



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعرييرج  
Université Mohammed El Bachir El Ibrahimi B.B.A

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض والكون  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers  
قسم العلوم البيولوجية  
Département des Sciences Biologiques

## Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine des Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques.

Spécialité : Microbiologie.

### Intitulé :

**Etude phénotypique de la résistance aux antibiotiques de  
dernières recours chez les Bacilles à Gram-Négatifs d'origine  
animale dans la wilaya de Bordj Bou Arreridj.**

### Présenté par:

Beghoura Amina / Benchouia Hanane / Benzemam Taous

Soutenu le 24 / 06/ 2023, Devant le Jury :

	Nom & Prénom	Grade	Affiliation / institution
<b>Président :</b>	M. MERIBAI Abdelmalek.	MCB.	Université de Bordj Bou Arreridj
<b>Encadrant :</b>	M. SEDRATI Tahar.	MCB	Université de Bordj Bou Arreridj
<b>Examineur :</b>	Mme. ZERROUG Amina.	MCA	Université de Bordj Bou Arreridj

Année Universitaire 2022/2023.

## *Remerciement*

*Nous remercions tout d'abord Allah Le Tout Puissant pour nous avoir accordé la santé, l'énergie et la force pour réaliser ce travail.*

*Nous tenons à remercier dans un premier lieu notre chère promoteur Dr. Sedrati Tahar Dr en microbiologie au département de Biologie de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers à l'Université Mohammed el bachir el Ibrahimi BBA pour sa patience, son encouragement sa disponibilité, et son aide tout le long de la réalisation de ce travail nous saisissons cette occasion pour lui exprimer notre profonde gratitude tout en lui témoignant notre respect pour ses qualités pédagogiques et scientifiques.*

*Nos remerciements les plus vifs s'adressent à Dr. Beghora Rafik médecin vétérinaire, pour la confiance qu'il nous accordée en acceptant de réaliser notre stage de fin d'étude au niveau de laboratoire bactériologie de son cabinet.*

*Nous le remercions amplement la confiance qu'elle nous a témoignée tout au long de la Durée de la partie pratique.*

*Nous adressons également nos remerciements aux membres de jury :*

*Dr Merabai Abdelmalek pour l'honneur qu'il nous a fait d'avoir accepté de présider ce jury.*

*MM Zerroug Amina d'avoir accepté d'apporter son examination à ce travail.*

*Un remerciement spécial à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin dans la réalisation de ce mémoire.*

## *Dédicace*

*Je dédie ce travail de fin d'étude*

*A Mon père **Ameur** et ma mère, dont le mérite, les sacrifices qui m'ont permis de vivre ce jours. Que dieu leurs donne une longue et joyeuse vie.*

*A mon mari **Abd elkader** qui n'est pas cessé de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études. Et à mon fils, mon amour **Miloud**. Que dieu le protège et lui offre le bonheur.*

*A mes beaux-parents **Abd el Malek** et **Aicha** pour leurs amour et leurs encouragements pour finir mes études.*

*A mes frères **marwene** et **Abd elbasset**. Et mes beaux-frères **Sofiane**, **Abd el wahab** et **Fares**. Pour leurs encouragements et leurs aides.*

*A mes sœurs **Nedjma**, **Hakima**, **Marwa**, **Nor el houda** pour m'avez toujours soutenu et encouragé durant ces années d'études.*

*A tous les membres de la famille **Benzemam** et **Derouaz**.*

*A mes trinômes **Amina** et **Hanane** qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite plus de succès.*

*A tous mes amies de promotion de 2<sup>me</sup> année Master et toute personne qui occupe une place dans mon cœur.*

**Taous**

## *Dédicace*

*Je dédicace ce mémoire :*

*A ma source d'Amour celle qui m'a donnée le courage  
l'Énergie et l'espoir le long de ce chemin ma chère mère  
pour ses prières et ses sacrifices.*

*A mon chère père mon guide qui m'avez encouragé  
toujours pour atteindre cette étape de ma vie*

*Qu'Allah vous protège.*

*A mes sœurs et mes deux frères pour leur support dans les  
moments difficiles.*

*A mes deux chères amies Amina et Taous je vous  
souhaite beaucoup de succès.*

*Hanane*

## *Dédicace*

*Je dédie ce mémoire*

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

*A mes frères « Manou » et « Mouadh » pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral.*

*A l'ensemble de la famille « Beghoura » et « Habouya ».*

*A mes cousines « Rayene, Hadil, Hanine, Ikram, Chaima, Lina, Chadha, Nouha et Chahd »*

*A tous mes amies qui sont toujours avec moi et m'encourage tout le temps « Khaoula et Asma »*

*Et à mon trinôme « Taous et Hanane » merci pour cette année et je vous souhaite une plein de succès.*

AMINA

# Table des matières

**Remerciements et dédicaces**

**Table des matières**

**Liste des tableaux**

**Liste des figures**

**Liste d'abréviation**

<b>Introduction Générale.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre II: Matériel et méthodes .....</b>	<b>4</b>
<b>1. Objectifs .....</b>	<b>4</b>
<b>2. Cadre d'étude .....</b>	<b>4</b>
2.1. Lieu et période de l'étude .....	4
2.2. Population étudiée.....	4
<b>3. Matériel utilisé.....</b>	<b>5</b>
<b>4. Méthodes .....</b>	<b>5</b>
4.1. Phase de prélèvements .....	5
4.1.1. Prélèvements des cas cliniques .....	5
4.1.2. Prélèvement de la matière fécale .....	6
4.2. Analyses bactériologiques .....	6
4.2.1. Phase d'enrichissement .....	7
4.2.1.1. La matière fécale .....	7
4.2.1.2. Les cas cliniques (volailles) .....	7
4.2.2. Phase d'isolement et de purification des souches.....	7
4.2.2.1. Ensemencement sur les milieux sélectifs.....	7
4.2.2.1.1. Préparation des milieux sélectifs .....	7
4.2.2.1.2. Ensemencement proprement dit .....	8
4.2.2.2. Purification des souches .....	9
4.2.3. Phase d'identification des souches .....	9

4.2.3.1.	Identification morphologique .....	9
4.2.3.1.1.	Examen macroscopique .....	9
4.2.3.1.2.	Examen microscopique .....	10
4.2.3.1.3.	Coloration de Gram .....	10
4.2.3.2.	Identification biochimique .....	10
4.2.3.2.1.	Test oxydase .....	10
4.2.3.2.2.	Test catalase .....	11
4.2.3.2.3.	Identification par galeries biochimiques .....	12
4.2.4.	Antibiogramme .....	18
4.2.5.	Recherche des souches productrices de BLSE par teste de synergie .....	21
<b>Chapitre III : Résultats et discussion .....</b>		<b>23</b>
<b>1. Résultats .....</b>		<b>23</b>
1.1.	Résultats des analyses bactériologiques .....	23
1.1.1.	Résultats globaux .....	23
1.1.2.	Pourcentage globale des Bacilles Gram-Négatifs isolées .....	24
1.1.3.	Répartitions des Bacilles Gram-Négatifs isolées dans chaque espèce animale.....	25
1.1.3.1.	Répartitions des Bacilles Gram-Négatifs isolées dans l'espèce aviaire ....	25
1.1.3.2.	Répartitions des Bacilles Gram-Négatifs isolés dans l'espèce Ovine .....	27
1.1.3.3.	Répartitions des Bacilles Gram-Négatifs isolés dans l'espèce Bovine .....	27
1.2.	Résultats des antibiogrammes.....	28
1.3.	Les profils de multi-résistante .....	30
1.4.	Résultats de recherche de Bêtalactamines à spectre élargie (BLSE) .....	31
<b>2. Discussions .....</b>		<b>32</b>
<b>Conclusion .....</b>		<b>38</b>
<b>Annexes.....</b>		<b>42</b>
<b>Résumé .....</b>		<b>45</b>
<b>Abstract .....</b>		<b>46</b>
<b>ملخص .....</b>		<b>47</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau I:</b> Nature et nombre des échantillons étudiés. ....	5
<b>Tableau II:</b> Les antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme.....	19
<b>Tableau III:</b> Diamètres critiques des différents antibiotiques testés.....	21
<b>Tableau IV:</b> Nombre globale des souches isolées par espèce animale. ....	23
<b>Tableau V:</b> Fréquences des germes résultants de l'espèce aviaire. ....	25
<b>Tableau VI:</b> Fréquences des germes résultants de l'espèce ovine.....	27
<b>Tableau VII:</b> Fréquences des germes résultants de l'espèce bovine. ....	27
<b>Tableau VIII:</b> Résultats des antibiogrammes. ....	29
<b>Tableau IX:</b> Profils des multi-résistances des souches isolées. ....	30

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Une carte géographique montre les lieux des prélèvements. ....	4
<b>Figure 2:</b> Réalisation des prélèvements des cas cliniques aviaire. ....	6
<b>Figure 3:</b> Prélèvements des matières fécales « espèce ovine ». ....	6
<b>Figure 4:</b> Lieu de réalisation des l'analyses bactériologiques. ....	7
<b>Figure 5:</b> Préparation des milieux sélectifs additionnés aux antibiotiques.....	8
<b>Figure 6:</b> Les antibiotiques utilisés « Colistine, Imipenème, Cefotaxime ».....	8
<b>Figure 7:</b> Ensemencement et incubation des échantillons. ....	9
<b>Figure 8:</b> Application des colorants de Gram. ....	10
<b>Figure 9:</b> Test oxydase.....	11
<b>Figure 10:</b> Test catalase. ....	12
<b>Figure 11:</b> Solutions de Mc Farland. ....	13
<b>Figure 12:</b> Techniques d'ensemencement de la galerie API20E.....	14
<b>Figure 13:</b> Logiciel de lecture des api 20 E et api 20 NE.....	15
<b>Figure 14:</b> Page de lecture de la galerie API 20 E.....	15
<b>Figure 15:</b> Galerie API 20 NE. ....	15
<b>Figure 16:</b> Page de lecture de galerie API 20 NE.....	16
<b>Figure 17:</b> Tableau d'interprétation bactérienne du test sur milieu TSI.....	17
<b>Figure 18:</b> Les disques d'antibiotique utilisés. ....	19
<b>Figure 19:</b> Application des disques d'antibiotiques. ....	20
<b>Figure 20:</b> Répartition des isolats. ....	23
<b>Figure 21:</b> Aspect des Bacilles Gram-Négatifs après coloration de Gram.....	24
<b>Figure 22:</b> Pourcentage des Bacilles Gram-Négatifs isolées.....	24
<b>Figure 23:</b> Répartition des BGN chez chaque espèce animale.....	25
<b>Figure 24:</b> Répartition des souches isolées à partir les cas cliniques. ....	26
<b>Figure 25:</b> Répartition des souches isolée à partir la matière fécale des ovins. ....	27
<b>Figure 26:</b> Répartitions des souches isolées à partir la matière fécale des bovins. ....	28
<b>Figure 27:</b> Profil globale de la résistance des souches isolées par espèce animale. ....	29
<b>Figure 28:</b> Fréquences des souches productrices de BLSE. ....	31
<b>Figure 29:</b> Aspect d'une souche BLSE positive « bouchon de Champagne ». ....	32

## Liste d'abréviation

**ADH** : Arginine di hydrolase.

**AMC** : Amoxicilline + acide clavulanique.

**API 20E** : Analytical Profile Index 20 Enterobacteria.

**API 20NE** : Analytical Profile Index 20 non Enterobacteria.

**ATM**: Aztréonam.

**BBA**: Bordj Bou Arreridj.

**BGN**: Bacilles à Gram négatif.

**BLSE** : les béta-lactamase à spectre étendu.

**BMR**: Bactéries multirésistantes.

**BN**: bouillon nutritive.

**C3G** : Céphalosporines de troisième génération.

**CA-SFM** : Le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.

**CHL**: chloramphénicol.

**CIT**: Citrate.

**CLSI**: Clinical and laboratory standard institute.

**COL**: Colistine.

**CRO**: Ceftriaxone.

**CTX**: Cefotaxime.

*E. coli*: *Escherichia coli*.

**EUCAST**: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.

**GEL**: Gélatinase.

**GEN**: Gentamicine.

**Glu(+):** glucose positif.

**GN :** gélose nutritive.

**H<sub>2</sub>S:** Sulfure d'hydrogène.

**I :** Intermédiaire.

**IND :** Indole.

**Lac(+):** lactose.

**LPS:** lipopolysaccharide.

**mcr:** Mobilized colistin resistance.

**MH:** Mueller-Hinton.

**MDR:** Multidrug resistance.

**ODC:** Décarboxylase de l'ornithine.

**OFX :** ofloxacin.

**ONPG:** (Ortho-Nitrophényl-β-galactoside).

**R :** résistante.

**Sacch(+):** saccharose.

**S :** sensible.

**spp :** Espèce.

**STX :** Triméthoprim + sulfaméthoxazole.

**TDA:** Tryptophane Désaminase.

**TSI:** Tri-Sugar Iron Medium.

**URE:** Uréase.

**VP:** Voges-Proskauer.

### Introduction Générale

L'avènement de l'antibiothérapie a révolutionné complètement le domaine médical et a entraîné une réduction significative de la mortalité associée aux maladies infectieuses.

Ainsi, les antibiotiques ont permis de traiter avec succès de nombreuses maladies infectieuses, telles que la pneumonie, la tuberculose, la syphilis et le choléra (**Carle, 2009**).

Malheureusement, leur utilisation excessive et inappropriée en médecine humaine et vétérinaire a conduit à l'émergence de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques. Cette résistance bactérienne est amplifiée par la surconsommation d'antibiotiques chez les animaux d'élevage en action thérapeutique et prophylactique, et de façon plus critiquée comme facteurs de croissance, qui peuvent ensuite contaminer l'environnement et l'homme (**Marshall et Clin, 2011; Carle, 2009**).

La résistance aux antibiotiques constitue un problème majeur de santé publique. Les bactéries résistantes peuvent provoquer des infections graves et difficiles à traiter, ce qui limite l'efficacité des traitements disponibles. De plus, cela peut également conduire à une augmentation des coûts de santé en raison de la nécessité d'utiliser des antibiotiques plus puissants et plus coûteux pour traiter les infections résistantes (**Baba Ahmed-Kazi Tani et Arlet, 2014**).

En effet, l'impact négatif clinique de la résistance aux antibiotiques est traduit par l'augmentation des coûts des soins, de la durée des séjours à l'hôpital, et de la morbidité et la mortalité. Ces conséquences sont plus sévères et ont plus d'effets néfastes que la gravité de la maladie et la virulence de la souche (**Deborah Friedman et al., 2016**).

D'une manière générale, les infections causées par des souches bactériennes résistantes entraînent des taux de conséquences négatives jusqu'à deux fois plus élevés que les infections similaires causées par des souches sensibles (**Cosgrove et Carmeli, 2003**).

D'autre part, Le secteur de l'élevage des animaux subit également une perte économique significative due aux maladies infectieuses causées par les bactéries résistantes. Aux États-Unis, les chiffres révèlent que cette perte représente environ 20 % de la valeur totale de la production avicole, soit près de trois fois la perte attribuée à la mortalité des animaux elle-même (**Berghiche et al., 2018**).

La résistance aux antibiotiques se produit par le biais d'une série de mécanismes de résistance dont les principaux sont : la modification de la cible des antibiotiques, la Diminution de la pénétration ou augmentation de l'excrétion de l'antibiotique, l'inactivation enzymatique de l'antibiotique et le system d'efflux (**Munita et Arias, 2016**).

Au cours de la dernière décennie, une prévalence croissante de la résistance aux antibiotiques a été observée principalement chez les bactéries à Gram négatifs d'origine animale. Parmi ces dernières, des cas particulièrement préoccupants ont été signalés chez *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* et les *Enterobacteriaceae*. Ces germes ont développé des résistances contre les différentes familles d'antibiotiques, en particulier : les Bétalactamines qui englobent les pénicillines et les céphalosporines. Les infections provoquées par ces microorganismes ont conduit les professionnels de la santé à recourir aux Carbapénèmes et la Colistine, qui étaient autrefois considérés comme des antibiotiques utilisés en dernier recours. Par conséquent, l'augmentation de leurs utilisation ces dernières années a conduit à l'émergence des souches résistantes aux antibiotiques de dernier recours (**Baba Ahmed-Kazi Tani et Arlet, 2014; Luo et al ., 2020**).

La colistine est un antibiotique polypeptidique qui appartient à la classe des polymyxines. Il est considéré comme un médicament de dernier recours pour combattre les infections causées par des bactéries multirésistantes (MDR) et résistantes aux Carbapénèmes. Il cible le lipopolysaccharide (LPS) de la membrane externe des bactéries gram-négatives, sa liaison au LPS augmente la perméabilité de la membrane bactérienne et entraîne une fuite du contenu cytoplasmique et, en fin de compte, la mort cellulaire. Le principal mécanisme de résistance à la colistine chez les bacilles à Gram négatifs (BGN) implique la modification du lipide A du LPS suite à un gène appeler Mobilized colistin resistance (*mcr*) qui code pour une enzyme catalysant l'ajout de phosphoryléthanolamine aux groupes phosphates du lipide A. En 2015, ce gène a été identifié dans un plasmide conjugatif, et donc transférable, dans des isolats d'*Escherichia coli* d'origine animale en Chine. Cela suggère un lien potentiel entre l'apparence des gènes *mcr* et l'utilisation de la colistine comme facteurs de croissance dans l'industrie avicole. Jusqu'à présent, neuf variantes des gènes *mcr*, de *mcr-1* à *mcr-9*, ont été identifiées dans différentes espèces d'entérobactéries (**Luo et al .,2020**).

De plus, des études antérieures ont mis en évidence le rôle des élevages d'animaux dans l'émergence et la propagation des bactéries multi-résistantes (BMR). En outre, il a été rapporté que les élevages sont considérés comme des réservoirs de bactéries résistantes, voire multi résistantes, et contribuent à la transmission de souches résistantes d'origine animale à l'homme et à l'environnement(**Oppliger, 2016**).

Bien que des efforts considérables aient été déployés ces dernières années pour tenter de maîtriser la propagation de la résistance aux antibiotiques dans les élevages, il subsiste des lacunes importantes à combler. Il est évident que des études épidémiologiques supplémentaires sont nécessaires, en complément de celles déjà réalisées, afin de mieux comprendre et contrôler la propagation et la montée de la résistance aux antibiotiques.

C'est dans ce contexte, et au vu de la rareté d'informations concernant la prévalence de tels organismes dans les élevages en Algérie en général, et particulièrement dans la région de Bordj Bou Arreridj( BBA) , nous nous sommes intéressés par l'étude de la résistance aux  $\beta$ -lactamines, et à la colistine chez les BGN dans différentes sources animales (aviaires, ovins et bovins).

De ce fait, l'étude menée avait pour objectif, dans un premier temps, d'isoler et d'identifier des BGN à partir d'échantillons prélevés sur des animaux dans différentes zones de la ville de BBA puis, dans un second temps, d'évaluer la sensibilité in vitro de ces microorganismes aux antibiotiques, en accordant une attention particulière aux antibiotiques de dernier recours et , enfin, de déterminer l'identité et la fréquence des bactéries à Gram négatif productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) dans les prélèvements d'animaux de la région de BBA.

## Chapitre II: Matériel et méthodes

### 1. Objectifs

L'étude qui a été menée a le but, dans un premier temps, d'isoler et d'identifier des bactéries à gram négatifs d'origine animales provenant de différentes régions de la ville de Bordj Bou Arreridj, puis dans un second temps, d'évaluer la sensibilité aux antibiotiques in vitro de ces germes, avec un intérêt particulier vis-à-vis des antibiotiques de dernier recours (Colistine).

### 2. Cadre d'étude

#### 2.1. Lieu et période de l'étude

La présente étude a été faite dans quatre Élevages situées dans la wilaya de BBA et, plus précisément, dans les communes d'El Achir, Hasnaoua, Ain soltan, Ain taghrout durant une période de 2 mois allant du 08 Mars Jusqu'au 06 Mai (Cf. Figure 01).



**Figure 1:** Une carte géographique montre les lieux des prélèvements

#### 2.2. Population étudiée

La facilité d'accès des élevages et la disponibilité des éleveurs ont été les seuls critères de choix.

Notre travail a porté sur des prélèvements de 3 espèces animales: ovine, bovine et avicole. Pour les cas de volaille, il s'agit des cas cliniques reçus au laboratoire du cabinet

vétérinaire de Dr Beghoura.R, provenant d'élevages suspects de la colibacillose aviaire située dans des fermes privées.

Pour les deux espèces, ovine et bovine, il s'agit des prélèvements de matières fécales effectués dans des fermes privées situées dans différentes régions de la wilaya de BBA.

### 3. Matériel utilisé

Le matériel utilisé est constitué de la verrerie, l'appareillage, les milieux de cultures et les différents réactifs (voir annexes 1).

### 4. Méthodes

#### 4.1. Phase de prélèvements

Un totale de 25 sujets différents (malade, sain/ male, femelle) ont été inclus dans notre travail (Cf. Tableau I).

**Tableau I:** Nature et nombre des échantillons étudiés

Espèces	Ovine	Bovine	Volaille (cas clinique)		
Nature de prélèvement	Matières fécales	Matières fécales	Liquide intestinal	Liquide inflammatoire	Surface du Foie
Nombre d'échantillon	5	3	17		

Toutes les informations concernant les échantillons sont regroupées dans des fiches de renseignements. (Voir annexes 2).

#### 4.1.1. Prélèvements des cas cliniques

Les prélèvements ont été réalisés au niveau de la salle d'autopsie du laboratoire vétérinaire en utilisant la méthode de l'écouvillonnage. Les échantillons ont été prélevés à partir de liquide inflammatoire, de la surface du foie et du liquide intestinal. L'écouvillonnage consiste à passer un écouvillon de coton (écouvillon stérile) sur la surface infecter dans un mouvement de zigzag combinée à une rotation ensuite replacée l'écouvillon délicatement dans son tube (CF. Figure 02) (Denis, 2011).



**Figure 2:** Réalisation des prélèvements des cas cliniques volaille

#### 4.1.2. Prélèvement de la matière fécale

Une quantité de 10 gramme de matière fécale fraîche est prélevée à l'aide d'une spatule stérile et placée dans des boites stériles étiquetées en indiquant le numéro d'échantillons et la date de prélèvement. Les échantillons ont été transportés dans un sac isotherme (CF. Figure 03).



**Figure 3:** Prélèvements de matière fécale « espèce ovine »

#### 4.2. Analyses bactériologiques

Les analyses bactériologiques ont été réalisées au laboratoire d'analyses microbiologiques du cabinet vétérinaire Dr Beghoura.R et le laboratoire de microbiologie du département de science de la vie et la nature à l'Université Mohamed el Bachir el Ibrahim Bordj Bou Arreridj (CF. Figure 04).

Elle est réalisé en suivant les étapes décrite dans la méthode française de routine NF U 47-101 de Novembre 2007 (BENKLAOUZ , 2017).



Figure 4: Lieu de réalisation des analyses bactériologiques

#### 4.2.1. Phase d'enrichissement

##### 4.2.1.1. La matière fécale

L'enrichissement est réalisé en mélangeant 5ml de bouillon nutritif (BN) (Pronadisa®; Spain) et 2 grammes de matière fécale dans des tubes à essai et ensuite incubé le tout à 37 °C pendant 24 heures.

##### 4.2.1.2. Les cas cliniques (volailles)

On retire délicatement l'écouvillon de son tube et on le place dans un tube à essai contenant 5 ml de (BN). Ensuite, on incube le tube à 37 °C pendant 24h.

#### 4.2.2. Phase d'isolement et de purification des souches

##### 4.2.2.1. Ensemencement sur les milieux sélectifs

Des ensemencements ont été réalisés sur des milieux sélectifs contenant des antibiotiques que nous avons préparés au préalable, dans le but de réaliser une sélection primaire des Bacilles Gram-Négatifs (BGN) résistantes aux  $\beta$ -lactamines à spectre étendu (Cefotaxime) et aux antibiotiques de derniers recours (Imipenème et Colistine).

##### 4.2.2.1.1. Préparation des milieux sélectifs

Pour les milieux sélectifs, nous avons utilisé de la gélose de Mac Conkey (Liofilchem®; Italie) à laquelle nous avons ajouté les antibiotiques suivants (Imipenème, cefotaxime et colistine). La préparation des milieux a été réalisée en suivant le protocole suivant (Bardet et al., 2018) (CF. Figure 05 et 06).

- **Milieu spécifique 1:** Mac Conkey + cefotaxime (1 $\mu$ g/1ml).
- **Milieu spécifique 2:** Mac Conkey + imipenème (1 $\mu$ g/1ml).
- **Milieu spécifique 3:** Mac Conkey + colistine (4 $\mu$ g/1ml).



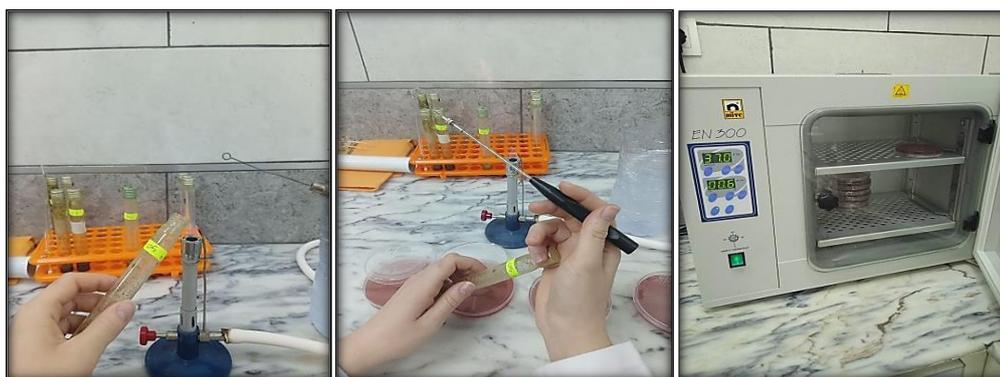
**Figure 5:** Préparation des milieux sélectifs additionnés aux antibiotiques



**Figure 6:** Les antibiotiques utilisés « Colistine, Imipenème, Cefotaxime »

#### 4.2.2.1.2. Ensemencement proprement dit

Le lendemain, après avoir homogénéisé la suspension bactérienne, nous avons prélevé une goutte de celle-ci à l'aide de l'anse de platine, puis nous l'avons étalée sur la surface de la gélose à l'aide d'une pipette râteau. Ensuite, nous avons placé les plaques dans une étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures (Denis et al., 2007) (CF. Figure 07).



**Figure 7:** Ensemencement et incubation des échantillons

#### 4.2.2.2. Purification des souches

Lors de la lecture à 24 heures, les colonies apparues ont été décrites sur le plan macroscopique (forme, taille, couleur et odeur). Chaque type de colonie a été ensuite repiqué sur une gélose Mac Conkey pour sélectionner les bactéries à Gram Négatifs et en même temps obtenir une culture pure. Ces boîtes ont été ensuite incubées à l'étuve (37 °C) pendant 24h (Denis et al., 2007).

#### 4.2.3. Phase d'identification des souches

L'identification des souches isolées a été réalisée en se basant sur la détermination de leurs caractères morphologiques et biochimiques.

##### 4.2.3.1. Identification morphologique

###### 4.2.3.1.1. Examen macroscopique

Cette étape nécessite l'observation directe de la colonie à l'œil nu afin de décrire leur taille, leur aspect, leur forme et leur couleur (Denis et al., 2007).

La morphologie des colonies sur la gélose Mac Conkey oriente le diagnostic. Il permet la différenciation entre colonies lactose + et lactose - :

- Colonie rose à rouge brique (lactose +).
- Colonies incolores (lactose -) (Fraperie et Lasserre, 2016).

Ainsi, certains BGN se présentent comme suit:

- Les colonies d'*Escherichia coli* sont roses à rose foncé (Lactose +), sèches, entourées par un halo opaque rose foncé de sels biliaires précipités.
- Les colonies de *Klebsiella* sont souvent muqueuses, grandes et rose foncé à pâle.
- Les colonies de *salmonella*, *Proteus*, *Yersinia* sont incolores et la gélose entourant ces bactéries devienne transparente (Fraperie et Lasserre, 2016).

#### 4.2.3.1.2. Examen microscopique

Basé sur l'observation microscopique des cellules bactériennes après la coloration de Gram.

#### 4.2.3.1.3. Coloration de Gram

##### ✓ Principe

La coloration de Gram est l'une des étapes clés dans notre travail, elle permet de déterminer la forme, la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées (Denis et al., 2007).

##### ✓ Technique

Cette étape est basée sur l'utilisation des produits suivants : le colorant Violet de gentiane (REACTIFS RAL®; France), le Lugol, L'Ethanol (EDEN LABO®; Algérie) et le colorant Fuch sine (BIOCHEM Chemopharma®; Belgique) (CF. Figure 08).

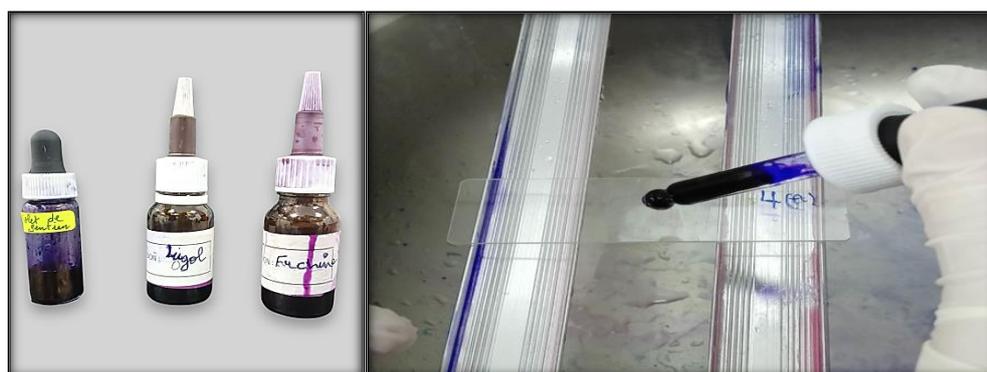


Figure 8: Application des colorants de Gram

##### ✓ Lecture

Sous le microscope optique, l'observation est effectuée avec un objectif x 100 après l'addition d'une goutte d'huile d'immersion. Les bactéries à Gram positifs apparaissent en violet foncé, tandis que et les bactéries à Gram négatifs sont colorées en rose.

#### 4.2.3.2. Identification biochimique

##### 4.2.3.2.1. Test oxydase

##### ✓ Principe

Le test de l'oxydase nous permet de distinguer les bacilles à Gram négatif non fermentatifs (positifs à l'oxydase) des entérobactéries (négatifs à l'oxydase) (Boukerouaz et Benmehidi, 2017).

**✓ Technique**

Nous réalisons ce test en déposant un disque d'oxydase (**HIMEDIA® ; India**) sur une lame stérile en verre, puis en l'humectant avec une goutte d'eau distillée. Ensuite, nous utilisons une pipette Pasteur stérile pour prélever une partie de colonie et l'étaler sur le disque d'oxydase (**Boukerouaz et Benmehidi, 2017**) (CF. Figure 09).



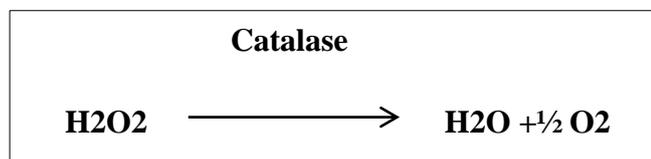
**Figure 9:** Test oxydase

**✓ Lecture**

La lecture se fait après 30 secondes. Si une couleur Blue –Violette apparaît sur le disque, cela indique la présence d'une réaction positive à l'oxydase.

**4.2.3.2.2. Test catalase****✓ Principe**

Ce test permet de détecter la présence de l'enzyme «catalase» qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en H<sub>2</sub>O avec dégagement d'oxygène (**Reiner, 2017**), selon la réaction suivante:

**✓ Technique**

On applique une goutte d'eau oxygénée sur une lame de verre stérile, puis on ajoute une petite quantité de culture bactérienne prélevée à partir d'un isolement (**Reiner, 2017**) (CF. Figure10).



Figure 10: Test catalase

✓ **Lecture**

La présence de catalase et la dégradation de l'eau oxygénée sous l'action de cette enzyme est traduit par la formation de bulles d'air sous forme de mousse (**Reiner, 2017**).

**4.2.3.2.3. Identification par galeries biochimiques**

Pour l'identification biochimique des souches nous avons utilisé trois types de galeries :

- La galerie API (20 E) (**BIO MÉRIEUX ®, France**) pour l'identification des bacilles à Gram négatifs oxydase négative.
- La galerie API (20NE) (**BIO MÉRIEUX ®, France**) pour identification des BGN non entérobactérie oxydase variable.
- La galerie classique.

**Galerie API (20E)**

✓ **Principe**

La galerie API 20E est un système utilisé afin d'identifier les *Enterobacteriaceae* et Autres bacilles à Gram négatifs par la détermination des caractéristiques biochimiques de certaines souches.

Ce système représenté par une bande comporte 20 cupules qui contiennent chacun un milieu réactionnel déshydraté différent.

Les réactions qui se déroulent pendant la période d'incubation entraînent des changements de couleurs dans les milieux réactionnels, spontanément ou révélés par l'addition des réactifs (**Bio Mérieux SA, 2010a**).

**✓ Technique**

L'identification par la galerie API20E est basée sur l'utilisation des souches bactériennes jeunes en phase de croissance exponentielle (ensemencées sur milieu GN coulé dans des boîtes de pétrie et incubées à 37°C pendant 18 à 24h).

À partir d'une culture jeune nous avons préparé une suspension bactérienne en dissolvant 1 ou 2 colonies à l'aide d'une anse de platine dans 5ml d'eau physiologique. La suspension a été homogénéisée soigneusement et ajustée à une opacité de 0,5 sur l'échelle de Mac Farland (Cf. Figure 11).



**Figure 11:** Solutions de Mc Farland ([Bioanalytic GmbH](#))

L'étape suivante consiste à assembler le fond et le couvercle d'une boîte d'incubation, puis à répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les puits pour créer une atmosphère humide. Ensuite, la boîte est marquée avec le code identifiant de la souche.

L'ensemencement des cupules à partir de la suspension bactérienne est réalisé délicatement à l'aide d'une pipette pasteur afin d'éviter la création des bulles d'air qui pourraient fausser les résultats.



**Figure 12:** Techniques d'ensemencement de la galerie API20E ([Damien Klein](#))

- Pour les tests CIT, VP, GEL, remplir tube et cupule.
- Pour les tests : ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, URE, le tube est rempli de la suspension puis recouvert d'huile de paraffine afin de créer une anaérobiose.
- Pour les autres tests, nous remplissons uniquement les tubes (et non les cupules).

Enfin, la boîte est refermée et incubée à 37°C pendant 24 heures.

Après l'incubation de 18-24 h, les réactions produites se traduisent par virages colorés ou révèlent par l'addition de différents réactifs pour la lecture :

**Kovac** : est ajouté au test IND, une couleur rose diffusant sur toute la cupule indique une réaction positive.

**TDA** : est utilisé pour le test TDA si une couleur marron-rougeâtre apparait, la réaction est positive.

**VP 1+2** : on ajoute une goutte de VP1 et VP2 dans le test VP et on attend minimum 10 minutes, si une couleur rose ou rouge apparait la réaction est positive (**Bio Mérieux SA, 2010a**).

#### ✓ Lecture

La lecture de la galerie est réalisée en se référant au tableau de lecture (voir annexe 3) après l'addition des réactifs. Les souches sont identifiées à l'aide d'un logiciel d'identification réalisées par **J-Noël JOFFIN** à partir du travail de **Michel CAVALLA**, des observations de **Jean CAU** (Cf. Figure 13, 14,16).



### ✓ Lecture

Après avoir ajouté les réactifs, la lecture des résultats s'effectue à l'aide d'un tableau de lecture, tandis que l'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification.

API 20 NE	
<b>Stenotrophomonas maltophilia</b>	<b>Bonne Id</b>
T	0.34
NO3	-
TRP	-
GLU	-
ADH	-
URE	+
ESC	+
GEL	+
PNP	+
GLU	+
ARA	-
MNE	-
MAN	-
NAG	+
MAL	+
GNT	-
CAP	-
ADI	-
MLT	+
CIT	+
PAC	-
OX	-

API 20 NE 6.0 (03/2000)	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNP	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	OX	P(taxo n/ profil)	P(tax on/ profil)	P(plus typique)	S	taxons	nombre d'incom patibilité
profil	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	*****		
Pseudomonas aeruginosa	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
Pseudomonas fluorescens	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
Pseudomonas maltophilia	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3
Pseudomonas putida	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3

Figure 16: Page de lecture de galerie API 20 NE

### Galerie Classique

En raison de l'indisponibilité et du coût des Galerie API, nous avons dû recourir à la méthode classique pour compléter l'identification des souches.

#### ✓ Principe

L'identification des BGN par la galerie classique repose sur l'observation de critères biochimiques tels que le métabolisme respiratoire, protéique, lipidique, glucidique et l'utilisation des sucres, sur 8 milieux différents : le milieu TSI (Tri-Sugar Iron Medium), mannitol-mobilité, urée-indole, Clark et Lubs, ONPG (Ortho-Nitrophényl-β-galactoside), milieu LDC, milieu ADH et citrate de Simmons.

Nous avons utilisé trois milieux principaux (Selon la disponibilité des milieux) :

#### 1. Milieu TSI (Tri- Sugar Iron Medium)

Ce milieu permet l'identification des souches bactériennes par la mise en évidence rapide de cinq critères :

- L'utilisation du trois sucres : le glucose, le lactose et le saccharose.
- La production d'hydrogène sulfuré (H<sub>2</sub>S).
- Le Dégagement du gaz (provenant de la fermentation du glucose).

✓ **Technique**

À l'aide d'une pipette Pasteur, nous avons ensemencé en réalisant des stries sériées de la surface inclinée jusqu'à la pointe, en terminant par une piqûre centrale. Les tubes seront ensuite incubés à 35 °C pendant 18 à 24 heures.

✓ **Lecture**

Le premier paramètre c'est le virage de la couleur du milieu comme résultat de la fermentation du lactose, glucose, saccharose :

- **Virage du culot au jaune** : glu (+) et le **Virage de la pente au jaune** : sacch / lac (+).
- Le découlement de la gélose indique une production du gaz (+) et l'apparition des traces noires sur le milieu montrer une production de sulfure d'hydrogène H<sub>2</sub>S (+).
- La lecture a été réalisée en se référant au tableau cité ci-dessous (Biorad, 2006).

MICRO-ORGAISMES	Pente lactose et /ou saccharose	Culot GAZ [1]	H <sub>2</sub> S
<i>Citrobacter</i>	+	+	+ [-]
<i>Edwardstella</i>	-	+	+
<i>Hafnia</i>	-	+	-
	+	+ [2]	-
<i>Escherichia</i>	+ [-]	+	-
<i>E. coli</i> (biotype A.d.)	-	-	-
<i>Klebstella</i>	+	+ [-]	-
<i>Levinea</i>	- ou +	+	-
<i>Proteus</i> • <i>vulgaris</i> • <i>mirabilis</i> • <i>morganii</i> • <i>rettgeri</i>	+ ou - - ou + - -	+ ou - + ou - + ou - -	+ + - -
<i>Providencia</i>	-	- [+]	-
<i>Salmonella sp.</i> <i>S. typhi</i> <i>S. paratyphi A</i> <i>S. arizona</i>	- - - -	+ - + +	+ traces - +
<i>Serratia</i>	+ ou -	- ou + [3]	-
<i>Shigella</i>	-	-	-
<i>Yersinia</i>	d [3]	-	Activ Accés

**Figure 17:** Tableau d'interprétation bactérienne du test sur milieu TSI

## 2. Citrate de Simmons

Ce milieu permet d'identifier l'utilisation du citrate de sodium comme seul source de carbone (seules les bactéries possédant un citrate perméase peuvent se développer sur ce milieu) et le sel d'ammonium (N) comme source de nitrate.

**✓ Technique**

On aensemencé en réalisant des stries sériées sur la moitié inférieure de la surface inclinée (la pente reste comme témoin) à 35 °C pendant 18 à 24 heures.

**✓ Lecture**

Le changement de couleur du milieu en bleu indique un test de citrate positif. Si le milieu reste vert, cela signifie un test de citrate négatifs.

**3. Milieu urée indole**

Ce milieu permet la mise en évidence de l'activité enzymatique de l'uréase (hydrolyse de l'urée par l'uréase) et de tryptophanase (hydrolyse du tryptophane par la triptophanase et la production de l'indole).

**✓ Technique**

On aensemencé délicatement quelques colonies de la souche dans un milieu urée indole et incubé pendant 24 heures à 35°C.

**✓ Lecture**

Après l'incubation, quelques gouttes de réactif de Kovac ont été ajoutées. La formation d'un anneau rouge indique un test d'indole positif, tandis que la formation d'un anneau clair indique une réaction négative.

**4.2.4. Antibiogramme**

Après identification des différentes souches des BGN, une recherche de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion en milieu solide selon la technique préconisé par l'EUCAST(Marisa et al., 2021) .

**✓ Principe**

Les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface d'un milieu adéquat qui est déjàensemencé avec une culture pure de la bactérie à tester.

Après une incubation de 24h, les boîtes de Pétri sont examinées par la mesure des zones d'inhibition entourant les disques.

Les diamètres obtenus sont ensuite comparés aux valeurs critiques des différents disques d'antibiotiques testés, afin de déterminer la catégorisation clinique (résistant, Intermédiaire, sensible).

Le diamètre de la zone d'inhibition est proportionnel à la sensibilité de la bactérie testée (BIORAD, 2013) .

- **Les antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme**

Nous avons utilisé un totale de 7 antibiotiques de différentes générations et de différentes familles (CF. Tableau II et Figure 18) :

**Tableau II:** Les antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme

La famille	L'antibiotique	Sigle	La charge	La marque
Pénicillines	Amoxicilline	AMC	30 (µg)	BioRad (France)
Polymexine	Colistine	COL	10(µg)	BioRad (France)
Phénicolés	Chloramphénicol	CHL	30(µg)	BioRad (France)
Sulfamides	Triméthoprime Sulfaméthoxazole	STX	25 (µg)	BioRad (France)
Fluoroquinolones	Ofloxacin	OFX	5 (µg)	BioRad (France)
Céphalosporine	Céftriaxone	CRO	30 (µg)	BioRad (France)
Aminosides	Gentamycine	GEN	50(µg)	BioRad (France)



**Figure 18:** Les disques d'antibiotique utilisés

- **Préparation de l'inoculum**

A partir d'une culture jeune incubée pendant 18h, nous avons préparé une suspension bactérienne en dissolvant plusieurs colonies pures dans l'eau physiologique stérile toute en agitant pour atteindre une turbidité équivalente à celle de l'étalon 0,5 de la gamme de Mac farland **EUCASTE (Marisa et al., 2021)**.

- ✓ **Ensemencement**

A l'aide d'un écouvillon stérile, on effectue un écouvillonnage en trempant l'écouvillon dans la suspension bactérienne (il est important d'éliminer l'excès de liquide). Ensuite, on passe l'écouvillon sur toute la surface du milieu en frottant de haut en bas de manière homogène. En tournant la boîte à 60°, on répète l'ensemencement trois fois. Enfin, on passe l'écouvillon sur les côtés de la boîte.

- ✓ **Application des disques d'antibiotiques**

- les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface de la gélose à la pince flambée.
- Les disques doivent être parfaitement appliqués à plat sans glissement en appuyant légèrement sur la surface de la gélose (Cf. Figure 19).



**Figure 19:** Application des disques d'antibiotiques

- ✓ **Incubation**

- Les boîtes sont incubées pendant 24 h à 37°C au plus tard 15 minutes après avoir été inoculées.

✓ **Lecture**

La lecture se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition- qui reflètent la présence d'une activité antimicrobienne - à l'aide d'une règle.

L'interprétation de l'antibiogramme se fait en comparant le diamètre de la zone d'inhibition et l'intervalle de la valeur critique de chaque antibiotique ):

**Tableau III:** Diamètres critiques des différents antibiotiques testés

Antibiotiques	R (mm)	I (mm)	S (mm)
<b>Amoxicilline</b>	≤ 13	[14 - 21]	≥ 22
<b>Chloramphénicol</b>	≤ 18	[19 - 22]	≥ 23
<b>Colistine</b>	≤ 15	[16]	≥ 17
<b>Gentamicine</b>	≤ 15	[16 - 18]	≥ 19
<b>Céftriaxone</b>	≤ 9	[10 - 20]	≥ 21
<b>Ofloxacin</b>	≤ 28	[29 - 33]	≥ 34
<b>Triméthoprim Sulfaméthoxazole</b>	≤ 9	[10 - 16]	≥ 17

- Si le diamètre est supérieur à la valeur critique → Bactérie sensible (S).
- Si le diamètre est inférieur à la valeur critique → Bactérie résistante (R).
- Si le diamètre est inclus dans l'intervalle de la valeur critique, l'activité antimicrobienne est dite intermédiaire (**Marisa et al., 2021**).

#### 4.2.5. Recherche des souches productrices de BLSE par teste de synergie

✓ **Principe**

Le test de synergie a été réalisé en disposant un disque d'amoxicilline + acide clavulanique (AMC) (20/10 µg) à une distance de 2 mm (centre à centre) d'un disque de céphalosporine de 3ème génération (Céftriaxone / cefotaxime). On recherchera une BLSE devant un diamètre inférieur aux valeurs suivantes :

- Céfotaxime (CTX à 27 mm).
- Céfotazidime (CAZ à 22 mm).
- Céftriaxone (CRO à 25 mm).
- Aztréonam (ATM à 27 mm).

**✓ Technique**

L'Ensemencement de la souche été réalisé par écouvillonnage à partir d'une suspension bactérienne d'une culture de 18 h (selon le même principe que nous avons suivi dans l'antibiogramme).

Ensuite, On dépose les trois disques d'antibiotiques (Amoxicilline + acide clavulanique (AMC), Cefotaxime (CTX), Céftriaxone (CRO) au centre de la boîte d'une façon asymétrique (on laisse un diamètre de 2 cm ente eux).

Les boîtes de pétri sont incubées pendant 18 heures à 37C.

**✓ Lecture**

La Présence d'une image de synergie ou « bouchon de Champagne » indique une production de BLSE (positive) par la souche. Ce bouchon est le résultat de l'inhibition des BLSE par l'acide clavunique, et la stimulation de l'activité des céphalosporines de troisième génération en présence de ce dernier.

L'absence du bouchon indique un BLSE négative.

### Chapitre III : Résultats et discussion

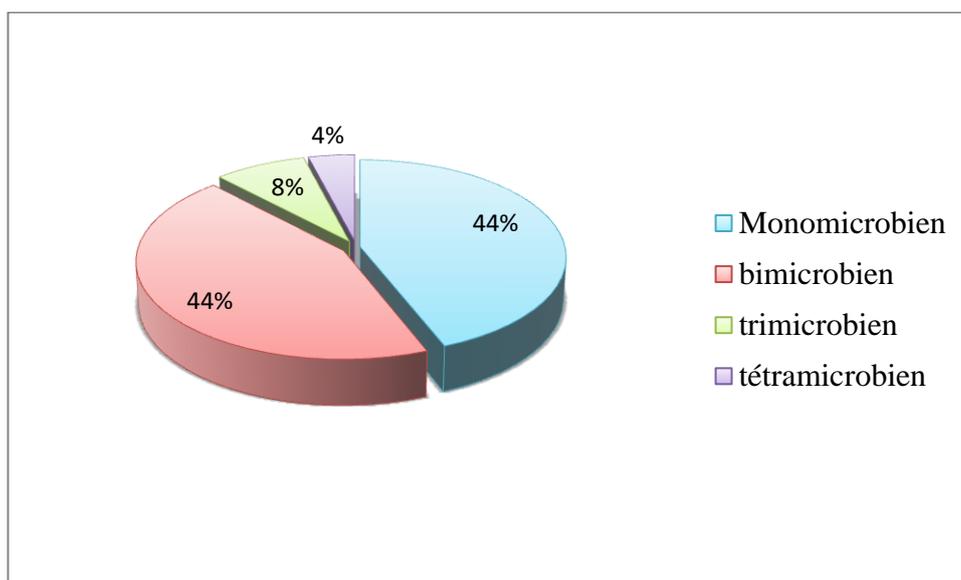
#### 1. Résultats

##### 1.1. Résultats des analyses bactériologiques

##### 1.1.1. Résultats globaux

Les examens bactériologiques ont révélé que sur les 25 échantillons analysés, 11 étaient mono-microbiennes (44%), 11 bi-microbiennes (44%), 2 tri-microbiennes (8%) et une seule tétra-microbienne (4%).

Ces résultats sont représentés dans la figure suivante :



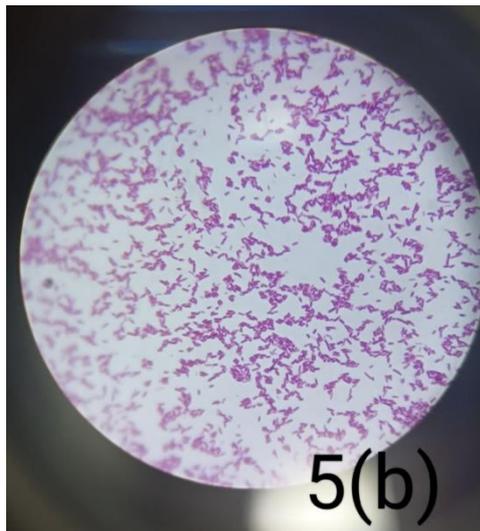
**Figure 20:** Répartition des isolats

Au total, nous avons obtenu 43 isolats à Gram négatifs en culture pure, provenant respectivement de l'origine aviaire ( $n = 30$ ), ovine ( $n = 7$ ) et bovine ( $n = 6$ ).

Ces résultats sont regroupés dans le Tableau IV.

**Tableau IV:** Nombre globale des souches isolées par espèce animale

Espèces	Nombre de bactéries isolées
Ovine	7
Bovine	6
Volaille	30
<b>Total</b>	<b>43</b>



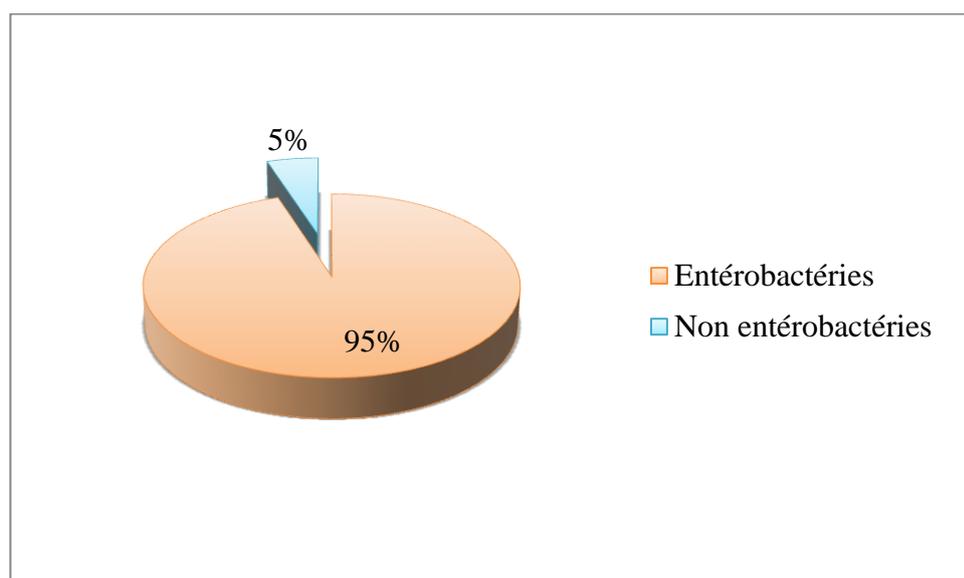
**Figure 21:** Aspect des Bacilles Gram-Négatifs après coloration de Gram

### 1.1.2. Pourcentage globale des Bacilles Gram-Négatifs isolées

En analysant l'aspect morphologique et en effectuant des tests biochimiques sur les souches isolées, nous avons pu réaliser une identification préliminaire permettant de différencier les entérobactéries des non-entérobactéries.

A partir de l'analyse de 25 échantillons, nous avons obtenu 43 isolats à Gram négatif en culture pure, répartis comme suit : 41 entérobactéries (95%) et 2 non entérobactéries (5%).

Ces résultats sont représentés sous forme d'un diagramme (Figure 22).



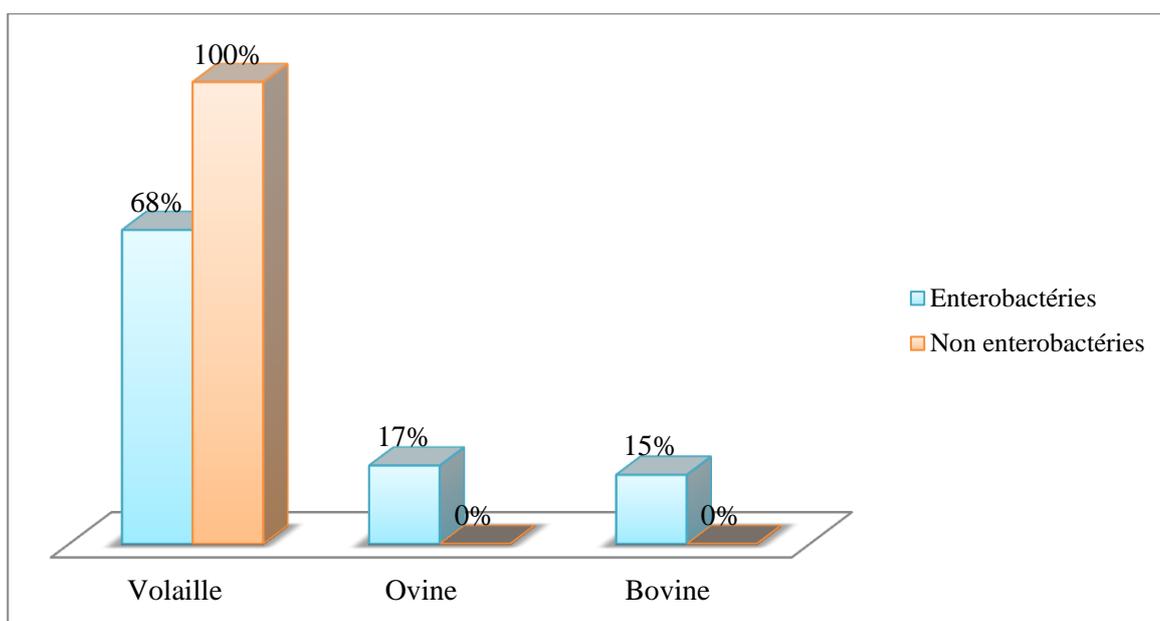
**Figure 22:** Pourcentage des Bacilles Gram-Négatifs isolées

Ce graphe démontre clairement la nette prédominance des entérobactéries, qui représentent la quasi-totalité des isoléments bactériens (95%).

### 1.1.3. Répartitions des Bacilles Gram-Négatifs isolés dans chaque espèce animale

Sur les 41 entérobactéries identifiées, 28 sont d'origine aviaire (68%), 7 sont d'origine ovine (17%) et 6 appartiennent à l'espèce bovine (15%). De plus, il est à noter que les deux souches non entérobactéries isolées dans notre étude sont d'origine aviaire seulement (100%).

Ces résultats sont représentés sous forme d'un diagramme (Figure 23).



**Figure 23:** Répartition des BGN chez chaque espèce animale

#### 1.1.3.1. Répartitions des Bacilles Gram-Négatifs isolés dans l'espèce aviaire

L'identification biochimique nous a permis de ressortir le genre (n= 17) et l'espèce (n= 8) des 30 souches d'origine aviaire. Le nombre et le pourcentage de chaque espèce et /ou genre, sont représentés dans le tableau V.

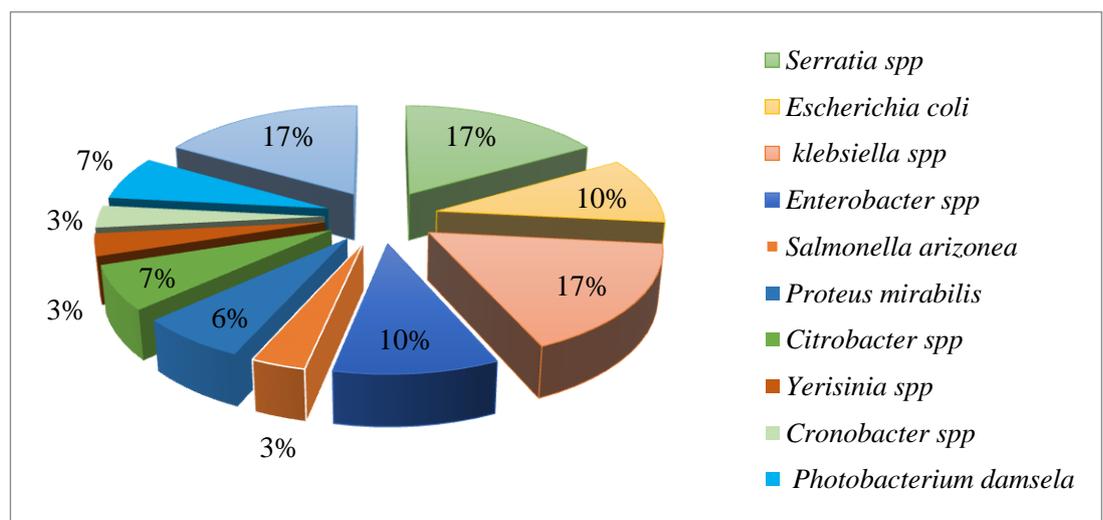
**Tableau V:** Fréquences des germes résultants de l'espèce aviaire

Bactérie isolée	Nombre	Fréquence
<i>Serratia spp</i>	5	17%
<i>Klebsiella spp</i>	5	17%
<i>Escherichia coli</i>	3	10%

<i>Enterobacter spp</i>	3	10%
<i>Photobacterium damsella</i>	2	7%
<i>Citrobacter spp</i>	2	7%
<i>Proteus mirabilis</i>	2	6%
<i>Salmonella arizonae</i>	1	3%
<i>Cronobacter spp</i>	1	3%
<i>Yersinia spp</i>	1	3%
Non identifié	5	17%
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>100%</b>

On constate une prédominance de *Serratia spp* et *Klebsiella spp* avec un pourcentage de 17%, suivies par *Enterobacter spp* et *Escherichia coli* avec une fréquence d'isolement de 10%. En troisième position, on trouve *Citrobacter spp*, *Proteus mirabilis* et *Photobacterium damsella*, avec une fréquence de 7% chacun. Les autres espèces sont moins représentées, telles que *Yersinia spp*, *Cronobacter spp* et *Salmonella arizonae*, dont 5 souches (17%) restent non identifiées.

Ces résultats sont représentés dans la figure 24 sous forme d'un diagramme.



**Figure 24:** Répartition des souches isolées à partir des cas cliniques aviaires

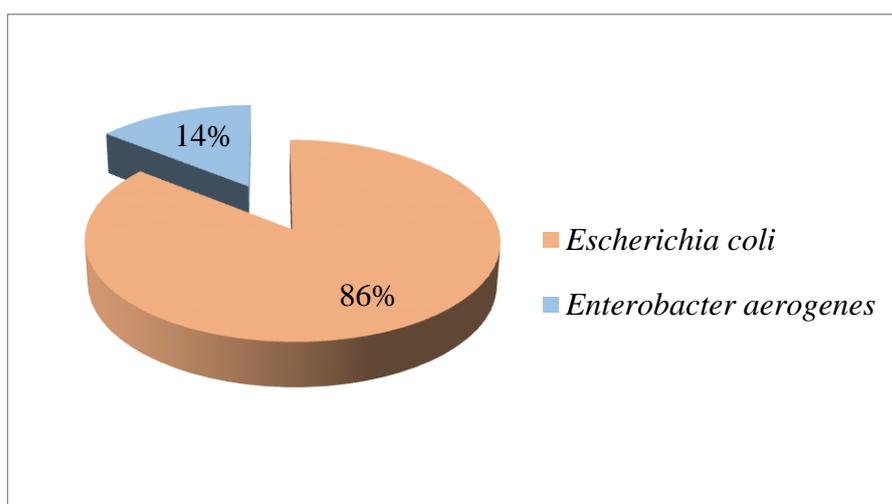
### 1.1.3.2. Répartitions des Bacilles Gram-Négatifs isolés dans l'espèce Ovine

Les fréquences relatives des BGN isolés dans l'espèce Ovine, sont représentées dans le tableau VI.

**Tableau VI:** Fréquences des germes résultants de l'espèce ovine

Bactérie isolée	Nombre	Fréquence
<i>Escherichia coli</i>	6	86 %
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	14 %

Nous observons que parmi les entérobactéries identifiées chez les ovins, il y a eu six souches d'*Escherichia coli* (86%) et une souche d'*Enterobacter aerogenes* (14%) (CF. Figure 25).



**Figure 25:** Répartition des souches isolées à partir de la matière fécale des ovins

### 1.1.3.3. Répartitions des Bacilles Gram-Négatifs isolés dans l'espèce Bovine

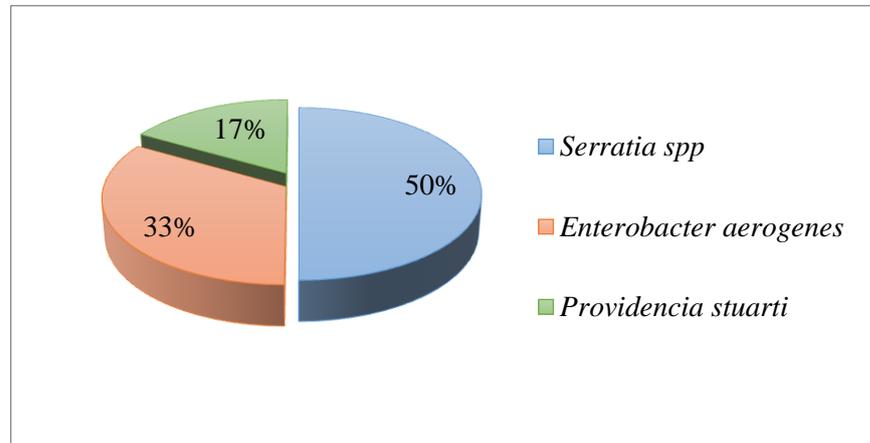
La répartition de différentes BGN d'origine Bovine est présentée dans le tableau VI.

**Tableau VII:** Fréquences des germes résultants de l'espèce bovine

Bactérie isolée	Nombre	Fréquence
<i>Serratia spp</i>	3	50%
<i>Enterobacter spp</i>	2	33%
<i>Providencia stuartii</i>	1	17%

Nous apercevons la présence de trois souches de *Serratia spp*, deux souches d'*Enterobacter spp* et une souche de *Providencia stuartii*.

Ces résultats sont représentés sous forme d'un diagramme (Cf. Figure26).



**Figure 26:** Répartitions des souches isolées à partir la matière fécale des bovins

Chez les bovins, la fréquence la plus élevée est observée chez *Serratia spp*, représentant la moitié du pourcentage total. Ensuite, on trouve *Enterobacter spp* avec un pourcentage de 33%, suivi de *Providencia stuartii* avec un pourcentage de 17%.

## 1.2. Résultats des antibiogrammes

Au total, 38 souches de BGN identifiées ont fait l'objet d'une évaluation de leur sensibilité in vitro aux antibiotiques.

Les résultats de l'antibiogramme révèlent une distribution intéressante des résistances à la gamme d'antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire (AMC, CHL, COL, GEN, CRO, OFX, STX) chez les trois espèces animales : Aviaire, Ovine et Bovine.

Ces résultats sont présentés par le **tableau VIII** et illustrés par la **figure 27**.

Tableau VIII: Résultats des antibiogrammes

	Aviaire (25 souches)			Ovine (7 souches)			Bovine (6 souches)		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S
AMC	92%	8%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%
CHL	64%	8%	28%	0%	0%	100%	17%	33%	50%
COL	44%	52%	4%	14%	86%	0%	67%	33%	0%
GEN	32%	68%	0%	0%	86%	14%	50%	50%	0%
CRO	48%	48%	4%	14%	86%	0%	67%	33%	0%
OFX	96%	4%	0%	0%	0%	100%	50%	50%	0%
STX	68%	4%	28%	0%	0%	100%	33%	17%	50%

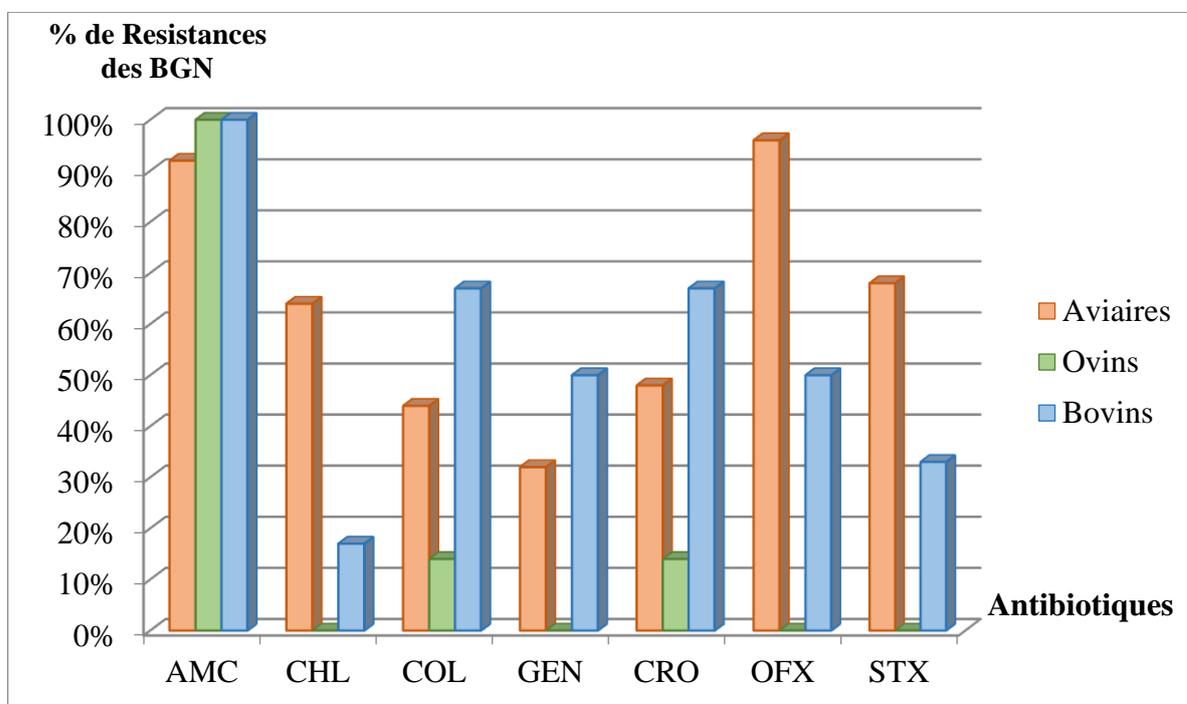


Figure 27: Profil globale de la résistance des souches isolées par espèce animale

D'après les résultats obtenus à partir des souches isolés de l'espèce aviaire, la majorité des souches montrent une résistance aux fluoroquinolones (OFX), aux  $\beta$ -lactamines (AMC, CRO), aux sulfamides (STX) et aux phénicolés (CHL) avec des taux de résistance de 96%, 70%, 68% et 64% respectivement. Des pourcentages de résistance de 44% pour les polymyxines (COL) ont également été observés. Un faible taux de résistance de 32% est présent pour les aminosides (GEN).

Les souches identifiées chez l'espèce ovine ont développées une résistance moyenne aux  $\beta$ -lactamines (AMC, CRO) avec un taux de (57%). Par contre une fréquence de 14% a été enregistrée vis-à-vis les polymixines (COL). Nous avons remarqué aussi une absence totale de résistance (0%) chez les autres familles d'antibiotiques (les phénicolés, les aminosides, les fluoroquinolones et les sulfamides).

En ce qui concerne l'espèce bovine, nous avons remarqué un taux très élevé de résistance de l'ordre de (83,5%) vis-à-vis les  $\beta$ -lactamines (AMC, CRO), et un moyen pourcentage de (67%) pour les polymixines (COL), (50%) pour les aminosides (GEN) et les fluoroquinolones (OFX). En revanche, nous avons noté des faibles fréquences de résistance de (33%) vis-à-vis les sulfamides (STX) et (17%) vis-à-vis les phénicolés (CHL).

### 1.3. Les profils de multi-résistante

Le tableau ci-dessous présente les différents profils de multi résistance des souches étudiées vis-à-vis des 06 familles d'antibiotiques utilisés.

**Tableau IX:** Profils de multi-résistances des souches isolées

<b>Antibiotypes</b>	<b>Profil</b>	<b>N(%)</b>
AMC COL	A	1(3%)
AMC OFX	B	2(7%)
OFX COL	C	1(3%)
OFX STX	D	1(3%)
AMC OFX CHL	E	2(7%)
AMC OFX STX	F	3(10%)
AMC CRO STX OFX	G	3(10%)
AMC CRO STX CHL	H	1(3%)
AMC OFX STX COL	I	1(3%)
AMC OFX STX CHL	J	2(7%)
COL OFX STX GEN	K	1(3%)
AMC CRO OFX COL STX	L	1(3%)
AMC CRO OFX COL CHL	M	1(3%)
AMC CRO OFX CHL GEN	N	1(3%)
AMC CHL OFX STX GEN	O	1(6%)
AMC CHL OFX STX COL	P	2(6%)
AMC CRO CHL OFX STX GEN	Q	3(10%)
AMC CRO CHL OFX STX COL	R	2(7%)
AMC CHL OFX STX COL GEN	S	1(3%)
<b>Total</b>		<b>30(100%)</b>

Suite aux résultats de l'antibiogramme nous avons détecté 19 profils de multi résistance dont la majorité des souches développent une résistance aux bêtalactamines.

Parmi les souches étudiées, 16% des souches ont développé une résistance à au moins deux familles d'antibiotiques. Nous avons identifié 4 profils de résistance à deux familles spécifiques (A, B, C, D). De plus ; 30% des souches ont monté une résistance à au moins trois familles d'antibiotiques (E, F, G, H) ce qui représente le pourcentage le plus élevé de multi résistance.

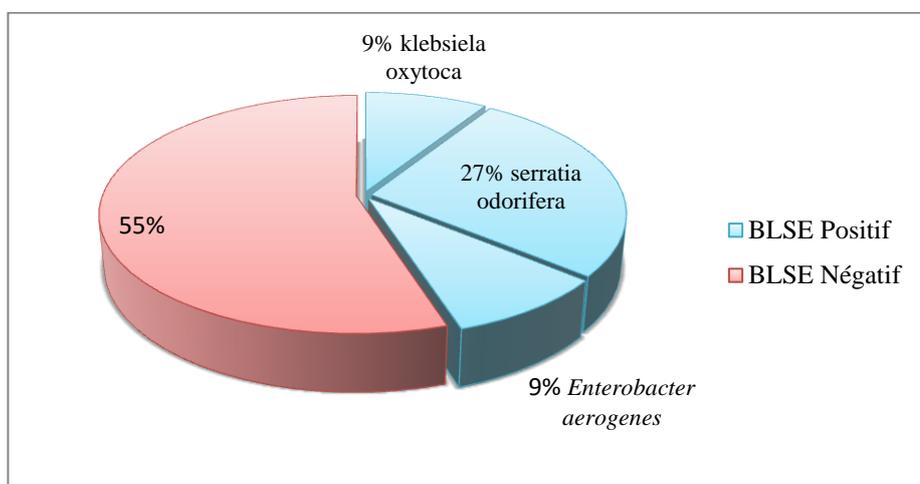
D'autre part, 22 % souches (profils I, J, K, L, M, N) sont résistantes à au moins 4 familles d'antibiotiques, tandis que 29 % des souches présentent une résistance à cinq familles d'antibiotiques (O, P, Q, R) ce qui représente un pourcentage pratiquement similaire. Le profil «S » est particulièrement remarquable, car la souche associée a développé une résistance à six familles d'antibiotiques utilisées, incluant, les bêtalactamines, les Polymixines, les Phénicolés, les sulfamides, les fluoroquinolones et les aminosides.

#### 1.4. Résultats de recherche de Bêtalactamines à spectre élargie (BLSE)

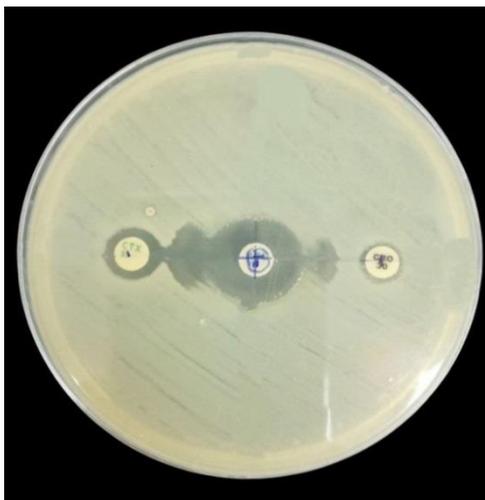
Parmi les 43 souches de BGN isolées et testées, 11 ont été résistantes au moins à une C3G, et ont un diamètre inférieur à 27 mm pour la et sont donc suspectées d'être productrice de BLSE.

D'après les résultats obtenus, nous avons identifié la présence de 5 souches (représentant 45% des souches suspect) qui sont productrices de  $\beta$ -lactamase à spectre étendu, présentant une image de synergie en forme de bouchon de champagne (voir Figure 30). Ces souches appartiennent aux espèces suivantes : *Enterobacter aerogenes* (9%), *Serratia odorifera* (27%), et *Klebsiella oxytoca* (9%).

Ces résultats sont représentés dans la figure ci-dessous.



**Figure 28:** Fréquences des souches productrices de BLSE



**Figure 29:** Aspect d'une souche BLSE positive « bouchon de Champagne »

## 2. Discussions

Dans notre étude, les résultats indiquant que 95% des germes appartiennent à la famille des entérobactéries, tandis que les 5% restants sont des non entérobactéries. Ces résultats sont en accord avec d'autres études portant sur les prélèvements de matières fécales d'origine ovine et bovine, ainsi que sur des cas cliniques de colibacillose aviaire. Ces études ont rapporté un taux de présence d'entérobactéries de l'ordre de 71% (Abbassi et al., 2017; Cécile Okalla Ebongue et al., 2015).

La cohérence des résultats entre notre étude et les études antérieures renforce la fiabilité de nos observations. La prédominance des entérobactéries dans les prélèvements de matières fécales est une caractéristique commune, et cette famille bactérienne est souvent associée aux infections et aux déséquilibres de la flore intestinale.

Les entérobactéries sont largement répandues dans le tractus gastro-intestinal des animaux et des humains. Cependant, dans le cas de la colibacillose aviaire, certaines souches pathogènes d'*E. Coli* peuvent provoquer des infections opportunistes, généralement chez des oiseaux ayant un système immunitaire affaibli ou confrontés à des conditions de stress.

Il est important de noter que la fréquence des entérobactéries peut varier en fonction de divers facteurs tels que l'alimentation, l'environnement et la santé des individus.

Il est intéressant de constater que parmi les entérobactéries d'origine aviaire isolées dans notre étude, *Serratia spp* et *Klebsiella spp* sont les plus fréquemment retrouvées, avec une fréquence de 17% pour *Serratia spp* et pour *Klebsiella spp*.

Ce classement est similaire à celui rapporté par l'étude menée par Meki en 2022 dans l'Algérie (Meki, 2022).

Cependant, il convient de noter qu'il existe un décalage entre les pourcentages rapportés dans notre étude et ceux de l'étude de (Meki, 2022) qui rapporte des fréquences d'isolement plus élevées pour *Klebsiella spp* et *Serratia spp*, avec un moindre pourcentage dans notre étude. Cette différence peut être expliquée par plusieurs facteurs.

Tout d'abord, la nature des prélèvements peut jouer un rôle important. Dans l'étude de (Meki, 2022), les prélèvements ont été effectués à partir de différentes sources telles que la surface, les œufs à couver, les fientes et les sujets vivants, ce qui peut influencer la diversité et la fréquence des bactéries isolées. En revanche, notre étude se concentre sur des cas cliniques atypiques spécifiques, ce qui peut conduire à une sélection différente des bactéries identifiées.

De plus, la taille de l'échantillon peut également influencer les résultats. L'étude de (Meki, 2022) a porté sur 580 prélèvements, tandis que notre étude est basée sur seulement 17 cas cliniques. Une plus grande taille d'échantillon peut fournir une représentation plus complète de la diversité bactérienne et des fréquences d'isolement.

Il est donc important de prendre en compte ces facteurs lors de l'interprétation des résultats et de reconnaître que les variations dans les méthodologies d'échantillonnage et les populations étudiées peuvent conduire à des différences dans les pourcentages d'isolement des entérobactéries.

Dans l'étude réalisée sur l'espèce ovine, un total de 7 souches de BGN ont été isolées à partir des matières fécales. Parmi ces souches, 86% ont été identifiées comme étant *Escherichia coli* (*E. coli*), et la deuxième position revient à *Enterobacter aerogenes*. Une étude similaire menée par (Barour et al., 2019) en Algérie a montré un pourcentage de 100% de souches isolées à partir des matières fécales.

La prédominance d'*E. coli* dans ce type de prélèvement s'explique par le fait que cette bactérie fait naturellement partie de la flore intestinale des animaux, y compris des ovins. Elle est rarement responsable d'une infection primaire, mais elle peut devenir pathogène en présence des facteurs déclenchant spécifiques.

Dans la présente étude, un total de 43 souches bactériennes ont été isolées, parmi lesquelles 6 souches de BGN ont été identifiées chez l'espèce bovine, notamment *Serratia*

*spp*, *Enterobacter spp* et *Providencia stuartii*. Ces bactéries sont fréquemment isolées dans les matières fécales des vaches laitières (**Tahar et al., 2020**) . La prédominance de *Serratia spp* et l'absence totale d'*Escherichia coli* (*E. coli*) peuvent être directement liées à un déséquilibre dans le microbiote intestinal des animaux étudiés.

Il convient de noter que seulement 3 échantillons ont été prélevés pour l'espèce bovine dans notre étude. Le faible nombre d'échantillons peut avoir une influence significative sur le nombre de souches isolées et étudiées. Une plus grande taille d'échantillon pourrait fournir une représentation plus complète de la diversité bactérienne présente dans les matières fécales des bovins.

Depuis plusieurs années, l'émergence de la résistance aux antibiotiques constitue un problème majeur tant pour la santé vétérinaire que pour la santé humaine.

Dans notre étude sur l'espèce aviaire, nous avons observé un taux élevé de résistance des bacilles à Gram négatifs aux fluoroquinolones (96%), aux sulfamides (68%) et aux bêta-lactamines (70%). Les phénicolés ont montré un taux de résistance moyen (64%), tandis que les polymyxines ont affiché un taux de résistance de 44%. En revanche, le pourcentage de résistance pour la famille des aminosides était faible (32%).

Ces résultats sont cohérents avec ceux présentés dans l'étude (**Mohamed, 2009**) et (**Khennouchi, 2016**), qui ont également constaté une résistance élevée des bacilles à Gram négatif aux bêta-lactamines, aux sulfamides et aux fluoroquinolones. Cependant, l'étude d'Abbassi et al. (2017) a montré des pourcentages de résistance moyens aux bêta-lactamines et aux aminosides pour les souches de bacilles à Gram négatifs isolées chez les volailles.

Par ailleurs, nos résultats diffèrent de ceux rapportés dans l'étude française (**ALPHA, 2013**), qui a signalé une absence totale de résistance dans la famille des aminosides.

Dans nos résultats, le pourcentage de résistance des BGN à la colistine atteindre un taux moyen (44%), il se rapproche de celui rapporté par (**Blanco et al., 1997**) qui ont montré un taux de 67%.

D'autre part, nous avons observé chez l'espèce ovine que les bacilles à Gram négatifs ont développé une résistance non négligeable aux antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines (AMC, CRO) avec un taux de 57%. En revanche, la fréquence de résistance enregistrée vis-à-vis des polymyxines était de 14%. Ces pourcentages sont supérieurs aux résultats de l'étude

de (Abbassi et al., 2017), qui ont montré un taux de résistance des BGN aux  $\beta$ -lactamines très faible (22,85%).

En ce qui concerne les isolats bovins, nous avons observé une résistance élevée aux  $\beta$ -lactamines (AMC, CRO) avec un taux de 83,5%. Les polymixines, les aminosides et les fluoroquinolones ont également montré un pourcentage moyen de résistance compris entre 50% et 67%. En revanche, des fréquences de résistance plus faibles ont été observées vis-à-vis des phénicolés et des sulfamides, avec des pourcentages allant de 17% à 33%. Nos résultats sont similaires à ceux de l'étude de (Martel, 2000) tandis que l'étude de (Abbassi et al., 2017) a montré des taux de résistance beaucoup plus bas par rapport à nos résultats.

Cette augmentation de la résistance aux antibiotiques dans certaines familles est largement attribuée à l'utilisation abusive, excessive et non réglementée des antibiotiques en médecine vétérinaire, tant à des fins thérapeutiques qu'en tant que promoteurs de croissance et préventifs contre les infections. De plus, le développement de la résistance à la colistine peut s'expliquer par l'émergence de gènes de résistance et la présence de nouveaux variants, comme le démontre l'étude de (Luo et al., 2020b). Ils ont identifié neuf variants de gènes *mcr*, allant de *mcr-1* à *mcr-9*, qui ont été détectés dans différentes espèces d'entérobactéries. Cela suggère une évolution et une adaptation continues des bactéries face à l'exposition aux antibiotiques.

Plusieurs familles d'antibiotiques ont perdu leur efficacité contre les bacilles à Gram négatifs en raison de la présence de réservoirs contenant des gènes de résistance et de multirésistance. La dissémination de ce phénomène est causée par une utilisation incontrôlée des antibiotiques en médecine vétérinaire (David, 2021). Dans notre étude, nous avons observé que 25 isolats (84%) étaient résistants à 3 familles d'antibiotiques ou plus. Ces résultats diffèrent totalement de ceux de l'étude de (Abbassi et al., 2017) qui a montré que 44,2% (77 isolats) étaient résistants à 3 familles d'antibiotiques ou plus. Cette différence peut s'expliquer par le nombre différent d'isolats étudiés et la dissémination des gènes de résistance correspondant aux antibiotiques.

Dans notre étude, parmi les 11 souches suspectes comme des souches productrices des bêta-lactamases, seulement 5 souches ont été positives et considérées comme des BLSE positives, ce qui représente 45% des souches suspectées. Ce pourcentage est largement inférieur à celui rapporté par KRAMER, 2016 sur les animaux d'élevage (avicole, bovine ...etc.) de différentes fermes dont le taux des souches confirmées comme productrices de BLSE est de (70%).

L'apparence des BLSE est liée principalement à l'utilisation excessive, inappropriée, et anarchique des antibiotiques par les éleveurs d'une façon prophylactiques (prévention contre les infections) et pour améliorer le rapport poids/aliment.

L'utilisation intensive d'antibiotiques dans la production animale exerce une pression de sélection simultanée sur les entérobactéries commensales, favorisant ainsi le développement et le maintien de la résistance antimicrobienne chez ces bactéries. La résistance, en particulier aux céphalosporines de troisième génération (C3G), est liée à l'émergence de nouvelles enzymes bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) telles que BES-1, CTX-M-1, PER-1, SFO-1, TLA-1, Toho-1, VEB-1 (**Philippon, 2013**). Cependant, les  $\beta$ -lactamases de type bla SHV, blaTEM et blaCTX-M. sont les plus prédominantes chez les bactéries Gram-négatifs (**Ahmed and Shimamoto, 2011**).

Ainsi, les enzymes de type bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) ont été largement observées chez les animaux d'élevage. Par exemple, en Chine, une souche d'*E. coli* ST162 a été identifiée, présentant à la fois une résistance aux céphalosporines de spectre étendu (BLSE) et au gène de résistance aux colistines (Mcr-1). Cette souche a été détectée dans des aliments destinés à la consommation humaine, ainsi que dans les matières fécales d'animaux d'élevage et de compagnie (**Yang et al., 2018**).

De plus, dans la région de Bordj Bou Arreridj en Algérie, des souches d'*E. coli* multirésistantes ont été récemment identifiées chez des cas de mammite bovine. Ces souches présentent des gènes de résistance contre quatre classes d'antibiotiques différentes, à savoir les  $\beta$ -lactamines, les aminosides, les fluoroquinolones et les tétracyclines (**Tahar et al., 2020**).

Ces résultats indiquent que le choix des antimicrobiens est très limité si ces isolats infectent les animaux ou l'homme. Ainsi, une surveillance stricte de l'antibiorésistance des BGN d'origine animale est nécessaire pour empêcher l'émergence et la propagation des bactéries multirésistantes.

Par ailleurs, il est crucial de souligner que la résistance des bacilles à Gram négatifs (BGN) aux céphalosporines à large spectre et à la colistine pose un grave problème de santé publique. Les céphalosporines sont largement utilisées comme traitement de première intention, tandis que la colistine est considérée comme un traitement de dernier recours. Cette résistance croissante compromet l'efficacité de ces médicaments essentiels dans le traitement

des infections, ce qui limite les options thérapeutiques disponibles et augmente les risques pour la santé humaine et animale(Yousfi et al., 2019).

### Conclusion

La résistance aux antibiotiques est un phénomène qui ne cesse pas à se propager dans l'Algérie et dans le nord d'Afrique.

L'objectif de notre étude est d'évaluer cette résistance aux antibiotiques de dernier recours chez les bacilles à gram négatif isolés de trois espèces animales : la volaille, les ovins et les bovins dans la wilaya de Bordj Bou Arreridj.

Sur les 43 souches isolées, nous avons identifié 38 entérobactéries, principalement d'origine volaille (68%), ovin (17%), et bovin (15%).

L'étude de la sensibilité, *in vitro*, des BGN identifiés vis à vis des antibiotiques a révélé une résistance non négligeable des germes pour quatre familles à savoir : les Bétalactamines, les Fluoroquinolones, les Phénicoles et les Polymyxines.

De plus, nous avons constaté que la résistance aux antibiotiques de dernier recours était la plus élevée chez les bovins, avec un taux de 67%. Ensuite, nous avons détecté un taux de résistance de 44% chez les volailles, tandis que le taux le plus faible a été observé chez les ovins, avec seulement 14% de résistance. Ainsi, 5 souches de BGN ont été confirmées phénotypiquement productrices de BLSE.

Cette étude reste préliminaire en raison de différents facteurs qui ont limité le suivi de la recherche. Parmi ces facteurs, nous pouvons citer le nombre réduit d'échantillons, l'indisponibilité des moyennes et des disques d'antibiotiques, ainsi que la courte durée de réalisation de cette étude. Par conséquent, il est nécessaire de compléter ce travail en augmentant le nombre d'échantillons afin d'inclure un plus grand nombre de souches. Une étude moléculaire est également souhaitée pour déterminer les gènes de résistance et leur support moléculaire dans les souches qui ont déjà été soumises à une étude phénotypique.

- Abbassi, M S, Mohamed Z, El Fekih O, and Noureddine Ben. 2017.** “Journal of Clinical Microbiology and Antimicrobial Resistance in Escherichia Coli Isolates from Healthy Poultry , Bovine and Ovine in Tunisia : A Real Animal and Human Health Threat” 3: 19–23.
- Ahmed, Ashraf M., and Tadashi S. 2011.** “Molecular Characterization of Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria Isolated from Bovine Mastitis in Egypt.” *Microbiology and Immunology* 55 (5): 318–27. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2011.00323.x>.
- Baba Ahmed-Kazi Tani, Z., and G. Arlet. 2014.** “Actualité de La Résistance Aux Antibiotiques Chez Les Bacilles à Gram Négatif En Algérie.” *Pathologie Biologie*. Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2014.01.005>.
- Bardet, L, Stephanie L, Thongpan L, and Jean-marc R. 2018.** “LBJMR Medium : A New Polyvalent Culture Medium for Isolating and Selecting Vancomycin and Colistin-Resistant Bacteria To Cite This Version : LBJMR Medium : A New Polyvalent Culture Medium for Isolating and Selecting Vancomycin and Colistin-Resistant Bacte.” <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1128-x>.
- Barour, Dj, Berghiche A, and Boulebda N. 2019.** “Antimicrobial Resistance of Escherichia Coli Isolates from Cattle in Eastern Algeria.” *Veterinary World* 12 (8): 1195–1203. <https://doi.org/10.14202/VETWORLD.2019.1195-1203>.
- BENKLAOUZ, M BOUTAIBA. 2017.** “Antibiorésistance Des Entérobactéries d’origine Aviaire Au Niveau de l’ouest Algérien.”
- Berghiche, A, Khenenou T, Kouzi A, and Labiad I. 2018.** “An Investigation on the Predominant Diseases, Its Diagnosis, and Commonly Used Drugs in the Poultry Farms in the North-Eastern Regions of Algeria.” <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.986-989>.
- Biomérieux SA. 2010a.** “API-20-NE.Pdf.”
- Biomérieux SA. 2010b.** “Système d’identification Des Enterobacteriaceae et Autres Bacilles à Gram Négatif Non Fastidieux.”
- Biorad. 2006.** “TSI / Gélose ( Triple Sugar Iron ) TSI / Gélose ( Triple Sugar Iron ),” 4–6.
- BIORAD. 2013.** “Disques Pour Antibiogramme,” 1–7.
- Boukerouaz A, Benmehidi R. 2017.** “Profil bactériologique des bactériémies à bacilles gram négatif”. Mémoire d’obtention du diplôme de Master. Université des frères Mentouri Constantine p 25.
- Carle, Sylvie. 2009.** “La Résistance Aux Antibiotiques : Un Enjeu de Santé Publique Important ! Figure Sélection de Souches.” *Pharmactuel* 42: 6–21.
- Cécile Okalla Ebongue, Martial Dongmo Tsi azok, Jean Pierre Nda Mefo’o, Guy Pascal Ngaba, Gérard Beyiha<sup>3</sup>, Dieudonné Adiogo. 2015.** “Evolution de La Résistance Aux Antibiotiques Des Entérobactéries Isolées à l’Hôpital Général de Douala de 2005 à 2012” 8688: 1–11. <https://doi.org/10.11604/pamj.2015.20.227.4770>.
- Cosgrove, Sara E., and Yehuda C. 2003.** “The Impact of Antimicrobial Resistance on Health and Economic

Outcomes.” *Clinical Infectious Diseases* 36 (11): 1433–37. <https://doi.org/10.1086/375081>.

**Denis, F, Marie-C P, Christian M, Bingen É, and Roland Q. 2007.** *Bactériologie Médicale, Techniques Usuelles. Revue Francophone Des Laboratoires*. Vol. 2007. [https://doi.org/10.1016/s1773-035x\(07\)80677-0](https://doi.org/10.1016/s1773-035x(07)80677-0).

**Fraperie P., Lasserre M., (2016).** Gélose Mac Conkey. [En ligne].disponible sur : <https://microbiologiemedicale.fr/gelose-mac-conkey/> (Page consultée le 27/05/2020).

**Friedman, N Deborah, Temkin E, and Yehuda C. 2016.** “The Negative Impact of Antibiotic Resistance.” *Clinical Microbiology and Infection*. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.002>.

**Kramer, opliger A et Julia. 2016.** “Bactéries Résistantes Aux Antibiotiques Dans Les Élevages d ’ Animaux : Risque de Transmission Pour l ’ Éleveur et Essai d ’ Éradication.” *Bulletin de Veille Scientifique* 30: 34–37.

**Luo, Q, Yuan W, and Yonghong X. 2020a.** “Biosafety and Health Prevalence and Transmission of Mobilized Colistin Resistance ( Mcr ) Gene in Bacteria Common to Animals and Humans.” *Biosafety and Health* 2 (2): 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.bsheat.2020.05.001>.

**Luo, Q, Yuan W, and Yonghong X.2020b.** “Prevalence and Transmission of Mobilized Colistin Resistance (Mcr) Gene in Bacteria Common to Animals and Humans.” *Biosafety and Health* 2 (2): 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.bsheat.2020.05.001>.

**Marisa, H, Jouy E, Kempf I, Laurentie M, Lequeux G, Lupo A, Pinsard J-l, Hôpital B, and Le Kremlin-b. 2021.** “Comité de l ’ Antibiogramme de La Société Française de Microbiologie.”

**Marshall, Bonnie M., and Stuart B. Levy C. 2011.** “Food Animals and Antimicrobials : Impacts on Human Health Food Animals and Antimicrobials : Impacts on Human Health” 24 (4). <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-11>.

**Martel, J L. 2000.** “9e CEMI Aspects Pratiques de La Histance En Mhdecine V6thinaire.”

**Meki, B B. 2022.** “Caractérisation Des Souches d’entérobactéries Multirésistantes d’origine Aviaire Au Niveau de l’ouest Algérien,” no. 59.

**Munita, J, and Cesar A. 2016.** “Mechanisms of Antibiotic Resistance,” no. May 2017: 1–24.

**Philippon, A. 2013.** “Les Bêta-Lactamases à Spectre Élargi Ou Étendu (BLSE).” *Immuno-Analyse et Biologie Spécialisee* 28 (5–6): 287–96. <https://doi.org/10.1016/j.immbio.2013.04.006>.

**Tahar, S, Menoueri M. Nabil, Tennah S, Edgarthe P. N, Azzi O, Chadi H, Zerrouki H, Jean M R, and Seydina M. Diene. 2020.** “Molecular Characterization of Multidrug-Resistant Escherichia Coli Isolated from Milk of Dairy Cows with Clinical Mastitis in Algeria.” *Journal of Food Protection* 83 (12): 2173–78. <https://doi.org/10.4315/JFP-20-198>.

**Reiner, K. 2013.** “Catalase Test Protocol,” no. November 2010: 1–9. <http://www.microbelibrary.org/library/laboratory-test/3226-catalase-test-protocol>.

**Yousfi, H, Linda H, Iman D, Rym L, Adil M, Kamel A, Ahlem D, et al. 2019.** “Colistin- and Carbapenem-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Clinical\_isolates: Algeria.” *Microbial Drug Resistance* 25 (2): 258–63. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0147>.

## Annexes

### Annexe 1

- Matériel utilisé :
  - Ecouvillon stérile
  - Pipette pasteur
  - Tubes à essai
  - Lame et lamelle
  - Micropipette
  - Boîtes stériles
  - Boîtes de pétrie
  - Bec bunsen
  - Etuve
  - Microscope
  - Bain marie
- Les Milieux de cultures
  - 1. Milieu de cultures solides
    - ✓ Mac conkey agar) Liofilchem ®; ITALY)
    - ✓ Gélose nutritive (BioKar diagnostics ® ; FRANCE )
    - ✓ Mueller Hinton Agar (BioKar diagnostics ®; FRANCE )
  - 2. Milieu de cultures liquides :
    - Bouillon nutritives (Pronadisa® ; Spain).
    - Eau physiologique (0,9%) (Institut pasteur d'Alger).
- Les teste biochimiques :
  - Api 20 E et Api 20 NE (BIO MÉRIEUX ® ; France)
- Les réactifs
  - Kovacs : (Institut pasteur d'Alger)
  - TDA : (Tryptophane Désaminase) (Institut pasteur d'Alger)
  - Réactif de James
- Galerie classique : (TSI (triple sugar Iron ) ), citrate de Simmons.
- Disques d'oxydase (HIMEDIA® ; India)
- Disques d'antibiotiques : (bio Rad ® ; FRANCE)

## Annexe 2

## Fiches de renseignements

## • Espèce aviaire

N° de prélèvement	Age	région	Utilisation d'ATB dans le traitement	Dernier traitement par ATB
V -1	35 j	El Achir	oui	+15j
V-2	35 j	El Achir	oui	+15j
V-3	39 j	El Ach	oui	+15j
V-4	39 j	Ben-daoued	oui	+15j
V-5	39 j	Ben-daoued	oui	+15j
V-6	35 j	El Achir	oui	-15j
V -7	38 j	El mhir	oui	-15j
V -8	35 j	El mhir	oui	+15j
V -9	14 semaines	Sidi Embarek	non	/
V -10	16 semaines	Sidi Embarek	non	/
V -11	58 semaines	Sidi Embarek	oui	+15j
V -12	58 semaines	Sidi Embarek	oui	+15j
V -13	58 semaines	Sidi Embarek	oui	+15j
V-14	8ème semaine	hasnaoua	non	/
V-15	8ème semaine	hasnaoua	non	/
V-16	35 j	Bordj ghedir	oui	+15j
V-17	38 j	Ain soltan	oui	-15j

## • Espèces Ovine

N° de prélèvement	Age	Région	Sexe M/F	Présence /Non d'autres espèces	Utilisation de la colistine dans le traitement	Dernier traitement par ATB
O-1	Adulte	Ain soltan	F	Non	Non	+ 15j
O-2	Adulte	Ain soltan	F	Non	Non	+15j
O-3	Agneau	EL Achir	M	Oui (bovine /volaille)	Non	/
O-4	Adulte	El Achir	M	Oui (bovine /volaille)	Non	/
O-5	agneau	lachbour	F	Oui (volaille)	Non	/

## • Espèce Bovin

N° de prélèvement	Age	Région	Sexe M/F	Présence /Non d'autres espèces	Utilisation de la colistine dans le traitement	Dernier traitement par ATB
B-1	3ans	Hasnaoua	F	Oui (Ovin/caprin)	non mentionner	+15 jours
B-2	10ans	Hasnaoua	F	Non	non mentionner	+15 jours
B-3	4ans	Ain Taghrout	F	Oui (Volaille/ovin)	non mentionner	+15jours

## Annexes 3

Tableau de lecture API20E

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

**Résumé**

L'augmentation croissante de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram-négatives (BGN) notamment d'origine animale est en train de devenir une crise mondiale critique. L'utilisation intensive d'antibiotiques dans le secteur d'élevage des animaux et dans la médecine vétérinaire conduit rapidement l'émergence de divers gènes de résistance. Ces gènes induisent des mécanismes de résistance multiples qui diminuent l'efficacité des antibiotiques.

Cette étude vise à identifier et évaluer les fréquences des BGN productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu, ainsi que la sensibilité à certaines familles d'antibiotiques d'importance critique, en particulier les antibiotiques de dernier recours tels que la colistine.

Au cours de ce travail, un total de 43 souches de BGN ont été isolées à partir d'échantillons d'origine animale, notamment ovine, bovine et aviaire. Les échantillons prélevés étaient de nature différente : des matières fécales pour les ovins et bovins, collectées dans différentes zones de la wilaya de Bordj Bou Arreridj, et des cas cliniques reçus au laboratoire vétérinaire pour les volailles. Dans ce contexte, nous avons identifié 38 souches, toutes étant des Entérobactéries.

L'étude de la sensibilité des BGN vis-à-vis de sept antibiotiques a été réalisée en utilisant la méthode de diffusion par disques. Les résultats ont révélé des taux de résistance élevé à la plupart des antibiotiques utilisés.

Des taux élevés de résistance ont été observés pour les bêtalactamines AMC/CRO (70 %), les fluoroquinolones OFX (49 %) et les polymyxines COL, tandis que les sulfamides STX (33,6 %), les phénicolés CHL et les aminosides GEN ont affiché des pourcentages de résistance plus faibles (27 %). Parmi les 43 souches isolées, 30 d'entre elles présentaient une résistance multiple. De plus, 5 souches des BGN ont été confirmé phénotypiquement productrices de BLSE.

**Mots clés** : Bacilles Gram-Négatifs (BGN), résistance aux antibiotiques,  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE), colistine, ovins, bovins, aviaire, Algérie.

**Abstract**

The growing incidence of antibiotic resistance in Gram-negative bacilli (BGN), particularly of animal origin, is becoming a critical global crisis. The intensive use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine is rapidly leading to the emergence of various resistance genes. These genes induce multiple resistance mechanisms that reduce the efficacy of antibiotics.

This study aims to identify and evaluate the frequencies of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing BGNs, as well as their susceptibility to certain families of critically important antibiotics, in particular last-resort antibiotics such as colistin.

In the course of this work, a total of 43 BGN strains were isolated from samples of animal origin, including ovine, bovine and avian. The samples taken were of different kinds: faeces for sheep and cattle, collected in different areas of the wilaya of Bordj Bou Arreridj, and clinical cases received at the veterinary laboratory for poultry. In this context, we identified 38 strains, all of which were Enterobacteriaceae.

BGN susceptibility to seven antibiotics was studied using the disk diffusion method. The results revealed high rates of resistance to most of the antibiotics used.

High rates of resistance were observed for betalactam AMC/CRO (70%), fluoroquinolones OFX (49%) and polymyxins COL, while sulfonamides STX (33.6%), phenicoles CHL and aminoglycosides GEN showed lower percentages of resistance (27%). Of the 43 strains isolated, 30 showed multiple resistance. In addition, 5 BGN strains were phenotypically confirmed as ESBL producers.

**Key words:** Gram-negative bacilli (BGN), antibiotic resistance, extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL), colistin, sheep, cattle, avian, Algeria.

## ملخص

أصبحت زيادة مقاومة المضادات الحيوية في البكتيريا سالبة الغرام خاصة من أصل حيواني أزمة عالمية حرجة. يؤدي الاستخدام المكثف للمضادات الحيوية في تربية الحيوانات والطب البيطري بسرعة إلى ظهور جينات مقاومة مختلفة تحفز هذه الجينات آليات مقاومة متعددة تقلل من فعالية المضادات الحيوية.

الغرض من هذه الدراسة هو تحديد وتقييم ترددات البكتيريا المنتجة للبيتا لاكتاماز بالإضافة إلى الحساسية لعائلات معينة من المضادات الحيوية وخاصة الكوليسيتين.

خلال هذا العمل، تم عزل مجموعة تحتوي على 43 سلالة من البكتيريا سالبة الغرام من عينات من أصل حيواني، بما في ذلك الدواجن والأبقار والأغنام. كانت العينات التي تم جمعها ذات طبيعة مختلفة: براز الأغنام والماشية، تم جمعها في مناطق مختلفة من ولاية برج بوعريريج، والحالات السريرية التي تم تلقيها في المختبر البيطري للدواجن. في هذا السياق، حددنا 38 سلالة، جميعها من البكتيريا المعوية

أجريت دراسة حساسية البكتيريا سالبة الجرام لسبعة مضادات حيوية باستخدام طريقة انتشار القرص. أظهرت النتائج مستويات عالية من المقاومة لمعظم المضادات الحيوية المستخدمة حيث لوحظت مستويات عالية لدى البيتا لاكتامين ( الاموكسيسيلين و السيفتريازون) بنسبة %70 و %49 فيما يخص الفلوروكينولون ( الأوفلوغاسين) ، %42 بالنسبة للبوليميكسين ( الكوليسيتين ) وبنسبة أقل %36 للسولفاميدات ( تريمتوبريم سولفاميتو غزاول ) ، %27 للفينيكوليات ( كلورومفينيكول) و الامينوزيدات ( جوناتاميسين).

من بين 43 سلالة المعزولة، كان لدينا 30 بكتيريا حاملة لمقاومة متعددة. بالإضافة إلى ذلك، تم تأكيد ان 5 سلالات من البكتيريا سالبة الغرام قدرة على انتاج البيتا لاكتاماز.

**كلمات مفتاحية :** البكتيريا سالبة الغرام ,مقاومة المضادات الحيوية , بكتيريا منتجة للبيتا لاكتاماز, الكوليسيتين ,

الأغنام ,الأبقار,الدواجن ,الجزائر.