظت أعلى مقاومة اتجاه المضادات الحيوية: سيفوكسيتين، التتراسيكلين، إيميبينيم، أمكسيسلين-حمض الكلافونليك. تم الكشف على إنتاج بيتا لاکتاماز ذات الطيف الموسع لدى 07 من 36 سلالة (19,44%) مع غالبية الايكولاي (28,57%).

تظهر دراستنا أن لحوم الدواجن يمكن أن تحمل البكتيريا المعوية المنتجة للبيتا لاکتاماز ذات الطيف الموسع حيث يمكن أن يمثل الانتشار المتزايد لها تأثيرات علاجية مهمة وبالتالي ينبغي مواصلة رصد البكتيريا المعوية المنتجة للبيتا لاکتاماز ذات الطيف الموسع على مختلف المستويات (حيوانات، مواد الغذائية و البشرية و البيئية) مع دراسة عوامل إنتقائها وانتشارها.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا معوية، البيتا لاکتاماز ذات الطيف الواسع، لحوم الدواجن.

Abstract

The antibiotic resistance of *Enterobacteriaceae* knows a worldwide worrying evolution with growing impact of extended- spectrum beta-lactamases (ESBL).

The objective of this study was to investigate ESBL producing *Enterobacteriaceae* from poultry meat marketed in the Tebessa region.

The results show a diversity of *Enterobacteriaceae* in poultry meat. Regarding the sensitivity to antibiotics, it was found that the most active antibiotics are: cefotaxime, ceftazidime, aztreonam, amikacin, gentamicin and nitrofurantoin. While the most significant resistance were observed against antibiotics: cefoxitin, tetracycline, imipenem, amoxicillin, clavulanic-acid. ESBL production was detected in 7/36 strains (19.44%), with a predominance of *E. coli* (28.57%).

Our study reveals that poultry meat can carry ESBL producing *Enterobacteriaceae*, whose the increasing prevalence may have important therapeutic implications. Thus, monitoring of ESBL producing *Enterobacteriaceae* should be pursued at different levels (animals, food, human and environment), while studying the factors that contribute to their selection and distribution.

Key words: *Enterobacteriaceae*, extended- spectrum beta-lactamases, poultry meat.

Résumé

La résistance des entérobactéries aux antibiotiques connaît aujourd'hui une évolution mondiale préoccupante avec un impact croissant des β -lactamases à spectre élargi (BLSE).

L'objectif de cette étude, a été de rechercher les entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi (EBLSE) à partir des viandes de volaille commercialisées dans la région de Tébessa.

Les résultats obtenus montrent une diversité quant aux genres et espèces des entérobactéries dans les viandes de volaille. Concernant la sensibilité aux antibiotiques, on a pu constater que les antibiotiques les plus actifs sont : céfotaxime, ceftazidime, aztréonam, amikacine, gentamicine et nitrofurantoïne. Alors que les résistances les plus marquées sont observées à l'égard des antibiotiques : céfoxitine, tétracycline, imipénème, amoxicilline-acide clavulanique. La production des BLSE a été détectée chez 7/36 souches (19,44%) avec une prédominance d'*E.coli* (28,57%).

Notre étude révèle que les viandes de volaille peuvent véhiculer des EBLSE, dont la prévalence croissante peut avoir des implications thérapeutiques importantes. Ainsi, le suivi des entérobactéries productrices de BLSE doit être poursuivie à différents niveaux (animaux, aliments, humains et environnement), tout en étudiant les facteurs qui contribuent à leur sélection et leur diffusion.

Mots clés: Entérobactéries, bêta-lactamases à spectre élargi, viandes de volaille.

Dédicace

Pour m'avoir permis d'être ce que je suis devenu aujourd'hui, je voudrais remercier le SEIGNEUR de monde par qui tout est possible : DIEU

*Le tout puissant qui m'a doté de volonté et de patience pour ce travail.
Avec joie et honneur, je dédie ce mémoire :*

Ma très chère Mère

A celle qui m'a donné la vie, qui a marqué chaque moment de mon existence avec son intarissable tendresse, à celle à qui je dois le meilleur de moi-même

A Mon très cher Père

A celui l'exemple du courage, du dévouement, de l'honnêteté, de la persévérance et du sacrifice.

A mes chères soeurs

Ichrack et Noussaiba, Merci pour votre support continu et de votre amour.

A Mon très cher frère

Zarakia Puisse Dieu tout puissant jouir votre vie, vous combler d'avantage, vous apporter du bonheur.

A Mes oncles et tantes

monsof, kamel, Narimene, rachida, Bariza aucun mot ne pourra exprimer l'amour et le respect que j'éprouve pour vous, ni vous remercier pour votre soutien et vos prières qui m'ont toujours apporté soutien moral et affectif lors des épreuves difficiles de ma carrière.

A mon amie

Nada Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi une amie sur qui je peux compter.

Je veux dédier aussi un grand merci à mon binôme Nadjette

A tous mes collègues de promotion, Merci pour votre amour et votre amitié

A tous ceux qui ont été à mes côtés jusqu'à aujourd'hui.

Remerciements

*à Allah, seigneur de l'univers Tout puissant Qui m'a inspiré Qui m'a guidé
dans le bon chemin Je vous dois ce que je suis devenue Louanges et
remerciements Pour votre clémence et miséricorde*

*Nous exprimons nos vifs remerciements à notre encadreur "Mme.
Mechai Manel" pour avoir accepté de diriger ce travail, pour ses conseils,
son aide, ses suggestions sur la rédaction de ce mémoire ainsi que la
confiance qu'elle nous a témoigné tout au long de cette étude. Pour sa
patience, sa gentillesse, et son esprit responsable*

*Nous offrons un grand remerciement à notre Co-encadreur "Mr. Mechai"
qui était très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire.*

*Nous exprimons aussi nos remerciements aux membres de jury d'avoir
accepté de jurer ce mémoire.*

*Sans oublier de remercier nos chers parents qui ont contribué à
l'avancement de toute belle chose dans nos vies et qui nous ont beaucoup
soutenu.*

*Nous remercions tous nos collègues et amies pour leur esprit de groupe
pendant le travail pratique.*

*Nos remerciements vont également à tous ceux et celles qui de près ou de
loin nous ont apporté l'aide et l'encouragement.*

Table des matières

ملخص

Abstract

Résumé

Dédicaces

Remerciements

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des symboles

Introduction..... [1]

Chapitre 01: revue bibliographique.

I.	Entérobactéries	[3]
1.	Définition.....	[3]
2.	Taxonomie.....	[3]
3.	Habitat.....	[4]
4.	Caractères cultureux.....	[5]
5.	Caractères antigéniques.....	[5]
6.	Pouvoir pathogène.....	[6]
II.	Béta-lactamines.....	[7]
1.	Structure et propriétés	[7]
2.	Classification.....	[7]
2.1	Pénicillines.....	[8]
2.2	Céphalosporines.....	[8]
2.3	Monobactames.....	[8]
2.3	Carbapénèmes.....	[9]
3.	Mode d'action	[9]
4.	Mécanismes de résistance aux β -lactamines.....	[9]

4.1	Imperméabilité.....	[9]
4.2	Système d'efflux.....	[10]
4.3	Modification des PLP	[10]
4.4	Inactivation enzymatique.....	[10]
III.	Bêta-lactamases.....	[10]
1.	Définition.....	[10]
2.	Classification.....	[11]
2.1.	Classification de Ambler.....	[11]
2.2.	Classification de Bush, Jacoby et Medeiros.....	[12]
3.	Bêta-lactamases à spectre étendu.....	[12]
3.1.	Définition.....	[12]
3.2.	Différents types.....	[13]
IV.	Viandes de volaille.....	[14]
1.	Définition	[14]
2.	Composition.....	[14]
3.	Contamination.....	[14]
3.1.	Origine de la contamination.....	[15]
3.1.1.	Origine endogène.....	[15]
3.1.2.	Contamination exogène.....	[15]

Chapitre 02 : Matériel et méthodes.

I.	Matériel.....	[17]
1.	Appareillages.....	[17]
2.	Verrerie.....	[17]
3.	Outils.....	[17]
4.	Réactifs et autres substances.....	[18]
5.	Milieux de culture.....	[18]

II. Méthodes.....	[18]
1. Prélèvement.....	[18]
2. Préparation de la suspension mère.....	[20]
3. Examen microscopique de la suspension mère.....	[20]
4. Préparation des dilutions	[20]
5. Recherche des entérobactéries totales.....	[21]
6. Recherche de <i>Salmonella et Shigella</i>	[21]
7. Examen macroscopique et microscopique.....	[21]
8. Purification.....	[22]
9. Conservation des isolats.....	[22]
10. Identification biochimique.....	[22]
11. Test de l'antibiogramme.....	[26]
12. Recherche d'une BLSE.....	[30]
12.1 Test de synergie.....	[30]
12.2 test de double disque	[32]

Chapitre 03: Résultats et discussion.

1. Examen macroscopique.....	[33]
2. Examen microscopique.....	[34]
3. Identification biochimique.....	[34]
4. Répartition des souches isolées selon les genres	[39]
5. Répartition des souches isolées selon les espèces.....	[41]
6. Sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques	[43]
6.1. Sensibilité des souches isolées vis-à-vis des antibiotiques testés.....	[47]
7. Détection des BLSE.....	[49]
8. Fréquence des EBLSE.....	[51]
9. Sensibilité aux antibiotiques des souches EBLSE	[52]

Conclusion et perspectives..... [56]

Références bibliographiques

Annexes

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Principaux genres et espèces des entérobactéries	04
02	Prélèvements réalisés au cours de l'étude	19
03	Lecture de la galerie miniaturisée Api 20E	25
04	Liste des antibiotiques testés	27
05	Résultats des tests de l'identification biochimique réalisée par API 20E	35
06	Effectif et pourcentage des souches selon les genres	41
07	Effectif et pourcentage des souches selon les espèces	42
08	Résultats du test de la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées.	45
09	Pourcentage de sensibilité aux antibiotiques des souches isolées.	48
10	Résultats des tests de détection de BLSE réalisés	49
11	Effectifs et pourcentages des souches EBLSE selon les espèces	51
12	Effectifs et pourcentages de sensibilité aux antibiotiques des souches EBLSE	53

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Structure du noyau β -lactame	07
02	Structures de quelques β -lactamines	08
03	Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle β -lactame	11
04	Echantillon de viande de volaille dans un sac ligaturé	19
05	Préparation de la suspension mère	20
06	Galerie API20 ^E	23
07	Schéma explicatif de la disposition des disques d'antibiotiques	29
08	Description de l'image de synergie	31
09	Schéma explicatif du test du double disque	32
10	Principaux aspects macroscopiques sur VRBG	33
11	Principaux aspects macroscopiques sur MC	33
12	Principaux aspect macroscopique sur SS	33
13	Principaux aspect macroscopique sur DCLS	33
14	Quelques aspects microscopiques (X 100)	34
15	Photographie de l'Api 20E de la souche 03 (<i>Serratia liquefaciens</i>)	38
16	Photographie de l'Api 20E de la souche 05 (<i>Pantoea spp4</i>)	38
17	Photographie de l'Api 20E de la souche 06 (<i>Salmonella spp</i>)	38
18	Photographie de l'Api 20E de la souche 10 (<i>K. ornithinolytica</i>).	38
19	Photographie de l'Api 20E de la souche 23(<i>Proteus mirabilis</i>)	38
20	Photographie de l'Api 20E de la souche 32 (<i>Salmonella arizonae</i>)	38
21	Photographie de l'Api 20E de la souche 24 (<i>Serratia odorifera1</i>)	39
22	Photographie de l'Api 20E de la souche 12 (<i>Pantoea spp1</i>)	39
23	Photographie de l'Api 20E de la souche 35 (<i>E.coli 1</i>)	39
24	Photographie de l'Api 20E de la souche14 (<i>Providencia alcalifaciens</i>)	39
25	Photographie de l'Api 20E de la souche15 (<i>Serratia odorifera 2</i>)	39
26	Photographie de l'Api 20E de la souche 07 (<i>Enterobacter sakazakii</i>)	39

Liste des figures (Suite)

N°	Titre	Page
27	Photographie de l'Api 20E de la souche 22 (<i>Proteus vulgaris</i>)	40
28	Photographie de l'Api 20E de la souche 31 (<i>Serratia marcescens</i>)	40
29	Photographie de l'Api 20E de la souche 26 (<i>Enterobacter cloacae</i>)	40
30	Photographie de l'Api 20E de la souche 34 (<i>Enterobacter gergoviae</i>)	40
31	Répartition des souches en fonction des genres	41
32	Répartition des souches en fonction des espèces	43
33	Histogramme représentatif de la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées	49
34	Photographies de test de synergie positif	51
35	Photographies du test de double disque positif	49
36	Répartition des souches EBLSE en fonction des espèces.	52
37	Histogramme représentatif de la sensibilité aux antibiotiques des souches EBLSE.	54

Liste des symboles

- ✚ °C: Degré Celsius.
- ✚ μm: micro mètre.
- ✚ ADH : Arginine dihydrolase.
- ✚ AK :Amikacine.
- ✚ AMC : Amoxiciline + Acide clavulanique.
- ✚ AMX: Amoxicilline.
- ✚ AMY: amygdaline.
- ✚ ARA: arabinose.
- ✚ Api 20E :Analytical profile index 20E (E= Entérobactéries)
- ✚ ATM:Aztréonam.
- ✚ BES:Brazil extended spectrum.
- ✚ BLSE : β-lactamase à spectre étendu.
- ✚ C: Chloramphénicol.
- ✚ CAZ:Ceftazidime.
- ✚ C1G: Céphalosporines de première génération.
- ✚ C2G: Céphalosporines de seconde génération.
- ✚ C3G: Céphalosporines de troisième génération.
- ✚ CIT: Citrate.
- ✚ CL: Céfalexine.
- ✚ CN: Gentamicine.
- ✚ CTX/CE: Céfotaxime.
- ✚ CTX-M: Cefotaximase- Munich.
- ✚ DCLS: Desoxycholate Citrate Lactose Sucrose.
- ✚ EBLSE: entérobactéries productrice de β-lactamase à spectre étendu.
- ✚ ECA: enterobacterial common antigen.
- ✚ FF : Nitrofurantoïne.
- ✚ FEC: Fecal *Escherichia coli*.
- ✚ FOS: Fosfomycine.
- ✚ FOX: Céfoxitine.
- ✚ GES: Guiana extended spectrum β-lactamase.
- ✚ GLU: Glucose.

- ✚ **GN:** Gélose nutritive.
- ✚ **H₂S :** hydrogène sulfuré.
- ✚ **I :** Intermédiaires
- ✚ **IND :** Indole.
- ✚ **INO :** Inositol.
- ✚ **IMI :** Imipénème.
- ✚ **K :** Kanamycine.
- ✚ **LDC :** Lysine décarboxylase.
- ✚ **LPS:** Lipopolysaccharide.
- ✚ **MC:** Mac Conkey.
- ✚ **MAN:** Mannitol.
- ✚ **MEL:** Melibiose.
- ✚ **MH:** Mueller-Hinton.
- ✚ **N₂ :** Azote.
- ✚ **NA :** Acide nalidixique.
- ✚ **NIT:** Nitrate réductase.
- ✚ **ODC:** Ornithine décarboxylase.
- ✚ **OFX:** Ofloxacin.
- ✚ **ONPG:** Orthonitrophényl-bêta-D-galactopyranoside.
- ✚ **OXA:** Oxacillinas.
- ✚ **PEF:** Péfloxacin.
- ✚ **PER:** *Pseudomonas* Extended Resistance.
- ✚ **PLP:** Protéine Liant la Pénicilline.
- ✚ **R:** Résistantes.
- ✚ **RHA:** Rhamnose.
- ✚ **S:** Sensibles.
- ✚ **SAC:** saccharose.
- ✚ **SFO:** *Serratia fonticola*.
- ✚ **SHV:** Sulfhydryl variable.
- ✚ **SOR:** sorbitol.
- ✚ **SS:** *Shigella Salmonella*.
- ✚ **SXT:** Triméthoprime-sulfaméthoxazole.
- ✚ **TDA :** Tryptophane désaminase.
- ✚ **TE :** Tétracyclines.

- ✚ **TEM:** Temoniera.
- ✚ **TIC:** Ticarcilline.
- ✚ **TLA:** Tlahuicas Indians.
- ✚ **URE:** Uréase.
- ✚ **VEB:** Vietnamese extended spectrum β -lactamase.
- ✚ **VP:** Voges-Proskauer.
- ✚ **VRBG:** Violet Red Bile Glucose agar.
- ✚ **Zn:** Zinc.

Introduction

Introduction

Au cours des cinquante dernières années, les antibiotiques ont joué un rôle crucial dans la lutte contre de nombreuses maladies et infections. Leur importance est d'une grande utilité pour une meilleure prise en charge de la santé publique [41]. Cependant, avec l'utilisation croissante et parfois injustifiée de ces molécules, les bactéries ont appris à se défendre et à s'adapter et certaines sont devenues résistantes aux antibiotiques par différents mécanismes. Parmi lesquels l'inactivation enzymatique par les β -lactamases [66] qui présentent le principal mécanisme de résistance aux bêtalactamines chez les entérobactéries [27].

Les β -lactamases regroupent plusieurs types dont les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) connaissent aujourd'hui une large diffusion mondiale. Les entérobactéries productrices de BLSE (EBLSE) ne sont pas plus pathogènes que d'autres entérobactéries, mais les infections qu'elles provoquent sont plus difficiles à traiter vu leur résistance à de nombreux antibiotiques [83].

Parmi les infections causées par les entérobactéries celles d'origine alimentaire dont les principaux aliments incriminés sont les viandes qui présentent un siège de contamination et de prolifération bactérienne, en raison de leur haute teneur en eau et en substances nutritives [68].

Dans ce contexte, notre étude consiste à rechercher les EBLSE dans la viande de volaille.

Les objectifs de ce travail sont donc :

- Evaluer le niveau de résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées;
- Contribuer à l'évaluation de la contamination de la viande de poulet par les EBLSE;
- Evaluer l'impact des viandes de volaille contaminées par ces bactéries multi résistantes sur la dissémination de la résistance dans la chaîne alimentaire;

Ce manuscrit comporte trois chapitres. Le premier est une synthèse bibliographique qui débute par des rappels sur les entérobactéries, les bêta-lactamines, et la résistance des entérobactéries à ces antibiotiques par les bêta-lactamases, précisément les BLSE, et enfin elle se termine par l'aspect microbiologique des viandes de volaille. Dans le deuxième chapitre, nous présenterons le matériel et les méthodes utilisées au cours des différentes étapes du travail pratique. Le troisième chapitre sera consacré à la présentation de l'ensemble de résultats obtenus et les discussions qui en découlent. Finalement, une synthèse d'une conclusion générale des différents résultats et discussions abordés au cours de ce travail sera présentée, avant de conclure par quelques perspectives.

Chapitre 01

Revue bibliographique

I. Entérobactéries

1. Définition

Les entérobactéries forment une vaste famille de bactéries qui sont naturellement présentes dans la flore intestinale. Cette famille regroupe l'ensemble des bacilles à Gram négatif, dont les dimensions varient de 6 µm de long et 0,3 à 1 µm de large. Certaines sont mobiles au moyen de flagelles péritriches et d'autres immobiles. Les entérobactéries sont non sporulées, anaérobies facultatives et chimioorganotrophes, fermentant le glucose, elles sont oxydase négatives et catalase positives, facilement cultivables, la plupart réduisent les nitrates (sauf certaines souches d'*Erwinia* et *Yersinia*) [62] [63] [72].

2. Taxonomie

Les entérobactéries sont des *Eubactéries*, elles appartiennent à la division des *Proteobacteria*, à la classe des *Gammaproteobacteria*, à l'ordre des *Enterobacteriales* et à la famille des *Enterobacteriaceae* [78].

La création de ce groupe a été proposée par Rahn en 1937 qu'il dénomma *Enterobacteriaceae*. La subdivision des genres et espèces est basée sur la comparaison des caractéristiques physiologiques, biochimiques, antigéniques et génétiques des bactéries. Plus de 40 genres et plus de 1700 espèces différents sont décrits au sein de cette famille [63].

Les principaux genres et espèces de cette famille sont présentés dans le **tableau 01**.

Tableau01:Principaux genres et espèces des entérobactéries [18].

Genres	Espèce	Genres	Espèce	Nouveaux genres
<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus</i>	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Proteus rettgerii</i>	<i>Kluyvera</i>
<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella enteridis</i>	<i>Erwinia</i>		<i>Cedecea</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Serratia</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Tatumella</i>
<i>Shigella</i>	<i>Shigella dysenteriae</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Shigella boydii</i> <i>Shigella sonnei</i>	<i>Edwardsiella</i>	<i>E.tarda</i>	
<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Providencia</i>	<i>P.stuartii</i> <i>P.rettgeri</i>	
<i>Yersinia</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Yersinia</i> <i>Pseudo tuberculosis</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>C.freundii</i> <i>C.amalonicus</i> <i>C.diversus</i>	

3. Habitat

Les entérobactéries sont des bactéries ubiquitaires retrouvées partout dans le sol, dans l'eau, dans certaines denrées alimentaires [78] [79]. On les trouve aussi dans la cavité buccale, au niveau des voies aériennes supérieures et sur les organes génitaux, mais la plupart des espèces qui composent cette famille sont des hôtes normaux ou pathogènes du tube digestif de l'homme et des animaux, pour cela elles sont nommées entérobactéries [35].

4. Caractères culturels

La culture des entérobactéries est rapide. Pour la plupart des espèces les colonies formées après 18-24 heures d'incubation à 35-37 °C, sont lisses et régulières et atteignent 2 millimètres de large sauf celles des *Yersinia* qui sont plus petites. Les *Proteus* ont tendance à envahir la gélose et à y former un tapis uniforme [88].

Selon l'espèce, on identifie le caractère macroscopique de la colonie : type R (rugueux), type M (muqueux), type S (Smooth=lisse) [7].

5. Caractères antigéniques

L'étude des différents caractères antigéniques permet de classer en sérotypes les souches appartenant à une même espèce ou au même genre [7].

- Il existe plusieurs types d'antigènes

- ✓ **Antigène de Kunitz**

C'est un antigène commun dénommé ECA (pour enterobacterial common antigen). Cet antigène n'existe que chez les entérobactéries et de ce fait, a un intérêt taxonomique. Sa présence chez les *Yersinia* a permis d'inclure ce genre dans la famille des entérobactéries. [53][88].

- ✓ **Antigène O ou somatique**

Cet antigène est localisé au niveau de la paroi bactérienne, de nature lipopolysaccharidique, possède une endotoxine bactérienne qui est thermostable et résiste à l'alcool ou à l'acide. Un immunosérum contenant les anticorps contre l'antigène O provoque une agglutination lente granulaire, difficile à dissocier par agitation. La spécificité O est perdue par les souches R qui sont auto-agglutinables en eau physiologique [7] [88] [35].

- ✓ **Antigène H ou flagellaires**

Ils n'existent que chez les souches mobiles. Constitués de protéines spécifiques dénommées flagelline; ils sont thermolabiles et inactivés par l'alcool. Ils provoquent une agglutination floconneuse (accolement des bactéries par leurs flagelles), rapidement constitués mais facilement dissociables par agitation [88] [35].

✓ Antigène K

Certaines souches possèdent en plus un antigène K qui masque l'antigène O, et qui correspond à une enveloppe polysidique constituant une véritable capsule et donnant un aspect muqueux [7].

6. Pouvoir pathogène

Les entérobactéries sont à l'origine de maladies de gravité très variable, en raison de mécanismes pathogéniques distincts [58].

Elles comprennent un nombre très élevé de genres et d'espèces. Leur abondance dans l'intestin, la rapidité de leur multiplication, l'acquisition fréquente de mécanismes de résistance aux antibiotiques expliquent qu'elles soient les bactéries les plus souvent impliquées en pathologie infectieuse humaine surtout en milieu hospitalier [43] [53].

Certaines espèces sont responsables de diarrhées et/ou d'infections opportunistes (infections urinaires, infections respiratoires, surinfections des plaies, septicémies, méningites). Chez l'homme, les entérobactéries, notamment *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. *Enterobacter*spp., *Proteus* spp, *Providencia* spp. Et *Serratia marcescens.*, sont responsables d'environ 50 % des infections nosocomiales [33] [06].

Klebsiella pneumoniae est également retrouvé dans des infections urinaires. *Klebsiella oxytoca* peut infecter les voies urinaires et respiratoires [34]. Les *Salmonella* majeures causent les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes et *Salmonella* mineures sont à l'origine d'intoxications alimentaires, de gastro-entérites et de bactériémies [51].

Serratia marcescens colonise les systèmes respiratoires, digestifs et urinaires, cause des bactériémies, des infections des voies respiratoires inférieures, des infections urinaires et cutanées [51]. *Enterobacter cloacae* sont à l'origine d'infections urinaires et de pneumonies, ainsi que d'infections cutanées [64]. Ils peuvent également être responsables de bactériémies. *Escherichia coli* cause principalement des infections du tractus digestif, la plus connue étant la diarrhée du voyageur [53].

II. Bêta-lactamines

1. Structure et propriétés

Les β -lactamines représentent la principale famille d'antibiotiques la plus développée et la plus utilisée dans le monde, cette large utilisation est due à leur spectre d'action, leur faible toxicité, leur efficacité et à leur faible coût pour certaines molécules [84][75]. Les β -lactamines ont en commun une structure appelée noyau β -lactame (**figure 01**), qui est formé de quatre membres : trois atomes de carbone et un atome d'azote. Ce noyau constitue la portion responsable de l'activité de ces molécules [37].

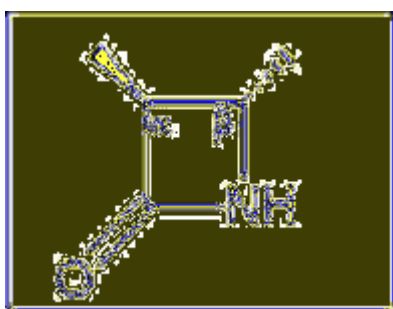


Figure 01: Structure du noyau β -lactame [49].

2. Classification

Les bêta-lactamines ont un noyau azétidine nitré, dont des variations au niveau de la chaîne latérale permettent de modifier les propriétés de la molécule antibiotique. En fonction de la nature du cycle accolé au noyau commun, on distingue plusieurs sous-familles de bêta-lactamines : les pénames ou pénicillines, les céphèmes ou céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames [31], dont les structures sont présentées dans la **figure 02**.

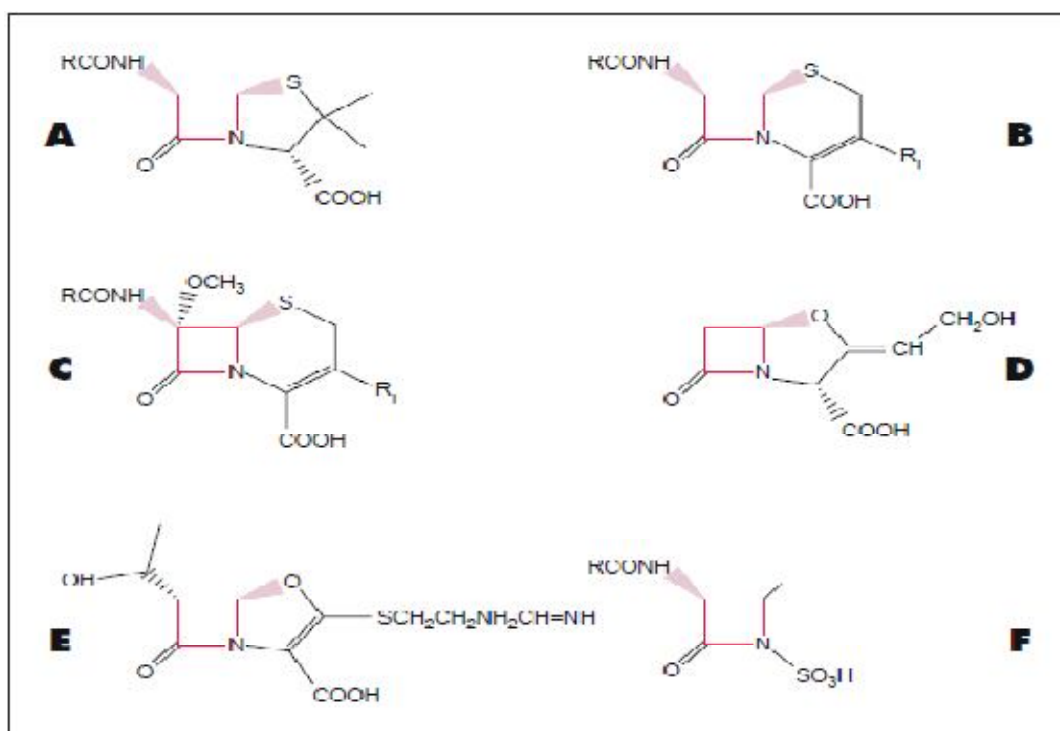


Figure 02 : Structures de quelques β -lactamines [23].

A : pénicillines ; **B** : céphalosporines ; **C** : céphamycines ; **D** : acide clavulanique ;
E : imipénème (carbapénème) ; **F** : monobactames

2.1. Pénicillines

Les pénicillines naturelles sont des molécules synthétisées par certains champignons microscopiques de la famille des *Penicillium* [85]. Trois groupes de pénicillines sont utilisés : pénicilline G et pénicilline V dont le spectre est essentiellement limité aux bactéries GRAM⁺ et à certaines anaérobies, les aminopénicillines, dont le spectre est élargi à certaines bactéries Gram (-) [74].

2.2. Céphalosporines

Elles sont produites par un mycète du genre *Cephalosporium*. Ces β -lactamines sont toutes à large spectre et leur intérêt réside surtout dans leur activité sur les bacilles à Gram négatif [56].

2.3. Monobactames

Les monobactames sont des β -lactamines monocycliques, initialement découvertes en 1977 dans des surnageant de cultures de bactéries non pathogènes (*Acetobacter*,

Gluconobacter [49]. Les monobactames sont inactifs sur les bactéries Gram (+) et les anaérobies. Par contre, ils sont très actifs sur les entérobactéries et sur *Pseudomonas aeruginosa*. Parmi les monobactames, l'aztréonam constitue une alternative de choix pour le traitement des infections graves aux bactéries Gram (-) chez les patients allergiques aux autres types de β -lactamines ou ne pouvant recevoir d'aminoglycosides (par exemple, les insuffisants rénaux) [24].

2.4. Carbapénèmes

Ce sont des antibiotiques bactéricides caractérisés par un large spectre d'activité. Ainsi, ils agissent sur les bactéries à Gram positif (streptocoques et staphylocoques), les entérobactéries les *Pseudomonas* [65]. Ils sont utilisés en première ligne au cours du traitement initial des infections nosocomiales sévères [86].

3. Mode d'action

Les β -lactamines agissent en se fixant sur des enzymes présentes dans la paroi bactérienne, appelées protéines liant les pénicillines (PLP), impliquées dans la synthèse du peptidoglycane. L'inhibition de ces enzymes fait accumuler des précurseurs du peptidoglycane qui activent le système autolytique de la bactérie (la muréine-hydrolase), entraînant ainsi sa lyse. Les bêta-lactamines n'agissent donc que sur les bactéries en croissance [6].

Chez les bactéries à Gram négatif, les β -lactamines doivent d'abord traverser la membrane externe par l'intermédiaire de porine, diffuser dans l'espace périplasmique et atteindre leur cible située sur la partie externe de la membrane cytoplasmique [71].

4. Mécanismes de résistance aux β -lactamines

Les entérobactéries peuvent résister aux β -lactamines selon différents mécanismes.

4.1. Imperméabilité

Les entérobactéries sont naturellement résistantes aux molécules hydrophobes et de masse moléculaire élevée (pénicillines G, V et M). Des résistances acquises dues à une diminution de perméabilité de la paroi ont été rapportées chez *E.coli*, *Klebsiella*, *Proteus* et *Enterobacter* suite à une altération quantitative ou qualitative des porines [71].

4.2. Système d'efflux

L'exportation active est un mécanisme de résistance de certaines bactéries aux antibiotiques grâce à des transporteurs membranaires appelés pompes d'efflux. Chez les bactéries à Gram négatif, les systèmes d'efflux sont souvent des complexes protéiques ternaires avec une pompe transmembranaire, une protéine périplasmique de jonction et une porine de la membrane externe [22] [89].

4.3. Modification des PLP

Les PLP sont des cibles physiologiques des β -lactamines. Chez les entérobactéries, des souches de *Proteus mirabilis* résistantes à l'imipénème ont été observées suite à une perte d'affinité de la PLP2 et une diminution de la quantité de la PLP. Ce mécanisme de résistance est très rare chez les entérobactéries [36].

4.4. Inactivation enzymatique

Les entérobactéries ont une capacité de produire des bêta-lactamases, enzymes qui inactivent les β -lactamines par ouverture du cycle bêta-lactame [78].

III. Bêta-lactamases

1. Définition

Les β -lactamases sont des enzymes bactériennes capables d'inactiver de nombreuses β -lactamines par ouverture du cycle bêta-lactame. Elles hydrolysent la liaison amide du cycle β -lactame pour donner un acyl-enzyme qui sera ensuite dégradé en acide inactif (**figure 03**). L'hydrolyse irréversible du noyau β -lactame entraîne alors l'inactivation de l'antibiotique et la perte totale de son activité antibactérienne. Les β -lactamases sont la cause la plus fréquente de résistance chez les bactéries à Gram négatif. Les gènes de résistance de ces enzymes se situent soit au niveau du chromosome bactérien, soit sur des éléments extra-chromosomiques [58] [01].

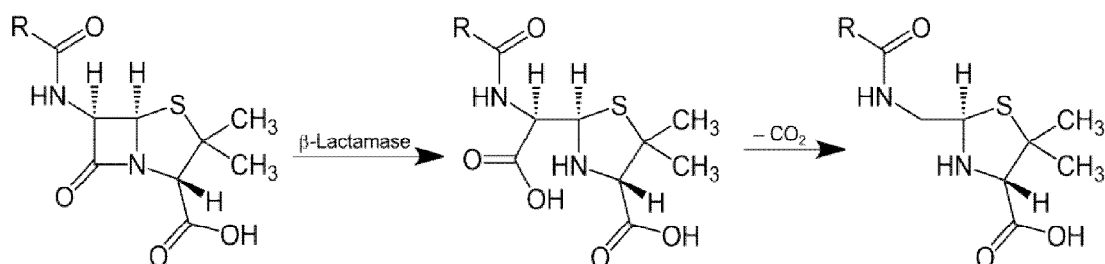


Figure 03 : Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle β -lactame [58].

2. Classification

Les β -lactamases sont classées suivant plusieurs propositions, deux d'entre elles sont actuellement utilisées: la classification structurale proposée par Ambler et la classification fonctionnelle de Bush.

2.1. Classification de Ambler

En 1980, Ambler a proposé une classification basée sur la structure primaire des β -lactamases, suivant cette classification, il existe quatre catégories (A, B, C et D).

Les β -lactamases des classes A, C et D font partie des enzymes à sérine active, qui possèdent dans leur site actif une sérine qui intervient dans le mécanisme d'acylation au cours de l'hydrolyse des β -lactamines. Par contre la classe B inclut les métallo- β -lactamases dont l'activité nécessite la présence d'ions métalliques (un ou deux ions de zinc) [30].

a) Classe A

Cette classe est la plus diversifiée, on y retrouve les pénicillinases des bactéries à Gram positif, les β -lactamases plasmidiques à large spectre qui hydrolysent les céphalosporines avec autant d'efficacité que les pénicillines, les β -lactamases à spectre élargi qui hydrolysent les céphalosporines de troisième génération et les monobactames. La majorité de ces enzymes est sensible aux inhibiteurs (acide clavulanique, sulbactame et tazobactame) utilisés en médecine. Les principaux représentants de ce groupe sont les β -lactamases du type TEM, SHV et récemment le type CTX-M [30].

b) Classe B

Les β -lactamases de la classe B hydrolysent les carbapénèmes, composés qui échappent à l'activité des β -lactamases à sérine active. La plupart des métallo- β -lactamases hydrolysent une variété de pénicillines et de céphalosporines, et sont insensibles aux inhibiteurs classiques (acide clavulanique, sulbactame, tazobactame) [39].

c) Classe C

Dans la classe C, on retrouve les céphalosporinases qui sont des enzymes résistantes à l'action de l'acide clavulanique et le sulbactame: toutefois certaines sont faiblement inhibées par le tazobactame [30]. Au départ à médiation chromosomique, les β -lactamases de la classe C sont aussi, aujourd'hui, à médiation plasmidique [67].

d) Classe D

Elle regroupe les β -lactamases qui hydrolysent les isoxazolylpénicillines comme la cloxacilline et l'oxacilline. Ces dernières sont réfractaires à l'hydrolyse par les autres classes de β -lactamases et possèdent une certaine activité inhibitrice. On les appelle des oxacillinases et sont représentées par les β -lactamases du type OXA. Ces enzymes sont plus ou moins résistantes à l'action de l'acide clavulanique, mais sont bien inhibées par le tazobactame [58].

2.2. Classification de Bush, Jacoby et Medeiros

Cette classification est basée sur les caractéristiques physicochimiques des enzymes comme leur point isoélectrique, poids moléculaire, substrat d'activité et profil d'inhibition [75].

3. Bêta-lactamases à spectre étendu**3.1. Définition**

Les BLSE constituent un groupe d'enzymes à large spectre d'action capables d'hydrolyser les pénicillines, toutes les générations de céphalosporines et les monobactames, elles sont inhibées par l'acide clavulanique. En contrepartie, les BLSE n'ont aucune action sur la céphamycine (β -lactamines différant des céphalosporines par la présence d'un groupement 7α -methoxy) et les carbapénèmes[59][88][02].

3.2. Différents types

Les BLSE ont été décrites pour la première fois en 1983, en Allemagne [98]. Aujourd'hui, les BLSE de classe A ont été réparties dans 11 familles selon leur séquence en acides aminés: TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES, SFO, FEC et OXA. L'apparition et la diversité des BLSE s'expliquent par l'accumulation de mutations des gènes codant les enzymes TEM et SHV. En effet, la moindre modification du site actif de l'enzyme conduit à un changement de l'activité de l'enzyme vis-à-vis de son substrat [84] [42] [08].

- **Type TEM** (TE Mnoneira : nom du patient)

Les BLSE de types TEM dérivent de TEM-1 et TEM-2 par substitution d'un ou de plusieurs acides aminés [19]. De nombreux dérivés de TEM-1/2 (>150) ont été décrits à ce jour. Bien que fréquemment retrouvées chez *E. coli* et *K. pneumoniae*, les BLSE de type TEM ont aussi été rapportées parmi les autres membres de la famille des entérobactéries ainsi que *P. aeruginosa* [36] [37].

- **Type SHV**

Les enzymes de type SHV présentent des changements d'acides aminés dans le site actif, le plus souvent aux positions 238 et/ou 240. Plus de 160 enzymes de type SHV ont été identifiées. Les variantes les plus répandues au niveau mondial sont SHV-5 et SHV-12 [59].

- **Type OXA**

Les BLSE de type OXA (OXA-18 et les dérivés d'OXA-2 et d'OXA-10) sont comparativement rares. Ces BLSE peuvent être chromosomiques ou plasmidiques [66].

- **Type CTX-M**

Leur dénomination de céfotaximase est liée à leur pouvoir hydrolytique plus important envers le céfotaxime comparé à la cefazidime et « M » pour Munich» indiquant leur premier lieu d'isolement 13. Ce sont des BLSE non-TEM non-SHV qui sont les plus répandues actuellement puisque, depuis 1995, elles émergent sur tous les continents en particulier le variant CTX-M-15. Les enzymes de la famille CTX-M comprennent

aujourd'hui plus de 90 enzymes isolées de nombreuses espèces d'entérobactéries et qui, sur la base de leurs séquences protéiques, sont divisés en 5 (cluster CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 et CTX M-25) [37] [82] [15].

IV. Viandes de volaille

1. Définition

Par définition les volailles est tout oiseau élevé ou détenu en captivité à des fins de reproduction de viande, d'œufs de consommation (oie, dinde, poule, pigeon) [90].

La viande de volaille recouvre un ensemble de produits, allant des carcasses aux viandes restructurés, en passant par les produits de découpe et différents produits de transformation actuellement commercialisés sous des formes diverses [10].

La volaille prend une place importante dans l'alimentation, en effet, c'est un produit bon marché, encore un produit de bonne qualité sur le plan diététique, car la volaille est riche en protéines et pauvre en graisses [68].

2. Composition

Les viandes de volaille contiennent 73 à 78 % d'eau, 18 à 24 % de protéines, 0,5 à 7,5 % de lipides et environ 1 % de minéraux. A l'exception du magret de canard gras, ces viandes contiennent peu de lipides. Les dépôts lipidiques sont localisés particulièrement dans la peau et au niveau de la cavité abdominale. Les teneurs en lipides plus importantes observées chez le canard gras sont la conséquence du gavage et de l'âge d'abattage plus élevé de ces animaux. Cependant, chez des animaux non gavés, la teneur en lipides des muscles de poulet réduit avec l'âge de l'animal abattu [13]

3. Contamination

Les contaminations de la viande de poulet par les bactéries sont à l'origine de deux principaux risques:

- Risque pour la santé publique (qualité hygiénique) lors de contaminations par les bactéries pathogènes. Cette contamination dépend d'une part de la contamination au cours des opérations d'abattage et de la découpe, et d'autre part du

développement des flores contaminants pendant la réfrigération, le stockage et la distribution [26] [29].

- Risque sur la présentation du produit final (qualité organoleptique) au cours de contaminations par les germes d'altération [70].

3.1. Origine de la contamination

Selon l'origine de la contamination, les microorganismes peuvent être endogènes qui correspondent à une contamination de la matière première, c'est à dire de l'animal avant abattage ou exogènes [54] c'est-à-dire apportés par le milieu extérieur au cours de la préparation [61].

3.1.1. Origine endogène

a) Flore profonde

La flore profonde est localisée dans le tube digestif. Parmi les germes composant cette flore : les bactéries anaérobies (*Clostridium* et *Bacteroides*), les bactéries aéro-anaérobies (Entérobactéries) ou microaérophiles (Entérocoques et *Campylobacter*). Ils contaminent le muscle au cours de l'éviscération et de découpe de la carcasse. Le passage de bactéries de l'intestin vers le sang est relativement fréquent chez les animaux de boucherie [68] [26].

b) Flore de surface

La peau du poulet est contaminée par une flore microbienne mésophile variée provenant de l'environnement (sol, eau, abreuvoirs, litières, excréments, cage...) ou par différents germes qui vivent sur la peau des volailles parmi lesquels : *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, staphylocoques, streptocoques et *Campylobacter* [89][74].

3.1.2. Contamination exogène

a) Contaminations d'origine humaine

La peau, les appareils respiratoire et digestif de l'homme sont des réservoirs de microorganismes variés. Les régions de la bouche, du nez et de la gorge contiennent des staphylocoques [77]. Les personnes souffrant d'infections de l'appareil respiratoire

(rhumes...) contaminent les aliments et les surfaces. Le tube digestif de l'homme contient de nombreux microorganismes qui sont excrétés avec les fèces. En effet, des individus, apparemment sains, peuvent ainsi rejeter des microorganismes pathogènes à l'origine des contaminations (*Salmonella*). Bien évidemment les personnes souffrant des maladies graves (tuberculose, brucellose, salmonellose...) sont très susceptibles de contaminer la viande et doivent être écartées [5]. Aussi, les viandes peuvent être contaminées par les cheveux et la barbe, qui sont des réservoirs de microorganismes, ainsi que par les mains et les tabliers qui peuvent héberger de nombreux micro-organismes. Tous ces microorganismes peuvent passer facilement vers la surface des carcasses par contact direct ou par projections [62] [29].

b) Infrastructure et équipements

Les surfaces des locaux (sols, murs, plafonds), les équipements, ainsi que le matériel (couteaux, haches, bacs, seaux ...) s'ils sont mal conçus, peuvent être source de contamination [04]. Ainsi, les surfaces de travail mal nettoyées constituent une source certaine de contamination [14].

c) Eau

L'eau constitue une source importante d'apport de *Pseudomonas* et *Aeromonas* [44], les bacs de refroidissement des volailles se chargent en *Pseudomonas* [76] et les bacs d'échaudages en *Salmonella*. L'eau non potable est une source importante de contamination puisqu'elle est un vecteur privilégié de nombreux parasites et germes pathogènes [46].

d) Air

L'air peut contenir des spores de moisissures, des bactéries et de germes divers qui se dissimulent dans le milieu [45]. En effet, les poussières et les particules véhiculées par l'air sont susceptibles de contaminer les surfaces de travail ainsi que les carcasses. Elles peuvent provenir du sol, des tenues du personnel et des murs [5].

Chapitre 02

Matériel et méthodes

I. Matériel**1. Appareillages**

- ✓ Autoclave 120°C.
- ✓ Balance électrique de précision.
- ✓ Etuve à 37°C.
- ✓ Microscope optique.
- ✓ Plaque chauffante.
- ✓ Réfrigérateur (-20°C à 5°C).

2. Verrerie

- ✓ Bêchers (1000 ml, 500 ml).
- ✓ Flacons stériles 250 ml.
- ✓ Lames.
- ✓ Pipettes graduées 10ml.
- ✓ Pipettes Pasteur.
- ✓ Tubes à essai.

3. Outils

- ✓ Mortier.
- ✓ Spatules.
- ✓ Anse de platine.
- ✓ Bec Bunsen.
- ✓ Boîtes de Pétri.
- ✓ Ecouvillons.
- ✓ Pince.
- ✓ Portoirs.
- ✓ Micropipette 1000µl.
- ✓ Micropipette 200µl.

4. Réactifs et autres substances

- ✓ Colorants de Gram (Violet de Gentiane, Lugol, Fuschine).
- ✓ Ethanol 95%.
- ✓ Disques d'antibiotiques.
- ✓ Eau distillée stérile.
- ✓ Eau physiologique stérile.
- ✓ Huile à immersion.
- ✓ Huile de vaseline stérile.
- ✓ Réactif de Kovacs.
- ✓ Réactif TDA.
- ✓ Réactifs VP1 et VP2.
- ✓ Réactifs nitrate réductase I et II.
- ✓ Poudre de zinc.

5. Milieux de culture

- ✓ Tryptone-sel.
- ✓ Gélose Désoxycholate Citrate Lactose Sucrose (DCLS).
- ✓ Gélose Mac Conkey (MC).
- ✓ Gélose Violet Red Bile Glucose agar (VRBG).
- ✓ Gélose nutritive (GN).
- ✓ Gélose *Salmonella* –*Shigella* (SS).
- ✓ Galerie biochimique miniaturisée API 20 E.
- ✓ Gélose Mueller-Hinton (MH).

II. Méthodes

1. Prélèvement

Notre étude s'est déroulée durant une période de 04 mois : de février à mai 2016. Elle porte sur des viandes de volailles prélevées à partir de différentes boucheries de la wilaya de Tébessa.

Un échantillon de 100 g de viande de volaille (poitrine) a été prélevé, aseptiquement dans un sac plastique stérile et ligaturé, puis transporté au laboratoire de microbiologie

dans un délai ne dépassant pas les 2 heures. Ainsi, 6 échantillons ont été prélevés à partir de différentes boucheries selon le tableau 02.

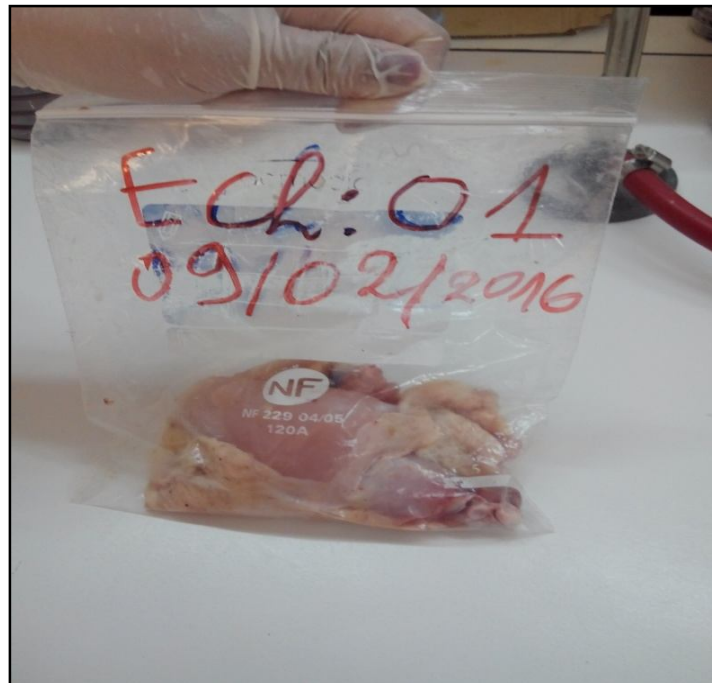


Figure 04 : Echantillon de viande volaille dans un sac ligaturé.

Tableau 02 : Prélèvements réalisés au cours de l'étude.

N° de l'échantillon	Date de prélèvement	Site de prélèvement
01	09-02-2016	Zaouïa
02	14 -02-2016	La commune
03	21-02-2016	Le grand marché
04	28-02-2016	Djbal djeurf
05	07-03-2016	Cité centrale (Ouenza)
06	09-03-2016	El wiam

2. Préparation de la suspension mère

- Peser aseptiquement 25 g de viande et les transférer dans un mortier stérile.
- Broyer la viande, en ajoutant progressivement 225ml de bouillon tryptone-sel, jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène.
- Laisser le broyat reposer pendant 15 à 45 minutes à température ambiante.



Figure 05: Préparation de la suspension mère.

3. Examen microscopique de la suspension mère

Faire la coloration de Gram à partir de la suspension mère. Cet examen permet d'avoir une idée sur les microorganismes présents et leur abondance.

4. Préparation des dilutions

- Répartir stérilement le diluant (tryptone- sel) dans 3 tubes à essai stériles, à raison de 9 ml par tube.
- A partir de la suspension mère (10^{-1}) et à l'aide d'une micropipette, transférer 1 ml dans le tube N°1, puis homogénéiser pour avoir la dilution 10^{-2} .
- A partir de la dilution 10^{-2} , transférer 1 ml dans le tube N°2 pour avoir la dilution 10^{-3} .
- A partir de la dilution 10^{-3} , transférer 1 ml dans le tube N°3 pour avoir la dilution 10^{-4} .

5. Recherche des entérobactéries totales

- Prélever à l'aide d'une micropipette (20-200 µl) 0,1 ml de la suspension mère et de ses dilutions et les déposer à la surface des deux milieux de culture (MC et VRBG), à raison d'une boîte par dilution et par gélose.
- Étaler à l'aide de pipettes Pasteur repliées en râteaux.
- Laisser reposer sur paillasse pendant 20 minutes (couvercle en haut).
- Incuber pendant 24 à 48 h à 37 °C, jusqu'à l'apparition des colonies macroscopiques.

6. Recherche de *Salmonella* et *Shigella*

a. Pré-enrichissement

- Incuber la suspension mère dans un flacon stérile pendant 16 à 24 h à 37°C.

b. Enrichissement

- 1 à 2 ml de bouillon du pré-enrichissement sont inoculés dans 10 ml du bouillon SFB.
- Incuber le bouillon SFB pendant 24 à 48 h à 37 °C.

c. Isolement

- A l'aide d'une pipette Pasteur prélever à partir du bouillon SFB et faire des stries à la surface des milieux DCLS et SS à raison de 3 boîtes pour chaque milieu.
- Incuber pendant 24 à 48 h à 37 °C jusqu'à l'apparition des colonies.

7. Examen macroscopique et microscopique

- Après incubation, repérer les colonies suspectes sur les différents milieux :
 - **VRBG** : les colonies rouges (glucose +) sont suspectes d'être des entérobactéries.
 - **MC** : colonies rouges (lactoses +) et colonies incolores (lactose -).
 - **DCLS**: colonies jaunes ou incolores (lactose -) avec ou sans centre noir, suspectes d'être *Salmonella* ou *Shigella*.
 - **SS**: colonies incolores avec ou sans centre noire, suspectes d'être *Salmonella* ou *Shigella*.
- Faire une coloration de Gram pour toute colonie suspecte.

- Retenir seulement les colonies ayant donné des bacilles à Gram négatif (BGN).

8. Purification

- Repiquer chaque type de colonies sur le même milieu d'isolement, en faisant des stries éloignées par l'anse de platine ou par une pipette Pasteur.
- Incuber pendant 24 à 48 h à 37 °C.
- Après incubation, vérifier si les colonies présentent le même aspect macroscopique et microscopique que celui présenté dans le premier isolement.
- Poursuivre le repiquage, si nécessaire, jusqu'à l'obtention d'un isolat pur présentant les mêmes caractéristiques que celui obtenu en premier isolement.

9. Conservation des isolats

- A partir de chaque isolat pur, repiquer en stries sur la pente d'une gélose nutritive (GN) inclinée en tube.
- Après incubation à 37°C pendant 24 h, conserver les cultures au réfrigérateur à + 4°C.

10. Identification biochimique

L'identification biochimique est réalisée par la galerie API 20E.

a) Principe et description de la galerie API 20E

L'API 20 E est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 20 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données.

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés (**figure 06**). Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs [59].



Figure 06: Galerie API20E.

b) Mode opératoire

➤ Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Incrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Sortir la galerie de son emballage.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

➤ Préparation de l'inoculum

Préparer une suspension bactérienne dense dans 10 ml d'eau physiologique stérile à partir d'une culture pure et jeune de 18 à 24 h faite sur GN.

➤ Ensemencement de la galerie

- Introduire la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, pointe appuyée à l'intérieur et sur le côté pour éviter la formation de bulles d'air.
- Pour les caractères soulignés : ADH, LDC, ODC, H₂S, URE, ensemercer le tubule par la suspension et la cupule par l'huile de vaseline stérile.
- Pour les caractères encadrés VP, CIT, Gel, ensemercer le tubule et la cupule par la suspension.
- Pour les caractères non encadrés, non soulignés ensemercer uniquement le tubule par la suspension.
- Refermer la boîte d'incubation et la placer à 37°C pendant 18 à 24 heures.

c) Lecture de la galerie

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture (**tableau 03**).
- Si 3 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 :
 - **Test TDA** : ajouter 1 goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
 - **Test IND** : ajouter 1 goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
 - **Test VP** : ajouter 1 goutte des réactifs VP 1 et VP 2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative.
 - **Test Glu** : Ajouter une goutte des réactifs NIT 1 et NIT 2 dans le tube GLU. Attendre 2-5 minutes, une coloration rouge indique une réaction positive (NO₂). Une réaction négative (coloration jaune) peut être due à la production d'azote : ajouter 2-3 mg de poudre de zinc dans la cupule GLU. Après 5 minutes, un tube resté jaune indique une réaction positive à noter sur la fiche des résultats. Si la cupule devient orange-rouge, la réaction est négative, les nitrates encore présents dans le tube ont été réduits en nitrites par le Zn.

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.

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.
- Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs.

Tableau 03 : Lecture de la galerie miniaturisée Api 20E [9].

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	Positif
ONPG	Ortho-nitro-phenyl-Galactosidase	Beta- galactosidase	Incolore	Jaune
ADH	L-arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/orangé
LDC	L-lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orangé
ODC	L-ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orangé
CIT	Citrate de sodium	Utilisation du citrate	Vert pâle/jaune	Bleu-vert/vert
H2S	Thiosulfate de sodium	Production d'H2S	Incolore/grisâtre	Dépôt noir/fin liseré
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orangé
TDA	L-tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA / immédiat	
			Jaune	Marron foncé
IND	L-tryptophane	Production d'indole	James/ 2 mn	
			Jaune	Anneau rouge
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	VP 1 + VP 2/ 10mn	
			Incolore	Rosé-rouge
GEL	Gélatine de kohn	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MAN	D-mannitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SOR	D-sorbitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
RHA	L-rhamnose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SAC	D-saccharose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MEL	D-melibiose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
ARA	L-arabinose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
Nitrate réductase Tube	Potassium nitrate	Production de NO ₂	NIT1 + NIT2 / 2-3 mn	
			Jaune	Rouge
GLU		Réduction au stade N ₂	Zinc / 5mn	
			Rouge/orangé	Jaune

ONPG: orthonitrophényl-bêta-D-galactopyranoside. **ADH:** arginine dihydrolase. **VP:** Réaction de Voges-Proskauer. **LDC:** lysine décarboxylase. **ODC:** ornithine décarboxylase. **CIT:** Utilisation du citrate. **H₂S:** recherche d'un thiosulfate réductase. **URE:** uréase. **TDA:** Tryptophane désaminase. **IND:** production d'indole. **GEL:** Gélatinase **GLU:** glucose. **MAN:** mannitol. **INO:** inositol. **SOR:** D-sorbitol. **RHA:** rhamnose. **SAC:** D-saccharose. **MEL:** melibiose. **AMY:** amygdaline. **ARA:** arabinose.

d) Interprétation des résultats

L'identification a été réalisée à l'aide d'un logiciel d'identification (feuille Excel pour l'identification microbienne).

11. Test de l'antibiogramme

Il a été réalisé selon la méthode diffusion en milieu gélosé, méthode des disques (Antibiogramme standard).

a) Définition

L'antibiogramme est l'examen biologique destiné à mesurer l'interaction entre chacune des molécules antibactériennes utilisables et une souche bactérienne susceptible d'être pathogène. Le résultat contribue à évaluer la sensibilité de la souche bactérienne examinée ou sa résistance, ce qui signifie que la molécule sera probablement active au sens thérapeutique ou le traitement sera un échec. Le résultat numérique brut est accompagné d'une interprétation ou remplacé par elle: résistant, sensible, intermédiaire ou (indéterminée) [50].

b) Principe

La méthode des disques consiste à déposer à la surface de la gélose Mueller-Hinton préalablementensemencée avec une suspension bactérienne, des disques pré imprégnés d'une dose connue des différents antibiotiques. Chaque antibiotique diffuse au sein de la gélose à partir du disque et y détermine des concentrations inversement proportionnelles à la distance du disque. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, chaque disque est entouré d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne. La multiplication des bactéries s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotique égale à la concentration minimale inhibitrice (CMI). Les caractères de sensibilité ou de résistance de la souche en seront déduits [28].

c) Choix des antibiotiques

Le choix des antibiotiques utilisés dans cette étude a été fait selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie [21] La liste des antibiotiques testés est présentée dans le **tableau 04**.

Tableau 04 : Liste des antibiotiques testés.

	Famille	Antibiotique	Sigle	Charge Du disque	Diamètres critiques	
					R (d)	I S (D)
β-Lactamines	Aminopénicilline	Amoxicilline	AMX	25 µg	< 14	≥14
	Carboxypénicilline	Ticarcilline	TIC	75 µg	<23	≥23
	Carbapénème	Imipénème	IPM	10 µg	<16	≥22
	Clavams	Amoxicilline+Acid eclavulanique	AMC	20+10 µg	<17	≥17
	Monobactame	Aztréonam	ATM/A O	30 µg	<21	≥24
	C2G	Céfoxitine	FOX	30 µg	<19	≥19
	C3G	Céfotaxime	CTX/CE	30 µg	<17	≥20
Ceftazidime		CAZ	30 µg	<19	≥22	
Aminosides	Amikacine	AK	30 µg	<13	≥16	
	Gentamicine	GN	15µg/10UI	<14	≥17	
Quinolones	Quinolones 1 ^{ère} G	Acide nalidixique	NA	30 µg	<14	≥19
	Quinolones 2 ^{ème} G	Ofloxacin	OFX	5 µg	<19	≥22
		Péfloxacin	PEF	5 µg	<16	≥22
Fosfomycines	Fosfomycine	FOS	50 µg	<14	≥14	
Furanes	Nitrofuranes	F	300 µg	<15	≥15	
Phénicolés	Chloramphénicol	C	30 µg	<17	≥17	
Triméthopri- sulfamides	Triméthopri- sulfaméthoxazole	SXT	25 µg	<13	≥16	
Tétracyclines	Tétracycline	TE	30 UI	<17	≥19	

C2G : céphalosporines de deuxième génération. **C3G** : céphalosporines de troisième génération.

d) Technique**➤ Préparation de l'inoculum**

- Préparer une suspension bactérienne : à partir d'une culture jeune de 18 heures sur GN, prélever au moins 03 colonies et émulsionner dans 05 ml d'eau physiologique stérile.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne [20].

➤ Ensemencement

L'ensemencement se fait par la méthode d'écouvillonnage :

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne et laisser s'imbiber.
- Le sortir du tube en l'essorant doucement sur la paroi.
- Ensemencer la boîte de Mueller-Hinton dont l'épaisseur de la gélose est de 4mm, en frottant l'écouvillon sur sa surface et en tournant la boîte 3 fois de 60°C afin d'assurer une bonne distribution de l'inoculum.
- Laisser sécher les boîtes pendant 15 à 20 minutes [20].

➤ Application des disques et incubation

Appliquer les disques à l'aide d'une pince préalablement flambée, en appuyant légèrement. Les disques doivent être parfaitement appliqués à plat sans glissement. Une distance minimale de 15 mm doit séparer un disque périphérique du bord de la boîte, et chaque disque doit être éloigné au minimum de 30 mm des autres. Les disques d'antibiotiques sont répartis sur trois boîtes de Pétri selon la figure 07. Incuber les boîtes à 37°C pendant 24 heures, couvercle en bas [20].

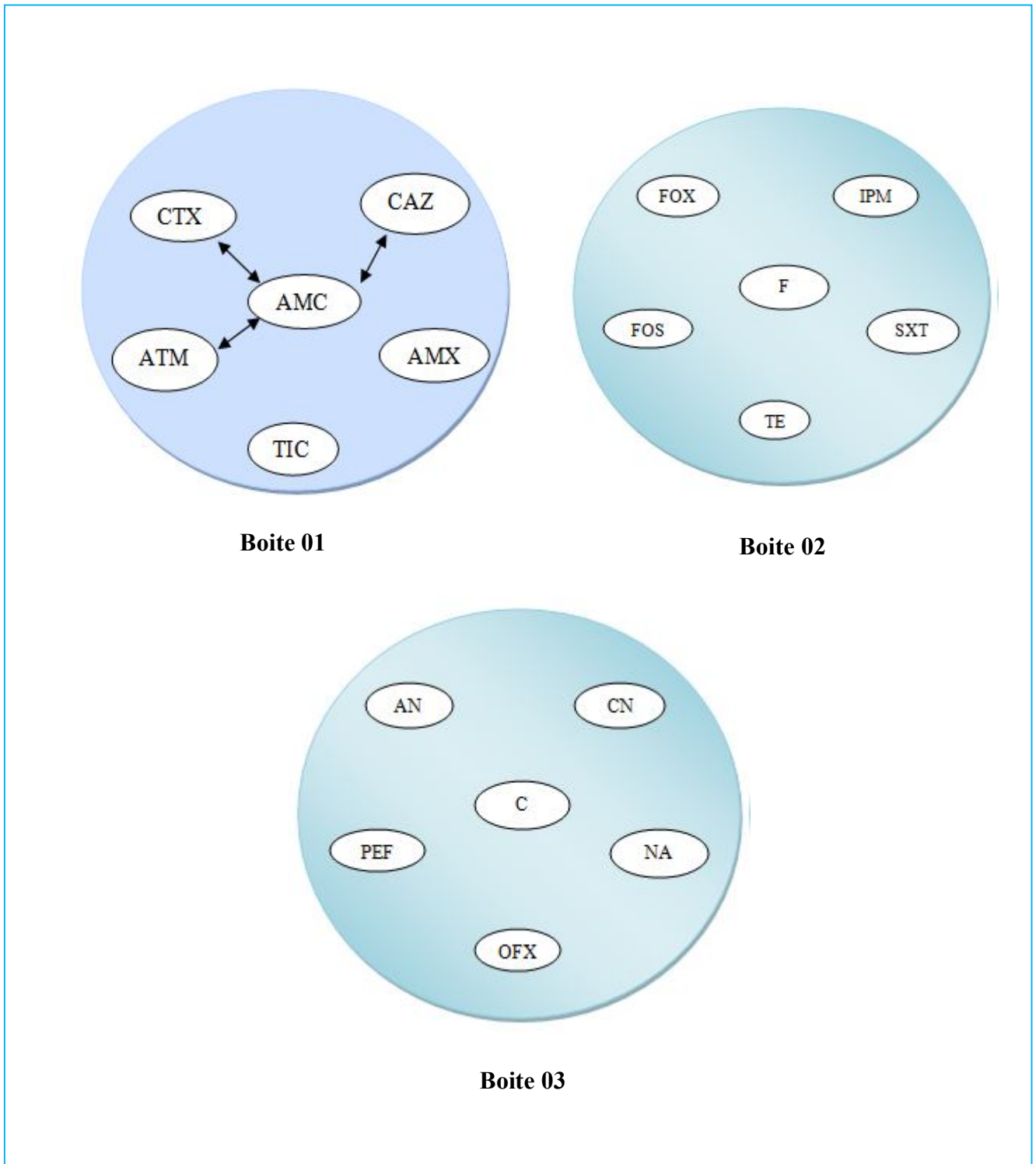


Figure 07 : Schéma explicatif de la disposition des disques d'antibiotiques.

e) Lecture et interprétation

Pour chaque antibiotique: mesurer le diamètre de la zone d'inhibition au revers de la gélose. L'interprétation des souches (sensibles, intermédiaires ou résistantes) se fait selon les diamètres critiques recommandés par CA-SFM (2014) [21] présentés dans le tableau 04. Chaque disque a une concentration minimale inhibitrice, caractérisée par un diamètre d'inhibition, la comparaison des diamètres mesurés autour des disques déposés et ceux recommandés permettra de détecter le phénotype sensible, intermédiaire et résistant :

- 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)[20].

12. Recherche d'une BLSE

La détection de BLSE est réalisée selon deux tests : le test de synergie et le test de double disque.

12.1. Le test de synergie

a) Principe

Il consiste à rechercher une image de synergie entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de β -lactamase et les disques de céphalosporines de troisième génération (cefotaxime, ceftazidime et céfépime) et l'aztréonam, cette image est dite en "bouchon de champagne" [65].

b) Technique

Un inoculum est préparé à partir d'une culture jeune de 18 à 24 h. La gélose Muller-Hinton estensemencée par la méthode d'écouvillonnage. Un disque d'amoxicilline/acide clavulanique est placé au centre de la boîte de Pétri distant de 3 cm de disques de céfotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ) et aztréonam (ATM) (**figure 07 : boîte 01**). Les boîtes sont incubées pendant 18 h à 37°C [69].

c) Lecture

La production des BLSE peut se traduire par l'apparition d'une image de synergie en « Bouchon de champagne » entre le disque AMC et CTX/ CAZ/ ATM (**figure 08**).

En l'absence d'une image de synergie, la production de BLSE sera suspectée devant toute diminution du diamètre autour des disques C3G ou de monobactam. On recherchera donc une BLSE devant un diamètre inférieur aux valeurs suivantes : CTX = 27 mm, CAZ = 22 mm et ATM = 27 mm. Dans ce cas, il faut pratiquer un test de confirmation de production de BLSE [69].

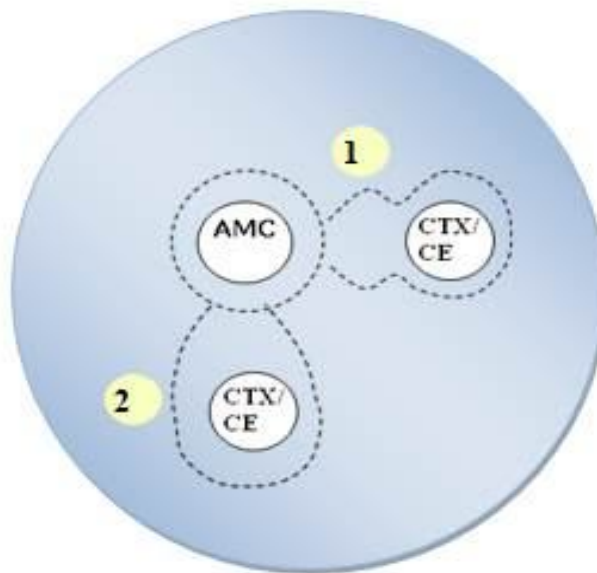


Figure 08 : Description de l'image de synergie.

1 : synergie en entonnoir

2 : synergie en bouchon de champagne.

12.2. Test de double disque

a) Principe

Ce test consiste à rechercher une augmentation de la zone d'inhibition d'un disque de C3G, précédé par l'application d'un disque contenant l'AMC, comparé à un autre disque portant la même céphalosporine et placé côte à côte sur la gélose de Mueller-Hinton [33].

b) Technique

- Préparer une suspension à partir d'une culture de 18 ou 24 h.
- Ensemencer la gélose Mueller-Hinton selon la technique de l'antibiogramme.
- Déposer un disque d'AMC et un disque de C3G (CTX) à une distance de 25mm (centre à centre).
- Laisser diffuser les antibiotiques à la température ambiante du laboratoire pendant une heure de temps.
- Après une heure d'incubation sur la paillasse, ôter le disque d'AMC et le remplacer par un disque de C3G (**figure 09**).
- Incuber pendant 18 heures à 37°C [69].

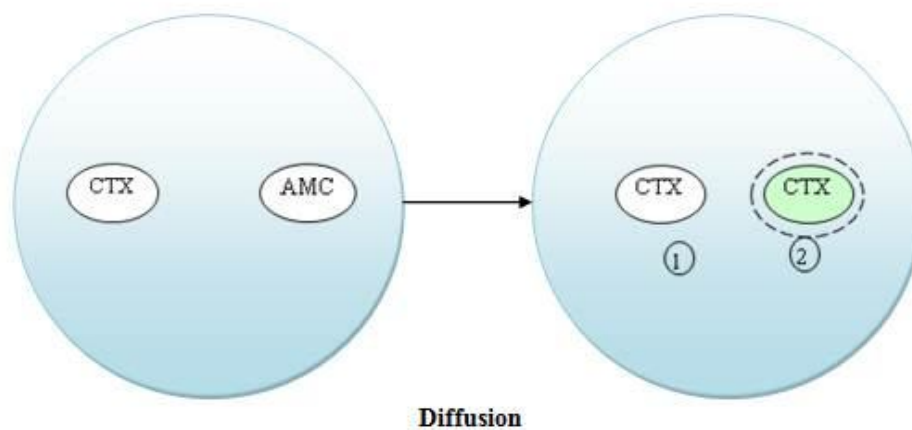


Figure 09 : Schéma explicatif du test du double disque.

c) Lecture

Le test du double disque est positif quand le diamètre d'inhibition du disque de C3G appliqué après diffusion du disque AMC est supérieur ou égal à 5mm par rapport au diamètre d'inhibition du disque de C3G, ce qui indique une production d'une BLSE [22].

Chapitre 03

Résultats et discussion

1. Examen macroscopique

Les principaux aspects macroscopiques des isolats obtenus sur les différents milieux de culture utilisés sont présentés dans les figures 10- 13.



Figure 10 : Principaux aspects macroscopiques sur VRBG.

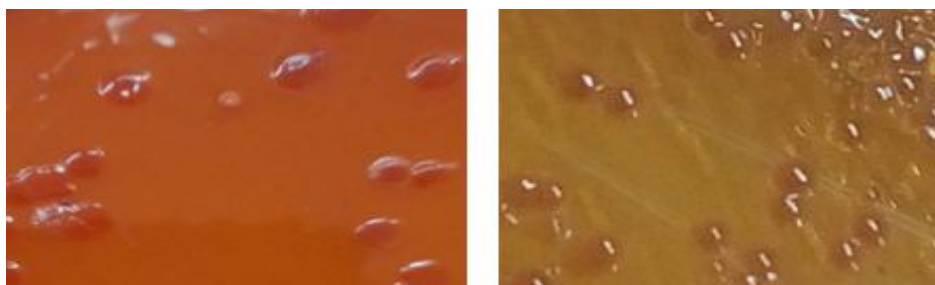


Figure 11 : Principaux aspects macroscopiques sur MC.

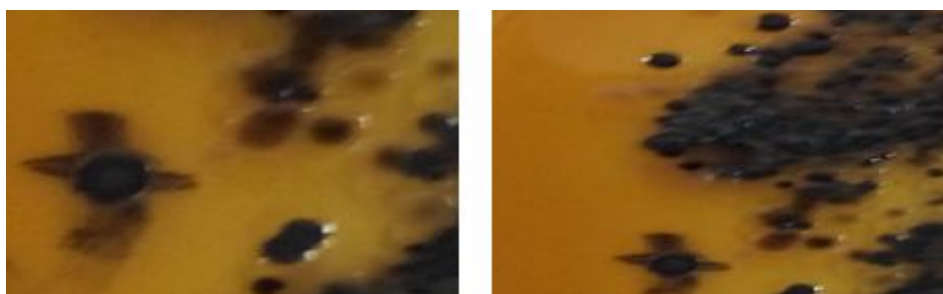


Figure 12 : Principaux aspects macroscopiques sur SS.

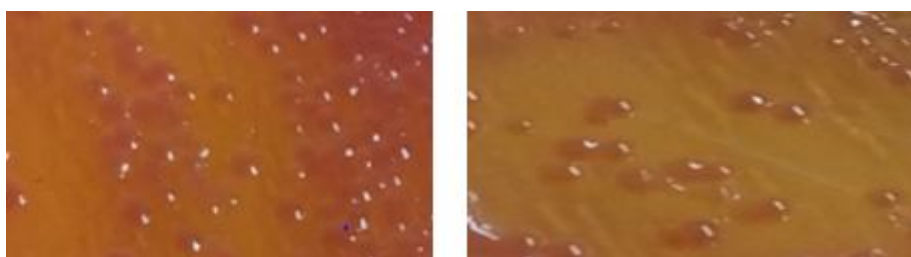


Figure 13 : Principaux aspects macroscopiques sur DCLS.

2. Examen microscopique

Cette étape permet de détecter la présence des bacilles à Gram négatifs droits, courts, moyens ou longs, épais ou fins, isolés ou regroupés en paires, ou en chainettes de longueur variable, ou bien des coccobacilles Gram négatifs isolés ou regroupés en paires.

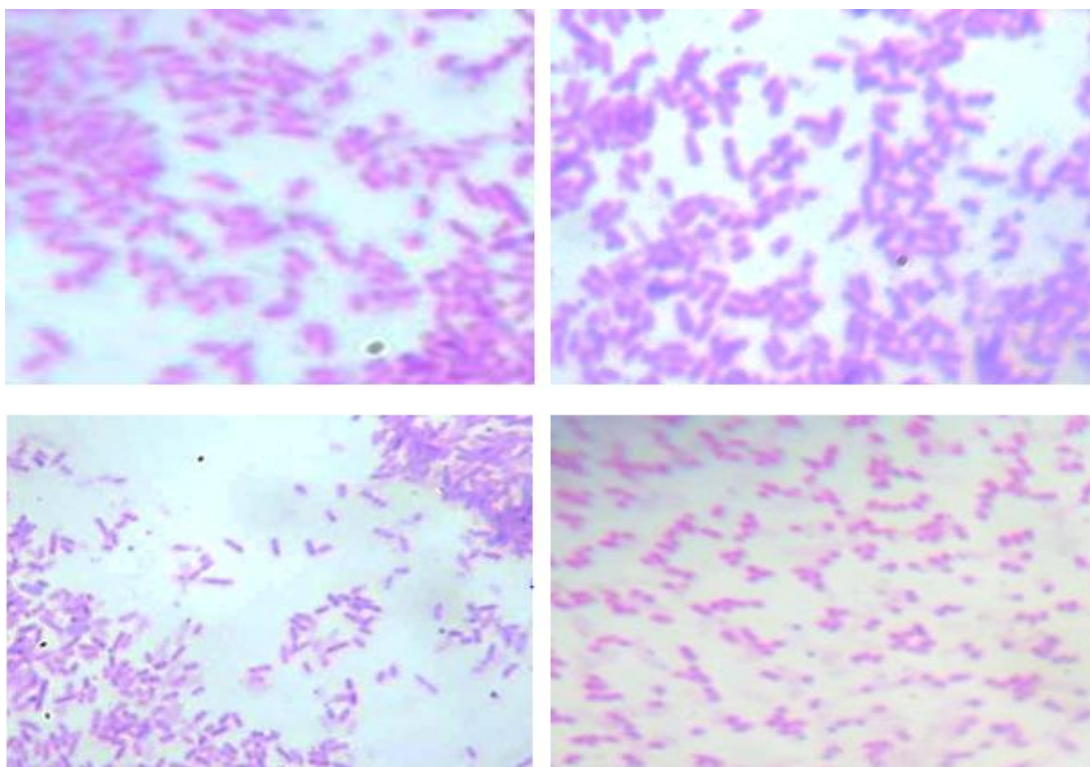


Figure 14 : Quelques aspects microscopiques (X 100).

La purification basée sur les examens macroscopiques et microscopiques nous a permis d'obtenir 75 isolats de BGN.

3. Identification biochimique

Vu le manque des galeries miniaturisées API20^E, on a seulement identifié 36 isolats parmi 75 BGN.

Les résultats des différents tests d'identification réalisés sont présentés dans le tableau 05 D'après ce tableau, on remarque une diversité des genres (8 genres) et des espèces (16 espèces).

Tableau 05: Résultats des tests de l'identification biochimique réalisée par API 20E.

Test	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	L'espèce	Code
Isolat																						
01	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	<i>Serratia liquefaciens</i>	S.101
02	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	<i>Serratia liquefaciens</i>	S.102
03	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	<i>Serratia liquefaciens</i>	S.103
04	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	<i>Protens mirabilis</i>	Pr.m01
05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	<i>Pantoea spp4</i>	Psppp401
06	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>Salmonella spp</i>	Salspp01
07	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter sakazakii</i>	En.s01
08	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella arizonae</i>	Sal.a01
09	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	<i>Pantoea spp4</i>	Psppp402
10	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>K. ornithinolytica</i>	K.001
11	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>Serratia odorifera 1</i>	S.o11

Tableau 05 (suite)

Test \ Isolat	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	L'espèce	Code
12	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	<i>Pantoea</i> spp1	Psp ₁ 01
13	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>E. coli</i> 1	E.c01
14	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>Providencia alcalifaciens</i>	Pv.a01
15	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>Serratia odorifera</i> 2	S.o201
16	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	<i>Pantoea</i> spp4	Psp ₄ 03
17	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>K. ornithinolytica</i>	K.o02
18	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	<i>E. coli</i> 1	E.c02
19	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>K. ornithinolytica</i>	K.o03
20	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>Salmonella</i> spp	Salspp02
21	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>E. coli</i> 1	E.c03
22	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>Proteus vulgaris</i>	Pr.v01
23	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Proteus mirabilis</i>	Pr.m02

Tableau 05 (suite)

Test \ Isolat	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	L'espèce	Code
24	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Serratia odorifera</i> 1	S.o102
25	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>K. ornithinolytica</i>	K.o04
26	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>E. cloacae</i>	En.c01
27	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Serratia odorifera</i> 1	S.o103
28	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	<i>Enterobacter cloacae</i>	En.c02
29	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Proteus mirabilis</i>	Pr.m03
30	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Proteus mirabilis</i>	Pr.m04
31	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	<i>Serratia marcescens</i>	Sm01
32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>Salmonella arizonae</i>	Sal.a02
33	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>E. coli</i> 1	E.c04
34	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	<i>Enterobacter gergoviae</i>	En.g01
35	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>E. coli</i> 1	E.c05
36	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella arizonae</i>	Sal.a03

Quelques exemples d'API 20^E de différentes souches, sont présentés dans les figures 15 à 30.



Figure 15 : Photographie de l'Api 20E de la souche 03 (*Serratia liquefaciens*).



Figure 16 : Photographie de l'Api 20E de la souche 05 (*Pantoea spp 4*).



Figure 17 : Photographie de l'Api 20E de la souche 06 (*Salmonella spp*).



Figure 18 : Photographie de l'Api 20E de la souche 10 (*K. ornithinolytica*).



Figure 19 : Photographie de l'Api 20E de la souche 23 (*Proteus mirabilis*).



Figure 20 : Photographie de l'Api 20E de la souche 32 (*Salmonella arizonae*).



Figure 21 : Photographie de l'Api 20E de la souche 24 (*Serratia odorifera 1*).



Figure 22 : Photographie de l'Api 20E de la souche 12 (*Pantoea spp1*).



Figure 23 : Photographie de l'Api 20E de la souche 35 (*E.coli 1*).



Figure 24 : Photographie de l'Api 20E de la souche 14 (*Providencia alcalifaciens*).



Figure 25 : Photographie de l'Api 20E de la souche 15 (*Serratia odorifera 2*).



Figure 26 : Photographie de l'Api 20E de la souche 07(*Enterobacter sakazakii*).



Figure 27 : Photographie de l'Api 20E de la souche 22 (*Proteus vulgaris*).



Figure 28 : Photographie de l'Api 20E de la souche 31 (*Serratia marcescens*).



Figure 29 : Photographie de l'Api 20E de la souche 26 (*Enterobacter cloacae*).



Figure 30 : Photographie de l'Api 20E de la souche 34 (*Enterobacter gergoviae*).

4. Répartition des souches isolées selon les genres

Le tableau 06 présente l'effectif et le pourcentage des souches en fonction des genres. La figure 31 illustre la répartition des souches en fonction des genres.

Tableau 06 : Effectif et pourcentage des souches selon les genres.

Genre	Effectif	Pourcentage
<i>Serratia</i>	8	22.22 %
<i>Proteus</i>	5	13.89 %
<i>Salmonella</i>	5	13.89 %
<i>Escherichia</i>	5	13.89 %
<i>Klebsiella</i>	4	11.11 %
<i>Pantoea</i>	4	11.11 %
<i>Enterobacter</i>	4	11.11 %
<i>Providencia</i>	1	2.78 %
TOTAL	36	100%

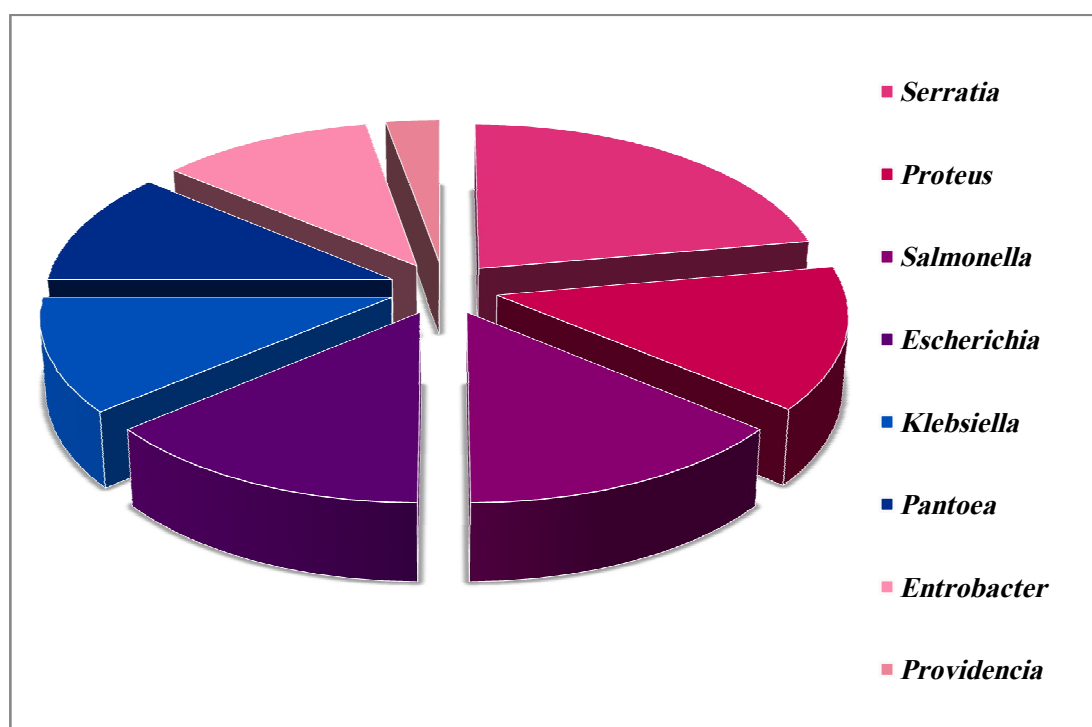


Figure 31 : Répartition des souches en fonction des genres.

Les résultats ont montré que les souches appartiennent à 8 genres différents dont *Serratia* domine avec un pourcentage de 22.22 %. Ces bactéries, se trouvent dans le sol, dans l'eau, sur les plantes et chez les animaux [80], ce qui justifie leur abondance dans les viandes de volaille.

Salmonella, *Escherichia* et *Proteus* occupent la deuxième position avec des fréquences égales 13.89 %.

Les trois genres *Klebsiella*, *Pantoea* et *Enterobacter* occupent la troisième position avec une fréquence de 11.11 % pour chacun.

5. Répartition des souches isolées selon les espèces

Le tableau 7 présente l'effectif et le pourcentage des souches en fonction des espèces. La figure 32 illustre la répartition des souches en fonction des espèces.

Tableau 07 : Effectif et pourcentage des souches selon les espèces.

Espèce bactérienne	Effectif	Pourcentage
<i>E.coli 1</i>	5	13.88 %
<i>Proteus mirabilis</i>	4	11.11 %
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	4	11.11 %
<i>Serratia odorifera1</i>	3	8.33 %
<i>Salmonella arizonae</i>	3	8.33 %
<i>Pantoea spp4</i>	3	8.33 %
<i>Serratia liquefaciens</i>	3	8.33 %
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	5.56 %
<i>Salmonella spp</i>	2	5.56 %
<i>Serratia marcescens</i>	1	2.78 %
<i>Enterobacter gergoviae</i>	1	2.78 %
<i>Enterobacter sakazakii</i>	1	2.78 %
<i>Pantoea spp1</i>	1	2.78 %
<i>Serratia odorifera2</i>	1	2.78 %
<i>Proteus vulgaris</i>	1	2.78 %
<i>Providencia alcalifaciens</i>	1	2.78 %
TOTAL	36	100 %

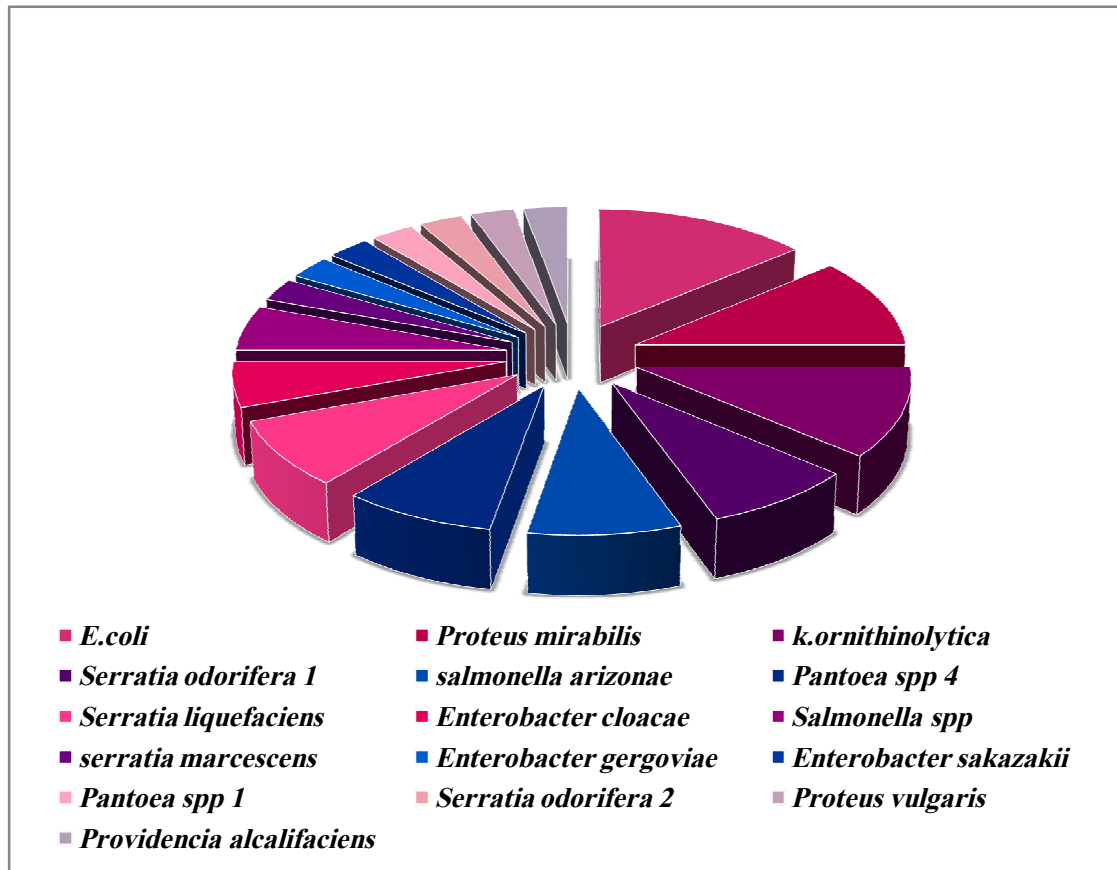


Figure 32 : Répartition des souches en fonction des espèces.

D'après le tableau 7, on remarque que les souches montrent une diversité importante, elles appartiennent à 16 espèces différentes. La figure 32 montre que l'espèce la plus fréquente est *E. coli* (13.88 %), suivie par les espèces *P. mirabilis* et *K. ornithinolytica* présentant 11.11 % pour chacune. Les espèces : *S. odorifera 1*, *Salmonella arizonae*, *Pantoea spp4* et *S. liquefaciens* viennent en troisième position avec des fréquences égales (8,33 %).

Les espèces trouvées dans notre étude peuvent avoir deux origines : origine endogène (l'animal, principalement à partir du tube digestif) ou origine exogène (manipulateur, matériel, environnement). Concernant leur pouvoir pathogène, certaines peuvent être incriminées dans des infections d'origine alimentaire plus ou moins graves selon l'agent responsable.

Pour *E.coli*, elle provoque des infections digestives (diarrhées, infections hépatobiliaires) et septicémies [52]. Ainsi, la présence d'*E.coli* est un témoin de la contamination fécale, provenant de l'intestin de l'homme et des animaux [61].

Cette espèce est également un bon indice de mauvaises conditions hygiéniques pendant ou après la transformation des aliments [44].

Quant au *Proteus mirabilis*, il a été signalé dans certains cas de gastro-entérites et d'intoxications alimentaires [32]

Le genre *Salmonella* est représenté par *Salmonella arizonae* et *Salmonella* spp dont l'habitat peut être l'homme et les animaux ou bien l'environnement. Toutes les espèces du genre *Salmonella* peuvent infecter les humains et causer des gastro-entérites, la bactériémie et la fièvre entérique [4].

Dans notre travail, on a isolé 5 souches de *Salmonella* à partir des viandes de volaille alors que Matouty a rapporté l'absence de cette bactérie dans les viandes de volaille commercialisées à Dakar [61]. Donc, du point de vue hygiénique, les viandes étudiées dans notre travail sont de mauvaise qualité, puisqu'elles contiennent des bactéries pathogènes. De ce fait, elles sont impropres à la consommation humaine.

Concernant le genre *Enterobacter* il est présenté par trois espèces : *En. gergoviae*, *En. Sakazaki* et *En. cloacae*. Cette dernière a été associée à des épidémies nosocomiales et est considérée comme pathogène opportuniste [48]. Ils peuvent causer de nombreux types d'infections, y compris abcès cérébraux, pneumonie, méningite, septicémie et infection de plaies, infection des voies urinaires et des infections de la cavité abdominale ou des intestins [35].

Enfin La forte contamination des carcasses par les microorganismes indicateurs d'hygiène révèle que les pratiques hygiéniques sont défectueuses notamment dans les abattoirs. La plumaison, l'éviscération, le lavage, sont des étapes de la préparation qui participent à l'ensemble du processus de contamination [38].

6. Sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques

Le tableau 08 présente le comportement des 36 souches isolées vis-à-vis des antibiotiques testés

Tableau 08 : Résultats du test de la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées.

Espèces	Familles		β-lactamines										Aminosides			Quinolones			Phénicoles	Fosfomycines	Triméthopri me-	nitrofuranes	Tétracycline
	ATB	Code	AMX	AMC	TIC	CTX	FOX	CAZ	IMI	ATM	CN	AK	NA	OFX	PEF	C	FOS	SXT	F	TE			
<i>Providencia alcalifaciens</i>	Pv.a01	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	R			
		S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	I	S	R	S	S	R	S	S	S	I		
<i>Serratia liquefaciens</i>	S.I02	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R			
		S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R			
		S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R			
<i>Serratia odorifera</i>	S.I03	S	S	S	S	S	R	S	I	S	S	R	R	R	R	S	S	R	S	R			
		R	R	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S			
		R	R	R	S	R	S	S	R	S	S	S	R	I	I	S			S	R			
<i>Serratia odorifera</i> 2	S.o103	R	R	R	S	R	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R			
		R	R	R	S	R	S	S	R	S	S	S	R	I	R	S	S	R	S	R			
		R	R	R	S	R	S	S	R	S	S	S	R	I	R	S	S	R	S	R			
<i>Serratia marcescens</i>	Sm01	R	R	R	S	R	S	R	R	S	S	R	I	I	R	R	R	R	R				
		R	R	R	S	R	S	S	R	S	S	S	R	I	R	R	R	R	R				
<i>Enterobacter cloacae</i>	En.c02	R	S	R	S	R	S	S	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S				
		S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S	R	R	S	R				
	En.c01	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	R	S	R				

Tableau: 08 (suite)

Espèces	ATB Code	AMX	AMC	TIC	CTX	FOX	CAZ	IMI	ATM	CN	AK	NA	OFX	PEF	C	FOS	SXT	F	TE
		<i>Enterobacter sakazakii</i>	En.s01	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	R
<i>Enterobacter gergoviae</i>	En.g01	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	R
	Sal.a01	R	R	S	S	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	R
	Sal.a02	R	R	R	S	R	S	I	S	S	S	I	I	I	R	S	R	S	R
<i>Salmonella arizonae</i>	Sal.a03	S	R	R	S	R	S	I	S	S	S	I	S	S	S	S	I	S	S
	Sal.spp01	S	R	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R
	Sal.spp02	R	R	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	S	R	S	R
<i>Pantoea spp1</i>	P.spp1_01	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R
	P.spp4_01	S	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
	P.spp4_02	S	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Pantoea spp4</i>	P.spp4_03	S	R	S	S	R	S	R	S	I	S	S	I	S	S	S	S	S	R
	Pr.m01	S	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S		S	S	S
	Pr.m02	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
<i>Proteus mirabilis</i>	Pr.m03	R	R	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	I	S	S	R	S	R
	Pr.m04	R	S	R	S	R	S	R	S	I	S	I	R	R	S	S	R	R	R

Dans notre étude, aucune souche d'*E.coli* n'a présenté une résistance au céfotaxime. Ce résultat diffère de celui rapporté par Alexandre Blanc-Gonnet, où 3% des souches isolées à partir de découpe de poulets de chair, ont été résistantes au céfotaxime [3].

De même, Lili Rao et al, ont rapporté une augmentation de pourcentage de la résistance des *E.coli* aux CTX en chine de 1,4% en 2003 à 48,5% en 2012 [57]. Par ailleurs, une étude tunisienne a également rapporté un taux de résistance au CTX égale à 46,1% (18/ 39 souches isolées de poulets de chair et dinde [13].

Concernant les quinolones, 60% des souches d'*E.coli* dans notre étude sont résistantes à l'acide nalidixique. Ce taux est supérieur à celui rapporté par FOFANA et qui était 54,44 %. [38]. De même, nous avons marqué un taux de résistance de 33,33 % pour les souches de *Salmonella* contre 9,68% dans l'étude de FOFANA [38].

Les 36 souches isolées sont réparties dans les trois catégories : résistante, sensible et intermédiaire selon le tableau 09 et la figure 33 illustre clairement cette répartition.

Tableau 09 : Pourcentage de sensibilité aux antibiotiques des souches isolées.

Antibiotique	Sigle	Nbre de souches (Pourcentage)		
		Résistante R	Intermédiaire I	Sensible S
Amoxicilline	AMX	21 (58.33 %)	0 (0 %)	15 (41.67 %)
Amoxicilline+acide clavulanique	AMC	23 (63.89 %)	0 (0 %)	13 (36.11 %)
Ticarcilline	TIC	20 (55.55 %)	0 (0 %)	16 (44.45 %)
Céfoxitine	FOX	34 (94.45 %)	0 (0 %)	2 (5.55 %)
Céfotaxime	CTX	1 (2.78 %)	0 (0 %)	35 (97.22 %)
Ceftazidine	CAZ	1 (2.78 %)	0 (0 %)	35 (97.22 %)
Imipénème	IMI	27 (75 %)	7 (19.44 %)	2 (5.55 %)
Aztréonam	ATM	1 (2.78 %)	0 (0 %)	35 (97.22 %)
Gentamycine	GN	0 (0 %)	3 (8.33 %)	33 (91.67 %)
Amikacine	AK	0 (0 %)	1 (2.78 %)	35 (97.22 %)
Acidenedalidixique	NA	15 (41.67 %)	6 (16.66 %)	15 (41.67 %)
Ofloxacine	OFX	17(47.22 %)	8 (22.22 %)	11(30.56 %)
Pefloxacine	PEF	8 (22.22 %)	8 (22.22 %)	20 (55.56 %)
Chloranphénicol	C	7 (19.45 %)	0 (0 %)	29 (80.55 %)
Fosfomycine	FOS	8 (23.52 %)	0 (0 %)	26 (76.48 %)
Triméthoprimesulfaméthoxazol	SXT	22 (62.86 %)	2 (5.71 %)	11 (31.43 %)
Nitrofuranes	F	3 (8.33 %)	0 (0 %)	33 (91.67 %)
Tétracycline	TE	29 (80.56 %)	2 (5.55 %)	5 (13.89 %)

NB : Seulement 35 souches parmi les 36 ont été testées avec le **SXT**, et 34 avec le **FOS** à cause d'insuffisance de ces disques.

D'après le tableau 09, on peut constater que les antibiotiques les plus actifs par ordre décroissant sont **CTX**, **CAZ**, **ATM** et **AK** avec une efficacité sur 97.22 % des souches, **GN** et **F** (91.67 %), **C** (80.55 %), **FOS** (76.48 %), **PEF** (55.56 %).

A l'opposé, les résistances les plus marquées sont observées à l'égard des antibiotiques : **FOX** (94.45 %), **TE** (80.56 %), **IMI** (75 %), **AMC** (63.89 %), **SXT** (62.86 %), **AMX** (58.33 %) et **TIC** (55.55 %).



Figure 33 : Histogramme représentatif de la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées.

La figure 33 montre que les souches étudiées dans notre travail, expriment une résistance à tous les antibiotiques, mais à des degrés variables, à l'exception des aminosides (CN et AK). En effet, les entérobactéries ont une capacité évidente d'acquérir et d'échanger des gènes porteurs de facteurs de résistance [60].

7. Détection des BLSE

Dans notre étude nous avons utilisé pour détecter la production de BLSE deux méthodes à savoir: le test de synergie et la méthode du double disque. Les résultats de ces tests sont représentés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Résultats des tests de détection de BLSE réalisés.

Test	Test de synergie		Test du double disque	
	Positif	Négatif	Positif	Négatif
Résultats	2	34	7	29

Le test de synergie était positif pour deux souches parmi 36 souches étudiées (Figure N°34). Alors que le test du double disque a confirmé la production de BLSE chez 7 souches (figures 35) soit 19.44%. Ce qui prouve l'importance de réalisation des tests de confirmation comme celui réalisé dans notre travail.

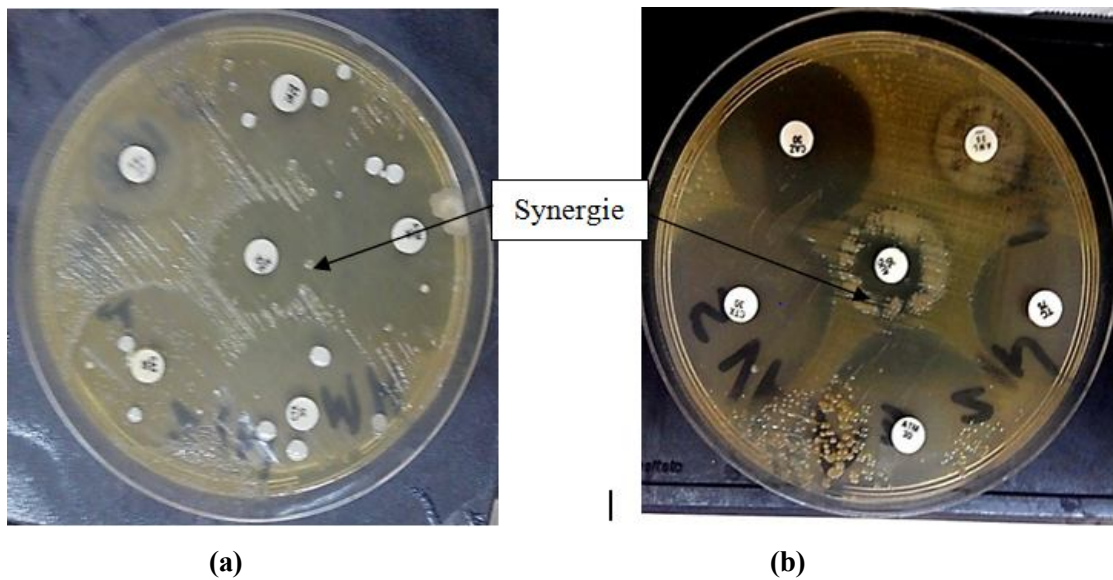


Figure 34: Photographies de tests de synergie positifs.

(a) *Serratia odorifera1*.

(b) *Serratia liquefaciens*.

NB: les cultures présentés dans la figure on été contaminées au cours de leur incubation vu l'encombrement intense dans l'étuve.



1. *Serratia liquefaciens*.

(b) *Enterobacter gergoviae*.

(c) *E.coli 1*.

Figure 35 : Photographies des tests de double disque positifs.

1: disque du CTX, **2:** disque du CTX remplaçant le disque AMC.

8. Fréquence des EBLSE

Dans notre travail, les souches EBLSE présentent un pourcentage de 19.44 % parmi les entérobactéries isolées, avec une prédominance de l'espèce *E.coli 1* (28.57 %). Les effectifs et les pourcentages des souches EBLSE en fonction des espèces sont présentés dans le tableau 11 et illustrés dans la **figure 36**.

Tableau 11 : Effectifs et pourcentages des souches EBLSE selon les espèces

Espèces	Effectifs des souches	Fréquences
<i>E.coli 1</i>	2	28.57 %
<i>Pantoea spp4</i>	1	14.29 %
<i>Proteus vulgaris</i>	1	14.29 %
<i>Proteus mirabilis</i>	1	14.29 %
<i>Enterobacte rgergoviae</i>	1	14.29 %
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	14.29 %
Total	7	100 %

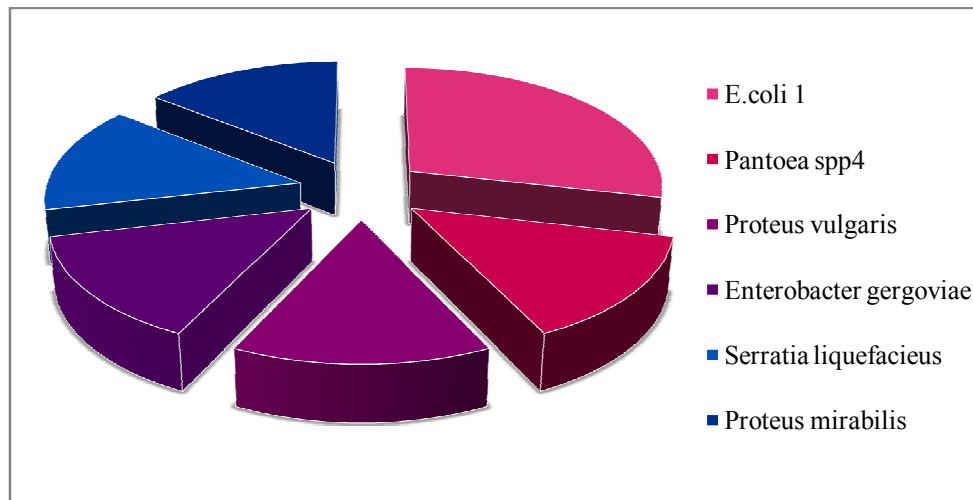


Figure 36 : Répartition des souches EBLSE en fonction des espèces.

Le taux des *E. coli* productrices de BLSE dans notre travail 28.58 % est inférieur à celui rapporté dans une autre étude faite sur les viandes de poulet [73] et qui était 79,8 % [73].

Dans notre étude la fréquence des *E. coli* productrices de BLSE parmi les *E. coli* totales est de 40% (2/5 souches). Ce résultat corrobore celui rapporté par [01] et qui était 41% (16/39 souches).

9. Sensibilité aux antibiotiques des souches EBLSE

Les résultats de sensibilité des souches EBLSE aux antibiotiques sont présentés dans le tableau 12 et figure 37

Tableau 12 : Effectifs et pourcentages de sensibilité aux antibiotiques des souches
EBLSE

Antibiotique	Sigle	Nbr de souches (Pourcentage)		
		Résistante R	Intermédiaire I	Sensible S
Amoxicilline	AMX	02 (28.57 %)	0 (00 %)	05 (71.43 %)
Amoxicilline+acide clavulanique	AMC	04 (57.14 %)	0 (00 %)	03 (42.86 %)
Ticarcilline	TIC	02 (28.57 %)	0 (00 %)	05 (71.43 %)
Cefotaxime	CTX	0 (00 %)	0 (00%)	07 (100 %)
Céfoxitine	FOX	05 (71.43 %)	0 (00%)	02 (28.57 %)
Ceftazidime	CAZ	0 (00 %)	0 (00 %)	07 (100 %)
Imipénème	IMI	07 (100 %)	0 (00 %)	0 (00 %)
Aztréonam	ATM	01 (14.29 %)	0 (00 %)	06 (85.71 %)
Gentamicine	CN	0 (00 %)	02 (28.57 %)	05 (71.43 %)
Amikacine	AK	0 (00 %)	01 (14.29 %)	06 (85.71 %)
Acidnalidixique	NA	02 (28.57 %)	0 (00 %)	05 (71.43 %)
Ofloxacine	OFX	05 (71.42%)	01 (14.29 %)	01 (14.29 %)
Pefloxacine	PEF	02 (28.57 %)	0 (00 %)	05 (71.43 %)
chloramphénicol	C	0 (00 %)	0 (00 %)	07 (100 %)
Fosfomycine	FOS	04 (57.14 %)	0 (00 %)	03 (42.86 %)
Triméthoprinesulfaméthoxazol	SXT	04 (57.14 %)	0 (00 %)	03 (42.86 %)
Nitrofuranes	F	0 (00 %)	0 (00 %)	07 (100 %)
Tétracycline	TE	06 (85.71 %)	01(14.29 %)	00 %



Figure 37 : Histogramme représentatif de la sensibilité aux antibiotiques des souches EBLSE.

Au vu des résultats de l’antibiogramme des 07 souches EBLSE (tableau 12), on peut constater que toutes les souches sont sensibles aux antibiotiques : céfotaxime, ceftazidime, nitrofuranes et chloramphénicol, alors qu’elles montrent toutes une résistance à l’imipénème. Parmi les β -lactamines, l’aztréonam reste également efficace sur la majorité de souches avec un taux de sensibilité de 85.71 %.

Quant aux aminosides, aucune résistance n’a été observé à l’égard de CN et AK, ce qui prouve leur efficacité par rapport aux quinolones, dont des taux de résistance élevés ont été marqués (NA et PEF : 28.57%, OFX : 71.42%). Un taux de résistance élevé (85.71 %) est également marqué à l’égard de la Tétracycline.

En comparant les taux de résistance aux antibiotiques des souches EBLSE à ceux des entérobactéries totales, on a pu observer une augmentation des taux de résistance à l’égard des antibiotiques imipénème, tétracycline, ofloxaciné, aztréonam, pefloxaciné et fosfomycine.

Concernant la résistance associée aux antibiotiques : aminosides, nitrofuranes et chloramphénicol, aucune souche n’a présenté ce type de résistance.

➤ ***E.coli 1***

Deux souches de cette espèce sont productrices de BLSE : E.c01 et E.c04. La souche E.c 01 est résistante à toutes les quinolones testées (NA, OFX, PEF), elle résiste également aux antibiotiques : AMC, FOX, IMI, FOS, SXT, TE. La souche E.c04 montre une résistance à toutes les β -lactamines testées sauf : CTX, ATM et CAZ. Elle est encore résistante aux ATB : OFX, SXT et TE.

➤ ***Pantoeas pp4***

Une seule souche de cette espèce Psp403 est BLSE positive. Cette souche résiste seulement aux antibiotiques : AMC, FOX, IMI et TE.

➤ ***Proteus vulgaris***

La souche Pr. V01 montre une résistance aux antibiotiques AMX, TIC, IMI, SXT et TE, et également à toutes les quinolones utilisées.

➤ ***Enterobacter gergoviae***

La souche En. G 01 est résistante à toutes les β -lactamines utilisées sauf ATM. Elle est aussi résistante à TE.

➤ ***Serratia liquefaciens***

La souche S.l02 montre une résistance à seulement 4 ATB : AMC, IMI, OFX et FOS. Elle est intermédiaire à AK et TE, mais sensible aux autres antibiotiques.

➤ ***Proteus mirabilis***

La souche Pr.m 02 est résistante aux antibiotiques : FOX, IMI, ATM, FOS et TE, mais sensibles aux autres antibiotiques.

- Chez les entérobactéries, des souches de *Proteus mirabilis* résistantes à l'imipénème ont été observées suite à une perte d'affinité de la PLP2 et à une diminution de la quantité de PLP1a [84].

Conclusion

Conclusion et perspectives

L'objectif de notre travail a été d'évaluer la contamination des viandes de volaille commercialisées dans la région de Tébessa, par les entérobactéries productrices de β - lactamases à spectre étendu (EBLSE) qui constituent un problème pour la santé animale et humaine.

Au cours de notre étude, 36 souches d'entérobactéries ont été identifiées, révélant une certaine diversité des genres et des espèces. Les genres les plus fréquents sont : *Serratia* (22.22%), *Proteus*, *Salmonella* et *Escherichia* présentant 13,89% pour chacun. Alors que les espèces prédominantes sont : *E.coli* (13.88%), *Proteus mirabilis* et *K.ornithinolytica* (11.11% chacune); les autres espèces ont présenté des fréquences plus faibles.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques nous a permis de constater des taux de résistance importants (plus de 50%) aux différentes β -lactamines utilisées sauf le céfotaxime, la ceftazidime, et l'aztréonam (2.78%). Ainsi, des résistances à l'égard des autres antibiotiques sont observées, sauf aux aminosides qui restent actifs.

Quant aux tests de détection des BLSE, les résultats nous ont permis de cribler 7 souches EBLSE soit 19.44%, avec une prédominance de l'espèce *E.coli* (28.57%) suivie par *Pantoea spp4*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter gergoviae*, *Serratia liquefaciens* et *Proteus mirabilis* (14.29% pour chacune).

Notre étude suggère donc la contamination des viandes de volaille par les EBLSE, ce qui signifie la mauvaise application des règles d'hygiène. Par conséquent, la transmission de ces bactéries multi résistantes par voie alimentaire peut avoir des conséquences thérapeutiques, dans le cas des bactéries pathogènes (*Salmonella*, *E. coli*). Par ailleurs, la consommation de tels produits contaminés pourrait contribuer à la diffusion des EBLSE et augmenter la prévalence de portage intestinal de ces bactéries.

Dans le cadre de la préservation de la qualité des viandes de volaille, il faut lutter contre la contamination par les bactéries résistantes, par l'hygiène à tous les

maillons de la chaîne alimentaire, dans les élevages d'animaux jusqu'à la consommation des viandes, et surveiller l'évolution de la résistance des bactéries aux antibiotiques de façon coordonnée.

En perspectives, nos résultats obtenus restent préliminaires et méritent d'être exploités et complétés. Donc on propose de :

- ✓ Faire une caractérisation moléculaire des EBLSE pour déterminer les gènes codant cette résistance et les résistances associées
- ✓ Faire une étude comparative à l'échelle phénotypique et moléculaire entre des souches EBLSE d'origine aviaire et d'autre d'origine humaine
- ✓ Faire une étude comparative complète qui suit l'évolution des EBLSE dans les végétaux et les produits carnés pour pouvoir estimer les risques sanitaires liés à la consommation des aliments considérés.
- ✓ Mettre en place des études complémentaires destinées à améliorer les reconnaissances sur les facteurs de risque d'acquisition des EBLSE communautaires.

Référence bibliographique

Références bibliographiques

- [1] Abbassi M S et al. 2010. *Escherichia coli* d'origine aviaire productrice de bêta-lactamases à spectre étendu en Tunisie: sur le chemin mondial de propagation des gènes *bla*_{CTXM}. These du doctorat : Vétérinaire. Tunisie : Université degli Studi di Modena e Reggio Emilia. Tunisie.
- [2] Abbassi M S et al. 2014. Isolement et caractérisation génotypique des *Escherichia coli* d'origine aviaire productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) : sur le chemin mondiale de dissémination de CTX-M. *researchgate*. 50(6) :26-31.
- [3] Alexandre Blanc-Gonnet., 2012. Les plans de surveillance de la résistance aux antibiotiques de *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Enterococcus* et *Campylobacter* mis en œuvre dans les filières animales en France. 53 (7) : 30-36.
- [4] Agence de la santé publique du Canada. Fiche technique santé-sécurité: agents pathogènes. *Salmonella enterica* spp. www.santepublique.gc.ca/inter
- [5] Andjong O., 2006. Etude de la contamination des surfaces dans les Industries de transformation des produits de la Pêche au Sénégal : cas de la pirogue bleue. Mémoire de Magister en médecine vétérinaire .p 29-30.
- [6] Anglaret X, Mortier E., 2002. *Maladies infectieuses*, 3 ème édition, Paris, De Boeck-Estem, 292 p.
- [7] Avril J.L et al. 2000. *Bactériologie Clinique Ellipses*, 3é edition, France : 114 p.
- [8] Bauernfeind, A., I. Stemplinger, R. Jungwirth, S. Ernst, and J. M. Casellas., 1996. Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and 120 relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. *Antimicrob.Agents Chemother.* 4 :509-513.
- [9] Bio merieux.

[10] Bourgeois C M et al. 2008. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments 1ere édition .paris .rue lavoisier.55p.

[11] Ben Abdallah N., 2010. Isolement et caracterisation de bacteries a fort potentiel probiotique à partir du tractus gastrointestinal de volaille. Mémoire de maîtrise : Microbiologie agroalimentaire. Québec : Université Laval Québec, 89p.

[12] Benaissa A., 2011 Etude de la qualité microbiologique des viandes cameline et ovine conservées selon différents modes. [En ligne]. Mémoire Magister : Microbiologie Appliquée. Ouargla : Universite Kasdi Merbah Ouargla.61p.

[13] Ben Slama K., Jouini A., Ben Sallem R., Somalo S., SáenzY., Estepa V., Boudabous A., Torres C., 2010. Prevalence of broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolates in food samples in Tunisia, and characterization of integrons and antimicrobial resistance mechanisms implicated. *International Journal of Food Microbiology*. 137(6) :281-286.

[14] Blood N., 1969. Food hygiene. *Food Processing In. GOUDIABY* (25): 37-40.

[15] Bonnet R., 2004. Growing group of extended-spectrum β -lactamases. The CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother*; 14: 1-14.

[16] Bonnet R., 2006. β -Lactamines et entérobactérie .In Courvalin P., Leclercq R., Bingen E. *Antibiogramme*. Edition ESKA ; 141-177.

[17] Bonnet R., 2011. *Antibiogramme*. 3ème Edition - Chapitre 16 - β -lactamines et entérobactéries. 165-188.

[18] Brenner D. J., Krieg N. R., Staley J. T and Garrity G M., 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition, vol. 2 (The Proteobacteria), part B (The Gammaproteobacteria), Springer-Verlag, New York.

[19] Bush.k.G.A., Jacoby A., Medeciros A., 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure .*Antimicrob Agents chemother*. 39:1211-1233.

[20] CA-SFM., 1998. AntibioGramme en diffusion. Recommandations techniques et Guide d'interprétation. Communiqué du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Sanofi Diagnostics Pasteur, 12p.

[21] CA-SFM, 2014: CA-SFM. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Recommandations 2014. 114 p

[22] Cattoir V., 2004. Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria. *Pathology Biology*. 10 :07-16.

[23] Charlier P., Coyette J., Dehareng D., Dive G., Duez C., Dusart J., Fonzé E., Fraipont C. Frère J.M., Galleni M., Goffin C., Joris B., Lamotte-Brasseur J and Nguyen-Distèche M., 1998. Résistance bactérienne aux β -lactamines. Synthèse. médecine/sciences, 14, 544-555.

[24] Chemelle J-A., 2010. Etude par modélisation moléculaire de l'effet allergène des antibiotiques de la famille des bêta-lactamines, tant sur le plan immédiat que retardé. [en ligne]. Thèse de doctorat. Ecole doctorale interdisciplinaire : sciences-santé. Lyon : Université de Lyon. 208p. Disponible sur : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00860118> submitted on 10 sep 2013.

[25] Claire C., 2012. Caractérisation phénotypique de souches d'entérobactéries produisant une oxacilline-4 isolées lors d'une épidémie survenue au CHU de Nancy en 2009/2011. Thèse du doctorat : pharmacie. Nancy : Université de Lorraine. 110p. Disponible sur : <http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>.

[26] Cuquj L., 2007. Microbiologie Alimentaire : Les relations microorganismes /aliments / consommateurs, Thèse du doctorat : Sciences et Technologies des Industries Alimentaires. Montpellier : Université de Montpellier. 107p.

[27] Decoster A., 2000. entérobactéries, FLM p : 1-16.

[28] Delarras C., 1998. Microbiologie. 90 heures de Travaux pratiques. Gaëtan Morin. France. 276p.

- [29] Dilmi Bouras A., Belhadri A., 2010. Etude de la prévalence d' *Helicobacter pylori* et de *Campylobacter jejuni* dans les viandes de volailles et les risques d'infection.
- [30] Doi Y., Wachino JI., Ishiguro M., Kurokawa H., Yamane K., Shibata N., Shibayama K., Yokoyama K., Kato H., Yagi T., Arakawa Y., 2004. Inhibitor sensitive AmpC β -lactamase variant produced by an *Escherichia coli* clinical isolate resistant to oxyiminocephalosporins and cephamycins. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 2652-2658.
- [31] Donowitz G.R. et Mandell G.L., 1988. Beta-lactam antibiotics, *N Engl J Med* , 318, 419-26, 490-500.
- [32] Durand J et Toumanoff C., 1997. Contribution a l'étude de la flore bactérienne des poissons du Niger supérieur. 8: 192-214.
- [33] Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H, and E. Stackebrandt. 2006. *The Prokaryotes*, 3rd edition vol. 6 (Proteobacteria: Gamma Subclass), Springer-Verlag, New York.
- [34] Eisenstein B, Zaleznif D., 2000. *Enterobacteriaceae*. In : Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, Vol 2. 5th edition, Churchill Livingstone : 2294-2310.
- [35] Fauchère J. L et Avril J. L., 2002. Bactériologie générale et médicale. Ed Ellipses. Paris. 368p.
- [36] Faure S., 2009. Transfert d'un gène de résistance aux β -lactamines *bla*CTX-M-9 entre *Salmonella* et les entérobactéries de la flore intestinale humaine : Impact d'une antibiothérapie. Thèse de doctorat. Université Rennes de France. 190p.
- [37] Fisher, J.F., Meroueh, S.O., and Mobashery, S., 2005. Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chem Rev*, 105, 395-424.
- [38] Fofana A., 2004. Etude de la résistance aux antibiotiques des souches de *salmonella* spp et *Escherichia coli* isolées de la viande de poulet de chair au Sénégal. Mémoire d'études approfondies: Médecine Vétérinaires. Sénégal : Université Cheikh Anta Diop de Dakar. 31p.

[39] Galleni M, Lamotte-Brasseur J, Rossolini GM, Spencer J, Dideberg O, Frère JM., 2001. the metallo- β -lactamase working group. Standard numbering scheme for class B β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 660-663.

[40] Grare M., 2009. De la genèse d'une nouvelle classe d'antibactériens à base de polyphénols cycliques de type calixarène. Etudes moléculaire(s), cellulaire(s), et structurale(s) en vue de l'identification des cibles d'action: le cas du paraganidinoéthylcalix[4]arène. Thèse du doctorat: pharmacie.

[41] Grace Yim., 2011. L'Attaque des superbactéries: Résistance aux antibiotiques. The Science Creative Quarterly. Issue Six. Lapsus Nivium.introduc.

[42] Gniadkowski, M., 2001. Evolution and epidemiology of extended spectrum beta-lactamases and ESBL producing micro-organisms. *Clin. microbial infect.* 7: 557-608.

[43] Gueye O., 2007. Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles à Gram négatif. Thèse doctorat. Université cheikh Anta Diop de Daka. 120p.

[44] Guiraud J et Galzy P., 1980. L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Paris: Ed. Usine Nouvelle.-239p.

[45] Guy S-N., 2000. Les points à risque de la contamination microbiologique de la viande de poulet de chair dans la région de dakar. C Thèse de doctorat : Médecine Vétérinaires. Dakar : Université cheikh anla diop de dakar.115p.

[46] Hamad B., 2009. Contribution à l'étude de la contamination superficielle bactérienne et fongique des carcasses camelines au niveau de l'abattoir d'EL-OUED. Mémoire de Magister : médecine vétérinaire. 29-30 p.

[47] Hammoudi M. Riad A., 2013. Contribution à l'étude de la contamination superficielle bactérienne des carcasses camelines au niveau de l'abattoir de ouargla. [En ligne].Mémoire Master Académique : Microbiologie Appliquée. Ouargla : Université Kasdi Merbah Ouargla.36p.

- [48] Hart C.A., 2006. *Klebsiella, Citrobacter, Enterobacter* and *Serratia* spp. Principles and practice of Clinical Bacteriology. 2nd ed. England, UK: John Wiley and Sons Ltd, 377- 386.
- [49] Hellinger W.C., Nelson S.B., 1999. Carbapenems and monobactams: imipenem, meropenem, and aztreonam. *Mayo Clin Proc*, 74, 420-434.
- [50] Heritage, J., F. H. M'Zali, D. Gascoyne-Binzi, and P. M. Hawkey., 1999. Evolution and spread of SHV extended-spectrum β -lactamases in gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother*, 44 : 309-18.
- [51] Isenberg H Enterobacteriaceae. In : Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR 1992., *Infectious Diseases*. Saunders, : 1463-1478.
- [52] Jaureguy, F., 2009. Host and bacterial determinants of *Escherichia coli* extra intestinal infections. *Med Sci, Paris*. 25(3). 221-223.
- [53] Joly B et Reynaud A., 2002. Entérobactéries : Systématique et méthodes de diagnostic. Ed TEC & DOC ed médicales Inter Nationales. Paris. 356P.
- [54] Kebede G., 1986. Contamination superficielle à l'abattoir de Dakar. Thèse de doctorat vétérinaire. Lyon : École nationale vétérinaire de Lyon. 69p.
- [55] Knothe, H., P. Shah, V. Krcmery, M. Antal, and Mitsuhashi, S., 1983. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *J Infect*, 11, 315-317.
- [56] Lagha N., 2015. Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) isolées de l'hôpital de laghouat. Thèse de Doctorat : Sciences. Tlemcen : Université Abou bekr Belkaïd. 80 p.
- [57] Lili R., Luchao L., Zhenling Z., Sheng C., Dandan H., Xiaojie C., Congming W., Yang W., Tong Y., Peng W., Yahong L., Jian-Hua L., 2014. Increasing prevalence of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in food animals and the diversity of CTX-M genotypes during 2003–2012. *elsevier* 8: 534–541.

[58] Livermor D-M., 1995. β -lactamases mediated resistance: past, present and future, J. infect.Dis.Soc. 6:75-83.

[59] Marilyse V., 2015. Résistance aux -lactamines à large spectre chez les bactéries à gram négatif épidémiologie ET diagnostic. Mémoire de Maîtrise : microbiologie-immunologie Maître ès sciences (M.Sc.). Canada: Université Laval Québec.105p.

[60] Martel J. L., 1996. Epidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes chez l'animal. Epidémiol. Santé Anim., (29) :107-120.

[61] Matouty P., 1992. Contribution à l'étude de la qualité bactériologique des viandes de volailles commercialisées à dakar. Thèse de Doctorat : Médecine vétérinaires. Dakar : Université Cheikh Anta Diop Dakar.105p.

[62] Mayer K, Opal S., 2000. Medeiros a Mechanisms of antibiotic resistance. In : Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, Vol 2. 5th edition, Churchill Livingstone: 236-253.

[63] Medboua. C., 2011. Caractérisation des phénotypes de résistance aux β -lactamines à large spectre des bacilles à Gram négatif isolés au niveau du laboratoire central mère et enfants du CHU Beni-Messous d'Alger. Mémoire de Magister en Microbiologie. Béjaïa : Université Abderrahmane Mira Béjaïa. 89p.

[64] Mirabaud. M. I., 2003. Entérobactéries à bêta-lactamases à spectre élargi en pédiatrie en 1996. [en ligne] Thèse de doctorat en médecine. Genève. Université de Genève, 45p. disponible sur : <http://archive-ouverte.unige.ch>.

[65] Pfaller M. Livermore D. Vora S and Auckenthaler R., 12/2010. Augmentation des bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) Suisse 2009; 220: 4.

[66] Poole K., 2004. Resistance to β -lactam antibiotics. Cellular and Molecular Life Sciences, 61, 2200-2223.

[67] Philippon A, Arlet G, Jacoby GA., 2002. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. Antimicrob. Agents Chemother; 4: 8-11.

- [68] Qualité microbiologique des denrées alimentaires. 2012. Geneve. SCAV.7p.
- [69] Rahal K., 2005. Standardisation de l'antibiogramme en Médecine Humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS. 4ème édition. 95p.
- [70] Ramadane M S., 2015. Etudes qualitatives et quantitatives des résidus d'antibiotiques dans la viande de volaille et les œufs dans la région de mitidja. Uilustration des probiotiques comme alternative. thèse de doctorat : Sciences Biologiques. Tizi ouzou : Université Mouloud Mammeri, 112p.
- [71] Ramoul A., 2013sensibilité aux antibiotiques et profil moléculaire des bactéries responsables d'infections respiratoires basses. Thèse de doctorat en microbiologie. : Universite Badji Mokhtar. Annaba.
- [72] Ray B. Indicators of bacterial pathogens. In : Ray B., 2001. (Ed.), Fundamental food microbiology. CRC Press : Boca Raton. 409-417.
- [73] Raymond J., 2014. Environnement et risque infectieux péril fécal et BMR. Elsevier Masson SAS. 1:100-101.
- [74] Répertoire commente des médicaments ausag veterinaire., 31 mars 2014, www.cbip-vet.be.
- [75] Rodriguez.V-H. Struelens M.-J., 2006. Résistance bactérienne par β -lactamases à spectre étendu : implications pour le réanimateur. Elsevier. [en ligne], 32(4). Disponible sur : <http://france.elsevier.com/direct/REAURG/> Réanimation 15 (2006) 205–213.
- [76] Roughyatou K., 2001. Resistances bactériennes au c.h.u. de fann: etat des lieux – perspectives. Thèse de doctorat : Médecine. Dakar : Universite Cheikh Anla Diop.113p.
- [77] Rozier J ; Carlier, F et Bolnot F., 1985.Bases microbiologiques de l'hygiène des aliments.Paris: SEPAIC. 230 p.
- [78] Ruppé E., 2010. Épidémiologie des β -lactamases à spectre élargi : l'avènement des CTX-M. Antibiotiques. 12: 3-16.

[79] Salah H., 2009. Etude de la Métagallo-résistance et de l'Halo-tolérance des Entérobactéries Isolées des Eaux de Surface de la Région de Sétif. Thèse du doctorat : Microbiologie. Université: ferhat Abbas.102p.

[80] Sciences de santé de Hamilton et Centre de soins de santé St-Joseph, Hamilton., 2007. Serratia dans l'USIN. [En ligne]. disponible sur : WPC\PtEd\CH\SerratiaNICUFRENCH-th.doc dt/25 octobre 2010.

[81] Sillicker J-H., 1980 et Coll Food commodities, vol 2.Londres; New York: Academie Pres de 997 p.

[82] Souana D., 2011. Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries au niveau du C.H.U de Sidi Bel Abbas. Mémoire de Magister : Biochimie appliquée. Tlemcen : Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.105p.

[83] Soussy C-J., 2007. Résistance bactérienne aux antibiotiques. Monographies en urologie. 21-46 p.

[84] Stéphanie F., 2009. Transfert d'un gène de résistance aux β -lactamines bla_{CTX-M-9} entre *Salmonella* et les entérobactéries de la flore intestinale humaine : impact d'une antibiothérapie. [En ligne]. Thèse de doctorat : Biologie et Santé. Rennes : université de rennes1.167p. Disponible sur : <http://tel.archives-ouvertes.fr>.

[85] Weintraub B., 2003. Ernst Boris Chain (1906-1979) and Penicillin. Bull. Israel Chem. Soc. 29, 13.

[86] Wolff M., Joly-Guillou M.L., Pajot O., 2008. Le point sur les carbapénèmes, Comparative review of carbapenems. Réanimation. 17: 242-250.

[87] Wray C. 1975. Survival and spread of pathogenic bacteria of veterinary importance with the environment. The veterinary bull. 45 : 543-550.

[88] Yassine K., 2011. Comportement des Enterobacteries isolees des Urines vis-a-vis de l'amoxicilline – acide Clavulanique l'imipeneme et l'ertapeneme. Thèse du doctorat en pharmacie. Rabat : Université Mohammed V. Ecole royale de service de sante militaire. 80p.

[89] Yang D., Guo Y., and Zhang Z., 2009. Combined Porin Loss and Extended Spectrum β -Lactamase Production is Associated with an Increasing Imipenem Minimal Inhibitory Concentration in Clinical *Klebsiella pneumoniae* Strains. *Curr.microbiol.* 58: 366-70.

Webographie

[90] www.edu.upmc.fr

Annexe

ANNEXE

✚ Compositions des milieux utilisés

➤ Violet Red Bile Glucose (VRBG)

Extrait de levure	3,0
Peptone	7,0
Chlorure de sodium	5,0
Sels biliaires	1,5
Glucose	10,0
Rouge neutre	0,03
Cristal violet	0,002
Agar	12,0
pH	7,4 ± 0,2

➤ Désoxycholate Citrate Lactose Saccharose (DCLS)

Peptone	5,0 g
Extrait de viande	5,0 g
Lactose	10,0 g
Citrate de sodium	8,5 g
Citrate de fer III	1,0 g
Désoxycholate de sodium	5,0 g

➤ Gélose nutritive (GN)

Extrait de viande	1,0 g /l
Extrait de levure	2,5 g /l
Peptone	5,0 g /l
Chlorure de sodium	5,0 g /l
Agar	15,00 g /l

➤ **Gélose Mac Conkey**

Peptone	20,0 g
Lactose	10,0 g
Sel biliaires n°3	1,5 g
Cristal violet	0,001 g
Rouge neutre	0,05 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Agar	15,0 g

➤ **Gélose *Salmonella Shigella* (SS)**

Peptone pancréatique de viande	5,0 g/l
Extrait de viande	5,0 g/l
Lactose	10,0 g/l
Sels biliaires	8,5 g/l
Citrate de sodium	10,0 g/l
Thiosulfate de sodium	8,5 g/l
Citrate ferrique ammoniacal	1,0 g/l
Rouge neutre	25,0 mg/l
Vert brillant	0,33 mg/l
Agar agar bactériologique	15,0 g/l

➤ **Tryptone-sel**

Tryptone	1g
NaCl	8,5g
Eau distillé	1000ml
PH	7

➤ **Gélose Mueller- Hinton (MH)**

Infusion de viande de bœuf	300 ml/l
Peptone de caséine	17,5g /l
Amidon de maïs	1,5 g /l
Agar	17,0 g /l

➤ **Eau Physiologique**

Chlorure	09g
Eau distillé	1000ml
PH	7

➤ **Bouillon SFB**

Tryptone	5,0 g
Lactose	4,0 g
Phosphate disodique	10,0 g
Hydrogénosélénite de sodium	4,0 g
L-cystine	10mg