

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE IBN KHALDOUN-TIARET



INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES

## THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat  
en Sciences Vétérinaires

## THEME

**Caractérisation des souches d'entérobactéries  
multirésistantes d'origine aviaire au niveau  
de l'ouest Algérien**

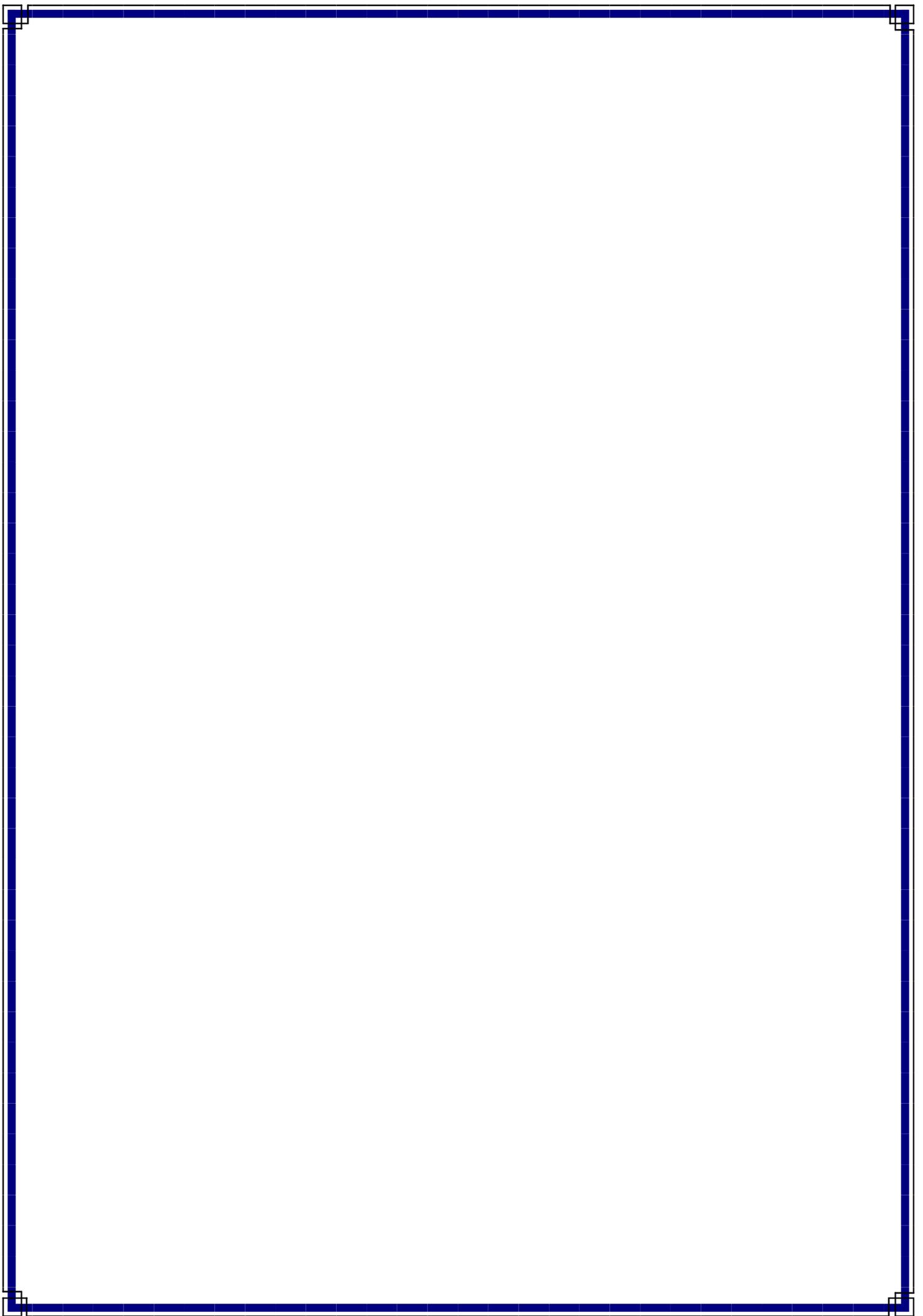
Présentée par :

**Mr BOUTAIBA BENKLAOUZ Meki**

**Devant le jury :**

- Président : Mr ABDELHADI Si Ameer Professeur -Université de Tiaret
- Directeur de thèse : Mr AGGAD Hebib Professeur -Université de Tiaret
- Examineur : Mr BAKKADA Ahmed Professeur - Université de Tissemsilt
- Examineur : Mr AICHOUNI Ahmed Professeur -Université de Tissemsilt
- Examineur : Mr ZIANE Mohamed Professeur -Université d'Ain Temouchent
- Examineur : Mr DERRAR Sofiane MCA -Université de Tiaret

**Année universitaire : 2022/2023**



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ  
الْحَمْدُ لِلَّهِ الَّذِي  
خَلَقَ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضَ  
وَالَّذِي جَعَلَ مِنَ  
النَّارِ سَمُوكًا  
وَالَّذِي جَعَلَ  
الْبُرُوجَ كَأَلْوَانٍ  
مُتَنَوِّعَاتٍ  
وَالَّذِي يَخْتَفِئُ  
بِالنَّجْمِ اللَّائِي  
تَرَى فِيهَا عِزَّةَ  
رَبِّكَ وَكُلَّ  
النَّجْمِ كَالْحَبِّ  
ذَرِينًا  
وَالَّذِي جَعَلَ  
النَّوْمَ وَالنَّوْمَ  
وَالَّذِي جَعَلَ  
النَّوْمَ وَالنَّوْمَ  
وَالَّذِي جَعَلَ  
النَّوْمَ وَالنَّوْمَ

# Dédicaces

*Je dédie ce travail*

*A*

*Mes très chers parents*

*Pour leur amour, leur encouragement et leur soutien sans faille  
Pour leurs nombreux efforts déployés tout au long de mon parcours  
Vous avez su me donner de vraies valeurs dans la vie et un équilibre  
qui m'a permis de réussir.*

*Un grand merci et un profond respect.*

*Mes frères et mes sœurs,*

*Que ce travail les incite à mieux faire  
et qu'il soit un faible témoignage de mon affection  
de leur grand cœur, inoubliables passés ensemble et pour leur  
soutien.*

*Mes cousins et cousines pour leurs encouragements perpétuelles et  
leur soutien moral.*

*Mon meilleur ami Qada pour son soutien permanent et son  
encouragement.*

*A tous mes collègues.*

*A tous ceux qui me sont chers.*

## **REMERCIEMENTS**

*Premièrement, je remercie le bon Dieu, le tout-puissant de m'avoir donné la volonté et la santé pour réaliser ce modeste travail.*

*Mes remerciements s'adressent d'abord,*

**À mon directeur de thèse, professeur AGGAD Hebib :**

*Pour avoir accepté la charge de m'encadrer, me guider et m'orienter tout au long de ces années de thèse. Je le remercie également pour toutes les heures qu'il a consacré pour l'accomplissement de ce travail, pour ses qualités pédagogiques et scientifiques, sa patience, sa disponibilité, sa sympathie et sa gentillesse inestimable.*

*Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma vive admiration et de mon infinie gratitude.*

*Je remercie également le président du jury,*

**Professeur ABDELHADI Si Ameur :** *Professeur à l'institut des sciences vétérinaires de Tiaret, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de thèse et d'évaluer ce travail.*

*Hommage respectueux.*

*Mes remerciements aussi s'adressent aux jurys,*

**Mr BAKKADA Ahmed :** *Professeur à l'université de Tissemsilt ;*

**Mr AICHOUNI Ahmed :** *Professeur à l'université de Tissemsilt ;*

**Mr ZIANE Mohamed :** *Professeur à l'université d'Ain Temouchent ;*

**Mr DERRAR Sofiane :** *Maitre Conférence classe « A » à l'université de Tiaret.*

*Pour l'honneur qu'ils nous font en acceptant de siéger dans notre jury, nous les prions de trouver ici l'assurance de notre vive reconnaissance.*

*Je tiens à remercier aussi,*

**Docteur KEBIR Ahmed :** *l'ex-directeur du laboratoire vétérinaire régional de Mostaganem; de m'avoir accueillie dans son établissement, a mis à ma disposition tout le matériel nécessaire pour la recherche. Je le remercie pour sa collaboration, pour le temps qu'il m'a consacré malgré ses obligations et ses responsabilités. J'exprime également mes plus profonds remerciements à tout le personnel du laboratoire et en particulier **Docteur BENBERNOU Sennia, Docteur SEBAI Ali, Docteur BOUZIRI Abduljalal, et Mme BENKHAMKHAM Naziha,** pour leur précieuse aide, leur gentillesse et leur amitié.*

*Je tiens également à exprimer ma gratitude à tout le staff technique du laboratoire d'hygiène et de pathologie animale à l'institut des sciences vétérinaires –Université de Tiaret- sous la direction du Professeur **AGGAD Hebib,** merci pour son aide et sa collaboration.*

*Un grand merci à Monsieur **ABBASSI Mohamed Salah** professeur assistant en bactériologie à l'institut de recherche vétérinaire –Université d'El Manar-Tunis- qui nous a réalisé la partie relative à la caractérisation moléculaire des souches bactériennes avec*

*une grande générosité et sans aucune contrainte. Je vous exprime ma profonde gratitude et un immense respect pour son aide inestimable.*

*Je voudrais désormais remercier mes collègues intimes Mr **BENAMEUR Qada** enseignant à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem et Mr **BOUZIDI Said** docteur vétérinaire à la direction des services agricoles de Tiaret pour leurs discussions scientifiques et leur ouverture d'esprit.*

*Enfin, je tiens à remercier également,*

*Tous les vétérinaires des inspections vétérinaires des wilayas de : Mostaganem, Mascara, Relizane, Chlef, Tiaret et Tissemsilt, pour leur collaboration, dans la partie initiale de ce travail, par la collection des prélèvements.*

*Merci enfin à tous ce qui ont contribué de près ou de loin à accomplir ce projet de thèse.*

*Merci.....!*

# Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des sigles et abréviations

Résumé en français

Résumé en arabe

Résumé en anglais

**INTRODUCTION** ..... 01

## **PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

### **Chapitre I. Généralités sur les entérobactéries**

1. Définition .....	04
1.2. Historique et taxonomie .....	04
3. Habitat .....	04
4. Classification .....	05
4.1. Tribu des <i>Escherichiae</i> .....	05
4.1.1. Genre <i>Escherichia</i> .....	05
4.1.2. Genre <i>Shigella</i> .....	05
4.1.3. Genre <i>Salmonella</i> .....	05
4.1.4. Genre <i>Citrobacter</i> .....	06
4.1.5. Genre <i>Edwarsiella</i> .....	06
4.1.6. Genre <i>Kluyvera</i> .....	06
4.2. Tribu des <i>Klebsiellae</i> .....	06
4.2.1. Genre <i>Klebsiella</i> .....	06
4.2.2. Genre <i>Entérobacter</i> .....	06
4.2.3. Genre <i>Serratia</i> .....	06
4.3. Tribu des <i>Proteae</i> .....	06
4.4. Tribu des <i>Yersinieae</i> .....	07
5. Caractères bactériologiques .....	07
5.1. Caractères morphologiques .....	07

5.2. Caractères cultureux .....	08
5.3. Caractères biochimiques .....	08
5.3. L'étude des voies métaboliques de la fermentation des sucres .....	08
5.3.2. Fermentation des sucres et des polyalcools.....	09
5.3.3. Production d'un métabolite terminal et recherche d'enzymes .....	09
5.3.4. Culture en utilisant une source de carbone définie .....	10
5.4. Caractères antigéniques .....	10
6. Pouvoir pathogène des entérobactéries en domaine aviaire .....	11
6.1. La colibacillose .....	11
6.2. La salmonellose .....	11

## **Chapitre II. Antibiotiques et antibiorésistance**

1. Antibiotiques .....	12
1.1. Définition .....	12
1.2. Rappel historique .....	12
1.3. Classification .....	13
1.4. Mécanismes d'action.....	14
1.4.1. Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne .....	15
1.4.1.1. Les $\beta$ -lactamines .....	15
1.4.1.1.1. Les pénames (pénicilline) .....	15
1.4.1.1.2. Les céphèmes (céphalosporine) .....	16
1.4.1.1.3. Les monobactames (aztréonam) .....	17
1.4.1.1.4. Les pénèmes (carbapénème) .....	17
1.4.1.2. Les glycopeptides .....	17
1.4.1.3. La fosfomycine .....	17
1.4.2. Antibiotiques avec une action sur la membrane cytoplasmique .....	17
1.4.3. Antibiotiques inhibant la synthèse protéique .....	18
1.4.3.1. Les tétracyclines .....	18

1.4.3.1. Les macrolides .....	18
1.4.3.3. Les aminosides .....	19
1.4.3.4. Les phénicolés .....	19
1.4.4. L'inhibition de la synthèse des acides nucléiques .....	19
1.4.4.1. Les quinolones .....	19
1.4.4.2. La rifampicine .....	20
1.4.5. Antibiotiques qui inhibent une voie métabolique .....	20
2. Résistance aux antibiotiques .....	21
2.1. Définition .....	21
2.2. Relation chronologique entre l'introduction des antibiotiques et l'apparition de résistance .....	21
2.3. Mécanismes biochimiques de la résistance aux antibiotiques .....	22
2.3.1. Altération ou Modification de la cible de l'antibiotique .....	22
2.3.2. Inactivation enzymatique de l'antibiotique .....	23
2.3.3. Imperméabilité aux antibiotiques .....	23
2.3.4. Pompes à efflux .....	23
2.4. Facteur de l'antibiorésistance .....	23
2.5. Impact de l'antibiorésistance .....	24
2.6. Point de situation de l'antibiorésistance dans la filière avicole en Algérie .....	24
2.6.1. Rappel des politiques avicoles mises en œuvre en Algérie .....	24
2.6.2. Consommation d'antibiotiques .....	25
2.6.3. Etat des lieux de la résistance aux antibiotiques en Algérie .....	26
2.7. Prévention .....	26

### **Chapitre III. Déterminants génétiques de la résistance aux antibiotiques**

1. Déterminants génétiques de la résistance .....	28
1.1. Résistance naturelle .....	28

1.2. Résistance acquise .....	28
1.2.1. Résistance chromosomique .....	28
1.2.2. Résistance extra-chromosomique .....	28
1.2.2.1. Les plasmides .....	29
1.2.2.2. Séquences d'insertion et transposons .....	30
1.2.2.3. Les intégrons .....	30
2. Résistance aux $\beta$ -lactamines .....	30
2.1. Mécanismes d'action des $\beta$ -lactamines .....	31
2.2. Mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines .....	31
2.2.1. Résistances non enzymatiques .....	31
2.2.2. Résistances enzymatiques .....	31
2.2.2.1. Mode d'action .....	31
2.2.2.2. Classification des $\beta$ -lactamases .....	32
2.2.2.3. Les $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) .....	33
2.2.2.4. Classification phylogénétique des BLSE .....	34
2.2.2.4.1. BLSE de type TEM .....	35
2.2.2.4.2. BLSE de type SHV .....	35
2.2.2.4.3. BLSE de type CTX-M .....	35
2.2.2.5. Épidémiologie des entérobactéries productrices de BLSE .....	36
3. Résistance aux quinolones .....	37
3.1. Mécanisme d'action des quinolones .....	37
3.2. Mécanismes de résistance aux quinolones .....	37
3.2.1. Diminution de la concentration intracellulaire d'antibiotique .....	38
3.2.2. Inactivation de l'antibiotique .....	38
3.2.3. La protection de la cible .....	39
3.2.4. Modifications de la cible .....	39
3.3. La résistance plasmidique des entérobactéries aux quinolones .....	40

4. Caractérisation des gènes de résistance aux antibiotiques .....	41
4.1. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) .....	41
4.1.1. Généralités .....	41
4.1.2. Historique .....	41
4.1.3. Principe de la technique .....	41
4.1.3.1. Etape de dénaturation .....	42
4.1.3.2. Etape d'hybridation des amorces .....	42
4.1.3.3. Etape d'élongation.....	42
4.1.4. Variantes associées à la PCR .....	43
4.1.4.1. La PCR classique .....	43
4.1.4.2. La PCR multiplex .....	43
4.1.4.3. La PCR en temps réel (PCR quantitative).....	43
4.1.4.4. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) .....	44
4.2. Séquençage .....	44
4.2.1. Historique .....	44
4.2.2. Principe de la technique .....	44

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

### **Chapitre I. Matériel et méthodes**

1. Rappel sur la problématique et les objectifs.....	46
2. Durée et lieu de l'étude .....	46
3. Zone d'étude et populations étudiées .....	47
4. Méthodologie .....	47
4.1. Types de prélèvements .....	47
4.1.1. Prélèvements de surfaces .....	47
4.1.2. Œufs à couver.....	47
4.1.3. Fientes .....	47
4.1.4. Sujets vivants.....	48

4.2. Isolement, purification et identification des entérobactéries.....	48
4.2.1. Isolement des entérobactéries .....	48
4.2.1.1. Etape de pré-enrichissement.....	48
4.2.1.2. Etape d'enrichissement .....	48
4.2.1.3. Etape d'isolement .....	49
4.2.2. Purification des isolats .....	50
4.2.3. Identification des entérobactéries .....	50
4.2.3.1. Identification morphologique .....	50
4.2.3.2. Identification biochimique (Galerie API 20E) .....	50
4.2.3.3. Sérotypage des salmonelles .....	51
4.3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme) .....	51
4.4. Conservation des souches .....	52
4.5. Tests de détection de BLSE .....	52
4.5.1. Test de synergie.....	52
4.5.2. Test de double disque pour confirmation.....	53
4.6. Caractérisation moléculaire des isolats .....	54
4.6.1. Principe.....	54
4.6.2. Protocole.....	54
4.6.2.1. Extraction de l'ADN bactérien .....	54
4.6.2.2. Mélange réactionnel .....	54
4.6.2.3. Détermination des groupes phylogénétiques d' <i>E. coli</i> .....	55
4.6.2.3.1. Interprétation des résultats de la PCR des groupes phylogénétiques .....	57
4.6.2.4. Détermination des gènes de résistance aux antibiotiques .....	57
4.6.2.5. Détection des produits de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose .....	59
4.6.3. Séquençage.....	61

## Chapitre II. Résultats et discussion

1. Caractérisation phénotypique des entérobactéries .....	62
1.1. Souches isolées .....	62
1.2. Sérotypes identifiés des salmonelles .....	63
1.3. Répartition des souches en fonction des prélèvements .....	63
1.4. Résultats de l'antibiogramme .....	65
1.4.1. Antibiorésistance des souches d' <i>E. coli</i> .....	65
1.4.2. Antibiorésistance des souches d'entérobactéries non- <i>E. coli</i> .....	68
1.4.2.1. Antibiorésistance des souches d'entérobactéries non- <i>E. coli</i> prédominantes .....	68
1.4.2.2. Antibiorésistance des souches de <i>Salmonella</i> spp. ....	70
1.4.3. Multirésistance des souches d'entérobactéries .....	73
1.4.3.1. Multirésistance des souches d' <i>E. coli</i> .....	73
1.4.3.2. Multirésistance des souches d'entérobactéries non- <i>E. coli</i> .....	74
1.4.5. Détection des souches BLSE.....	75
1.4.6. Sensibilité des souches productrices de BLSE aux antibiotiques .....	77
2. Caractérisation génotypique des souches BLSE .....	79
2.1. Résultats des groupes phylogénétiques d' <i>E. coli</i> BLSE .....	79
2.2. Résultats de caractérisation génotypique des gènes de résistance aux antibiotiques .....	81
2.2.1. Résultat de l'amplification du gène " <i>bla<sub>TEM</sub></i> " .....	83
2.2.2. Résultat de l'amplification du gène " <i>bla<sub>CTX-M</sub></i> " .....	84
2.2.3. Résultat de l'amplification du gène " <i>qnr</i> " et " <i>aac (6)-Ib-cr</i> " .....	86
2.2.3.1. Gène " <i>qnr</i> " .....	86
2.2.3.2. Gène " <i>aac (6)-Ib-cr</i> " .....	86
<b>CONCLUSION, RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>89</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>93</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>113</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau N°01 :</b> Nature des prélèvements effectués selon l'âge des sujets .....	48
<b>Tableau N°02:</b> Composition du mix pour la réalisation de la PCR .....	55
<b>Tableau N°03 :</b> Les amorces et les conditions d'amplifications utilisées pour la détermination des groupes phylogénétiques d' <i>E. coli</i> .....	56
<b>Tableau N°04:</b> Les composants de la recherche des groupes phylogénétiques et leurs concentrations .....	56
<b>Tableau N°05 :</b> Guide d'interprétation des résultats de PCR .....	57
<b>Tableau N°06 :</b> Amorces, conditions d'amplification et références des gènes de résistance recherchés .....	58
<b>Tableau N°07 :</b> Pourcentages de résistances des souches de <i>Salmonella</i> spp. ....	70
<b>Tableau N°08 :</b> Pourcentage de multirésistance des souches d'entérobactéries non- <i>E. coli</i> .....	74
<b>Tableau N°09 :</b> Interprétation des résultats des groupes phylogénétiques d' <i>E. coli</i> BLSE .....	80
<b>Tableau N°10 :</b> Fréquence des gènes de résistance chez les souches d' <i>E. coli</i> BLSE d'origine aviaire.....	81
<b>Tableau N° 11 :</b> Caractéristiques des souches d' <i>E. coli</i> BLSE.....	82

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure N°01</b> : Structure et aspect microscopique des entérobactériaceae.....	7
<b>Figure N°02</b> : Chronologie de l'introduction des nouvelles classes d'antibiotiques .....	13
<b>Figure N°03</b> : Mode d'action des antibiotiques .....	14
<b>Figure N°04</b> : Chronologie de la découverte des différents antibiotiques et de la première détection d'une souche respectivement résistante à chacun d'entre eux .....	22
<b>Figure N°05</b> : Les trois voies de transmission des résistances bactériennes.....	29
<b>Figure N°06</b> : Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle $\beta$ -lactame.....	32
<b>Figure N°07</b> : Différentes classes de bêta-lactamases selon la classification d'Ambler....	33
<b>Figure N°08</b> : Classification phylogénétique des BLSE .....	34
<b>Figure N°09</b> : Etapes de la PCR.....	42
<b>Figure N°10</b> : Les six wilayas de la zone d'étude.....	47
<b>Figure N°11</b> : Protocole d'isolement et d'identification des entérobactéries .....	49
<b>Figure N°12</b> : Schéma de détection de BLSE par le test de double disque .....	53
<b>Figure N°13</b> : Arbre dichotomique pour déterminer le groupe phylogénétique d'une souche de <i>E. coli</i> .....	55
<b>Figure N°14</b> : Appareil de la PCR (le thermocycleur).....	59
<b>Figure N°15</b> : Appareil UV pour la visualisation et la prise des photos (à gauche) et cuve d'électrophorèse (à droite) .....	60
<b>Figure N°16</b> : Répartition des souches isolées .....	62
<b>Figure N°17</b> : Répartition des souches en fonction des prélèvements .....	63
<b>Figure N°18</b> : Résultat de l'antibiogramme d'une souche d' <i>E. coli</i> .....	65
<b>Figure N°19</b> : Pourcentage de résistance des souches d' <i>E. coli</i> .....	66
<b>Figure N°20</b> : Pourcentage de résistance des souches d'entérobactéries non- <i>E. coli</i> prédominantes .....	68
<b>Figure N°21</b> : Sensibilité des serotypes salmonelliques aux antibiotiques.....	71
<b>Figure N°22</b> : Sensibilité d'une souche de <i>Salmonella kentucky</i> aux antibiotiques .....	72

<b>Figure N°23</b> : Multirésistance des souches d' <i>E. coli</i> .....	73
<b>Figure N°24</b> : Fréquence des souches BLSE .....	75
<b>Figure N°25</b> : Test de synergie positif des souches d' <i>E. coli</i> BLSE (image du bouchon de champagne).....	76
<b>Figure N°26</b> : Test de double disque positif.....	77
<b>Figure N°27</b> : Pourcentages de résistance des souches productrices de BLSE aux différents antibiotiques .....	77
<b>Figure N°28</b> : Gels d'électrophorèse de PCR des gènes des groupes phylogénétiques (A, B1, B2 et D).....	79
<b>Figure N°29</b> : Gels d'électrophorèse de PCR du gène <i>bla</i> <sub>TEM</sub> .....	83
<b>Figure N°30</b> : Gels d'électrophorèse de PCR du gène <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> .....	84
<b>Figure N°31</b> : Gels d'électrophorèse de PCR du gène <i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> .....	85
<b>Figure N°32</b> : Gels d'électrophorèse de PCR du gène <i>aac(6')Ib-cr</i> .....	86

## LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

**A** : Adénine

**aac-(6')-Ib-cr** : aminoside 6-N-acétyltransférase bi-fonctionnelle

**ACT** : *AmpC* Type

**ADC** : Décarboxylase de l'Arginine

**ADH** : Dihydrolase de l'Arginine

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AMC** : Amoxicilline + acide clavulanique

**AM** : Ampicilline

**ANSES** : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

**AFSSA** : Agence française de sécurité sanitaire des aliments

**APEC** : Avian pathogenic *Escherichia coli*

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

**ARN** : Acide ribonucléique

**ARNr** : ARN ribosomique

**ARNt**: Acide ribonucléique de transfert

**ATB** : Antibiotique

**ATCC** : American Type Culture Collection

**BCP**: Bromocrésol pourpre

**BES** : Brazilian extended spectrum

**BLSE** : Béta-lactamase à spectre élargi ou étendu

**C** : Cytosine

**C** : Chloramphénicol

**C°** : Degré Celsius

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

**C1G** : Céphalosporine de 1<sup>ère</sup> génération

**C2G** : Céphalosporine de 2<sup>ème</sup> génération

**C3G** : Céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération

**C4G** : Céphalosporine de 4<sup>ème</sup> génération

**CIP**: Ciprofloxacine

**CLSI**: Clinical and laboratory standard institute

**CMY** : CéphaMYcinase

**CN** : Gentamycine  
**CO2** : Le gaz carbonique  
**CRD** : Maladie respiratoire chronique  
**CT**: Colistine  
**CTX-M**: Céfotaximase-Munich  
**DHA** : **DHA**hran (Arabie Saoudite)  
**DHPS** : Dihydroptéroate synthétase  
**dNTP** : désoxyribonucléotide triphosphate  
**ddNTP** : didéoxyribonucléotides triphosphates  
***E. coli***: *Escherichia coli*  
**EBLSE**: Entérobactéries productrice de bêta-lactamase à spectre étendu  
**EDTA** : Acide éthylène diamine tétra-acétique  
**EGM** : Eléments génétiques mobiles  
**ENR**: Enrofloxacin  
**EPT**: L'eau peptonée tamponnée  
**EUCAST**: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing  
**F**: Forward (brin principal)  
**FAO**: Food and Agriculture Organization  
**FEC** : Fecal *Escherichia Coli*  
**FOX** : Résistance acquise à la cé**FOX**itine  
**FT** : Nitrofurantoïne  
**G**: guanine  
**GES** : Guyana Extended Spectrum  
**GyrA** : Gyrase A  
**GyrB** : Gyrase B  
**H** : Antigène flagellaire  
**H2** : L'hydrogène moléculaire  
**HK** : Hecktoen  
**H2S** : Sulfure d'hydrogène  
**IR** : Séquence Inversée Répétée / Intégrons de résistance  
**IS** : Séquence d'insertion  
**IPA** : Institut Pasteur d'Algérie  
**K** : Antigène capsulaire  
**kb** : kilobases

**LDC** : Décarboxylase de Lysine  
**MADR** : Ministère de l'agriculture et du développement rural  
**MDR**: Multidrug resistance  
**MFS**: Major facilitator superfamily  
**MK**: Mac-conkey  
**N** : Néomycine  
**NA** : Acide nalidixique  
**NaCl** : Chlorure de Sodium  
**NX** : Norfloxacin  
**O** : Antigène de la paroi  
**ODC** : Décarboxylase de l'ornithine  
**OIE** : Office Internationale des Epizooties  
**OMS** : Organisation mondiale de la santé.  
**ONAB** : Office National des Aliments du Bétail  
**O.N.P.G**: Ortho-nitro-phényl - $\beta$ - Galactoside  
**ORAC** : Office régional avicole du Centre  
**ORAVIE** : Office régional avicole de l'Est  
**ORAVIO** : Office régional avicole de l'Ouest  
**OXA** : **OXA**cillinases  
**PABA** : Acide para aminobenzoïque  
**PCR** : Polymérase Chain Reaction  
**PDA** : Décarboxylase de phénylalanine  
**PER** : *Pseudomonas aERuginosa* ou Poirel Esthel Ronco  
**ph** : potentiel hydrogène  
**PLP** : Protéines liants la pénicilline  
**PMQR** : Plasmid mediated quinolone resistance  
**PNAS**: Proceedings of the National Academy of Sciences  
**qepA** : Quinolone efflux pompe A  
**Qnr** : Quinolone résistance  
**qPCR** : PCR quantitative  
**qRT-PCR** : RT-PCR quantitative  
**QRDR**: Quinolone-resistance determining region  
**R** : Reverse (brin complémentaire)  
**RM** : Rouge de méthyle

**RT-PCR** : Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

**SFB**: Bouillon sélénite cystine

**SFO** : *Serratia Fonticola*

**SHV** : Sulfhydryl variable

**SI** : Super-intégron

**Spp** : Espèce

**SXT** : Triméthoprime +sulfaméthoxazole

**T** : thymine

**Taq** : *Thermus aquaticus*

**TBE**: Tampon (Tris, Borate, EDTA)

**TDA** : Tryptophane Désaminase

**TE** : Tétracycline

**TEM**: Temoneira

**TLA** : **TLA**huicas, tribu Inca au Mexique

**UV**: Ultra-violet

**VEB**: Vietnam extended spectrum

**Vi** : Antigène de virulence de certaine salmonelle

**VP**: Voges-Proskauer

**WGS**: Whole genome sequencing

**WHO**: World Health Organisation

**XNL**: Ceftiofur

**Zn<sup>2+</sup>** : Zinc

## RESUME

La résistance aux antibiotiques des entérobactéries d'origine animale connaît une évolution mondiale préoccupante avec un impact croissant des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE), notamment dans les élevages avicoles. Le but de cette étude était d'évaluer la fréquence de résistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries d'origine aviaire et de rechercher les gènes de résistance à certaines familles d'antibiotiques d'importance critique comme les quinolones et les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, au niveau de six régions dans l'ouest Algérien.

L'étude de la sensibilité des souches d'entérobactéries vis-à-vis de quatorze antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion des disques selon les normes de CLSI. La détection des souches productrices de BLSE a été faite par le test de synergie et confirmée par la méthode de double disque.

Les souches confirmées BLSE ont également été analysées par PCR pour la recherche de *bla*<sub>BLSE</sub> (*TEM*, *SHV* et *CTX-M*), des gènes *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*) et du gène *aac* (6')-*Ib-cr*.

Au total, 315 souches d'entérobactéries ont été isolées durant cette étude; les espèces majoritaires étaient réparties comme cela : *Escherichia coli* (*E. coli*) (55,23%), *Proteus* spp. (16,82%), *Enterobacter* spp. (13,33%), *Citrobacter* spp. (3,49%), *Klebsiella* spp. (3,17%), et *Salmonella* spp. (1,9%).

Les souches d'*E.coli* ont présenté des pourcentages alarmants de résistance vis-à-vis de la tétracycline (91,37%) et la plupart des antibiotiques de 1<sup>ère</sup> ligne (NA : 92,52%, AM : 85,05%, CIP : 82,75 %, N : 80,68). Les souches non-*E. coli* ont également présenté des hauts niveaux de résistance à ces antibiotiques.

Des pourcentages de 97,70% et 92,19% des souches d'*E. coli* et non-*E. coli* respectivement ont été trouvés multirésistants aux antibiotiques. En plus, 32 souches (10,15%) de colibacilles ont présenté le phénotype BLSE.

La caractérisation moléculaire a montré la dissémination des gènes suivants : *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M -1</sub>, *bla*<sub>CTX-M -9</sub> et pour la première fois en Algérie le gène *aac* (6')-*Ib-cr* chez les souches d'*E. coli* BLSE d'origine aviaire.

L'instauration d'un plan de surveillance de l'antibiorésistance en pathologie aviaire est de priorité.

**Mots clés :** entérobactéries, antibiorésistance, BLSE, aviculture, Algérie.

## ملخص

مقاومة سلالات بكتيريا الامعاء ذات الاصل الحيواني للمضادات الحيوية تعرف تطورا كبيرا و مثيرا للقلق في جميع انحاء العالم ، و بالخصوص مع الانتشار التصاعدي للبكتيريا المنتجة للبتالكتمالز الواسع المدى ( BLSE ) ، خاصة في مزارع الدواجن. كان الغرض من هذه الدراسة تقييم مستويات مقاومة بكتيريا الامعاء المعزولة عند الدواجن في ست مناطق في غرب الجزائر، كما هدفت الدراسة الي التوصيف الجيني للسلالات المنتجة ل BLSE وهذا من خلال إظهار جينات المقاومة لعائلات المضادات الحيوية الهامة للغاية مثل الكينولونات والجيل الثالث من السيفالوسبورينات. تم تقييم الحساسية ضد أربعة عشر مضاد حيوي عن طريق انتشار الاقراص في وسط هلامي وفقا لمعايير CLSI . كما تم الكشف عن السلالات المنتجة ل BLSE عن طريق اختبار التأزر وأكد ذلك من خلال طريقة القرص المزدوج .

وبعد ذلك تم اختبار هذه السلالات عن طريق البيولوجية الجزئية ( PCR ) للبحث عن الجينات التالية :

. ( *bla* TEM, *bla* SHV, *bla* CTXM, *qnr*(*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*), *aac*(6') *ib-cr* )

بينت نتائج الدراسة على عزل 315 سلالة من البكتيريا المعوية، ابرزها موزعة على الترتيب التالي: الايشيريشيا

القولونية بنسبة 55.23٪، تليها بروتوس 16.82٪، انتيروبيكتر 13.33٪، سيتروبيكتر 3.49٪ ثم كلابسيلا 3.17٪ و سالمونيلا 1.9٪.

ابانت سلالات الايشيريشيا القولونية على نسب مقاومة مقلقة ضد النتراتسيكلين (91,37%) وكذا معظم المضادات

الحيوية من الخط الاول، اهمها: حمض الناليديكسيك (92.52٪)، الأمبيسلين (85.05٪)، السبيروفلوكساسين (82.75٪) و النيوميسين (80.68٪). كما أظهرت السلالات غير الايشيريشيا القولونية ايضا مستويات عالية من المقاومة لنفس المضادات الحيوية المذكورة.

ايضا 97.70٪ و 92.19٪ من سلالات الايشيريشيا القولونية وغير الايشيريشيا القولونية على التوالي كانت متعددة

المقاومة للمضادات الحيوية. كما اكدت دراستنا على وجود نسبة من من سلالات الايشيريشيا القولونية المنتجة للبتالكتمالز الواسع المدى ( BLSE ) تقدر ب 10.15٪ .

كشفت نتائج البيولوجيا الجزئية عند سلالات الايشيريشيا القولونية المنتجة للبتالكتمالز الواسع المدى على انتشار

جينات من نوع CTX-M-1 , CTXM-9 , TEM و للمرة الاولى في الجزائر جين *aac* (6')-*Ib-cr* .

احترام و وضع نظام لمراقبة مقاومة المضادات الحيوية عند الدواجن يعد امرا ذا أولوية قصوى.

**الكلمات المفتاحية :** بكتيريا الأمعاء، مقاومة المضادات الحيوية ، BLSE، تربية الدواجن، الجزائر.

## SUMMARY

The antibiotic resistance of enterobacteriaceae of animal origin knows a worldwide worrying evolution with an increase of the extended spectrum betalactamases (ESBL), notably in poultry breedings. This study aimed to evaluate the frequency of antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae isolates of poultry origin and to investigate the presence of resistance genes to some critically important antibiotics, as quinolones and cephalosporins of 3<sup>rd</sup> generation, in six regions in western Algeria.

For susceptibility testing, disk diffusion method to 14 antimicrobials was used according to CLSI standards. ESBL producing strains were detected by synergy test and confirmed by double disc synergy test.

The confirmed ESBL strains were also analyzed using PCR for the detection of *bla*<sub>ESBL</sub> (SHV, TEM and CTX-M), *qnr* genes (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*) and the *aac* (6')-Ib-cr gene.

A total, 315 Enterobacteriaceae strains were isolated in this study, the predominant species are distributed as follows: *Escherichia coli* (*E. coli*) (55,23%), *Proteus* spp.(16,82%), *Enterobacter* spp.(13,33%), *Citrobacter* spp.(3,49%), *Klebsiella* spp.(3,17%), and *Salmonella* spp.(1,9%).

High levels of resistance of *E. coli* strains were registered to tetracycline (91,37%) and many first ligne antibiotics notably: NA : 92,52%, AM : 85,05%, CIP : 82,75 %, N : 80,68. Non-*E. coli* strains also showed high pourcentages of resistance to the same antibiotics as *E. coli*. Overall, 97.70% and 92.19% of, respectively, *E.coli* and non-*E.coli* strains demonstrated MDR (resistant to at least three antibiotics). In addition, thirty tow *E. coli* isolates (10,15%) were confirmed as ESBL producers.

Molecular characterization results showed the presence of *bla*<sub>ESBL</sub> genes (TEM, CTX-M -1 et CTX-M -9) or for the first time in Algeria the *aac* (6')-Ib-cr gene in ESBL *E. coli* strains of avian origin.

The establishment of a monitoring program to reduce this increasing antimicrobial resistance in avian pathology is a priority.

**Keywords:** enterobacteriaceae, antimicrobial resistance, ESBL, poultry, Algeria.

# **INTRODUCTION**

# INTRODUCTION

---

## INTRODUCTION

L'aviculture est indéniablement la branche des productions animales qui a enregistré le développement le plus remarquable ces dernières années. Le secteur de l'aviculture continu à se développer et à s'industrialiser dans de nombreuses régions du monde (FAO, 2015).

En Algérie, Durant les trois dernières décennies, la filière avicole a connu l'essor le plus spectaculaire parmi les productions animales grâce aux importants investissements consentis par les secteurs privés et publics. L'offre en viandes blanches est passée de 95 000 à près de 300 000 tonnes entre 1980 et 2010, soit une progression de +212 % en 30 ans (MADR, 2011); et en 2017, a atteint 5,3 millions de quintaux, contre 2,092 en 2009, soit une augmentation de 153% (MADR, 2017).

Néanmoins, les performances techniques d'élevage enregistrent clairement un retard considérable comparant par les pays développés ; ce qui a crié beaucoup d'obstacles à la filière avicole surtout par l'émergence de pathologies diverses qui portent atteinte à la qualité du produit et la rentabilité économique, notamment celles causées par les entérobactéries. La colibacillose et la salmonellose, deux pathologies majoritaires causées par *Escherichia coli* (*E.coli*) et *Salmonella* spp. respectivement, représentent à l'heure actuelle les causes les plus importantes des pertes économiques dans le secteur avicole et constituent l'un des motifs de saisie les plus fréquents à l'abattoir.

Devant cette situation inquiétante, les aviculteurs ont toujours fait recours aux antibiotiques non seulement dans un contexte curatif mais aussi dans un contexte préventif et comme facteurs d'amélioration des performances zootechniques. Cependant leur utilisation massive voire abusive peut engendrer de nombreux problèmes au premier rang desquels la sélection de bactéries résistantes. Les résistances aux antibiotiques ont émergé rapidement et se sont propagées essentiellement par transferts horizontaux de gènes entre les bactéries ainsi que par la diffusion de bactéries devenues résistantes entre individus de même espèce et entre humains, animaux et environnement (Schmieder et Edwards, 2012; Von Wintersdorff *et al.*, 2016); ce qui constitue parfois des véritables impasses thérapeutiques, dont la fréquence augmente même dans les pays à revenu élevé (Unemo et Nicholas, 2012).

La résistance aux antibiotiques est devenue un risque de santé publique global touchant à la fois la santé humaine et la santé animale. A cet effet, elle est identifiée par l'organisation mondiale de la santé (OMS) comme l'une des menaces les plus sérieuses pour la santé publique.

## INTRODUCTION

---

Au cours de ces dernières années, Les résistances bactériennes aux antibiotiques atteignent désormais des niveaux dangereusement élevés dans les différentes régions du monde ; il est difficile d'avoir une vision claire et partagée de leur épidémiologie en raison de données dont la qualité et l'accessibilité sont très variables (Coignard, 2019). Ces résistances ont été rencontrées principalement chez différentes espèces d'entérobactéries, dont *E. coli*, qui sont résistantes à plusieurs antibiotiques à la fois (multirésistantes) voire quasiment résistantes à tous les antibiotiques prescrits (Chaudhary, 2016).

En Algérie, beaucoup de travaux ont montré la dissémination des souches d'*E. coli* multirésistantes en élevages avicoles (Hammoudi et Aggad, 2008; Aggad *et al.*, 2010; Benameur *et al.*, 2014; Benameur *et al.*, 2016; Halfaoui *et al.*, 2017) et de *Salmonella* spp. (Elgroud, 2009 ; Djefal *et al.*, 2017 ). Cependant, très peu de données publiées sont disponibles sur la résistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries d'origine aviaire autres que *E. coli* et *Salmonella* spp..

Sont considérés comme antibiotiques d'importance critique en médecine vétérinaire, les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> génération (C3G/C4G) et les fluoroquinolones, ils s'appellent aussi des classes de molécules d'intérêt, grâce à leur place dans l'usage thérapeutiques en première intention contre les infections graves chez l'être humain (ANSES, 2014).

L'OMS a dressé une liste d'agents pathogènes pour lesquels les phénomènes de résistance posaient un enjeu critique en santé humaine afin d'orienter les recherches. Dans cette liste, on retrouve principalement la famille des entérobactériaceae (*Klebsiella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Providencia* et *Morganella*). (WHO, 2017).

Dans le cadre des plans de surveillance de l'OMS, certains mécanismes de résistance chez les entérobactéries font l'objet d'une surveillance ciblée. Il s'agit des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE) chez les entérobactéries qui ont la capacité de détruire différentes classes de  $\beta$ -lactamine dont les C3G. Ce mécanisme de résistance est souvent associée à la résistance aux fluoroquinolones et d'autres familles d'antibiotiques (Iabadene *et al.*, 2010).

L'un des déterminants génétique de la résistance plasmidique des entérobactéries aux fluoroquinolones est le gène *qnr*, dont la caractéristique principale est d'être portée par un intégrom de classe 1 extrêmement mobile entre différents plasmides. La particularité de ce support génétique est son caractère transférable et sa capacité à accélérer la diffusion de la résistance aux fluoroquinolones par le biais du transfert de gènes plasmidiques (Robicsek *et*

## INTRODUCTION

---

*al.*, 2005). Ce nouveau mécanisme fait redouter une diffusion extrêmement rapide de type épidémique de la résistance aux fluoroquinolones (Paauw *et al.*, 2004).

En effet, ces dix dernières années ont été marquées par l'émergence et la dissémination des gènes de résistance à ces deux familles d'antibiotiques en médecine humaine (Meradi *et al.*, 2011 ; Gharout-Sait *et al.*, 2012) et vétérinaire (Meguenni *et al.*, 2015 ; Belmahdi *et al.*, 2016; Chabou *et al.*, 2017) en Algérie.

La problématique de la multirésistance et de la dissémination de la résistance aux antibiotiques est globale. Elle doit tenir compte du mésusage d'antibiotiques en médecine humaine, vétérinaire et de la contamination via les êtres vivants, par des antibiotiques, de bactéries résistantes et des gènes de résistance dans l'environnement. À souligner que, la résistance aux antibiotiques n'est pas spécifique aux bactéries responsables d'infections. Elle touche également les bactéries des flores commensales qui constituent le microbiome des individus vivants. D'où la nécessité de mieux comprendre comment les bactéries résistantes et les gènes de résistance se disséminent globalement, et comment ces bactéries peuvent remplacer les bactéries sensibles.

Aussi, la présente thèse a été une contribution à l'étude de la fréquence de résistance et de multi-résistance des entérobactéries d'origine aviaire dans l'ouest Algérien et la mise en évidence des gènes de résistance aux C3G et aux quinolones.

La première partie du manuscrit a été consacrée à une synthèse bibliographique portant sur des généralités sur les entérobactéries, les antibiotiques et l'antibiorésistance et les déterminants génétiques de la résistance aux antibiotiques. La seconde partie, organisée en deux chapitres : matériels et méthodes et résultats et discussion ; elle s'articule autour de deux axes principaux :

Dans un premier volé, nous avons étudié le profil de résistance aux antibiotiques des entérobactéries d'origine aviaire dans l'ouest Algérien ; la fréquence de multi-résistance a été également évaluée.

Dans un second volé, nous nous sommes focalisés à la détection des souches productrices de BLSE. En outre, La recherche des gènes de résistance aux quinolones (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS* et *aac (6')-Ib-cr*) et aux C3G (CTX-M du groupe 1, 2, 8, 9 et 25, TEM et SHV) a été également réalisée.

Enfin, la conclusion et les perspectives ultérieures de nos résultats ont été présentées.

**PARTIE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

**Chapitre I.**  
**Généralités sur les**  
**Entérobactéries**

## Chapitre I. Généralités sur les entérobactéries

### 1. Définition :

Les entérobactéries sont définies par un ensemble de caractères généraux communs. Ce sont des bacilles à Gram négatif, dont les dimensions varient de 6 µm de long et 0,3 à 1 µm de large, Ces dimensions varient suivant l'âge de la culture, l'espèce, la souche. Certaines espèces peuvent être très polymorphes, notamment le genre *Proteus*.

Elles sont non sporulés, le plus souvent mobiles, mais immobiles dans le cas des bactéries des genres *Klebsiella*, *Shigella* et *Yersinia*.

Elles sont aérobies-anaérobies facultatives et elles peuvent être cultivées sur les milieux ordinaires.

Elles fermentent le glucose avec ou sans production de gaz et réduisent les nitrates en nitrites (sauf certaines souches d'*Erwinia* et *Yersinia*).

Elles n'ont pas d'oxydase et possèdent une catalase (sauf *Shigella dysenteriae* sérotype 1). Ces caractères permettent de différencier les entérobactéries des autres bacilles à Gram négatif pouvant être cultivés sur des milieux ordinaires (Avril *et al.*, 2000 ; Joly et Reynaud, 2002).

### 2. Historique et taxonomie :

Les entérobactéries constituent un grand groupe de bactéries ayant une forte similitude. La création de ce groupe a été proposée par Rahn en 1937 qu'il dénomma entérobactériaceae et dans lequel il rassembla les genres bactériens déjà décrits (tels que *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Shigella*) dans le genre unique *Entérobacter*. Les entérobactéries sont des Eubactéries, appartiennent à la division des Protéobactéria, la classe des Gammaprotéobactéria, à l'ordre des Entérobactériales et à la famille des Entérobactériaceae. La subdivision des genres et espèces est basée sur la comparaison des caractéristiques physiologiques, biochimiques, antigéniques et génétiques des bactéries. Le séquençage des gènes codant pour l'ARNr 16S et surtout des gènes codant l'ARN polymérase B permet en effet une identification très précise de toutes les espèces (Joly et Reynaud, 2002).

### 3. Habitat :

Les entérobactériaceae sont nommées ainsi parce que la plupart des espèces qui composent cette famille sont des hôtes normaux ou pathogènes du tube digestif de l'homme et des animaux. On les trouve aussi dans la cavité buccale, au niveau des voies aériennes supérieures et sur les organes génitaux. Ils peuvent persister en dehors d'organismes vivants,

on les rencontre dans le sol, l'eau et dans certaines denrées alimentaires (Fauchere et Avril, 2002).

#### 4. Classification :

Une centaine d'espèces d'entérobactériaceae sont individualisées, mais 23 d'entre elles représentent 99% des souches isolées en clinique (Avril *et al.*, 2000).

Les entérobactéries qui intéressent la bactériologie médicale peuvent être regroupées en quatre tribus (Carbonnelle *et al.*, 1987):

. Tribu des *Escherichiae*;

. Tribu des *Klebsiellae*;

. Tribu des *Proteae*;

. Tribu des *Yersiniae*

Ces différentes tribus peuvent être individualisées en genres, en espèces, en sérogroupes, en sérotypes.

##### 4.1. Tribu des *Escherichiae* :

Ce groupe défini par des caractères négatifs, comprend 4 genres principaux : *Esherichia*, *Shigella*, *Salmonella* et *Citrobacter*. Les genres *Edwarsiella*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Moellerella* et *Yokenella* qui possèdent les caractères biochimiques de définition de cette tribu sont rarement retrouvés.

##### 4.1.1. Genre *Escherichia* :

Ce genre ne comporte qu'une seule espèce *E. coli* intéressante en bactériologie médicale et qui est l'espèce la plus fréquemment isolée dans le laboratoire de bactériologie. Les autres espèces sont : *E. albertii*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, et *E. vulneris*.

##### 4.1.2. Genre *Shigella* :

Ce genre comprend quatre espèces correspondant à quatre séro-groupe A, B, C, D pouvant comporter un ou plusieurs sérotypes : groupe A (*S. dysenteriae*) avec dix sérotypes ; groupe B = *S. flexnerie* avec six sérotypes ; groupe C = *S. boydii* avec quinze sérotypes et groupe D = *S. sonnei* avec un seul sérotype.

##### 4.1.3. Genre *Salmonella* :

Il s'agit d'un très vaste groupe bactérien comportant plus de 2000 sous espèces. Ce genre est divisé en cinq sous-genres, le sous genre 1 étant celui isolé le plus souvent chez l'homme. Les autres étant retrouvés chez les animaux à sang froid.

Depuis 2005, une nouvelle nomenclature est en vigueur sur le plan international (Tindall *et al.*, 2005). Elle fait suite aux études moléculaires (hybridations ADN-ADN) qui

ont révélé la présence de seulement deux espèces dans le genre *Salmonella* (*S. enterica*, espèce majoritaire et *S. bongori*, espèce rare).

- *S. enterica* est elle-même subdivisée en six sous-espèces : *enterica* (l'ancien sous-genre I de Kauffmann), *salamae* (l'ancien sous-genre II), *arizonae* (les souches monophasiques de l'ancien sous-genre III), *diarizonae* (les souches diphasiques de l'ancien sous-genre III), *houtenae* (l'ancien sous-genre IV) et *indica*.

- L'espèce *bongori* et les différentes sous espèces d'*enterica* sont ensuite subdivisées sur la base du sérotypage en de très nombreux sérotypes (François, 2009).

Du point de vue médical, il convient de distinguer deux grands groupes chez salmonelles : les salmonelles majeures, agents de la fièvre typhoïde et des fièvres paratyphoïdes (*S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B*, *S. paratyphi C*) et tous les autres sérotypes « mineurs » responsables d'intoxications alimentaires, de gastro-entérites ou d'infections septicémiques de type opportuniste.

#### 4.1.4. Genre *Citrobacter* :

Ce genre est composé de trois espèces : *C. freundii*, *C. amalonaticus* et *C. diversus*.

#### 4.1.5. Genre *Edwardsiella* :

Ce genre ne compte qu'une seule espèce en bactériologie médicale : *E. tarda*.

#### 4.1.6. Genre *Kluyvera* :

Il s'agit d'un genre de création récente. Il existerait au moins trois espèces dont deux ont actuellement une dénomination précise : *K. ascorbata*, *K. crycrescens*.

### 4.2. Tribu des *Klebsiellae* :

Cette tribu comporte trois genres *Klebsiella*, *Entérobacter* et *Serratia*.

#### 4.2.1. Genre *Klebsiella* :

Ce genre est composé de quatre espèces *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. rhinoscleromatis* et *K. ozenae*.

#### 4.2.2. Genre *Entérobacter* :

Il est composé de six espèces : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. hafniae*, *E. agglomerans*, *E. gergoviae* et *E. sakazakii*.

#### 4.2.3. Genre *Serratia* :

Il est composé de cinq espèces : *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *S. rubidea*, *S. plymuthica* et *S. odorifera*.

### 4.3. Tribu des *Proteae* :

Elle comporte actuellement trois genres regroupant six espèces :

- ***Proteus*** : *P. mirabilis*, *P. vulgaris* et *P. alcalifaciens*.

- *Providencia* : *P. stuartii* et *P. rettgeri*
- *Morganella* : *M. morganii*.

#### 4.4. Tribu des *Yersiniea* :

Elle comporte sept espèces : *Y. pestis*, *Y. ruckerii*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. intermedia*, *Y. fredericksonii*, *Y. kristensenii*.

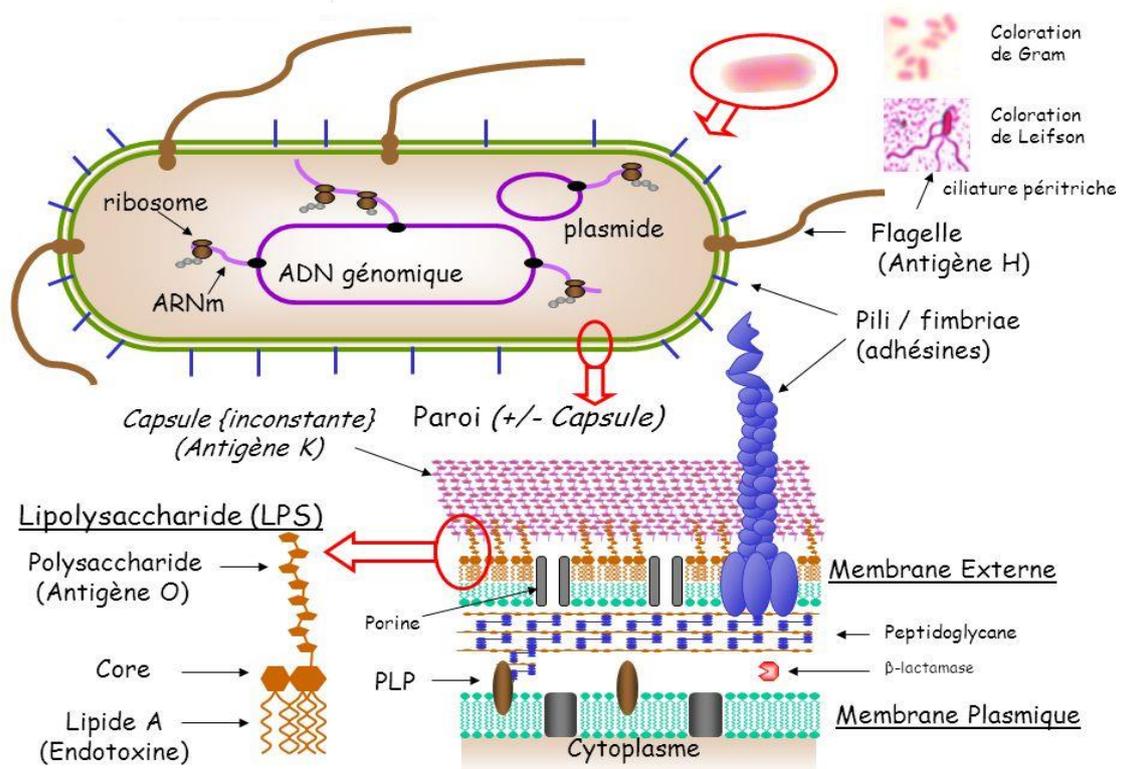
### 5. Caractères bactériologiques :

#### 5.1. Caractères morphologiques :

Toutes les entérobactéries ont une morphologie habituellement typique de type bacilles à Gram négatif de 2-3  $\mu$  de long sur 0,6  $\mu$  de large, généralement polymorphes.

Les espèces mobiles sont les plus nombreuses grâce à une ciliature péritriche. Certaines sont immobiles (*Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia pestis*). La présence d'une capsule visible au microscope est habituelle chez les *Klebsiella*. La plupart des espèces pathogènes pour l'homme possèdent des fimbriae ou pili qui sont des facteurs d'adhésion (Drame, 2001).

La structure des entérobactéries est montrée dans la figure N°01.



**Figure N°01** : Structure et aspect microscopique des entérobactériaceae (Denis *et al.*, 2007).

**5.2. Caractères cultureux :**

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 bombées et rondes à bord net, leur surface est lisse et brillante, il s'agit des formes S « smooth ». Après repiquage en bouillon des colonies S, la culture se traduit par un trouble homogène sur toute la hauteur du tube.

Après plusieurs repiquages d'une souche en phase S, les colonies deviennent rugueuses, sèches, plates, leur contour est irrégulier, leur teinte mate, il s'agit des formes R « rough ».

En bouillon elles donnent une culture dont l'aspect est granuleux après agitation et elles forment des agglutinats spontanés qui sédimentent, elles sont auto-agglutinables dans une suspension en eau salée (2 % de NaCl) (Joly et Reynaud, 2002).

Les colonies des bactéries produisant une capsule, notamment de *Klebsiella pneumoniae*, sont muqueuses et plus grandes que les colonies habituelles (leur diamètre peut atteindre 10 mm), elles ont une consistance gélatineuse. Dans le cas des espèces *Proteus vulgaris* et *Proteus mirabilis* qui sont particulièrement mobiles, il se produit fréquemment un envahissement de la surface des milieux solides qui s'étend par vagues successives et peut gagner en 24 heures la totalité de la surface (Joly et Reynaud, 2002).

Il existe cependant des entérobactéries ayant une croissance faible dont les colonies restent très petites (colonies naines). Il s'agit d'une exigence en un ou plusieurs facteurs de croissance. Pour d'autres bactéries la croissance est lente, les colonies de taille normale ne sont obtenues qu'après plusieurs jours d'incubation, c'est le cas de certaines espèces des genres *Shigella* et *Yersinia*. Pour ces dernières par exemple une incubation d'au moins 48 heures à 37°C est nécessaire (Joly et Reynaud, 2002 ; Bidet et Bingen, 2007).

Les entérobactéries sont des chimio-organotrophes, beaucoup sont prototrophes : à partir d'une source unique de carbone (sucre, ...) et d'énergie (électrons), elles sont capables de synthétiser tous les éléments nécessaires à leur survie et à leur croissance (Avril *et al.*, 2000).

**5.3. Caractères biochimiques :**

L'identification des différents genres et espèces repose sur plusieurs caractères biochimiques (Joly et Reynaud, 2002).

**5.3.1 Étude des voies métaboliques de la fermentation des sucres :**

Les entérobactéries sont des micro-organismes anaérobies facultatifs, c'est-à-dire que leur métabolisme peut être transféré de la respiration vers la fermentation lorsque leur environnement est privé en oxygène moléculaire (conditions anaérobies).

Les deux voies fermentaires essentielles sont :

- Fermentation des acides mixtes, les sucres sont fermentés en acides mixtes. Chez certaines espèces il y a formation de métabolites supplémentaires tels que le gaz carbonique (CO<sub>2</sub>), l'hydrogène moléculaire (H<sub>2</sub>) et éthanol. Cette voie est notamment empruntée par les genres *Escherichia*, *Salmonella* et *Shigella*. Les bactéries utilisant ce métabolisme sont repérables grâce à la réaction au rouge de méthyle (RM).
- Fermentation butanediolique, la fermentation des sucres se traduit par la production de l'acétoïne. Cette voie est notamment empruntée par les genres *Klebsiella*, *Enterobacter* et *Serratia*. Les bactéries l'utilisant sont repérables grâce à la réaction de Voges-Proskauer (VP) qui permet la détection spécifique de l'acétoïne.

### 5.3.2. Fermentation des sucres et des polyalcools :

Ce métabolisme est étudié en eau peptonée additionnée d'un indicateur de pH (bleu de bromothymol ou rouge de phénol). La fermentation produit des acides qui entraînent le virage de l'indicateur par acidification.

### 5.3.3. Production d'un métabolite terminal et recherche d'enzymes :

Certaines réactions enzymatiques aboutissent à la production de métabolites qui sont identifiables grâce à une réaction spécifique, par exemple :

- Production d'indole à partir du L-tryptophane grâce à une tryptophanase.
- Production d'hydrogène sulfuré (H<sub>2</sub>S) à partir du thiosulfate grâce à une thiosulfate réductase.
- Production de gaz par une hydrogène lyase. Après action des bactéries sur un substrat, l'enzyme impliquée est détectée par la mise en évidence du substrat modifié ou d'un changement de la coloration initiale du milieu de culture, par exemple :
  - Bêta-galactosidase révélée par acidification du milieu (ONPG).
  - Décarboxylases de la lysine (LDC) et de l'ornithine (ODC), transformées respectivement en cadavérine et putrescine, décarboxylase (ADC) et dihydrolase (ADH) de l'arginine, révélées par alcalinisation du milieu.
  - Désaminases de la phénylalanine (PDA) et du tryptophane par tryptophane désaminase (TDA) qui les transforment respectivement en acide phénylpyruvique et en acide indolpyruvique dont la présence dans le milieu est révélée par le perchlorure de fer qui donne un précipité brun.
  - Uréase qui produit à partir de l'urée du carbonate d'ammonium révélé par alcalinisation du milieu.

#### 5.3.4. Culture en utilisant une source de carbone définie :

C'est un test d'assimilation, possible seulement avec des bactéries prototrophes. Cette étude permet de rechercher leur capacité à cultiver dans un milieu minimal synthétique dans lequel la substance carbonée est unique et définie. L'utilisation du citrate de sodium comme source de carbone est la recherche la plus courante.

L'identification présomptive repose sur la coloration des colonies associée à l'examen direct par coloration de Gram complétée par des tests biochimiques.

#### 5.4. Caractères antigéniques :

L'étude des différents caractères antigéniques permet de classer en sérotypes les souches appartenant à une même espèce ou au même genre. La détermination des sérotypes a un grand intérêt épidémiologique pour certaines entérobactéries pathogènes comme *Salmonella*, *Shigella* et *E. coli* (Avril *et al.*, 2000).

Il existe plusieurs types d'antigènes :

- **Antigène commun** : Cet antigène, appelé « antigène de Kunin » est présent chez toutes les entérobactéries sauf certaines *Erwinia*. Il est généralement sous forme hapténique, non immunogène, mais il a cependant la capacité de sensibiliser les hématies. Sa forme immunogène existe chez de rares souches dont *E. coli* O : 14 (Joly et Reynaud, 2002).
- **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 (Fauchere et Avril, 2002).
- **Antigène H ou flagellaire** : Il n'existe que chez les bactéries mobiles. L'antigène H est constitué de la protéine flagelline, il est thermostable et inactivé par l'alcool. En présence d'anticorps, l'agglutination est floconneuse, lâche et facilement dissociée par agitation (Fauchere et Avril, 2002; Bidet et Bingen, 2007).
- **Antigène K ou capsulaire** : Cet antigène est généralement constitué d'une couche externe polysaccharidique ou protéique. Parmi les antigènes K, se trouvent les antigènes L, A, B d'*E. coli* et l'antigène Vi de certaines *Salmonella* ou *Citrobacter*. Ces antigènes peuvent rendre la souche inagglutinable pour les antisérums O. Ils sont détruits par une ébullition de deux heures. Les antigènes d'adhérences, de nature protéique, en relation avec la présence de pili sont classés parmi les antigènes K (Bidet et Bingen, 2007).

## 6. Pouvoir pathogène des entérobactéries en domaine aviaire :

Généralement, deux pathologies causées par deux espèces majoritaires (*E.coli* et *Salmonella* spp.) qui peuvent engendrer des pertes économiques considérables chez les volailles, en l'occurrence la colibacillose et la salmonellose.

### 6.1. La colibacillose :

La colibacillose aviaire est une des maladies les plus fréquentes en élevage de volaille, avec une recrudescence des cas dans les dernières années ; cette pathologie est causée par certains sérotypes, de haute pathogénicité, de l'espèce *E.coli* appelés « *Avian Pathogenic E. coli* » ou *APEC* (sérotypes majoritaires : O1, O2 et O78), sont associées au syndrome de la colibacillose, dont les lésions et les manifestations peuvent être variables suivant l'âge de l'animal (infection de la vésicule vitelline, colisepticémie, maladie respiratoire chronique ou CRD, salpingite, péritonite, affection chronique de la peau, « swollen-head disease », ostéomyélite) (Stordeur et Mainil, 2002).

L'évolution perpétuelle de cette maladie entraîne une utilisation importante d'antibiotiques, générant des risques d'antibiorésistance, ainsi que des pertes économiques importantes en élevage.

### 6.2. La salmonellose :

Les salmonelles responsables de la salmonellose aviaire sont deux principaux sérotypes : *S.gallinarum* (la typhose) et *S. pullorum* (la pullorose). La pullorose est une salmonellose aiguë touchant les jeunes poussins ; la maladie se traduit par une atteinte plus ou moins importante de l'état général associée à une diarrhée blanche, crayeuse et collante ; il y a développement d'une septicémie rapide qui peut causer une très forte mortalité. Des formes subaiguës ou chroniques peuvent également survenir, avec des atteintes localisées (Shivaprasad, 2003). La typhose est une salmonellose aiguë touchant uniquement les adultes, qui se traduit par une importante atteinte de l'état général, une cyanose des appendices, une diarrhée verdâtre et hémorragique, une atteinte respiratoire et parfois des symptômes nerveux. Des formes chroniques peuvent également survenir, et sont généralement la conséquence d'une pullorose. (Villate, 1997).

A côté de ces deux sérotypes précédents, il existe d'autres: *S. entéritidis* et *S. typhimurium*, ces sérotypes sont doués de pouvoir de résistance dans le milieu extérieur : 2 ans dans les fientes à l'abri des rayons solaires, 9 mois dans le sol et plusieurs mois dans l'eau et la boue ; ces deux sérotypes sont considérés parmi les principaux sérotypes de salmonellose transmise de l'animal à l'homme dans la plupart des régions du monde (OMS, 2018).

**Chapitre II.**  
**Antibiotiques et**  
**antibiorésistance**

## Chapitre II. Antibiotiques et antibiorésistance

### 1. Antibiotiques :

#### 1.1. Définition :

Sur la base de l'étymologie du mot « antimicrobien » (du grec anti : contre, mikros : petit et bios: vie), on définit un composé de ce type comme toute substance capable d'agir contre la vie des micro-organismes. Le mot antibiotique (du grec anti : contre, biotikos : concernant la vie) utilisé pour la première fois en 1889, en référence à une substance synthétisée par un organisme pour en détruire un autre, se précisera plus tard, comme une substance chimique produite par un microorganisme et disposant en solution diluée de la capacité d'inhiber sélectivement la croissance voir même de détruire d'autres micro-organismes (Muylaert et Mainil, 2012).

#### 1.2. Rappel historique :

En 1897, le médecin français Ernest Duchesne a découvert l'action neutralisante d'une moisissure (*Penicillium glaucum*) sur plusieurs cultures bactériennes durant l'un de ses travaux de recherches.

Grâce aux travaux d'Alexander Flemming, la découverte des premiers antibiotiques a été publiée. Il a remarqué, en 1928, qu'une colonie de *Penicillium notatum* empêchait la prolifération des staphylocoques. Il a, alors, isolé la substance antibactérienne synthétisée par le champignon, et a décidé de la nommer « pénicilline ». Il avait découvert l'action antibiotique de cette substance, mais n'avait pas réussi à la purifier. En 1939, Ernest Chain (biochimiste) et Howard Florey (pharmacologue) y sont parvenus, et ont obtenu de la pénicilline pure. En 1945, ces trois hommes ont obtenu le prix Nobel de physiologie et de médecine pour la découverte de la pénicilline et de ses effets curatifs dans diverses maladies infectieuses.

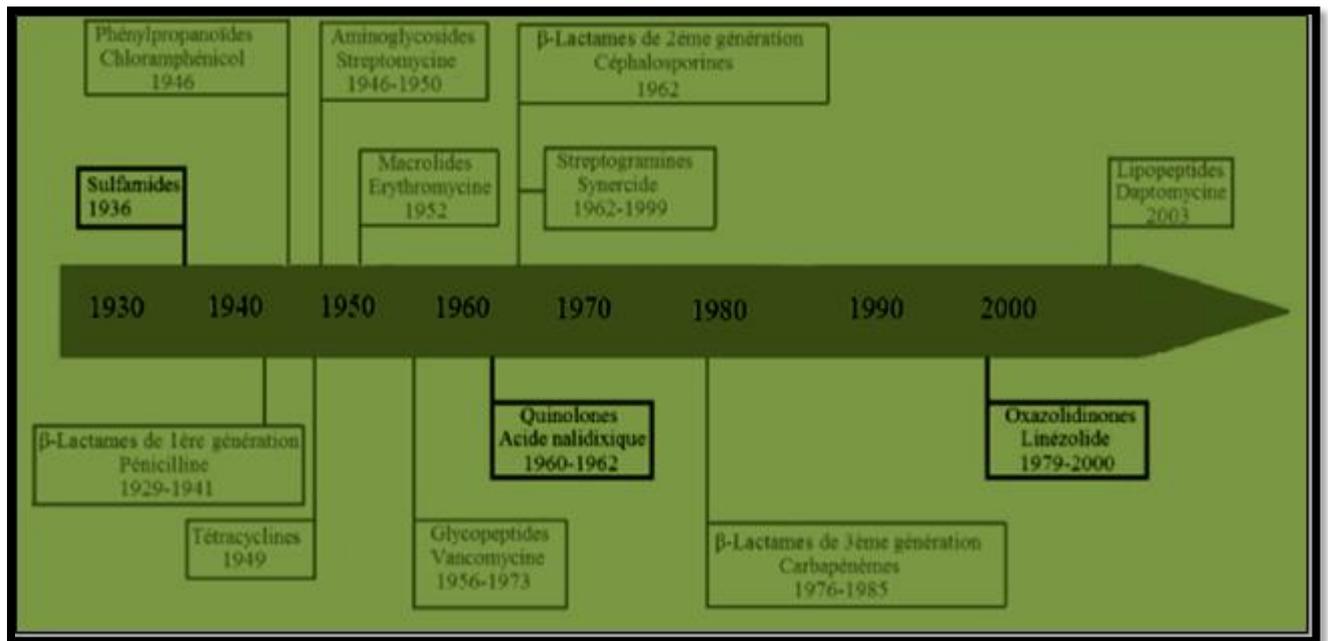
La découverte des sulfamides est concomitante à celle de la pénicilline. Ainsi, en 1935, Gerhard Domark a-t-il breveté sa découverte de la sulfamidochrysoïdine sous le nom de «Prontosil ». En effet, celui-ci avait un effet sur certaines infections à streptocoques.

En 1952, Selman Waksman a obtenu le prix Nobel de physiologie et de médecine pour la découverte de la streptomycine (Sadikalay, 2018).

La découverte fortuite en 1928 de la pénicilline par Alexander Fleming, puis la recherche de nouveaux antibiotiques et leur utilisation en médecine humaine et vétérinaire constituent une avancée scientifique majeure au 20<sup>ème</sup> siècle. De nombreuses maladies infectieuses bactériennes, fléaux pour l'Homme et les animaux d'élevage, ont ainsi pu être

combattues (Chardon et Brugere, 2014). Mais, au cours des dernières décennies, des mécanismes d'adaptation développés par les bactéries ont été découverts. Ils leur permettent de résister à des environnements hostiles, et notamment à la présence d'antibiotiques. Ces bactéries devenues résistantes ne cessent de se propager, sur tous les continents.

Dès 1940, les premières résistances aux antibiotiques ont été détectées chez des bactéries vis-à-vis de molécules de la famille des sulfamides (Ligon, 2004). La figure N°02 résume les années d'introduction sur le marché des grandes familles d'antibiotiques.



**Figure N°02 :** Chronologie de l'introduction des nouvelles classes d'antibiotiques (Singh et Barrett, 2006).

### 1.3. Classification :

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

- L'origine : élaboré par un organisme (produit naturellement par des champignons, des bacilles ou des *Streptomyces*) ou par synthèse (synthétique ou semi synthétique).
- La nature chimique : très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (ex : cycle  $\beta$  lactame) sur laquelle il y a hémisynthèse. La classification selon la nature chimique nous permet de classer les antibiotiques en familles ( $\beta$  lactamines, aminosides, tétracyclines.....etc.) (Yala *et al.*, 2001).
- Le mode d'action : paroi, membrane cytoplasmique, synthèse des protéines, synthèse des acides nucléiques

- Le spectre d'activité : liste des espèces sur lesquelles les antibiotiques sont actifs (Gram+, Gram-, spectre large ou étroit).

Les antibiotiques peuvent également être classés suivant qu'ils soient bactéricides ou bactériostatiques (Alanis, 2005), suivant leur mode d'action. Par définition, un antibiotique bactéricide est une molécule qui stoppe la croissance bactérienne et tue l'agent pathogène tandis qu'un antibiotique bactériostatique est une molécule qui inhibe la croissance bactérienne sans tuer la bactérie.

#### 1.4. Mécanismes d'action :

Les antibiotiques agissent sur les bactéries de diverses manières par l'inhibition spécifique d'une étape précise de leur fonction (figure N°03). Certains empêchent la formation de leurs enveloppes protectrices (membrane et paroi). D'autres substances agissent en bloquant certaines réactions chimiques indispensables à leur métabolisme. Enfin, certains antibiotiques empêchent la traduction de leur information génétique (leurs gènes) en protéines.

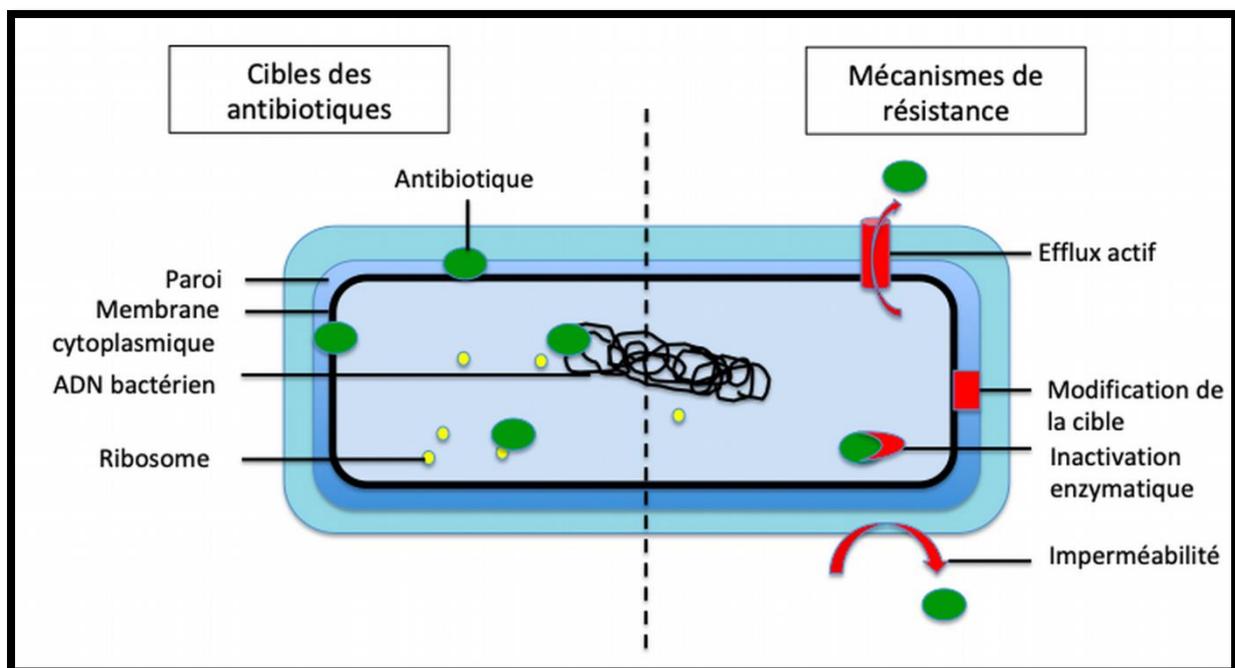


Figure N° 03 : Mode d'action des antibiotiques (www.bacteriologie.net).

**1.4.1. Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne :**

( $\beta$ -lactamines, glycopeptides, fosfomycine)

**1.4.1.1. Les  $\beta$ -lactamines :**

Les  $\beta$ -lactamines bloquent la synthèse de la paroi par inhibition de la transpeptidase via une liaison avec une protéine de liaison à la pénicilline (PLP) ; ce qui entraîne une inhibition de la synthèse du peptidoglycane. Au cours de la croissance bactérienne, il n'y aura pas de synthèse d'une véritable paroi. Ainsi la bactérie se déformera jusqu'à sa lyse et sa mort. Ces molécules représentent une grande famille d'antibiotiques bactéricides comprenant 4 sous familles, les pénames (pénicilline), les céphèmes (céphalosporine), les monobactames (aztréonam) et les pénèmes (carbapénème), (Sadikalay, 2018).

**1.4.1.1.1. Les pénames (pénicilline) :**

Les pénicillines sont formées du cycle  $\beta$ -lactame associé à un cycle thiazolidine et sont les premiers antibiotiques qui ont été synthétisés de manière industrielle (Kong *et al.*, 2010). Elles sont divisées en plusieurs molécules :

- Les pénicillines naturelles, comme les pénicillines G et V (respectivement benzylpénicilline et phénoxy-pénicilline), qui sont utilisées pour traiter les infections à bactéries Gram+ aérobies et sont sensibles aux pénicillinases.
- Les pénicillines résistantes aux pénicillinases, aussi appelées pénicillines M comme la méthicilline, l'oxacilline et la cloxacilline, qui sont surtout utilisées pour traiter des infections impliquant des souches de staphylocoques produisant des pénicillinases.
- Les aminopénicillines, comme l'ampicilline et l'amoxicilline. Leur groupement amine les rend plus hydrophiles, ce qui facilite leur prise en charge par les porines présentes chez les Gram $\neg$ . Elles sont utilisées contre les bactéries à Gram+ aérobies, les coques à Gram $\neg$  et certaines entérobactéries comme *E. coli* et *P. mirabilis* par exemple. Elles sont sensibles aux pénicillinases, et de ce fait, utilisées en combinaison avec un inhibiteur de  $\beta$ -lactamases, par exemple amoxicilline + acide clavulanique. Les pénicillines à large spectre (ou carboxypénicillines) comme la ticarcilline, la carbénicilline, dont les groupements en chaîne latérale les rendent plus perméantes encore que les aminopénicillines pour les bactéries à Gram- et plus résistantes aux pénicillinases. Elles sont utilisables contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* et *Enterobacter*.
- Les uréidopénicillines, comme la pipéracilline administrable par voie intraveineuse et intramusculaire, sont également des pénicillines antipyocyaniques et sensibles aux

pénicillinases. Par conséquent, la pipéracilline peut être associée au Tazobactam (Boutal, 2017).

#### 1.4.1.1.2. Les céphèmes (céphalosporine) :

Chez les céphalosporines, le cycle thiazolidine est remplacé par un cycle dihydrothiazine qui possède un carbone supplémentaire. Elles ont été découvertes par Giuseppe Brotzu en 1940 à partir d'un champignon, *Cephalosporium acremonium*. Actuellement, il existe quatre générations de céphalosporines classées selon leur date de mise sur le marché et leur spectre d'activité.

- Les céphalosporines de première génération (C1G : céfalotine, céfazoline), avec un spectre d'action comparable aux pénicillines M, sont actives contre les cocci à Gram<sup>+</sup> et certains bacilles à Gram<sup>-</sup>, mais elles restent toutefois sensibles aux pénicillinases.
- Les céphalosporines de deuxième génération (C2G : céfamandole, céfuroxime et céfoxitine), sont plus résistantes aux  $\beta$ -lactamases. Elles possèdent un spectre d'action plus large (vers les Gram<sup>-</sup>) et une meilleure diffusion tissulaire que les C1G. Elles sont notamment utilisables dans des infections respiratoires, urinaires et ostéo-articulaires.
- Les céphalosporines de troisième génération (C3G : céfotaxime, ceftazidime et ceftriaxone) ont un spectre d'action moindre pour les Gram<sup>+</sup> mais plus élargi pour les Gram<sup>-</sup> (Paladino *et al.*, 2008) telles que les entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa*. Elles sont utilisables à plus faible concentration et sont plus résistantes aux céphalosporinases que les C1G et C2G. Elles sont principalement employées dans le traitement d'infections nosocomiales. Elles offrent une bonne pénétration tissulaire et traversent la barrière hémato-encéphalique. Malheureusement ces molécules sont hydrolysées par les céphalosporinases (à spectre étendu).
- Les céphalosporines de quatrième génération (C4G : céfépime et cefpirome), résistent mieux à l'hydrolyse des céphalosporinases que les C3G. De plus elles ont une meilleure affinité pour les protéines liants la pénicilline (PLP) (Boutal, 2017).

Dans certains cas les  $\beta$ -lactamines sont utilisées en association avec des inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases ce qui permet d'élargir le spectre antibactérien ou de restaurer une activité sur certaines espèces devenues résistantes. Les trois cités le plus souvent sont l'acide clavulanique, le tazobactam et le sulbactam. Ces molécules sont des substrats suicides des  $\beta$ -lactamases auxquelles ils se lient de façon irréversible, protégeant ainsi les  $\beta$ -lactamines de l'inactivation enzymatique (Drawz et Bonomo, 2010).

**1.4.1.1.3. Les monobactames (aztréonam) :**

Représentés par l'aztréonam, qui a une activité sur les bacilles à Gram négatif comparable à celles des céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, mais elle est inactive sur les bactéries à Gram+ et les anaérobies (Bryskier, 1999).

**1.4.1.1.4. Les pénèmes (carbapénème) :**

Les carbapénèmes sont les  $\beta$ -lactamines les plus récemment développées avec le spectre d'activité le plus large : Gram $\neg$  et Gram+. De plus, ils sont résistants à la plus part des  $\beta$ -lactamases, y compris les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi, et sont donc des candidats de choix pour traiter des infections impliquant des organismes résistants. Ce sont des antibiotiques dits de "dernier recours". L'imipénème est, de toutes les  $\beta$ -lactamines, celle avec le spectre le plus large. Leur usage est principalement limité au milieu hospitalier pour traiter les infections nosocomiales, mais l'incidence des entérobactéries produisant des BLSE tant à l'hôpital que dans la population pourrait entraîner une augmentation de leur utilisation (Pitout *et al.*, 2008).

**1.4.1.2. Les glycopeptides:**

Sont des molécules complexes qui se fixent au niveau des extrémités peptidyl-D-Ala-D-Ala des précurseurs lipopeptidiques du peptidoglycane lors de leur transport à travers la membrane cytoplasmique et inhibent ainsi les étapes de transglycosylation et transpeptidation. Ces molécules ont un effet bactéricide principalement sur les bactéries Gram + car elles ne traversent pas la paroi des bactéries Gram $\neg$ ), (Sadikalay, 2018).

**1.4.1.3. La fosfomycine :**

Est un antibiotique bactéricide à large spectre (Gram + et Gram $\neg$ ) qui agit en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne par action sur la pyruvyl transférase. Il est utilisé en association avec le trométamol qui améliore son adsorption digestive, essentiellement en monodose comme traitement de première intention de la cystite non compliquée (Talarmin, 2016).

**1.4.2. Antibiotiques avec une action sur la membrane cytoplasmique :**

Les polymyxines (colistine, daptomycine) :

Les polymyxines sont des antibiotiques produits naturellement par des espèces de *Paenibacillus polymyxa*. Plusieurs classes (A, B, C, D et E) existent mais seules deux sont utilisées en clinique. Il s'agit de la polymyxine B et de la polymyxine E aussi appelée colistine (Dortet *et al.*, 2016).

Les antibiotiques de cette catégorie s'insèrent au niveau des phospholipides de la membrane externe des bactéries ; ce qui a pour effet de perturber la perméabilité membranaire

(augmentation anormale), et de permettre la diffusion de substances hydrosolubles hors de la bactérie, ce qui entraîne sa destruction.

La colistine est un antibiotique bactéricide qui agit, essentiellement, sur les bactéries aérobies à Gram négatif. Cet antibiotique est, généralement, utilisé en milieu hospitalier. De par son effet polycationique, cet antibiotique (à la fois hydrophile et lipophile) désorganise les groupes phosphates des lipopolysaccharides de la membrane des bactéries. Cette interaction entraîne une augmentation de la perméabilité de la membrane ; conduisant à la fuite du contenu intracellulaire.

La daptomycine est un lipopeptide cyclique polyanionique, appartient à une nouvelle classe d'antibiotique uniquement active sur les bactéries Gram<sup>+</sup>. En présence d'ions calcium, l'antibiotique se lie à la membrane bactérienne des cellules en phase de croissance, et en phase stationnaire, entraînant, ainsi, une dépolarisation et aboutissant à une inhibition rapide de la synthèse protéique de l'ADN et de l'ARN aboutissant à la mort des bactéries (Sadikalay, 2018).

### **1.4.3. Antibiotiques inhibant la synthèse protéique :**

(tétracyclines, macrolides, aminosides, phénicolés)

#### **1.4.3.1. Les tétracyclines :**

Les tétracyclines sont des antibiotiques bactériostatiques dont le spectre d'activité s'étend à des bactéries Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup>. Les tétracyclines vont atteindre leur cible après un passage de la membrane externe des Gram<sup>-</sup> par des porines puis un transport actif au travers de la membrane cytoplasmique via des transporteurs. Cette molécule interfère avec la sous-unité ribosomale 30S en perturbant l'attachement de l'ARN (Sadikalay, 2018).

Les tétracyclines ont été découvertes dans les années 1940, mais ont perdu beaucoup de leurs indications devant la diffusion de gènes de résistance (Talarmin, 2016).

#### **1.4.3.2. Les macrolides:**

Les macrolides sont des molécules naturelles produites par *Streptomyces spp.* ou obtenues par hémi-synthèse. La première molécule isolée en 1950 a été appelée pikromycine à cause de son goût amer (du grec *pikro* signifiant amer). Ils sont constitués d'un noyau lactonique et sont classés en fonction de la taille de ce cycle sur lequel est fixé un sucre aminé et/ou un sucre neutre. Un des plus connus est l'érythromycine. Ils sont surtout efficaces contre les bactéries aérobies à Gram<sup>+</sup>. Du fait de l'imperméabilité partielle de la membrane externe des bactéries à Gram<sup>-</sup> à ces composés hydrophobes, leur concentration dans le cytoplasme est 100 fois plus faible que chez les Gram<sup>+</sup> (Mao et Putterman, 1968). Leur spectre d'action

ressemble à celui de la pénicilline, c'est pour ça sont utilisés comme alternative aux  $\beta$ -lactamines chez les bactéries Gram positif.

#### **1.4.3.3. Les aminosides :**

Les aminosides sont des antibiotiques bactéricides. En se liant de façon irréversible aux sous unités 30S et 50S du ribosome, ils occasionnent une accumulation d'erreurs dans les protéines synthétisées ; entraînant la désorganisation et l'altération de la paroi bactérienne. La streptomycine est le premier antibiotique découvert au sein de cette classe qui a été introduite en thérapie en 1944 (Sadikalay, 2018).

#### **1.4.3.4. Les phénicolés :**

Les phénicolés se fixent à la sous-unité 50S des ribosomes bactériens. Ils inhibent la synthèse des protéines (transpeptidation) en empêchant la liaison du complexe amino-acyl-ARNt à son site de fixation. A l'exemple du chloramphénicol, ce sont des antibiotiques bactériostatiques à large spectre, mais leur utilisation reste limitée à cause de leur toxicité médullaire. L'antibiotique se lie spécifiquement aux résidus A2451 et A2452 de l'ARNr 23S de la sous unité 50S du ribosome bactérien, et empêche la formation de la liaison peptidique (Sadikalay, 2018).

#### **1.4.4. L'inhibition de la synthèse des acides nucléiques :**

(quinolones et rifampicine)

##### **1.4.4.1. Les quinolones :**

Ces molécules sont une des trois principales familles d'antibiotiques utilisées en thérapeutique humaine et vétérinaire. Ce sont des antibactériens de synthèse dérivés de l'acide nalidixique, chef de file des quinolones classiques, longtemps indiquées dans le traitement des infections urinaires (Honoré *et al.*, 2006). Les quinolones sont des dérivés de la quinoléine et toutes les molécules possèdent un cycle pyridine dont l'azote peut être diversement substitué (Soussy, 2006). Les quinolones sont des antibiotiques bactéricides et sont généralement classées en générations en fonction de leur spectre d'activité et de la chronologie de leur découverte :

- ✓ Les premières quinolones, dites de première génération (acide nalidixique, acide oxolinique, acide pipémidique), comprennent des molécules à spectre étroit utilisées dans le traitement des infections urinaires dues aux entérobactéries (Andriole, 2005).
- ✓ Les quinolones de deuxième génération, communément appelées fluoroquinolones, sont caractérisées biologiquement par un plus grand spectre d'action et une meilleure biodisponibilité. Ces caractéristiques sont en partie liées à la présence d'un atome de

fluor en position 6 d'où leur appellation commune (Van Bambeke, 2005). On retrouve dans cette classe la norfloxacin, l'ofloxacin, la péfloxacin et la ciprofloxacin.

- ✓ Les molécules de troisième génération, dites fluoroquinolones anti-pneumococciques, ont été développées pour étendre le spectre à *Streptococcus pneumoniae*. On retrouve dans cette classe la sparfloxacin, la lévofloxacin et la moxifloxacin, la grepafloxacin, la levofloxacin, la moxifloxacin ou la sparfloxacin, la danofloxacin, l'enrofloxacin, la difloxacin, l'orbifloxacin, l'ibafloxacin ou la marbofloxacin (Andriole, 2005).
- ✓ Les fluoroquinolones de quatrième génération (la trovafloxacin, la gatifloxacin) présentent une activité accrue sur les bactéries anaérobies strictes (Andriole, 2005). Cette classe combine les caractéristiques de deuxième et troisième génération (Van Bambeke, 2005).

#### 1.4.4.2. La rifampicine :

Elle appartient à la famille des ansamycines qui sont des molécules lipophiles traversant facilement les membranes. Elles sont composées de deux cycles aromatiques reliés par une chaîne aliphatique (van Bambeke *et al.*, 2017). La rifampicine est un dérivé hémisynthétique de la ryfamycine B produite par *Nocardia mediterranei*. C'est une molécule à large spectre qui inhibe la transcription au niveau de son initiation par blocage de l'ARN polymérase ADN dépendante (Campbell *et al.*, 2001). C'est un antibiotique bactéricide avec un effet post-antibiotique du fait de sa liaison irréversible à sa cible (Boutal, 2017). Il est aussi l'un des médicaments de choix des infections à mycobactéries. Des risques non négligeables de toxicité hépatique sont toutefois associés à son usage. De nouveaux dérivés (rifabutine) trouvent des indications particulières (patients immunodéprimés).

#### 1.4.5. Antibiotiques qui inhibent une voie métabolique (L'inhibition de la synthèse des folates) : (sulfamides, triméthoprime)

Les bactéries ont besoin de produire de l'acide folique (par voie métabolique) qui est un cofacteur de la synthèse des bases puriques et pyrimidiques, et est donc indispensable pour la production du matériel génétique. Les antibiotiques agissent par inhibition compétitive de la dihydroptéroate synthétase (DHPS) en se substituant à l'acide para aminobenzoïque (PABA) par analogie structurale ; ce qui empêche la synthèse d'acide folique nécessaire à la croissance de certaines bactéries. Les sulfamides sont des antibiotiques synthétiques bactériostatiques, avec un spectre d'action large.

Le triméthoprime est un anti-infectieux bactériostatique et est un inhibiteur compétitif de la dihydrofolate réductase qui catalyse la réduction de l'acide dihydrofolique en acide

tétrahydrofolique. Il est utilisé en association avec le sulfaméthoxazole, un sulfamide. Cette combinaison, également connue sous le nom de Triméthoprine+sulfaméthoxazole, est utilisée pour son effet bactéricide (Sadikalay, 2018).

## **2. Résistance aux antibiotiques :**

### **2.1. Définition :**

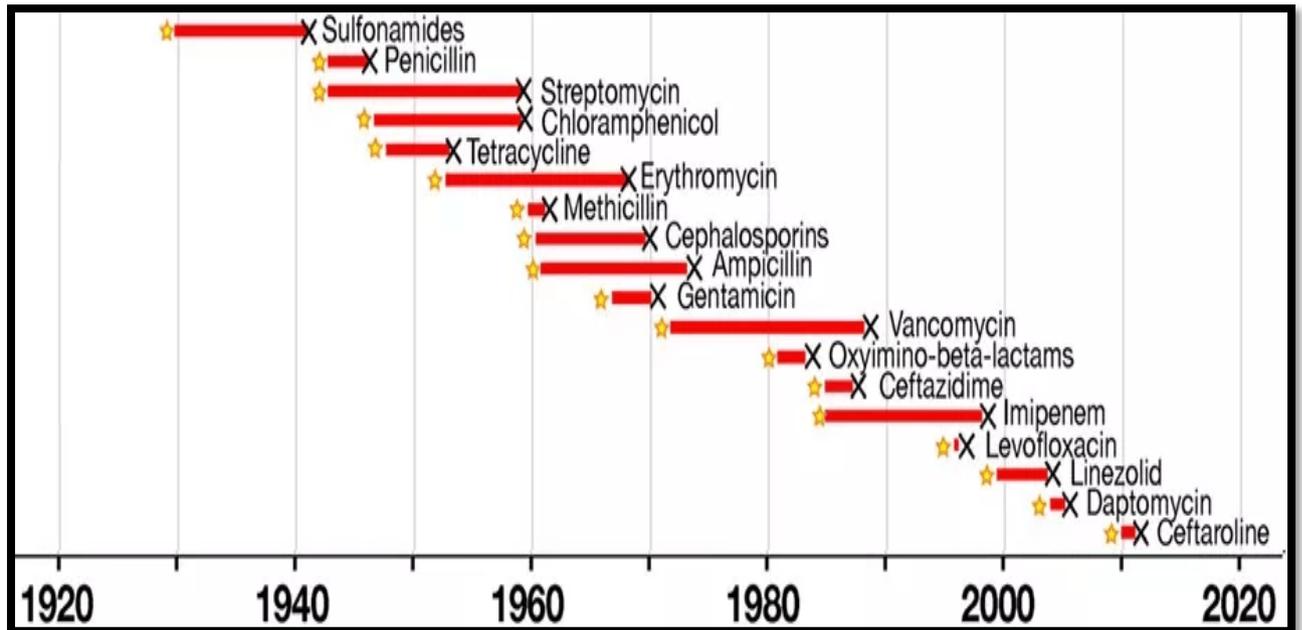
La résistance aux antimicrobiens est un terme tout à fait relatif. En effet, il existe un grand nombre de définitions pour l'expression « résistance bactérienne aux antibiotiques », qui sont basées sur différents critères (génétiques, biochimiques, microbiologiques et cliniques). Les définitions les plus fréquemment employées se fondent sur les critères microbiologiques (résistance *in vitro*) et sur les critères cliniques (résistance *in vivo*).

Selon la définition microbiologique du terme, une souche est dite résistante lorsqu'elle se cultive en présence de concentration plus élevée en antibiotique comparativement à d'autres souches qui lui sont phylogénétiquement liées. Par conséquent, la résistance est une propriété qui ne peut être étudiée que par comparaison d'au moins deux souches, dont l'une de référence souvent appelée souche sauvage et développée en laboratoire à partir d'individus prélevés dans la nature, d'une même espèce ou d'un même genre, cultivées dans les mêmes conditions.

Selon la définition clinique, une souche est qualifiée de résistante lorsqu'elle survit à la thérapie antibiotique mise en place (Muylaert et Mainil, 2012).

### **2.2. Relation chronologique entre l'introduction des antibiotiques et l'apparition de résistance :**

Le développement de molécules nouvelles a été motivé par l'apparition de résistance aux anciennes molécules chez des bactéries naturellement sensibles. La figure N° 04 indique que les résistances aux antibiotiques ont suivi de près leur mise sur le marché, démontrant les possibilités adaptatives des bactéries. Avant même le début de l'utilisation des premiers antibiotiques, des phénomènes de résistance des bactéries avaient été observés (Talarmin, 2016).



**Figure N° 04 :** Chronologie de la découverte des différents antibiotiques (étoiles) et de la première détection d'une souche respectivement résistante à chacun d'entre eux (X noirs) (<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01068>).

### 2.3. Mécanismes biochimiques de la résistance aux antibiotiques :

Les systèmes de résistance aux antibiotiques des bactéries peuvent être d'origine intrinsèque, comme une membrane perméable, un état physiologique particulier, ou provenant d'éléments mobiles, comme les transposons, intégrons et plasmides. Ils fonctionnent généralement selon un des quatre modes d'actions qui inclut : (1) l'altération ou la modification de la cible, (2) l'inactivation enzymatique de la molécule antibiotique, (3) la réduction de son entrée dans la cellule (impermeabilité) et (4) son expulsion vers le milieu externe (pompes à efflux) (Poole, 2005).

#### 2.3.1. Altération ou Modification de la cible de l'antibiotique :

Ce mécanisme de résistance s'exprime par l'affection des cibles des antibiotiques. Dans certains cas, la bactérie modifie l'affinité de ses protéines de liaison à des antibiotiques spécifiques. Par exemple, certaines souches pathogènes modifient l'affinité des PLP, ce qui leur permet de résister à des antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines (Poole, 2004).

Aussi, la cible d'un antibiotique peut être altérée suite à une seule modification génétique. Par exemple, lorsqu'une mutation ponctuelle survient sur un seul acide aminé de l'ADN gyrase ou la topoisomérase IV, la cible des quinolones est altérée (Wax *et al.*, 2008).

### **2.3.2. Inactivation enzymatique de l'antibiotique :**

C'est le principal mécanisme de résistance des bêta-lactames, des aminoglycosides et des phénicolés. L'enzyme en modifiant le noyau actif de l'antibiotique par clivage ou par addition d'un groupement chimique, empêche la fixation de l'antimicrobien sur sa cible et provoque une perte d'activité. Ces enzymes sont généralement associées à des éléments génétiques mobiles. Parmi les réactions biochimiques catalysées par ces enzymes bactériennes, on peut citer des hydrolyses, des acétylations, des phosphorylations, des nucléotidylations, des estérifications, des réductions et des réactions d'addition d'un glutathion (Muylaert et Mainil, 2012).

### **2.3.3. Imperméabilité aux antibiotiques :**

La majorité des antibiotiques ont des cibles intracellulaires, ce qui implique que la molécule doit traverser la membrane externe et/ou la membrane cytoplasmique pour avoir un effet antimicrobien. Les bactéries ont développé des mécanismes pour bloquer la diffusion des antibiotiques. Ce phénomène est très répandu chez les bactéries à Gram<sup>-</sup> pour lesquelles cette diffusion, concernant les tétracyclines, les fluoroquinolones ou les  $\beta$ -lactamines, est dépendante des porines (Pagès *et al.*, 2008).

### **2.3.4. Pompes à efflux :**

Cet efflux empêche ainsi la concentration intracellulaire de l'antibiotique d'atteindre un niveau d'action, ce qui empêche son action. Le système d'efflux actif est efficace grâce aux protéines transmembranaires ancrées dans la membrane plasmique mais également dans la membrane externe des bactéries Gram négatif (Walsh, 2003). Ces protéines sont spécifiques d'une classe d'antibiotiques ou au contraire responsables de « multidrug resistance » (MDR) de certaines bactéries, leur conférant une résistance simultanée à plusieurs classes d'antibiotiques.

## **2.4. Facteur de l'antibiorésistance :**

Le phénomène d'antibiorésistance chez l'animal est souvent interprété comme une conséquence de la pression de sélection exercée par les antibiotiques en usage vétérinaire.

De nombreux travaux ont démontré que tout traitement antibiotique crée une pression de sélection favorable au développement des bactéries résistantes (Sanders *et al.*, 2011). La pression de sélection des antibiotiques contribue à la dissémination de gènes de résistance à la fois par l'expansion clonale et par la propagation de nouvelles bactéries de la même espèce ou d'autres espèces. L'expansion clonale au sein de l'hôte augmente la probabilité de propagation à d'autres hôtes (Martinez et Baquero, 2002). Cette pression de sélection s'exerce essentiellement sur les bactéries présentes dans le tube digestif qui sont en très grand nombre

dans la partie terminale de l'intestin. Pendant un traitement antibiotique, les bactéries résistantes sont favorisées par rapport aux bactéries sensibles. La durée d'exposition (nombre de jours du traitement) est un facteur favorable à cette sélection. Les bactéries résistantes sont disséminées à partir des animaux porteurs vers d'autres animaux, vers l'environnement ou vers l'homme via les aliments (Sanders *et al.*, 2011).

### **2.5. Impact de l'antibiorésistance :**

L'antibiorésistance des bactéries est un problème de santé publique touchant à la fois la santé animale et la santé humaine notamment par l'émergence de gènes et de bactéries résistantes.

En 2017, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) alertait déjà sur les risques liés à l'antibiorésistance, qui pourrait devenir l'une des plus grandes menaces de santé à l'échelle mondiale. En effet, plus les êtres vivants absorbent de médicaments, plus les bactéries deviennent résistantes, et plus il est difficile de traiter les infections.

Des études ont estimé que l'antibiorésistance des bactéries pourrait causer jusqu'à 10 millions de décès à l'horizon 2050 (OMS, 2015). Selon les estimations, la résistance aux antimicrobiens pourrait réduire la production animale mondiale de 2.6% à 7.5% d'ici à 2050, les pays à faible revenu risquant d'être les plus durement touchés, avec une baisse pouvant atteindre 11% (Banque mondiale, 2016). En plus de ces conséquences sanitaires, ces microorganismes multi-résistants allongent les durées et coûts de traitement faisant aussi peser une charge économique plus importante sur les institutions de santé. Mondialement, ces surcoûts sont estimés entre 300 et 1000 milliards de dollars par an d'ici 2050 (O'Neill, 2014). Donc, la survenue d'une résistance dans un pays est un problème pour tous les pays (Aarestrup, 2005).

### **2.6. Point de situation de l'antibiorésistance dans la filière avicole en Algérie :**

#### **2.6.1. Rappel des politiques avicoles mises en œuvre en Algérie :**

Après l'indépendance, l'aviculture maintiendra le même système de production durant la période coloniale (aviculture fermière de type familial), qui ne couvrait qu'une faible partie de la consommation qui était de l'ordre de 500 g de viande blanche et une dizaine d'œufs par habitant et par an (ONAB, 2004).

Assez rapidement, l'adoption d'une aviculture industrielle devenait une nécessité pour pallier le déficit en protéines animales que les viandes rouges à elles seules ne pouvaient satisfaire. L'état prend totalement en charge le développement de l'aviculture nationale en créant, dès 1969, l'Office National des Aliments du Bétail (ONAB). Les prérogatives de cet office, très diversifiées, tournaient autour de la production des

aliments composés du bétail (essentiellement l'alimentation de la volaille), du développement de l'élevage avicole et même de la régulation des marchés des viandes rouges. A partir de 1980, l'ONAB est physiquement restructuré. Sa spécialisation dans la production d'aliments du bétail est maintenue, tandis que l'activité «aviculture» est confiée à trois Offices régionaux (ORAC dans la région du Centre, ORAVIE à l'Est et ORAVIO à l'Ouest) dans le but évident de généraliser l'activité à l'ensemble du territoire national (Kaci et Boukella, 2007).

Le développement de la filière avicole en Algérie a permis d'améliorer la consommation des populations en protéines animales à moindre coût. En effet, la production de viande de volailles a atteint, en 2017, une production de 5,3 millions de quintaux, contre 2,092 millions de quintaux en 2009. La production d'œufs de consommation a atteint les 6,6 milliards d'unités produites en 2017 contre 3,8 unités en 2009 (MADR, 2017).

Actuellement, la production avicole en Algérie est le fait d'éleveurs privés et d'entreprises économiques publiques. Mais la production de ces dernières reste insignifiante par rapport à celle des exploitations privées qui représentent, respectivement, 92% et 73% des capacités de production nationale en viandes blanches et en œufs de consommation. Cette démarche a certes mis fin à l'importation des produits finis (œufs de consommation et poulet de chair) mais, elle a accentué la dépendance des marchés mondiaux pour l'approvisionnement des entreprises en intrants industriels (inputs alimentaires, matériel biologique, produits vétérinaires, équipements,...) ce qui demeure le principal handicap au développement de l'aviculture algérienne (OFAL, 2010).

### **2.6.2. Consommation d'antibiotiques :**

En 15 ans, la consommation d'antibiotiques a bondi de 65% dans le monde. Un phénomène inquiétant qui pourrait devenir un réel problème de santé publique. Les antibiotiques sont également utilisés massivement dans les fermes d'élevage, pour prévenir ou traiter les infections ou activer la croissance des animaux.

A l'échelle mondiale, il a été estimé leur utilisation à 63 151 tonnes en 2010, et la consommation devrait augmenter de 67% d'ici 2030, en raison de l'augmentation de la demande de viande animale pour la consommation humaine, notamment dans les pays à revenus moyens (Van Boeckel *et al.*, 2014). Il existe peu de données fiables sur l'utilisation des antibiotiques à usage vétérinaire dans les pays à faibles revenus mais certaines études ont montré des taux élevés de résidus antibiotiques dans la viande, laissant suggérer que l'utilisation intensive des antibiotiques n'est pas une pratique rare, surtout dans les grandes exploitations (Okeke *et al.*, 2005).

L'Algérie a été citée parmi les top 5 des pays dans le monde, à côté de la Tunisie, la Turquie, et la Roumanie où le taux de consommation d'antibiotiques a été le plus élevé en 2015 (PNAS, 2018). La situation est plus préoccupante quant à la consommation des antibiotiques dans le secteur de l'élevage, en particulier la filière avicole où l'utilisation de ces produits devrait doubler (Klein *et al.*, 2018).

### **2.6.3. Etat des lieux de la résistance aux antibiotiques en Algérie :**

Durant les dernières décennies, la résistance aux antibiotiques en Algérie a connu une augmentation remarquable, notamment celle des entérobactéries en médecine humaine et vétérinaire, selon les données publiées annuellement par le réseau Algérien de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques (<http://www.sante.dz/aarn/>).

En plus beaucoup d'études sur le sujet des antibiorésistances vétérinaires ont été publiées dans certaines régions du centre et de l'ouest Algérien (Agabou *et al.*, 2015 ; Belmahdi *et al.*, 2016; Halfaoui *et al.*, 2017; Benameur *et al.*, 2018). D'après ces résultats, une évolution importante de la résistance aux antibiotiques a été enregistrée dans des souches d'origine aviaire. La nature de cette résistance devient de plus en plus inquiétante avec une augmentation constante de la résistance aux antibiotiques de premier recours tels les  $\beta$ -lactamines et les fluoroquinolones. La majorité des souches circulantes sont multi-résistantes et peuvent être sources d'impasses thérapeutiques.

### **2.7. Prévention :**

L'approche « One Health » de la lutte contre l'antibiorésistance, portée depuis 2015 par l'OMS, favorise l'articulation de la prévention entre santé humaine, santé animale et environnement. Les antibiotiques étant un bien précieux permettant de traiter les infections bactériennes, il est urgent de mettre en œuvre les moyens nécessaires pour les préserver. La résistance aux antibiotiques est devenue un enjeu majeur de santé publique, et notamment la récente augmentation de l'incidence des infections aux entérobactéries productrices de BLSE qui est reconnue comme une menace sérieuse par l'OMS (WHO, 2014).

L'utilisation des antibiotiques dans le cadre de la production d'aliments d'origine animale (viande, lait, œufs, miel) fait l'objet d'une attention particulière des instances internationales en charge de l'analyse de risque. La sécurité sanitaire pour tous est au cœur des efforts des organisations en charge de l'alimentation.

L'Algérie dispose maintenant d'un ancrage juridique à travers la promulgation récente du décret exécutif N°17-310 du 24 octobre 2017 portant création, missions, organisation et fonctionnement du comité national multisectoriel de lutte contre la résistance aux antimicrobiens pour l'élaboration et la mise en œuvre du plan d'action national. Ce plan

national d'action a été adopté pour renforcer le dispositif, déjà mis en place par le ministère de tutelle, à travers le réseau Algérien de surveillance de la résistance aux antibiotiques avec comme laboratoire de référence le laboratoire de bactériologie médicale et de surveillance de la résistance aux antibiotiques de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA) et celui mis en place par le Ministère de l'Agriculture, à savoir le réseau vétérinaire de surveillance de la résistance aux antibiotiques.

L'OMS, la FAO (Food and Agriculture Organization), et l'OIE (Office Internationale des Epizooties, devenu l'organisation mondiale de la santé animale) ont adopté récemment un plan d'action mondiale pour combattre la résistance aux antimicrobiens. Il se décline en cinq axes:

- Sensibiliser le personnel de santé et le public ;
- Renforcer la surveillance et la recherche ;
- Prendre des mesures d'assainissement, d'hygiène et de prévention des infections ;
- Optimiser l'usage des antimicrobiens en santé humaine et animale ;
- Soutenir des investissements durables pour la mise au point de nouveaux traitements, diagnostics ou vaccins.

## **Chapitre III.**

# **Les déterminants génétiques de la résistance aux antibiotiques**

**Chapitre III. Déterminants génétiques de la résistance aux antibiotiques****1. Déterminants génétiques de la résistance :**

La résistance bactérienne aux antibiotiques aurait deux origines essentielles, naturelle et acquise. La première est programmée au niveau du pool génomique alors que la seconde est due à une mutation chromosomique ou à une acquisition de gène (résistance extra-chromosomique).

**1.1. Résistance naturelle : (intrinsèque)**

Le chromosome bactérien est porteur des informations génétiques nécessaires à l'existence même de la bactérie et contient aussi les gènes responsables de sa résistance naturelle intrinsèque (liée à sa structure ou à son métabolisme). Les gènes de résistance codant pour des enzymes d'inactivation ou des systèmes d'échappement s'expriment de façon constitutive lorsqu'ils sont portés par le chromosome conférant les caractères de résistance naturelle de la bactérie (Doyle, 2006).

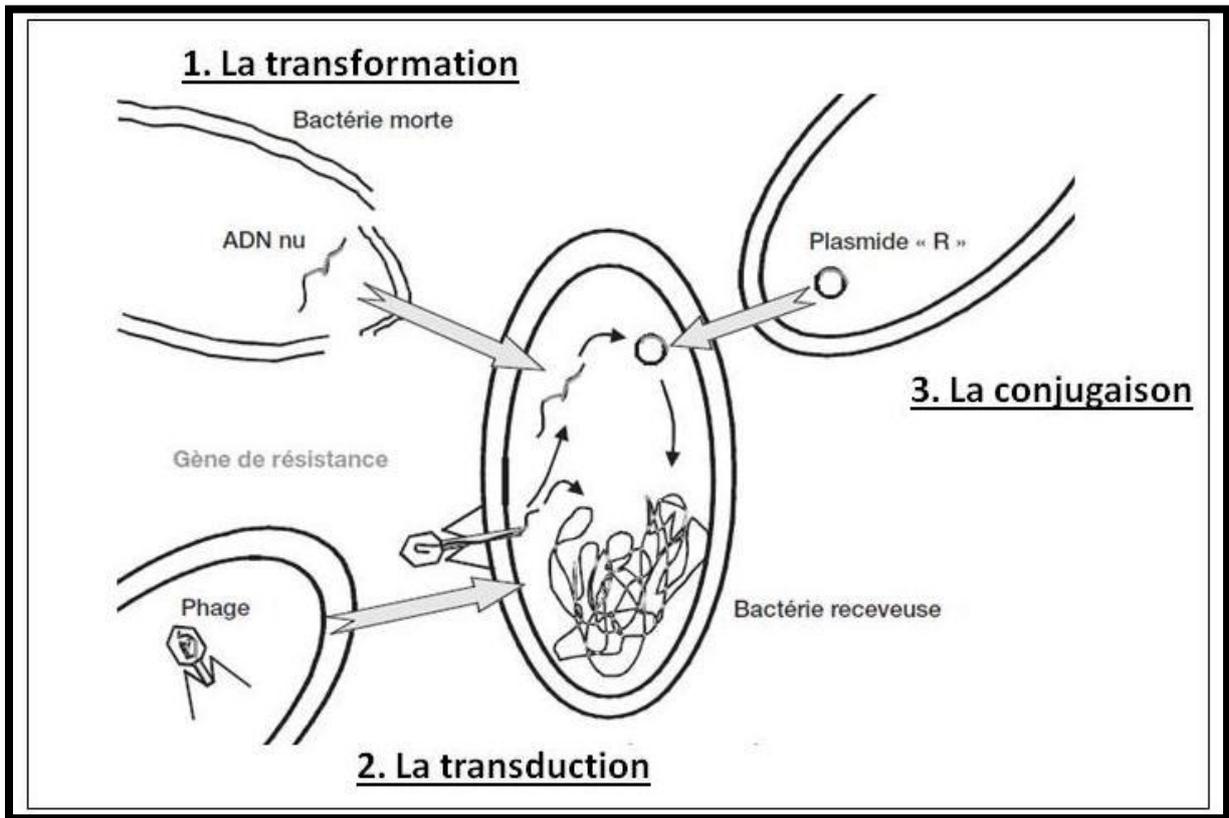
**1.2. Résistance acquise :****1.2.1. Résistance chromosomique:**

La résistance chromosomique acquise résulte d'une mutation. La fréquence de ces mutations est faible et variable ( $10^{-6}$  à  $10^{-9}$ ) mais la mutation est stable et transmissible à la descendance. La résistance apparaît dans ce cas au hasard et n'est donc pas influencée par l'antibiotique qui ne fait que la révéler. La mutation du gène peut entraîner l'apparition d'une protéine particulière ou d'une variabilité structurelle responsable de la résistance; elle peut aussi entraîner la disparition ou la modification d'une protéine structurale ou enzymatique normale. En absence d'antibiotiques dans le milieu exerçant une pression de sélection, la plupart des mutants naturels vont disparaître.

**1.2.2. Résistance extra-chromosomique :**

Ce type de résistance est principalement due à la présence de trois types d'éléments génétiques mobiles (EGM), extra-chromosomiques, portant des gènes de résistance: les plasmides, les transposons et des cassettes de résistances insérées sur un intégron (Walsh, 2006 ; Bennett, 2008 ; Martinez, 2009). Les espèces microbiennes partagent des éléments génétiques entre elles d'une manière perpétuelle. Cet échange est appelé transfert horizontal du matériel génétique. Ce transfert est généralement réalisé grâce à trois phénomènes essentiels, à savoir la conjugaison (transfert des fragments via des plasmides conjugatifs), la transformation (incorporation par une bactérie des fragments d'ADN libérés par d'autres bactéries) et la transduction (transfert des gènes via les bactériophages) (Sommer *et al.*, 2009)

(figure N°05). Le transfert des gènes peut se produire entre des bactéries phylogénétiquement éloignées, essentiellement entre les bactéries à Gram+ et celles à Gram- (Courvalin, 1994). Le transfert horizontal des gènes a donné lieu à une résistance aux différentes classes d'antibiotiques telles que les aminoglycosides, les céphalosporines et les fluoroquinolones (Nordmann et Poirel, 2002).



**Figure N° 05** : Les trois voies de transmission des résistances bactériennes (AFSSA, 2006)

#### 1.2.2.1. Les plasmides :

Les plasmides sont des structures d'ADN extra-chromosomal double brin, mobiles, et circulaires. Ils sont de taille variable allant de quelques kilobases (kb) à 500 kb. Ils peuvent se répliquer de façon autonome puisqu'ils possèdent des systèmes de réplication. Ils sont le support génétique de nombreuses propriétés comme des fonctions métaboliques, la résistance aux antibiotiques, aux désinfectants, aux métaux lourds et aux toxines bactériennes. Une bactérie peut contenir plus d'un plasmide. Les plasmides bactériens revêtent une importance toute particulière dans l'étude des phénomènes de résistance car ils constituent à la fois un vecteur de premier plan pour la dissémination des résistances et un immense réservoir génétique (Diallo, 2013).

### 1.2.2.2. Séquences d'insertion et transposons :

La forme la plus simple de transposon est la séquence d'insertion (IS) composée d'un gène de transposase bordé de part et d'autres de séquences inversées répétées (IR). Leur taille n'excède pas 1 à 2 kb et elles sont retrouvées dans de nombreuses espèces bactériennes (Siguier *et al.*, 2006). Les transposons forment une classe très hétérogène d'éléments génétiques pouvant s'insérer par transposition à divers endroits sur un chromosome ou un plasmide. Les transposons sont composés de séquences d'ADN qui fonctionnent comme des sites de recombinaison et de gènes codants pour des protéines qui participent à la réaction de recombinaison. Les sites de recombinaison sont situés aux deux extrémités du transposon et organisés en séquences inversées répétées. La taille de ces répétitions inversées terminales varie entre 25 et quelques centaines de paires de bases (Diallo, 2013). Le caractère transposable chez la majorité des gènes est responsable de l'apparition des souches multi-résistantes.

### 1.2.2.3. Les intégrons :

L'implication des intégrons dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques est de découverte plus récente que les précédents EGM, et remonte à la fin des années 1980. Un intégron est caractérisé par la présence d'une plateforme fonctionnelle composée de trois éléments clés : un gène *IntI* qui code pour une intégrase IntI, un site de recombinaison spécifique *attI* et un promoteur *Pc* qui dirigent l'expression de gènes localisés dans des cassettes en aval de la plateforme fonctionnelle (Hall et Collis, 1995). L'intégrase codée par l'intégron est capable de recombiner de petites unités d'ADN circulaires nommées gènes cassettes. Les intégrons peuvent être divisés en 2 sous-groupes : les super-intégrons(SI) et les intégrons de résistance (IR), mobiles, qui sont liés à des EGM et qui sont principalement impliqués dans la diffusion des gènes de résistance aux antibiotiques après leur transfert entre les bactéries (Ploy *et al.*, 2005). La volaille est considérée parmi les réservoirs importants en IR (Nandi *et al.*, 2004).

## 2. Résistance aux $\beta$ -lactamines :

Les  $\beta$ -lactamines sont les antibiotiques les plus utilisés dans la pratique clinique courante, surtout dans le traitement des infections dues aux entérobactéries (Zogheib et Dupont, 2005). Ce nom est dû au fait que tous les membres de cette classe portent une fonction lactame en position  $\beta$ .

**2.1. Mécanismes d'action des  $\beta$ -lactamines :**

Les  $\beta$ -lactamines bloquent la synthèse du peptidoglycane (ou mucopeptide, ou muréine) qui est le polymère majeur spécifique de la paroi des bactéries à Gram $\neg$  et à Gram $+$ . Ce blocage intervient par inhibition de certaines enzymes responsables de la transpeptidation, étape essentielle de la synthèse du peptidoglycane. Ces enzymes, collectivement appelées PLP, sont insérées dans la partie externe de la membrane cytoplasmique bactérienne. Pour être actives, les  $\beta$ -lactamines vont devoir atteindre leur cible en pénétrant dans la paroi bactérienne et se fixer sur les PLP.

**2.2. Mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines :**

Il existe deux types de mécanismes de résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines : enzymatique et non enzymatique.

**2.2.1. Résistances non enzymatiques :**

Il y a plusieurs mécanismes qui permettent aux bactéries de contrecarrer l'action des antibiotiques :

- Diminution de la perméabilité
- Modification de la cible
- Hyperproduction de système d'efflux

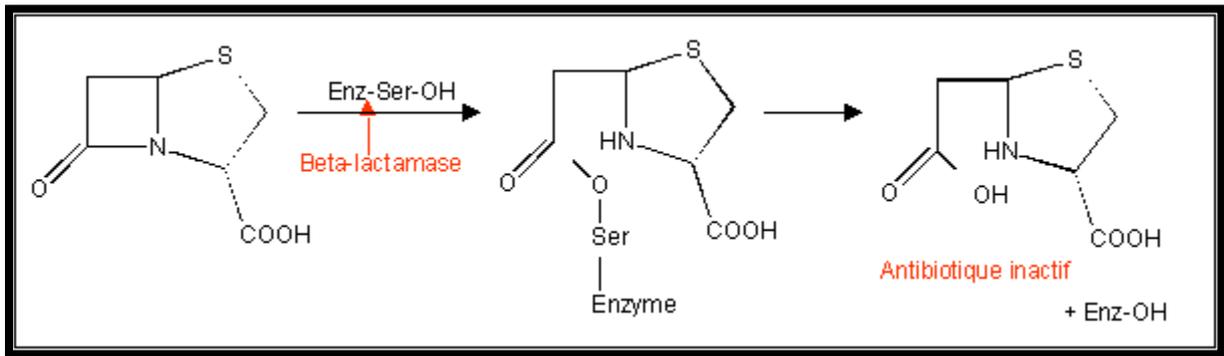
**2.2.2. Résistances enzymatiques (Production de  $\beta$ -lactamases) :**

Chez les entérobactéries, la production de  $\beta$ -lactamases est le mécanisme prédominant de résistance aux  $\beta$ -lactamines (Livermor, 2003). Les  $\beta$ -lactamases ont été identifiées en 1940 par Abraham et Chain, qui ont mis en évidence une enzyme capable d'empêcher l'action de la pénicilline chez *E. coli* ; ils la nommèrent pénicillinase (Abraham et Chain, 1940).

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes hydrolysant les  $\beta$ -lactamines en ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame et menant à la perte d'un groupement carboxyle, provoquant l'inactivation de l'antibiotique en question (Ambler, 1980). Ces enzymes sont localisées au niveau de l'espace périplasmique chez les bactéries Gram négatif (Medeiros, 1984).

**2.2.2.1. Mode d'action :**

Les  $\beta$ -lactamases catalysent de manière efficace et irréversible l'hydrolyse du pont amide de l'anneau  $\beta$ -lactame des pénicillines, des céphalosporines, des monobactames et des carbapénèmes ; pour donner un acyl-enzyme qui sera ensuite dégradé en acide inactif (figure N°06). Ainsi, les pénicillines sont dégradées en acide pénicilloïque et les céphalosporines en acide céphalospoïque (Medeiros, 1984).



**FigureN° 06 :** Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle  $\beta$ -lactame (Barrial et Scotet, 2006)

### 2.2.2.2. Classification des $\beta$ -lactamases :

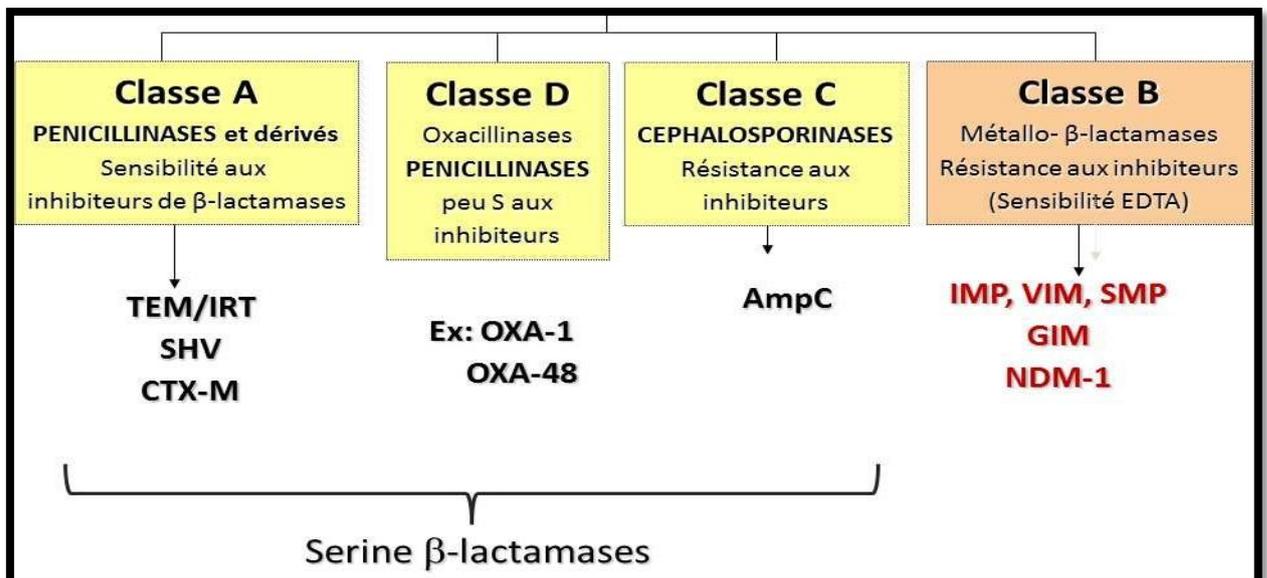
Généralement, Les classifications d'Amblar et de Bush-Jacoby-Medeiros sont considérées comme étant les plus pertinentes :

- La classification de Bush : a été établie selon les propriétés fonctionnelles de l'enzyme, définies par son substrat préférentiel et son profil d'hydrolyse (Bush *et al.*, 1985). Les enzymes sont divisées en quatre groupes (1 à 4) avec plusieurs sous-groupes. Cette classification phénotypique des  $\beta$ -lactamases pose un certain problème puisque différentes mutations ponctuelles peuvent influencer leur sensibilité aux substrats et inhibiteurs ;
- La classification moléculaire d'Amblar (figure N° 07) : qui est basée sur l'homologie de séquence des acides aminés. Cette nomenclature se compose de quatre groupes, soit les  $\beta$ -lactamases de classe A, B, C et D. Les enzymes de classe A, C et D sont dites à sérine active responsable de l'ouverture du cycle  $\beta$ -lactame. À l'opposé, les  $\beta$ -lactamases de classe B ont besoin d'un ou deux atomes de zinc ionisé ( $Zn^{2+}$ ) pour hydrolyser leur substrat et sont ainsi couramment appelées sous le nom de « métalloenzymes » (Jacoby et Munoz-price, 2005).

- ✓ **Classe A :** Les principaux représentants de cette classe sont les  $\beta$ -lactamases de type TEM, SHV et CTX-M. Ces enzymes sont caractérisées par une résistance à haut niveau aux pénicillines et par une sensibilité à l'acide clavulanique et le tazobactam (inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (Arlet et Philippon, 2003).
- ✓ **Classe B :** Cette classe des  $\beta$ -lactamases est composée par des métallo-enzymes dont le site actif contient un ion zinc, résistantes à l'acide clavulanique mais inhibées par l'EDTA. Ces enzymes sont généralement actives contre les carbapénèmes et contre d'autre  $\beta$ -lactamines (Grall *et al.*, 2011).
- ✓ **Classe C :** Les enzymes de cette classe, peuvent être divisés en 2 groupes : les  $\beta$ -lactamases chromosomiques AmpC et les  $\beta$ -lactamases plasmidiques. Les  $\beta$ -

lactamases AmpC sont capable d'hydrolyser les céphalosporines y compris les céphamycines (céfoxitine), les pénicillines, mais pas le céfépime. Ces  $\beta$ -lactamases sont résistantes aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (Rodriguez *et al.*, 2006). Les représentants de ce groupe sont les enzymes de types AmpC, FOX, ACT, CMY (Arlet et Philippon, 2003). Ces enzymes confèrent aux bactéries productrices une forte résistance aux céphalosporines de première génération et à un degré variable aux céphalosporines de deuxième génération (Bryskier, 1999).

- ✓ **Classe D :** La classe D regroupe les  $\beta$ -lactamases appelées (oxacillinases) ou OXA (Szarecka *et al.*, 2011). Ces  $\beta$ -lactamases sont peut inhibées par l'acide clavulanique. Dans cette classe, on retrouve les  $\beta$ - lactamases qui hydrolysent la cloxacilline (Grall *et al.*, 2011).



**Figure N°07:** Différentes classes de bêta-lactamases selon la classification d'Ambler (Ambler, 1980).

### 2.2.2.3. Les $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) :

Les BLSE ont été décrites pour la première fois en 1983, en Allemagne (Knothe *et al.*, 1983), il n'y a pas de consensus concernant la définition de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE). Classiquement, les BLSE sont définies comme des enzymes appartenant à la classe A (à l'exception des BLSE de type OXA classe D) de la classification d'Ambler, capables d'hydrolyser les pénicillines, céphalosporines de première, deuxième, troisième et quatrième

génération (céfépime ou ceftiprome) et l'aztréonam. Elles sont inhibées in vitro par les inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases (acide clavulanique, tazobactam et sulbactam) (Livermore, 1995). Par contre, les BLSE sont sensibles aux céphamycines (céfotétan et cefoxitine) ainsi qu'aux carbapénèmes. Une co-résistance avec les aminosides, les tétracyclines et les fluoroquinolones est fréquente. Les bactéries possédant des BLSE sont dites multirésistantes (Paterson et Bonomo, 2005).

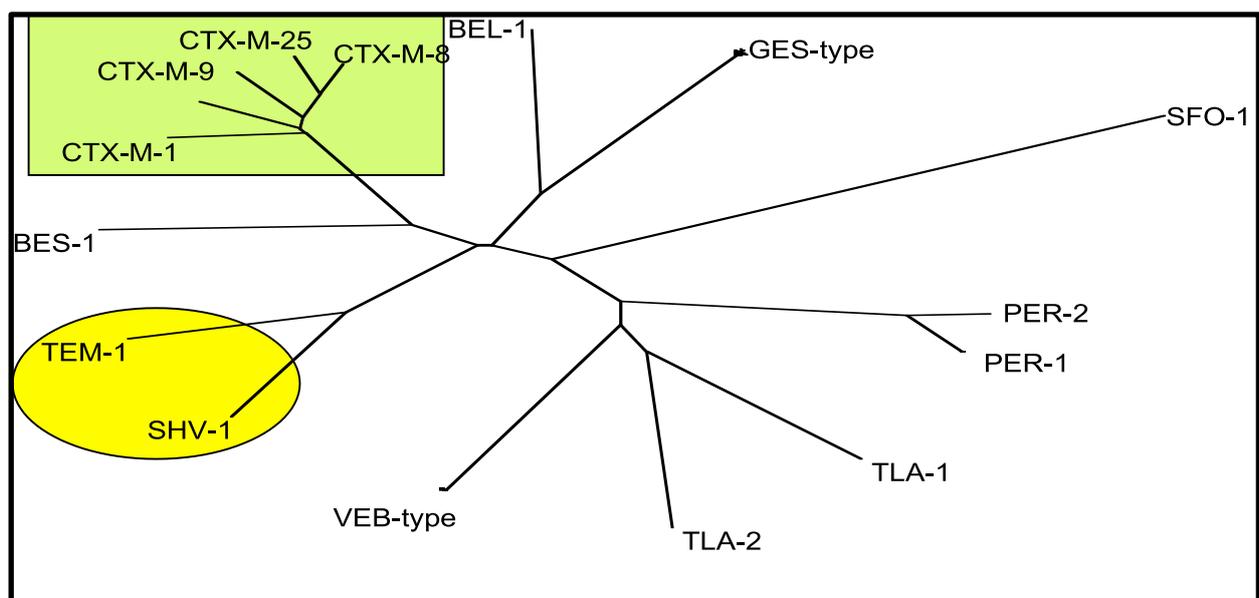
Il s'agit d'un mécanisme de résistance de type plasmidique, et donc transmissible à d'autres bactéries. La présence de ce -type de mécanisme de résistance au sein de souches pathogènes fait peser un risque majeur d'inadéquation thérapeutique et donc d'échec thérapeutique (Schwaber et Carmeli, 2007), et est également un facteur de diffusion.

Au sein des entérobactéries, *Klebsiella pneumoniae* et *E. coli* sont les deux espèces les plus fréquemment porteuses de ces mécanismes de résistance.

#### 2.2.2.4. Classification phylogénétique des BLSE :

A ce jour, plus de 600 variantes de BLSE ont été décrites à travers le monde représentant un problème majeur de santé publique (Geser *et al.*, 2012).

En fonction de leur séquence en acides aminés, ces enzymes ont été classées dans 11 familles différentes: TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES, SFO, FEC et OXA (figure N° 08). Les BLSE les plus anciennes dérivent de TEM-1, 2 et de SHV-1.



**Figure N°08:** Classification phylogénétique des BLSE (Arlet, 2006).

**2.2.2.4.1. BLSE de type TEM (Temoneira) :**

La première  $\beta$ -lactamase plasmidique de type TEM (TEM-1) a été isolée en 1965, en Grèce, à partir d'une souche d'*E. coli* isolée chez une patiente nommée « Temoneira », d'où la nomination (Datta et Kontomichalou, 1965).

La majorité des BLSE de ce type dérivent par quatre à sept mutations ponctuelles de l'enzyme originale (TEM-1 ou TEM-2). Les substitutions les plus courantes sont le glutamate en lysine en position 104, l'arginine en sérine en position 164, la glycine en sérine en position 238 et le glutamate en lysine en position 240 (Bradford, 2001). Ces mutations rendent l'enzyme capable d'hydrolyser les C3G, mais aussi plus vulnérable à l'action des inhibiteurs (acide clavulanique). Cependant, d'autres mutations peuvent conférer la résistance aux inhibiteurs. Ces variantes sont appelées TRI (TEM résistantes aux inhibiteurs). 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* (Bradford, 2001 ; Paterson et Bonomo, 2005). En Europe, les BLSE de type TEM les plus fréquentes sont TEM-24 chez *Enterobacter aerogenes*, TEM-3 et TEM-4 chez *K. pneumoniae*, et TEM-52 chez *Salmonella enterica* et *E. coli* (Cantón *et al.*, 2008).

**2.2.2.4.2. BLSE de type SHV (Sulphydryl variable) :**

Les enzymes BLSE de type SHV dérivent par mutations ponctuelles de l'enzyme originale SHV-1 qui correspond à un gène *bla<sub>SHV</sub>* de pénicillinase chromosomique de *K. pneumoniae* (Brisse et Verhoef, 2001 ; Haeggman *et al.*, 2004). La majorité des BLSE de type SHV ont été décrites chez les souches de *K. pneumoniae*, toutefois ces enzymes ont été trouvées chez *Citrobacter freundii*, *C. diversus*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae* (Bradford, 2001). Ainsi, ces enzymes sont aussi présentes chez les espèces de *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter spp* (Naiemi *et al.*, 2005) ; la présence de la séquence d'insertion IS26 sur le gène SHV faciliterait l'acquisition du phénotype BLSE (Hammond *et al.*, 2005).

**2.2.2.4.3. BLSE de type CTX-M (Cefotaximase-Munich) :**

Les BLSE de type CTX-M ont été décrites initialement en 1986 (FEC-1) au Japon, Allemagne et France en 1989 (CTX-M-1) et ont depuis lors disséminé largement dans le monde (Thomson et Moland, 2000). Ces « nouvelles » enzymes représentent à l'heure actuelle les BLSE les plus fréquentes au niveau mondial après leur diffusion rapide depuis les années 90 (Bonnet, 2004 ; Livermore *et al.*, 2007). Les enzymes CTX-M présentent une forte homologie avec les  $\beta$ -lactamases chromosomiques de *Kluyvera ascorbata* et *Kluyvera goergiana*, espèces d'entérobactéries de l'environnement. Pour l'heure, plus d'une centaine de

CTX-M ont été identifiées (<http://www.lahey.org/Studies/>) classées en cinq groupes (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, et CTX-M-25) en se basant sur les différentes substitutions d'acides aminés (Arlet, 2006).

#### **2.2.2.5. Epidémiologie des entérobactéries productrices de BLSE :**

À la fin des années 1980 et au début de 1990 en Europe, au Japon et en Argentine ou encore au Mexique, Les souches productrices des BLSE ont été initialement rapportées de façon plus ou moins sporadique (Bonnet, 2004). Les BLSE de type TEM et SHV ont très rapidement et largement été diffusés dans le monde avec des prévalences variables selon les pays. L'apparition des CTX-M s'est accompagnée d'une profonde modification dans l'épidémiologie des entérobactéries productrices de BLSE dans la mesure où elles se sont répandues chez *E. coli* alors que les BLSE dérivées de TEM et SHV étaient principalement présentes chez *K. pneumoniae* et *Enterobacter cloacae* (Pitout *et al.*, 2005). De plus, le portage digestif de souches productrices de BLSE est devenu non négligeable avec un réservoir de BLSE animal important (Rossolini *et al.*, 2008).

Chez l'animal, la production d'enzymes de type BLSE a été décrite chez la plupart des entérobactéries d'importance clinique (*E. coli*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*,...etc). Néanmoins, c'est chez *E. coli* que les BLSE ont été le plus fréquemment décrites. La détection de ces résistances est également majeure dans la filière poules/poulets, où la proportion de souches résistantes est en nette augmentation (Rapport Résapath : [www.resapath.anses.fr](http://www.resapath.anses.fr)). De façon générale, aucune espèce animale n'est épargnée, y compris les animaux de compagnie.

En Algérie, la présence des souches d'*E. coli* productrices de BLSE a été de plus en plus signalée en milieu hospitalier et communautaires (Iabadene *et al.*, 2008; Touati *et al.*, 2008 ; Meradi *et al.*, 2011; Gharout-Sait *et al.*, 2012; Baba Ahmed-Kazi Tani *et al.*, 2013).

Chez l'animal, la production d'enzymes de type BLSE a été décrite chez des souches d'*E. coli* d'origine aviaire au cours des dernières années ( Meguenni *et al.*, 2015 ; Belmahdi *et al.*, 2016). Des BLSE de type CTX-M-1- et CTX-M-15 dans des souches d'*E. coli* d'origine aviaire dans les régions du centre Algérien (Meguenni *et al.*, 2015) et de type SHV-12,TEM-1 et CTX-M-1 ont été détectées dans des souches d'*E. coli* isolées à partir d'intestins de poulets abattus dans la région du l'est Algérien (Belmahdi *et al.*, 2016); Aussi dans la région de l'ouest Algérien , des souches d'*E.coli* de type TEM-1 , SHV-12 et CTX-M 1 ont été détectées dans les deux spéculations aviaires : chair et ponte (Benameur *et al.*, 2018 ; Benameur *et al.*, 2019).

### **3. Résistance aux quinolones :**

Les quinolones forment une large classe d'antibactériens de synthèse qui comprennent les dérivés de l'acide nalidixique découvert en 1962 et utilisé chez l'homme dès l'année suivante. Cette famille d'antibactériens a fait l'objet de recherches très importantes aboutissant au dépôt de plus de 10 000 brevets. L'ajout de l'atome de fluor dans les années 1970 a permis d'augmenter fortement la pénétration des molécules quinolones dans les cellules (jusqu'à 200 fois plus) ; De façon générale, les quinolones sont caractérisées par un large spectre d'activité, une bonne biodisponibilité orale, une bonne pénétration tissulaire (Larouche, 2001).

#### **3.1. Mécanisme d'action des quinolones :**

Pour atteindre leur cible, les quinolones doivent traverser la paroi bactérienne et la membrane cytoplasmique des bactéries à Gram positif. Chez les bactéries à Gram négatif, elles doivent aussi traverser la membrane externe, mais cette étape est facilitée par une diffusion passive à travers les porines, en fonction de leur degré d'hydrophobicité et de leur poids moléculaire, et éventuellement par un passage direct à travers la double couche phospholipidique.

Les quinolones vont alors bloquer la synthèse d'ADN en inhibant les enzymes cellulaires impliquées dans le maintien de la structure de l'ADN.

Les cibles des quinolones sont les topoisomérases bactériennes de type 2 (ADN gyrase et topoisomérase IV). Ces topoisomérases sont des enzymes ubiquitaires des cellules eucaryotes et procaryotes, nécessaires à la vie cellulaire. Elles sont impliquées dans le compactage de l'ADN et la régulation de la conformation de l'ADN lors de la réplication, de la transcription et de la recombinaison.

Les topoisomérases de type 2 agissent sur l'ADN double brin. Ce sont des enzymes composées de paires de 2 sous-unités : GyrA et GyrB pour l'ADN gyrase et ParC et ParE pour la topoisomérase IV organisées en 2 paires identiques responsable respectivement de la liaison de l'ADN (GyrB /ParE) et de l'action catalytique (GyrA/ParC).

Les coupures d'ADN double brin par les quinolones constitueraient des lésions non réparables de l'ADN responsable de bactéricidie. L'effet bactéricide varie en fonction de la molécule et de l'espèce bactérienne considérées (De Lastours et Fantin, 2014).

#### **3.2. Mécanismes de résistance aux quinolones :**

Jusqu'en 1998, il était admis que la résistance aux quinolones était liée exclusivement à des mécanismes de résistance de support chromosomique, transmissibles verticalement. Il

s'agissait majoritairement de mécanismes de sélection de mutants résistants par accumulation de mutations ponctuelles. Depuis 1998, la découverte de gènes de support plasmidique impliqués dans la résistance aux quinolones chez les entérobactéries (Martinez-Martinez et al., 1998) a suscité de nombreuses études épidémiologiques qui ont mis en évidence leur large diffusion au sein d'éléments génétiques mobiles, transférables horizontalement. Cette diffusion est très liée à celle d'autres gènes de résistance, particulièrement les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE). L'impact des différents mécanismes de support plasmidique, qui ne concernent pour l'instant que les entérobactéries, est encore peu connu en pratique clinique, mais pourrait contribuer, par le biais d'une sensibilité diminuée, à la sélection ultérieure de mutants résistants (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2007).

### **3.2.1. Diminution de la concentration intracellulaire d'antibiotique :**

La diminution de la concentration intracellulaire de quinolones pouvant atteindre la cible peut être liée soit à une imperméabilité par mutation des gènes régulateurs de la synthèse des porines soit à une hyperexpression de pompes d'efflux actif. Chez les bactéries à Gram positif, on peut citer par exemple, les pompes de la famille MFS (major facilitator superfamily), NorA chez *Staphylococcus aureus* et PmrA chez *Streptococcus pneumoniae*.

Chez *E. coli*, le système AcrAB-TolC participe également à la résistance de bas niveau aux quinolones. Une mutation dans le répresseur de AcrAB, *acrR* ou dans le répresseur de MarA, *marR*, entraîne une hyperproduction de la pompe d'efflux. Plusieurs pompes d'efflux sont également décrites chez *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*. Elles ne sont pas spécifiques des quinolones et peuvent être hyperproduites sous la pression de sélection de nombreux autres antibiotiques ou antiseptiques. Récemment, une pompe d'efflux MFS à 14 segments transmembranaires, QepA, spécifique des quinolones, codée par un gène de support plasmidique, a été décrite chez les entérobactéries (Périchon *et al.*, 2007).

Dans tous les cas, ces mécanismes d'efflux confèrent une résistance de bas niveau aux fluoroquinolones, variable selon la molécule, mais pouvant se cumuler avec d'autres mécanismes pour conférer une résistance de haut niveau.

### **3.2.2. Inactivation de l'antibiotique :**

L'antibiotique pénètre dans la bactérie et atteint une concentration intracellulaire normale, mais il est partiellement dégradé par une enzyme, ce qui diminue son activité sur la cible. Ce mécanisme de découverte récente pour les quinolones (2006) n'est décrit pour l'instant que chez les entérobactéries. Il est lié à la présence d'une acétylase codée par un gène

*aac-(6')-Ib-cr* de support plasmidique qui code une aminoside 6-N-acétyltransférase plasmidique bi-fonctionnelle, capable d'acétyler à la fois les aminosides, la ciprofloxacine et la norfloxacine au niveau du groupement amine secondaire du cycle piperazinyl (Robicsek *et al.*, 2006b).

### 3.2.3. La protection de la cible :

La molécule de quinolone arrive intacte au niveau de l'ADN gyrase et de la topoisomérase, mais une protéine à motifs pentapeptidiques répétés, nommée Qnr, vient interférer dans le complexe ADN gyrase/ADN/quinolones et inhibe l'action des quinolones sur sa cible (Tran *et al.*, 2005). En présence de la protéine Qnr, les fonctions de surenroulement, relâchement, désenchevêtrement de l'ADN gyrase sont rétablies. À ce jour, 5 déterminants différents ont été rapportés, QnrA, QnrB, QnrS, QnrC, QnrD. Il s'agit là encore d'une résistance de bas niveau, puisque les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont multipliées par un facteur 4 à 8. Ces protéines Qnr sont codées par des gènes *qnr* de support plasmidique chez les entérobactéries, qui auraient été mobilisés à partir de gènes *qnr* chromosomiques présents chez des bactéries de l'environnement hydrique, comme les Vibrionaceae (Poirel *et al.*, 2005). Plusieurs gènes *qnr*-like chromosomiques ont été décrits chez des bactéries à Gram positif (*E. faecalis*) ou chez les mycobactéries (*M. smegmatis*, *M. tuberculosis*). Certains d'entre eux pourraient être impliqués dans la résistance intrinsèque de bas niveau aux quinolones chez ces espèces.

### 3.2.4. Modifications de la cible :

Suite à la mutation des gènes de structure, diminuant l'affinité de l'antibiotique pour sa cible Il s'agit du mécanisme principal, chez toutes les espèces bactériennes. Ces mutations surviennent principalement dans les gènes de l'ADN gyrase ou de la topoisomérase IV, selon la cible préférentielle de la molécule et selon l'espèce bactérienne. Chez les bactéries à Gram négatif, le premier site de mutations est l'ADN gyrase car elle est la cible principale.

Chez *E. coli*, par exemple, la région située à proximité du site catalytique, entre les acides aminés 67 et 106, correspond à la « quinolone-resistance determining region » (QRDR), où est retrouvée la majorité des mutations responsables de résistance aux fluoroquinolones. Les résidus les plus fréquemment modifiés sont situés aux positions 83 et 87 de la sous-unité GyrA. L'effet de ces mutations sur l'activité des quinolones dépend de leur type, de leur nombre et de la molécule concernée. Dans la majorité des cas, une seule mutation dans la QRDR de GyrA suffit à entraîner une résistance de haut niveau à l'acide

nalidixique. En revanche, la résistance à l'ofloxacin peut nécessiter deux mutations, alors qu'il en faudra trois pour la ciprofloxacine (Mérens et Servonnet, 2010).

### 3.3. La résistance plasmidique des entérobactéries aux quinolones :

Chez les entérobactéries, la résistance aux quinolones résulte principalement d'une accumulation de mutations au niveau des gènes codant les cibles de ces molécules, l'ADN gyrase et la topoisomérase IV. Les autres mécanismes chromosomiques, comme une hyper-expression des pompes d'efflux ou une imperméabilité entraînant une diminution de la concentration intracellulaire d'antibiotique peuvent également être impliqués.

Depuis la description du premier gène *qnrA1* en 1998, trois familles de gènes de résistance transférables horizontalement grâce à un support plasmidique ont été décrites chez les entérobactéries : *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* et *qepA* (Strahilevitz *et al.*, 2009). Ils sont essentiellement responsables de résistance de bas niveau aux quinolones, mais concourent à une augmentation de la fréquence de sélection des mutants résistants (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2007). Plusieurs études ont montré que les déterminants *qnr*, principalement *qnrA* et *qnrB*, étaient plus fréquents chez les entérobactéries productrices de BLSE ; ces gènes *qnrA* et *qnrB* sont portés par de grands plasmides de 40-320 kb, au sein d'intégrons de classe 1 de type *sull*. *qnrS* est moins fréquemment associé à des BLSE, mais plutôt à des bêta-lactamases TEM-1 ou LAP-1. Alors que le premier *qnrA1* décrit en 1998 chez une souche de *Klebsiella pneumoniae* isolée en Alabama était porté par le plasmide pMG252, en association avec la céphalosporinase FOX-5, il existe moins de données sur les associations entre *qnr* et céphalosporinases plasmidiques, mais l'association de *qnrB4* avec DHA-1, initialement décrite en Asie, puis aux États-Unis et en France (Mérens et Servonnet, 2010).

Le gène *aac(6')-Ib-cr* code un variant de l'aminoglycosyltransférase *aac(6')-Ib*, enzyme responsable d'une résistance à la kanamycine, tobramycine et amikacine ; aussi confère une augmentation d'un facteur 2 à 4 des concentrations minimales inhibitrices de la ciprofloxacine et de la norfloxacine. En général, ce gène est un gène cassette d'un intégron de classe 1 de type *sull* et est associé à des bêta-lactamases OXA-1, CTX-M15 ou SHV-12. Il a été ponctuellement retrouvé chez des souches productrices de céphalosporinases plasmidiques (DHA-1 ou CMY), mais souvent également productrices de BLSE et en association avec *qnr*.

Enfin, le gène *qepA*, codant une pompe d'efflux (QepA1 ou QepA2), confère une diminution de sensibilité aux quinolones hydrophiles (norfloxacine, ciprofloxacine, principalement). À ce jour, les études épidémiologiques concernant *QepA* sont encore rares, mais sa prévalence est faible (< 1 %) (Mérens et Servonnet, 2010).

En Algérie, les gènes *qnr* (-A, -B, -S) ont été détectés chez des souches hospitalières et communautaires d'entérobactéries produisant des BLSE (CTX-M, SHV-12 et VEB-1) (Touati *et al.*, 2008 ; Meradi *et al.*, 2011; Gharout-Sait *et al.*, 2012; Baba Ahmed-Kazi Tani *et al.*, 2013). En plus, *qnrA* a été identifié chez des souches d'*E. coli* d'origine aviaire porteuses de SHV-12 (Belmahdi *et al.*, 2016), et *qnrS1* et *qnrB5* chez des souches d'*E. coli* productrices de BLSE d'animaux de compagnie (Yousfi *et al.*, 2016). Et plus récemment, *qnrS1* chez des souches d'*E. coli* d'origine aviaire productrices de BLSE de type CTX-M-1 (Benameur *et al.*, 2018).

#### **4. Caractérisation des gènes de résistance aux antibiotiques :**

##### **4.1. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) :**

###### **4.1.1. Généralités :**

Les tests moléculaires les plus utilisés aujourd'hui sont basés sur l'amplification du génome cible, ils reposent sur la technique de PCR (Mullis *et al.*, 1992). L'apport de la PCR dans le domaine du diagnostic est considérable au vu de ses performances en matière de sensibilité et de spécificité. Le principe d'amplification d'une région génomique permet de multiplier une molécule d'ADN ou d'ARN initialement présente en trop faibles quantités pour être détectée ou pour d'autres applications nécessitant beaucoup de matériel.

###### **4.1.2. Historique :**

En 1983, Kary Mullis un scientifique travaillant pour la Société Cetus, imagine une technique totalement nouvelle et innovante, la polymérase chain reaction (PCR) (Mullis, 1987).

En 1987, il dépose un brevet où la technique est adaptée et simplifiée grâce à l'utilisation de la Taq polymérase, une ADN polymérase stable à haute température provenant d'un microorganisme « extrémophile » vivant à 100° C, *Thermus aquaticus* évitant des ajouts itératifs de la polymérase, thermosensible, après chaque cycle de chauffage (Green *et al.*, 2010). Kary Mullis recevra le prix Nobel de chimie en 1993 (Berche, 2016).

###### **4.1.3. Principe de la technique :**

La PCR permet d'amplifier, en un nombre élevé de copies, une séquence particulière d'ADN. La polymérisation se réalise dans un mélange réactionnel contenant de faibles quantités d'ADN possédant la séquence à amplifier, les deux amorces nucléotidiques complémentaires des séquences qui encadrent la cible à amplifier, l'ADN polymérase et un mélange des quatre désoxyribonucléotides-triphosphates (dNTP) (dATP, dTTP, dCTP et dGTP). Elle débute par une étape de dénaturation thermique de l'ADN à amplifier, en suite

l'hybridation des amorces et leur élongation par l'ADN polymérase (Uhel et Zafrani, 2019). (figure N°09).

#### 4.1.3.1. Etape de dénaturation :

Une première étape de chauffage à 95 °C permet de séparer les deux brins d'ADN, d'homogénéiser le milieu réactionnel et d'inhiber d'autres enzymes potentiellement présentes dans la solution. La Taq ADN polymérase est en revanche stable à cette température.

#### 4.1.3.2. Etape d'hybridation des amorces (56–64 °C) :

Des séquences oligonucléotidiques complémentaires ou amorces sont alors hybridées aux extrémités 3' des deux brins du fragment d'ADN matrice.

#### 4.1.3.3. Etape d'élongation (72 °C) :

L'allongement des amorces dans le sens 5' 3' est ensuite assuré par l'ADN polymérase Taq. Les nouvelles molécules d'ADN ainsi formées sont dénaturées et un nouveau cycle peut commencer. La répétition du cycle de variation de température environ 25 à 35 fois permet d'amplifier la quantité totale d'ADN correspondant à la séquence cible de façon quasi exponentielle.

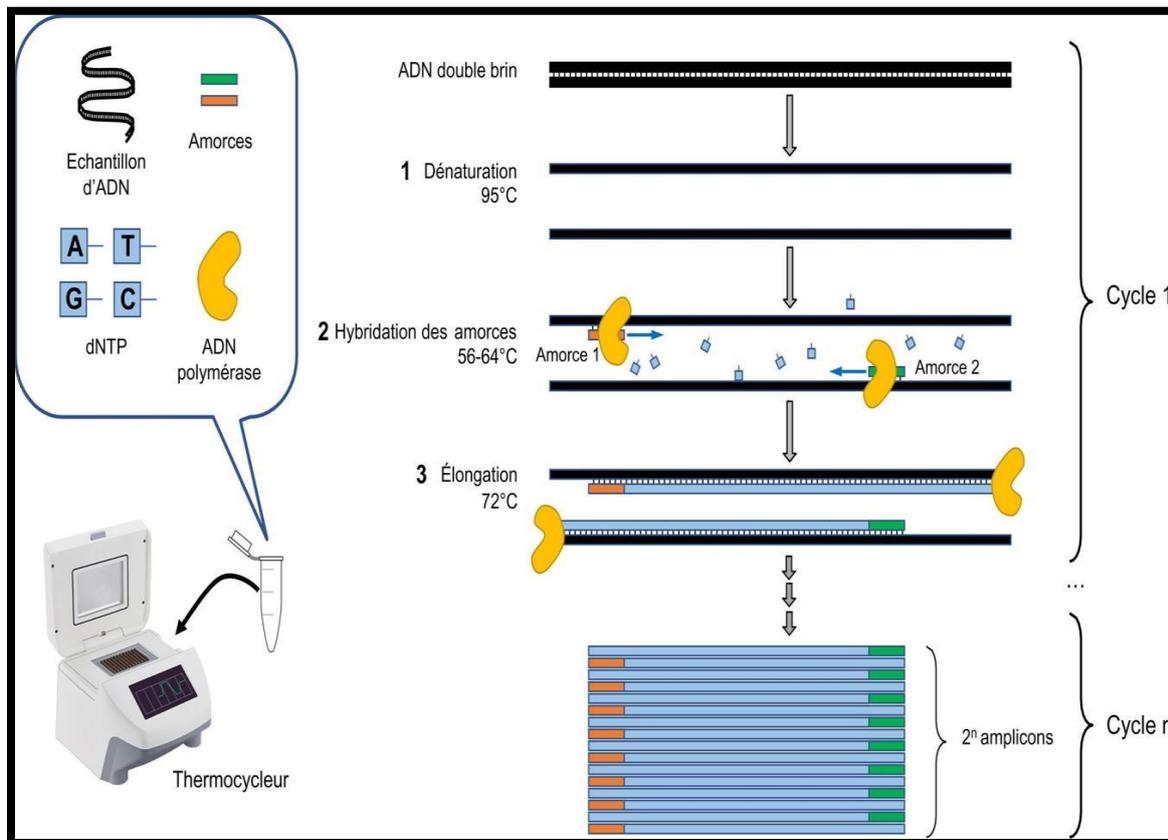


Figure N° 09: Etapes de la PCR (Uhel et Zafrani, 2019).

**4.1.4. Variantes associées à la PCR:****4.1.4.1. La PCR classique :**

La détection des produits est faite à la fin des réactions de PCR, soit en couplant un test ELISA, soit en réalisant une migration électrophorétique sur gel d'agarose (Diarra, 2014). Cette dernière est la plus largement utilisée pour analyser le produit de PCR en séparant les produits d'ADN en fonction de la taille et de la charge. L'électrophorèse sur gel d'agarose est la méthode la plus simple de visualisation et d'analyse du produit PCR. Il permet de déterminer la présence et la taille du produit PCR. Un ensemble prédéterminé de produits ADN avec des tailles connues est exécuté simultanément sur le gel en tant que marqueurs moléculaires standardisés pour aider à déterminer la taille du produit (Garibyan et Avashia, 2013).

**4.1.4.2. La PCR multiplex :**

La PCR est une technologie de choix pour la recherche d'un agent pathogène précis. Cependant, le domaine du diagnostic requiert parfois, selon le contexte clinique, la recherche de plusieurs agents dans un même échantillon et en une seule réaction. L'objectif de la manœuvre est d'une part économique mais cela permet également d'économiser du temps et de préserver les échantillons. On parle alors de PCR multiplex. Elle a l'avantage de permettre un gain de temps par rapport à une PCR qui utilise un seul couple d'amorces. Néanmoins, la difficulté réside dans l'obtention d'une bonne combinaison d'amorces et d'un mélange réactionnel adapté, afin d'obtenir les produits d'amplification voulus. Du fait de phénomènes de compétition, cette technique est limitée par le nombre de couples d'amorces et on peut actuellement, utiliser cinq voir six couples maximum dans une même réaction (Yao *et al.*, 2010).

**4.1.4.3. La PCR en temps réel (PCR quantitative) :**

La PCR en temps réel (Real-time PCR) est une révolution dans l'utilisation de la PCR. Cette technique consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle, non pas au final mais tout au long de la réaction, (temps réel) grâce à un marqueur fluorescent. Elle permet par son principe de faire des mesures quantitatives d'ADN durant la réaction (expliquant l'appellation PCR quantitative, qPCR), alors que la PCR classique ne donne que la mesure finale (Kaltenboeck et Wang, 2005), mais elle nécessite des thermocycleurs particuliers.

**4.1.4.4. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) :**

La RT-PCR est une technique qui permet de faire une PCR (réaction en chaîne par polymérase) à partir d'un échantillon d'ARN. L'ARN est tout d'abord rétro-transcrit grâce à une enzyme appelée transcriptase inverse, qui permet la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc). Ce dernier est ensuite utilisé pour réaliser une PCR (Cavé *et al.*, 2003).

Dans la recherche scientifique, la technique de qRT-PCR, pour RT-PCR quantitative, est fréquemment utilisée. Celle-ci permet de quantifier un type d'ARN initialement présent dans un échantillon. Elle est par exemple utilisée pour connaître le niveau d'expression d'un gène dans une condition donnée. Plus un gène est exprimé, plus le nombre de molécules d'ARN synthétisées sera grand. Grâce à la qRT-PCR, les chercheurs peuvent donc comparer le niveau d'expression d'un gène donné dans deux conditions différentes.

**4.2. Séquençage :****4.2.1. Historique :**

À la fin des années 1970, les scientifiques ont mis au point les deux premières méthodes de séquençage de l'ADN. Allan Maxam et Walter Gilbert ont développé le séquençage chimique, méthode également appelée séquençage de Maxam-Gilbert. Cette méthode s'appelle également le séquençage chimique. Elle se sert de produits chimiques pour diviser l'ADN en petits fragments afin de déterminer sa séquence. Cette méthode était révolutionnaire à l'époque. Cependant, elle est moins efficace que celles qu'on a élaborées plus récemment.

En 1977, Frederick Sanger et ses collègues ont conçu une autre méthode de séquençage de l'ADN. Pendant environ 40 ans, elle est demeurée la méthode la plus utilisée. Même si on a développé des méthodes plus rapides et moins coûteuses depuis, celle de Sanger est encore largement utilisée (Heather et Chain, 2016).

Frederick Sanger a remporté le prix Nobel de chimie à deux reprises! L'un des prix a récompensé ses recherches sur la structure de l'insuline et l'autre, sa méthode de séquençage de l'ADN.

**4.2.2. Principe de la technique :**

D'abord, il est nécessaire d'amplifier l'ADN cible par PCR, puis de le dénaturer afin d'obtenir un ADN simple brin.

La prochaine étape consiste à abaisser la température et à ajouter une amorce d'ADN. Celle-ci est une courte séquence d'ADN à un seul brin. L'amorce d'ADN s'attache au brin

d'ADN qu'on tente de séquencer. Elle indique le début du séquençement, un peu comme une ligne de départ.

De l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', cette enzyme ajoute les dNTP complémentaires et de manière aléatoire et inconstante des didéoxyribonucléotides triphosphates (ddNTP), par exemple un ddGTP sera parfois ajouté à la place d'un dGTP. La réaction se faisant dans un seul tube, les ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP et ddTTP) sont marqués à l'aide de fluorophores différents pour chaque ddNTP (fluorophores « quatre couleurs »). Lorsqu'un ddNTP est incorporé à la place d'un dNTP, l'ADN polymérase ne peut plus continuer sa polymérisation. La réaction d'extension s'arrête (en effet, le didéoxynucléotide ne possède pas de groupe 3'-hydroxyle indispensable à la réaction de polymérisation de l'enzyme). Statistiquement, au cours de la réaction, pour chaque « base » de l'ADN cible, au moins une fois, un ddNTP complémentaire sera incorporé à la place d'un dNTP. Par conséquent, à la fin de la réaction, nous obtiendrons des fragments de taille différente (Lamoril *et al.*, 2008).

L'analyse de la réaction est ensuite effectuée. Différentes méthodes d'analyse sont possibles. Aujourd'hui, l'électrophorèse capillaire réalisée sur un automate de séquençage est la méthode de choix. Lors de la migration, chaque fragment (contenant un ddNTP marqué par un fluorophore) sera excité par un laser et le signal obtenu analysé par un logiciel spécifique. L'analyse informatique des signaux permet d'obtenir la séquence étudiée.

La première séquence connue d'un être vivant date de 1977 : il s'agit du génome du bactériophage  $\Phi$ X174 séquencé par la méthode de Sanger (Sanger, 1977). En 1998, le premier génome d'un animal (en fait, un ver de terre), *Caenorhabditis elegans*, fut publiée. Grâce aux procédés technologiques les plus récents, le génome bactérien entier (WGS : whole genome sequencing) peut être séquencé (Piso *et al.*, 2017). La méthode du WGS emploie généralement des isolats bactériens. Toutefois, des protocoles pour le séquençage directement à partir de l'échantillon du patient sont de plus en plus souvent développés. La méthode du WGS permet en outre un typage de haute résolution ainsi que la classification des isolats dans un contexte moléculaire épidémiologique (Egli *et al.*, 2018).

À l'avenir, la mise en place des techniques de séquençage du génome entier permettra d'avoir facilement la cartographie des gènes de résistance des bactéries d'un patient et pourra peut-être permettre un choix d'antibiotique plus pertinent et adapté aux potentielles émergences de souches résistantes chez le patient. Ce type de technique pourra également permettre de documenter facilement les transmissions croisées de bactéries résistantes (Köser *et al.*, 2012).

**PARTIE**  
**EXPERIMENTALE**

# **Chapitre I.**

## **Matériel et méthodes**

## Chapitre I. Matériel et méthodes

### 1. Rappel sur la problématique et les objectifs :

Afin de lutter contre l'émergence et la diffusion de l'antibiorésistance, et également de protéger la santé du consommateur, l'évaluation des niveaux de résistance et de multirésistance aux antibiotiques et la meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et leur origine tout au long de la filière avicole sont absolument nécessaires à la mise en place d'une stratégie de prévention de dissémination globale des bactéries multi-résistantes.

Notre travail a eu, par conséquent, deux objectifs principaux :

- Le premier consacré à l'étude phénotypique de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries d'origine aviaire et l'investigation de la multirésistance ;
- Le second, avait pour but de détecter les souches productrices de bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE) et la recherche des déterminants génétiques de résistance (gènes de résistance) à deux familles d'antibiotiques d'importance critique en santé humaine et animale (les quinolones et les C3G).

### 2. Durée et lieu de l'étude :

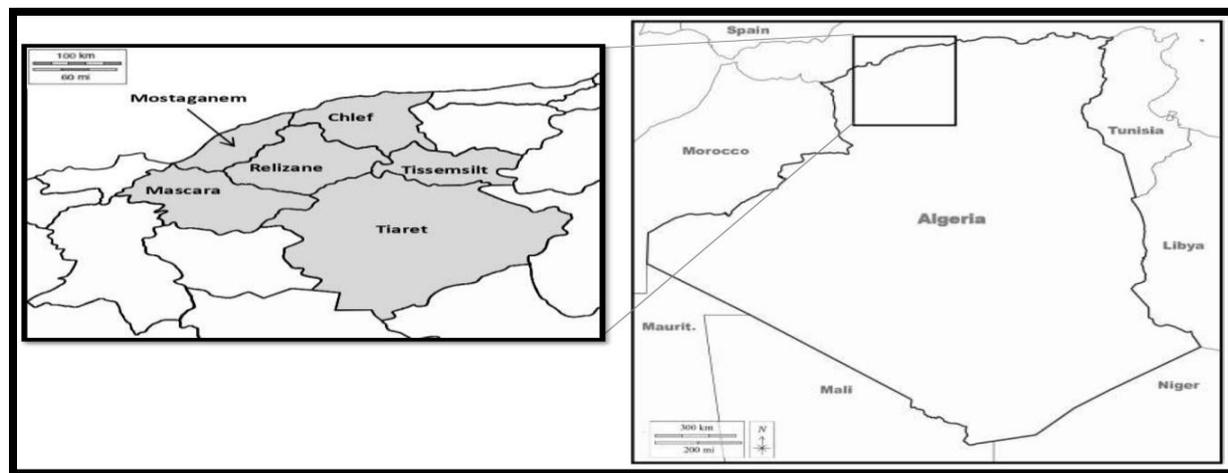
Ce travail a été réalisé au niveau de trois laboratoires :

- La partie relative à l'isolement bactériologique et à la caractérisation phénotypique des isolats a été réalisée au sein de l'Equipe de Recherche « Hygiène et qualité des aliments d'origine animale » dans le Laboratoire de Recherche « Hygiène et pathologies animales », de l'Institut des Sciences Vétérinaires – Université Ibn Khaldoun de Tiaret, ainsi qu'au niveau du service de bactériologie médicale du « laboratoire vétérinaire régional de Mostaganem » qui appartient au réseau de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques en Algérie (Ministère de l'agriculture et du développement rural), durant la période s'étalant du mois de Septembre 2017 jusqu'au mois de Janvier 2020.
- La caractérisation moléculaire des isolats a été réalisée au niveau du « laboratoire de recherche bactériologique »- institut de recherche vétérinaire -Tunis- pour une période de 08 mois allant du mois de Février au mois d'Octobre 2022.

### 3. Zone d'étude et populations étudiées :

Notre travail a porté sur des prélèvements provenant de six régions dans l'ouest Algérien: Mostaganem, Mascara, Relizane, Chlef, Tiaret et Tissemsilt (figure N°10). Les prélèvements sont parvenus au laboratoire suite aux demandes d'analyses rédigées par les vétérinaires officiels appartenant aux inspections vétérinaires des six wilayas citées ci-dessus.

Les prélèvements reçus au service de bactériologie médicale du laboratoire vétérinaire régional de Mostaganem provenaient d'élevages avicoles à vocation chair et ponte (fermes étatiques et privées) dans le but d'effectuer des analyses dans le cas de suspicion de la salmonellose aviaire et parfois pour effectuer des antibiogrammes.



**Figure N°10 :** Les six wilayas de la zone d'étude.

#### **4. Méthodologie :**

##### **4.1. Types de prélèvements :**

Quatre types de prélèvements ont été reçus au niveau du service de bactériologie médicale du laboratoire vétérinaire régional de Mostaganem.

##### **4.1.1. Prélèvements de surfaces :**

Les prélèvements, par écouvillonnage, ont été effectués avant l'arrivée des poussins et pour toutes les mises en place, afin d'évaluer la qualité de la désinfection réalisée. Trois écouvillons (sol, murs, matériels) ont été effectués par prélèvement.

##### **4.1.2. Œufs à couvrir :**

Prélèvement de trente œufs par bâtiment (une plaquette).

##### **4.1.3. Fientes :**

Prélevées dans des tubes stériles et acheminés au laboratoire dans les brefs délais.

##### **4.1.4. Sujets vivants :**

Prélèvement systématique de dix à trente sujets vivants par bâtiment dans le cas de poussins et cinq à dix sujets vivants dans le cas de poulet, selon la capacité du bâtiment d'élevage (conformément à la note N° 787 du 08/11/2004, MADR, relative au renforcement du contrôle sanitaire vétérinaire en aviculture).

Après examen externe, les sujets ont été autopsiés au niveau de la salle d'autopsie du laboratoire. Les organes prélevés sont placés dans des boîtes de pétri et acheminés au service

de bactériologie médical. Les prélèvements ont été réalisés aseptiquement et clairement identifiés. La nature des prélèvements effectués variait selon l'âge des animaux prélevés (tableau N°01).

**Tableau N°01 : Nature des prélèvements effectués selon l'âge des sujets.**

Age	Organes prélevés
Sujets jeunes (poussins)	Sac vitellin, foie, rate et cœur
Sujets adultes	Foie, rate et cœur

## **4.2. Isolement, purification et identification des entérobactéries :**

### **4.2.1. Isolement des entérobactéries :**

La méthode d'isolement des entérobactéries a été faite selon le protocole de la recherche des entérobactéries appliqué au niveau du laboratoire vétérinaire régional de Mostaganem (figure N°11), inspirée de la méthode française de routine NF U 47-101 de Novembre 2007 qui comporte les étapes suivantes:

#### **4.2.1.1. Etape de pré-enrichissement : (pour toutes les entérobactéries)**

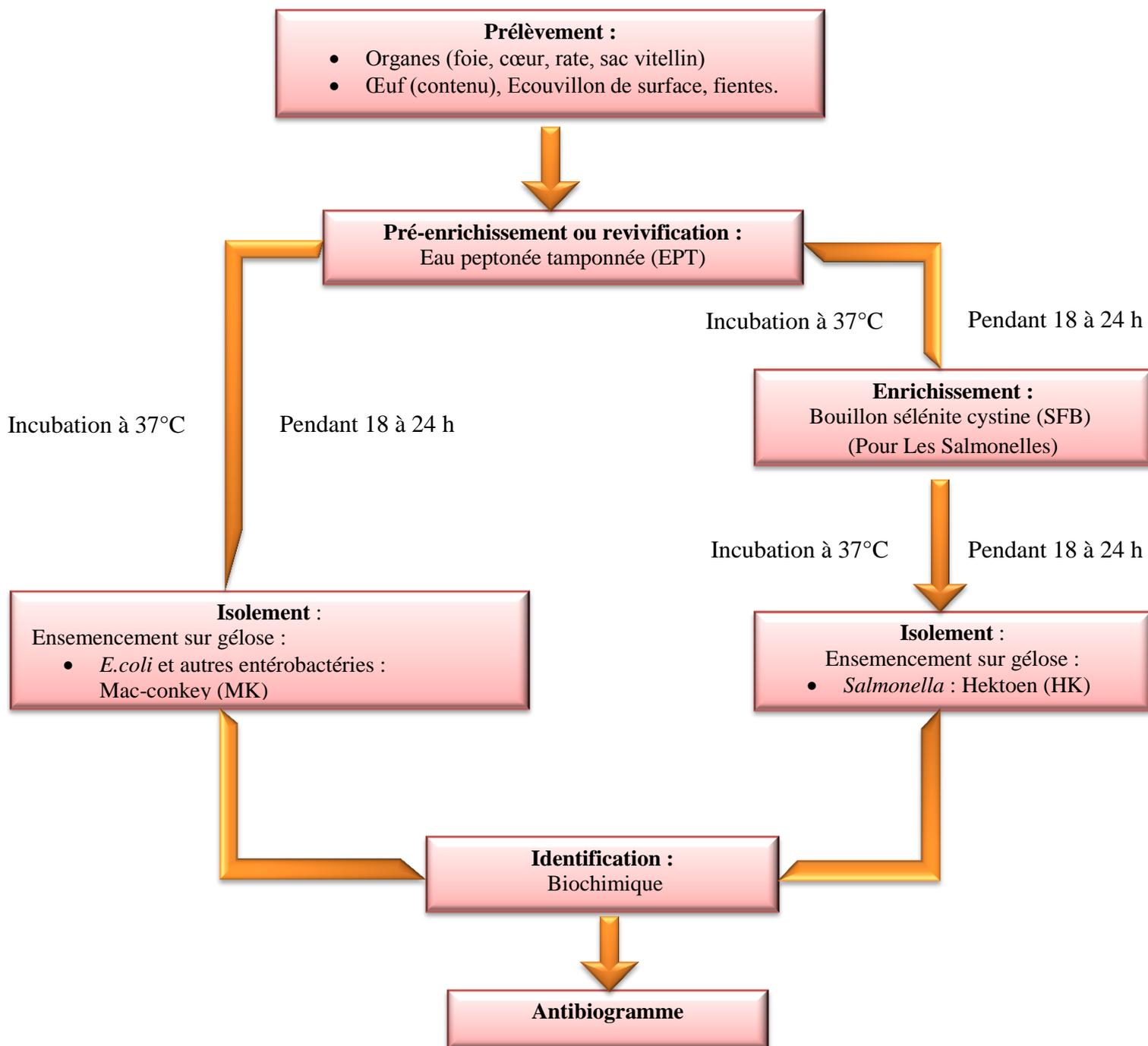
Après cautérisation de la surface, 1g de prélèvement d'organe broyé a été plongé dans 10 ml d'eau peptonée tamponnée (EPT), Pour les œufs, 1 ml du contenu d'œuf est mélangé avec 10 ml d'EPT ; laissé pour revivification à température ambiante pendant 30 mn puis incubé à 37°C pendant 18 à 20 h.

#### **4.2.1.2. Etape d'enrichissement : (seulement pour les salmonelles)**

1 ml du pré-enrichissement est transféré pour enrichissement, dans 20 ml de bouillon sélénite cystine (SFB) et incubé pendant 18 à 24 h à 37°C.

#### **4.2.1.3. Etape d'isolement :**

Le lendemain, après homogénéisation, 0,1 ml de la suspension estensemencée dans une boîte de gélose Hecktoen pour les salmonelles et de Mac-Conkey pour les autres entérobactéries et étuvées à 37°C pendant 18 à 24 h.



**Figure N° 11 :** Protocole d'isolement et d'identification des entérobactéries  
(Laboratoire vétérinaire régional de Mostaganem, Algérie).

#### 4.2.2. Purification des isolats :

La purification se fait en poursuivant le repiquage sur le même type de milieu jusqu'à l'obtention d'un isolat pure présentant les mêmes caractéristiques que celui obtenu en premier isolement. La dernière culture pure doit être faite sur gélose nutritive pour faire l'objet d'autres tests (tests préliminaires, identification biochimique, antibiogramme...).

**NB :** la composition des milieux de culture utilisés est décrite dans l'annexe N°01.

#### 4.2.3. Identification des entérobactéries :

##### 4.2.3.1. Identification morphologique :

- Sur le plan macroscopique : la forme et la couleur des colonies sont décrites dans les annexes N°02 et 03.
- Sur le plan microscopique : L'identification est basée sur l'observation microscopique de bacilles Gram- après coloration différentielle de Gram. Ces entérobactéries se présentent sous l'aspect de petits bâtonnets (2 à 3 µm par 0,6 à 1 µm) (annexe N° 04).

La phase d'identification morphologique des entérobactéries est complétée par le test d'oxydase (annexe N°05). Toutes les colonies qui sont Gram - et oxydase - seront identifiées par les galeries biochimiques.

##### 4.2.3.2. Identification biochimique : (Galerie API 20E)

###### ➤ Principe:

La galerie API 20E est un système pour l'identification des entérobactéries à Gram négatifs, utilisant 20 tests biochimiques standardisés et miniaturisés, ainsi qu'une base de données. Il s'agit de galerie qui se présente sous forme de produits desséchés que l'on réhydrate par inoculation de la suspension du germe à tester (annexe N°06).

###### ➤ Technique :

On réunit fond et couvercle d'une boîte d'incubation avec la répartition environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide, sans oublié d'inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.

En effet, on retire la galerie de son emballage individuel et on la dépose dans la boîte d'incubation, puis on prépare l'inoculum bactérien: une colonie dans 5ml d'eau physiologique, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland.

Pour inoculer la galerie, il faut remplir à l'aide d'une pipette Pasteur les tubes et les cupules des tests CIT, VP et GEL avec la suspension bactérienne ; et pour les autres tests, on va remplir uniquement les tubes (et non les cupules) avec la création d'une anaérobiose dans

les tests: ADH, LDC, ODC, URE, H<sub>2</sub>S en remplissant leur cupule par l'huile de vaseline stérile.

Enfin, on incube à 37 C° pendant 18-24 heures.

➤ **La Lecture:**

La lecture des galeries API 20E se fait selon les indications du fournisseur. Après codification des réactions en un profil numérique, on se réfère à un catalogue analytique où l'identification est donnée avec un pourcentage et une appréciation (Annexe N°07).

**4.2.3.3. Sérotypage des salmonelles :**

Le sérotypage des salmonelles a été effectué par agglutination sur lame à l'aide d'une culture fraîche des salmonelles et des sérums appropriés. Il a d'abord été vérifié que les isolats n'étaient pas en phase rugueuse (Rough: R.) ou auto agglutinables, en observant qu'aucune agglutination n'apparaissait en les mélangeant à une goutte d'eau physiologique.

Les sérotypes étaient déterminés en utilisant d'abord les sérums O polyvalents : OMA, OMB, OMC, OMD, OME, OMF et OMG puis par les sérums monovalents anti O et enfin par les sérums anti H (HMA, HMB, HMC et H1). En pratique, les sérums polyvalents OMA et OMB permettent de déterminer 99 % des souches de *Salmonella*. L'utilisation des sérums monovalents anti-O permet de préciser le groupe auquel appartiennent la salmonelle, et les sérums anti H pour la précision du sérotype.

Enfin le tableau de Kaufmann-White, est utilisé pour la détermination de la formule antigénique et la lecture des résultats du sérotypage (annexe N°08).

**4.3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme) :**

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par la méthode classique de diffusion des disques d'antibiotiques sur gélose, répondant aux critères définis par le CLSI (CLSI, 2015).

➤ **Liste des antibiotiques testés :**

Quatorze antibiotiques appartenant à huit familles différentes ont été testés (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) : ampicilline (AM, 10 µg), amoxicilline/ acide clavulanique (AMC, 20/10 µg), céfalotine (CEP, 30 µg), ceftiofur (XNL, 30 µg), acide nalidixique (NA, 30 µg), ciprofloxacine (CIP, 5 µg), norfloxacine (NX, 10 µg), tétracycline (TE, 30 µg), triméthoprim+ sulfaméthoxazole (SXT, 1, 25/23, 75 µg), néomycine (N, 30 µg), gentamicine (CN, 10 µg), chloramphénicol (C, 30 µg), nitrofurantoïne (FT, 300 µg), et colistine (CT, 50 µg). Le choix de ces antibiotiques a été fait selon les recommandations du CLSI (CLSI, 2015). Ces antibiotiques sont représentés dans l'annexe N°09.

➤ **Technique :**

- ✓ A partir d'une culture pure de 18-24 h sur milieu gélosé Mueller-Hinton, une suspension en 5 ml de solution saline (0,9 % NaCl), son opacité doit être équivalente à 0,5 McFarland (densitomètre) ou à une D.O. de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm.
- ✓ A partir de cette suspension bactérienne, une dilution au 1/10 dans l'eau physiologique (0,9 % NaCl) a été réalisée et bien homogénéisée; puis ensemencée, par écouvillonnage sur des boîtes de Pétri gélosées en Mueller-Hinton, en stries serrées, de haut en bas.
- ✓ Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

➤ **Lecture:**

La lecture a été faite par la mesurer avec précision les différents diamètres des zones d'inhibition, en comparaison ces résultats aux valeurs critiques figurant dans l'annexe N°10. Les bactéries ont été classées dans l'une des catégories: Sensible (S), Intermédiaire (I) ou Résistante (R). Dans notre travail, la souche de référence étudiée est: *E.coli* ATCC 25922 souche sensible, utilisée pour contrôler les paramètres de conformité (contrôle de qualité) (Annexe N°11).

#### **4.4. Conservation des souches :**

Afin d'effectuer une caractérisation moléculaire ultérieurement, les souches ont été conservées à 4°C, après avoir ensemencées par piqure centrale et incubées pendant 24 H à 37°C, dans des tubes contenant la gélose de conservation (Bio-Rad, France).

#### **4.5. Tests de détection de BLSE:**

Après l'antibiogramme ; En cas de réduction de la sensibilité aux céphalosporines de troisième génération, les BLSE ont été mises en évidence par la recherche d'une synergie entre l'acide clavulanique et les céphalosporines de troisième génération selon les techniques suivantes.

##### **4.5.1. Test de synergie: (Jarlier *et al.*, 1988).**

##### **Principe:**

La recherche de la  $\beta$ -lactamase à spectre étendu se fait dans les conditions standards de l'antibiogramme en disposant un disque d'amoxicilline + acide clavulanique AMC (20/10  $\mu$ g) à 30 mm (centre à centre) d'un disque de céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération: Céftiofur XNL (30  $\mu$ g).

➤ **Lecture :**

Il y a présence d'une BLSE ou un test de synergie positif quand il y a une image caractéristique, en « bouchon de champagne ». Un résultat positif est basé sur l'inhibition des BLSE par l'acide clavulanique, et par conséquent l'augmentation de l'activité des céphalosporines de troisième génération (C3G) en présence d'acide clavulanique.

**4.5.2. Test de double disque pour confirmation:**

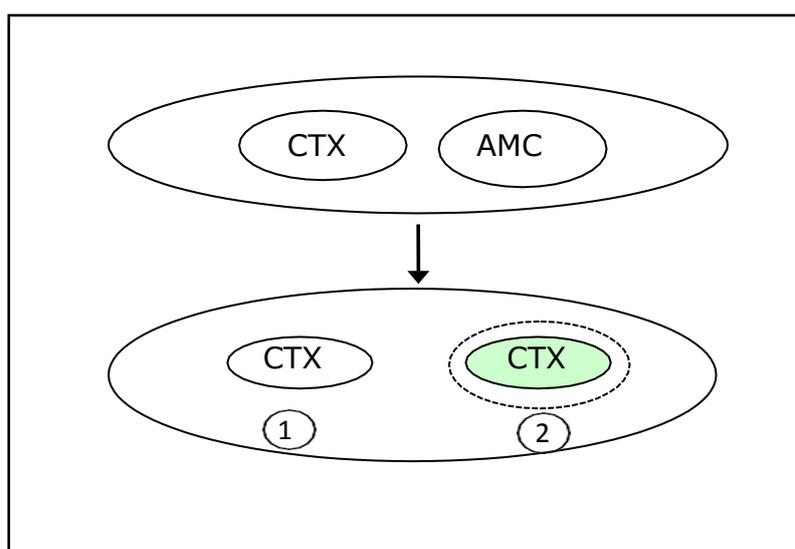
Ce test se fait systématiquement devant l'absence de synergie avec diminution des diamètres des céphalosporines de troisième génération (C3G).

➤ **Principe :**

- ✓ On dépose un disque d'AMC et un disque de céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération (Céftiofur) à une distance de 30 mm (centre à centre) ;
- ✓ Laisser diffuser les antibiotiques pendant une heure, à la température ambiante (sur la paillasse). La boîte est déposée le couvercle vers le haut ;
- ✓ Après diffusion, on enlève le disque d'AMC et on le remplace par un disque d'XNL ;
- ✓ On incube la boîte 37°C pendant 24 H.

➤ **Lecture :**

Le test du double disque est positif quand le diamètre d'inhibition du disque de céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération appliqué après diffusion du disque AMC est supérieur ou égal à 5mm par rapport au diamètre d'inhibition du disque de céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération (figure N°12), ce qui indique une production d'une BLSE (OMS, 2014).



**Figure N° 12:** Schéma de détection de BLSE par le test du double disque (Rahal *et al.* 2005).

- **Remarque :** dans notre étude, le CTX (Cefotaxime) est remplacé par l'XNL (Ceftiofur).

#### 4.6. Caractérisation moléculaire des isolats :

Nos isolats ont été caractérisés génotypiquement par PCR classique en ciblant :

- ✓ Les gènes des groupes phylogéniques des souches d'*E. coli*. BLSE.
- ✓ Les gènes *bla*<sub>BLSE</sub> : (TEM, SHV et CTX-M) chez les souches d'entérobactéries BLSE.
- ✓ Les gènes *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*) et *aac* (6')-Ib-cr chez les souches d'entérobactéries BLSE résistantes aux quinolones et fluoroquinolones.

##### 4.6.1. Principe:

La réaction de PCR (Polymerase Chain Reaction) consiste à amplifier in vitro une région bien déterminée de l'ADN bactérien permettant de détecter les gènes de résistance et les marqueurs génétiques des groupes phylogéniques ciblés.

##### 4.6.2. Protocole :

###### 4.6.2.1. Extraction de l'ADN bactérien :

Les isolats étudiés ont été ensemencés sur gélose Mueller-Hinton (Bio-Rad), et incubés à 37 °C pendant une nuit. Une strie de bactéries a été prélevée par l'anse de platine et suspendue dans 1 ml du tampon (DNase-RNase-free distilled water) dans un tube eppendorf puis chauffé pendant 10 min dans un bain contenant de l'eau en ébullition pour assurer la lyse bactérienne.

Ensuite, mise à -20 °C pendant 10 minutes. Puis, les tubes ont été centrifugés à 8000 tr/min pendant 10 minutes. En fin, le surnageant contenant l'ADN a été récupéré et soigneusement transféré dans un nouveau tube eppendorf et conservé à -20 °C jusqu'à utilisation pour les réactions de polymérisation PCR (Hassen *et al.*, 2021).

###### 4.6.2.2. Mélange réactionnel :

Les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume réactionnel final de 25 µl. Les composants et leurs concentrations sont indiqués dans le tableau N°02; ils doivent comporter un contrôle positif et un contrôle négatif (Mix avec de l'eau).

**Tableau N°02:** Composition du mix pour la réalisation de PCR.

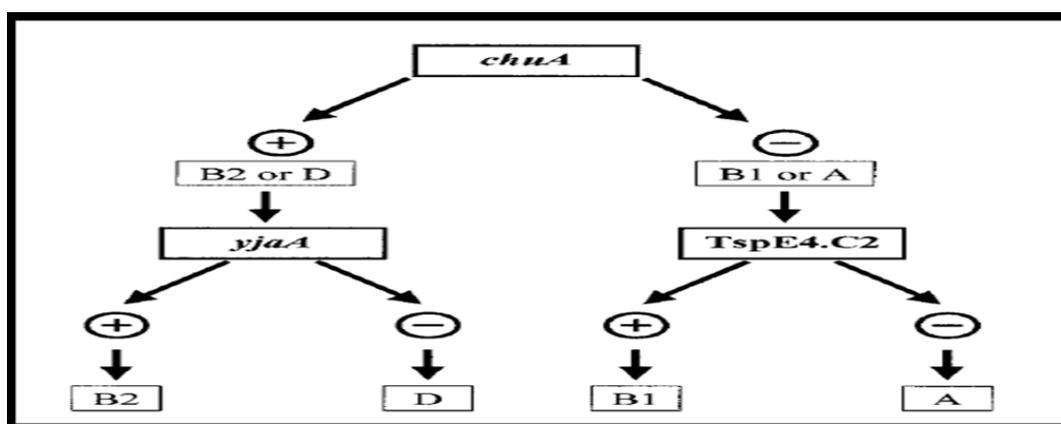
Composants	Concentration stock	Concentration finale
Amorce sens	50 $\mu$ M	1 $\mu$ M
Amorce inverse	50 $\mu$ M	1 $\mu$ M
ADN Polymérase	5 U/ $\mu$ l	1,25 U
Tampon	10 X	1 X
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,5 mM
dNTPs	100 mM	0,2 mM
ADN	-	200-400 ng
Eau miliQ stérile	-	quantité suffisante pour 25 $\mu$ l

#### 4.6.2.3. Détermination des groupes phylogénétiques d'*E.coli*:

Récemment, Clermont *et al.* en 2000 ont mis au point une technique de PCR multiplex pour déterminer les groupes phylogénétiques d'*E.coli* en se basant sur le profil électrophorétique de trois marqueurs génétiques :

- *ChuA* : gène impliqué dans le transport de l'hème ;
- *YjaA* : gène dont la fonction est inconnue ;
- TspE4.C2 : fragment d'ADN anonyme.

La présence ou l'absence de ces marqueurs génétiques définit le groupe phylogénétique (figure N°13).



**Figure N°13:** Arbre dichotomique pour déterminer le groupe phylogénétique d'une souche de *E. coli* en utilisant les résultats de l'amplification PCR des gènes *ChuA* et *YjaA* et du fragment d'ADN TspE4.C2. (Clermont *et al.*, 2000).

Les amorces et les conditions d'amplifications utilisées pour la détermination des groupes phylogénétiques d'*E. coli* sont représentées dans le tableau N°03.

**Tableau N°03 :** Les amorces et les conditions d'amplifications utilisées pour la détermination des groupes phylogénétiques d'*E. coli* (Clermont *et al.*, 2000).

Locus	Amorces (5'-3')	Taille (pb)
<b>ChuA</b> ChuA.1 ChuA.2	5' - GACGAACCAACGGTCAGGAT-3' 5' - TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'	279
<b>YjaA</b> YjaA .1 YjaA .2	5' - TGAAGTGTTCAGGAGACGCTG-3' 5' - ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-3'	211
<b>TspE4C2</b> TspE4C2.1 TspE4C2.2	5' - GAGTAATGTTCGGGGCATTCA-3' 5' - CGCGCCAACAAAGTATTACG-3'	152

Les conditions d'amplifications ont été d'abord : une dénaturation initiale à 94 °C pendant 4 min suivie de 35 cycles passant par les étapes suivantes : dénaturation à 94 °C pendant 15 s, hybridation à 60 °C pendant 30 s, élongation à 72 °C pendant 45 s et élongation finale à 72 °C pendant 5 min (Clermont *et al.*, 2000).

Le contenu d'un tube PCR est de 25 µl pour la recherche des groupes phylogénétiques. Les concentrations finales utilisées pour chaque réaction sont rapportées dans le tableau N°04.

**Tableau N°04:** Les composants de la recherche des groupes phylogénétiques et leurs concentrations.

Composants	1 tube PCR (µl)	20 tubes
Tampon 10X	2,5	50
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2,5	50
dNTPs (10 mM)	2	40
ChuA-F (50 pmol)	0,25	5
ChuA - R (50 pmol)	0,25	5
YjaA-F (50 pmol)	0,25	5
YjaA -R (50 pmol)	0,25	5
TSPE4.C2-F (50 pmol)	0,25	5
TSPE4.C2-R (50 pmol)	0,25	5
Taq Poly (5 U/µl)	1,5	30
Eau	10	200
ADN	5	-

**4.6.2.3.1. Interprétation des résultats de la PCR des groupes phylogénétiques:**

L'appartenance d'une souche d'*E. coli* à l'un des groupes phylogénétiques A, B1, B2 et D est défini par la présence ou l'absence dans son génome de trois marqueurs moléculaires : les gènes *chuA*, *yjaA* et le fragment d'ADN TspE4C2.

L'interprétation des résultats a été effectuée selon (Clermont *et al.*, 2000) et les sous-types selon (Escobar-Paramo *et al.*, 2004) (tableau N°05).

**Tableau N°05 :** Guide d'interprétation des résultats de la PCR (Clermont *et al.*, 2000 ; Escobar-Paramo *et al.*, 2004).

PCR			Phylogroupes	Sous-types
<i>Chu A</i>	<i>YjaA</i>	TspE4C2		
-	-	-	A	A0
-	+	-	A	A1
+	+	-	B2	B2 <sub>2</sub>
+	+	+	B2	B2 <sub>3</sub>
+	-	-	D	D <sub>1</sub>
+	-	+	D	D <sub>2</sub>
-	+/-	+	B1	B1

**3.6.2.4. Détermination des gènes de résistance aux antibiotiques :**

Les séquences d'amorces utilisées, la taille des amplicons ainsi que les conditions d'amplification pour chaque gène sont portées dans le tableau N°06.

**Tableau N°06** : Amorces, conditions d'amplification et références des gènes de résistance recherchés

Gènes /Amorces (5' → 3')	Taille	Conditions d'amplification	Références
<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> F: GTTACAATGTGTGAGAAGCAG R: CCGTTTCCGCTATTACAAAC	1041	94°C/7min; 30 cycles: (94°C/50s, 50°C/50s, 72°C/1min); 72°C/5min	(Jouini <i>et al.</i> , 2007)
<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> F: CGACGCTACCCCTGCTATT R: CCAGCGTCAGATTTTTCAGG	552	94°C/5 min; 30 cycles: (94°C/25s, 52°C/40s, 72°C/50s); 72°C/6 min	(Woodford <i>et al.</i> , 2005)
<i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub> F: TCGCGTTAAGCGGATGATGC R: AACCCACGATGTGGGTAGC	666		
<i>bla</i> <sub>CTX-M-25</sub> F: GCACGATGACATTCGGG R: AACCCACGATGTGGGTAGC	327		
<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> F: GTGACAAAGAGAGTGCAACGG R: ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC	856	94°C/ 3 min; 35 cycles : 94°C/45 s, 62°C/45 s, 72°C/45 s; 72°C/10 min	(Jouini <i>et al.</i> , 2007)
<i>bla</i> <sub>SHV</sub> F: TTATCTCCCTGTTAGCCACC R: GATTTGCTGATTTGCTCGG	795	94°C/10 min; 35 cycles: (94°C/30s, 50°C/30s, 72°C/1 min); 72°C/10 min	(Weill <i>et al.</i> , 2004)
<i>bla</i> <sub>TEM</sub> F: ATAAAATTCTTGAAGACGAAA R: GACAGTTACCAATGCTTAATC	1080		
<i>qnrA</i> F : AGAGGATTTCTCACGCCAGG R : TGCCAGGCACAGATCTTGAC	580	95°C/10 min ; 35 cycles : (95°C/1 min, 54°C/1 min, 72°C/1 min) ; 72°C/10 min	(Cattoir <i>et al.</i> , 2007)
<i>qnrB</i> F : GATCGTGAAAGCCAGAAAG R : ACGATGCCTGGTAGTTGTCC	469	95°C/10 min; 32 cycles: (94°C 45s, 54°C 45s, 72°C 1 min), 72°C 10 min	(Gay <i>et al.</i> , 2006)
<i>qnrS</i> F : GCAAGTTCATTGAACAGGGT R : TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	428	95°C/10 min ; 35 cycles : (95°C/1 min, 54°C/1 min, 72°C/1 min) ; 72°C 10 min	(Cattoir <i>et al.</i> , 2007)
<i>aac (6')-Ib-cr</i> F : TTGCGATGCTCTATGAGTGGCA R : CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	482	95°C/5 min; 34 cycles: (94°C/45s, 55°C/45s, 72°C/45s); 72°C 7 min	(Park <i>et al.</i> , 2006)

pb : paires de bases, F : forward (brin principal); R : reverse (brin complémentaire), min : minute, s : seconde.

Le thermocycleur utilisé dans les réactions PCR est de type : ESCOHEALTHCARE SWIFT max pro (figure N° 14).



**Figure N° 14 :** Appareil de la PCR (le thermocycleur).

#### **4.6.2.5. Détection des produits de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose:**

##### **✓Principe :**

L'électrophorèse est utilisée à des fins analytiques car elle permet la séparation et la purification des fragments d'ADN en fonction de leur taille et de leur charge électrique. Elle fait référence à une technique où les molécules sont obligées de traverser une couche de gel sous l'impulsion d'un courant électrique. L'énergie motrice de l'électrophorèse est la tension qui est appliquée à des électrodes placées de part et d'autre de la couche du gel. Les propriétés d'une molécule déterminent la rapidité avec laquelle un champ électrique peut traverser un milieu gélatineux. En fonction de la nature de la charge du réseau, les particules chargées migreront soit vers la cathode, soit vers l'anode.

L'électrophorèse se réalise sur le gel d'agarose. Un tampon de migration est ajouté pour améliorer les conditions de migration des molécules à séparer. La position de l'ADN dans le gel peut, par ailleurs, être déterminée en teintant celui-ci avec une faible concentration de bromure d'éthidium, un fluorochrome s'intercalant entre les bases de l'ADN.

Les échantillons d'ADN à charger sur le gel d'agarose sont tout d'abord mélangés à un tampon de chargement pour faciliter leur chargement dans les puits pour électrophorèse.

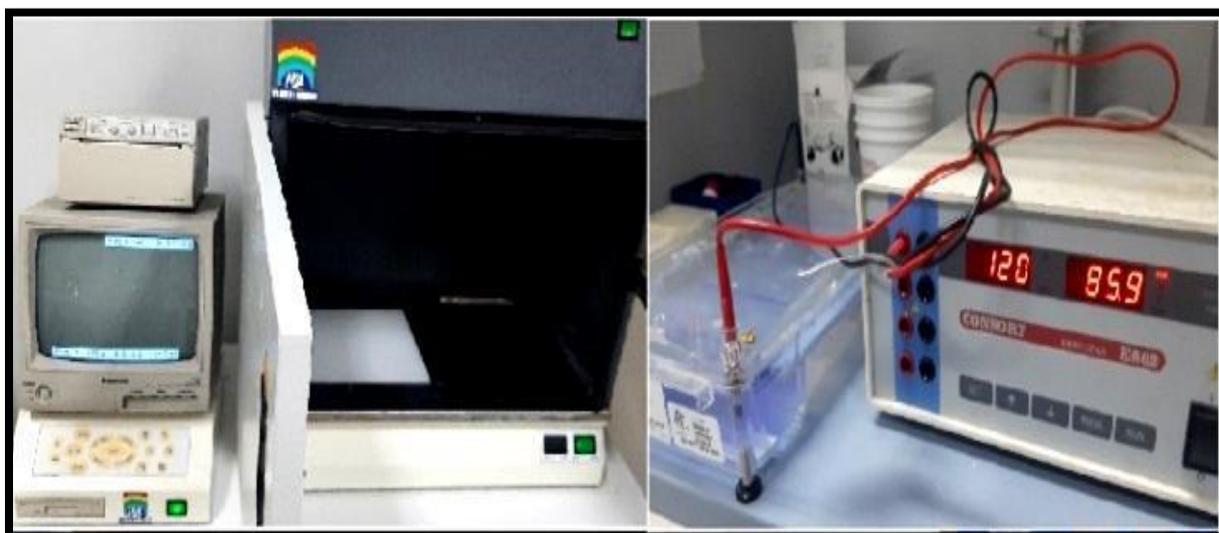
Un ADN marqueur d'une taille connue doit être ajouté. En effet, un marqueur contient généralement un nombre défini de fragments d'ADN connus, ce qui permet de déterminer plus facilement la taille des ADN inconnus (Westermeier, 1997).

✓**Protocole :**

L'électrophorèse a été réalisée sur gel d'agarose à une concentration 2 % : 4 g d'agarose sont dissous dans 200 ml de TBE 0,5 X (45 mM Tris-acide borique et 1 mM EDTA [pH 8.0]) puis porté à ébullition jusqu'à dissolution de l'agarose. Après refroidissement du mélange jusqu'à une température de 60 °C, 6,5 µl de bromure d'éthidium d'une solution mère de 10 mg/ml (concentration finale 0,5 µg/ml) sont rajoutés à l'agarose puis coulés dans la cuve d'électrophorèse. Les suspensions à analyser ont un volume final de 15 µl composé de 10 µl du produit PCR additionné de 5 µl de tampon de charge (bleu de bromophénol 25 mg + 5 ml de glycérol + 5 ml H<sub>2</sub>O). Pour chaque gel, un marqueur de taille de 100 pb utilisé comme marqueur de taille des fragments de gènes amplifiés a été placé dans le premier puit. La cuve a été remplie de tampon TBE 0,5 X et la migration effectuée sous un voltage constant de 120 V pendant 1 h.

✓**Lecture :**

Les résultats de l'électrophorèse sont visualisés sous une lumière UV incorporée à un appareil photo (figure N°15).



**Figure N° 15 :** Appareil UV pour la visualisation et la prise des photos (à gauche) et cuve d'électrophorèse (à droite).

**4.6.3. Séquensage:**

Cette approche est utilisée seulement pour le gène de résistance *bla<sub>CTXM</sub>*, afin d'identifier précisément les variantes recherchées (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 et CTX-M-25).

En effet, quand la PCR était positive, les amplicons ont été purifiés à travers des colonnes de centrifugation K501 Biomatik (Wilmington, DE) et ont été utilisés comme matrices dans une réaction à cycle unique en utilisant des amorces appropriées, « le kit AmpliTaq DNA polymerase FS Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) » et « the automatic ABI Prism\_3100 genetic analyzer (Applied Biosystems) ».

Les séquences ont été analysées à l'aide du logiciel BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) pour déterminer les variantes de ce gène.

## **Chapitre II.**

# **Résultats et discussion**

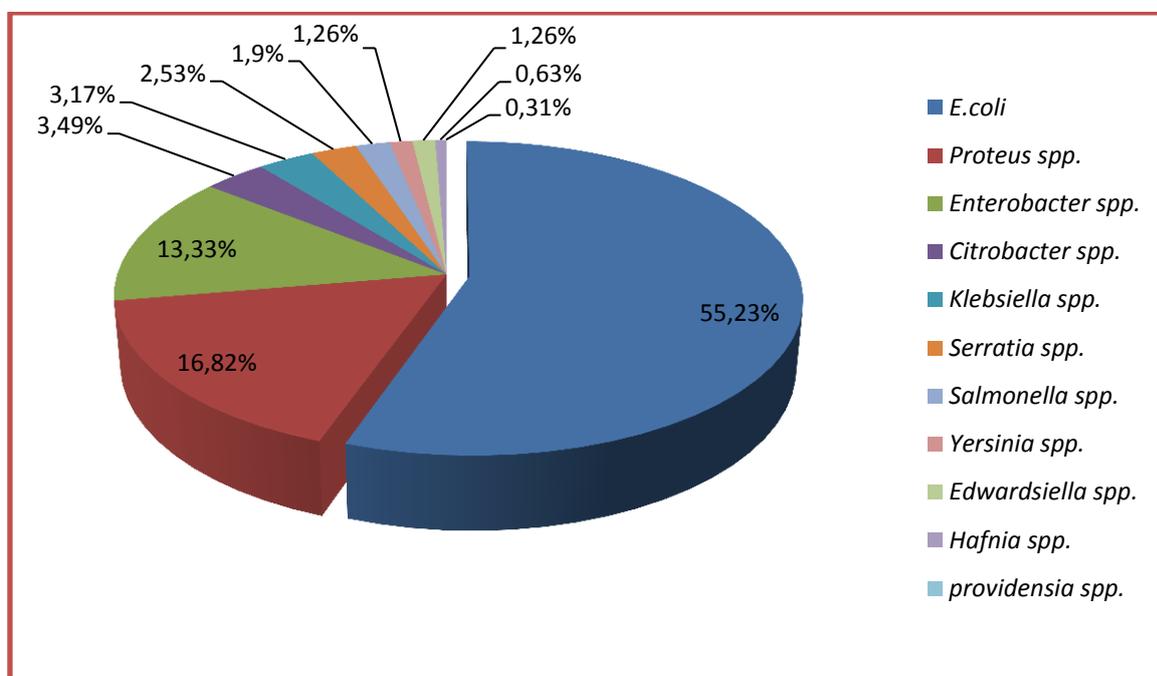
## Chapitre II. Résultats et discussion

### 1. Caractérisation phénotypique des entérobactéries :

#### 1.1. Souches isolées :

Au cours de cette étude, 315 souches d'entérobactéries ont été isolées à partir de 580 prélèvements d'origine aviaire reçus au sein du service de bactériologie médicale du laboratoire vétérinaire régional de Mostaganem ; ce qui représente 54,31% de l'ensemble des bactéries à Gram négatif isolées pendant la période d'étude.

Les souches d'entérobactéries identifiées étaient réparties comme suit : 174 *E. coli*, 53 *Proteus spp.*, 42 *Enterobacter spp.*, 11 *Citrobacter spp.*, 10 *Klebsiella spp.*, 8 *Serratia spp.*, 6 *Salmonella spp.*, 4 *Yersinia spp.*, 4 *Edwardsiella spp.*, 2 *Hafnia spp.* et une *Providencia spp.* (figure N° 16).



**Figure N°16** : Répartition des souches isolées.

Dans l'ensemble des souches isolées, *E. coli* reste l'espèce dominante avec une fréquence d'isolement de 55,23% (174/315), suivie par *Proteus spp.* et *Enterobacter spp.* avec des taux d'isolement pratiquement rapprochés soit 16,82% (53/315) et 13,33% (42/315) respectivement. Alors que, *Salmonella spp.* occupe la dernière place avec un pourcentage d'isolement de 1,9% (6/315). Les autres espèces étaient moins représentées.

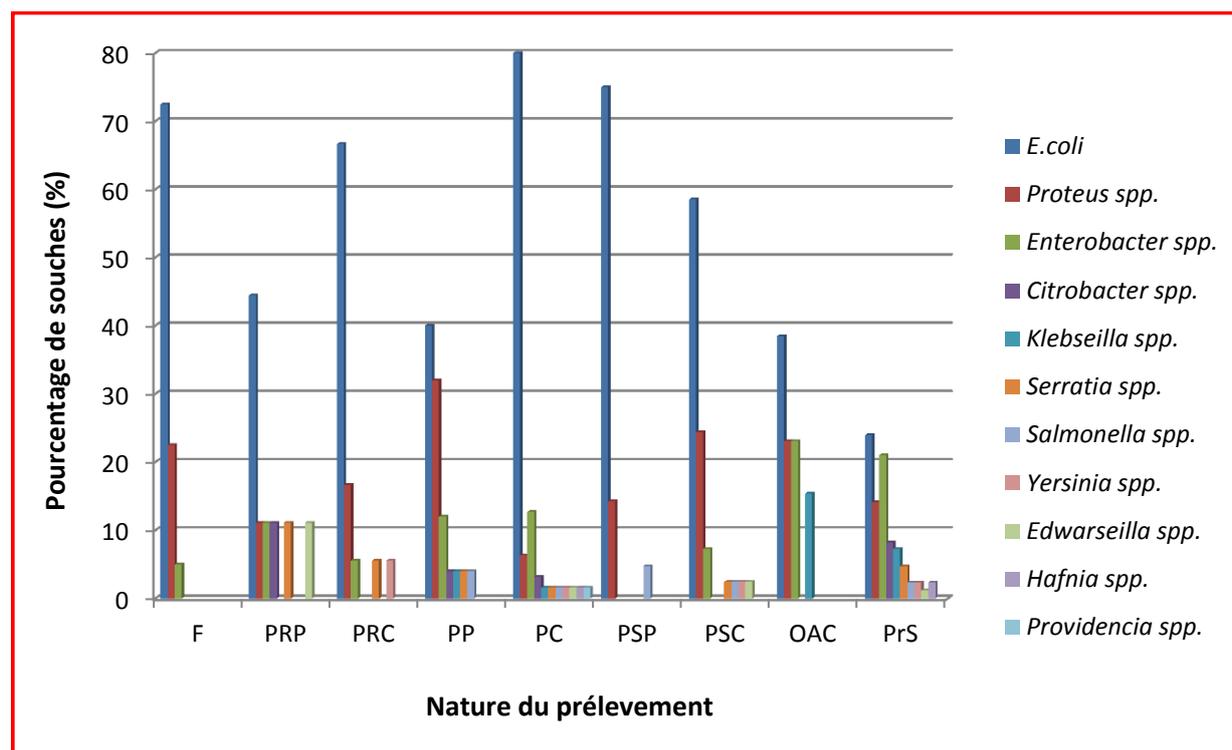
Le même classement a été rapporté par Benameur en 2011 dans la même région, mais avec un moindre pourcentage concernant la première espèce, (48,33%, 25,41% et 12,91% pour *E. coli*, *Proteus spp.* et *Enterobacter spp.* respectivement), et avec absence de contamination salmonellique.

### 1.2. Sérotypes identifiés des salmonelles :

Les six isolats de salmonelles de notre étude ont été représentés par quatre sérotypes : *S. kentucky*, *S. worthington*, *S. dublin* et *S. kedougou*. Ces sérotypes ne sont pas fréquents en Algérie. Ils pourraient provenir de l'environnement, poussins importés ou des autres espèces animales, indiquant ainsi la grande diversité des réservoirs potentiels de contamination par les souches non typhoïdique de *Salmonella* telles : aliments, eau, accès facile des autres espèces animales, contact humain et autres.

### 1.3. Répartition des souches en fonction des prélèvements :

La figure suivante (N°17) récapitule la répartition des souches isolées selon la nature des prélèvements effectués durant cette étude.



**Figure N° 17 :** Répartition des souches en fonction des prélèvements.

F : fientes, PRP : poulette repro-ponte, PRC : poulette repro-chair, PP : poule pondeuse, PC : poulet de chair, PSP : poussin ponte, PSC : poussin de chair, OAC : œufs à couvrir, PrS : prélèvement de surface.

La distribution des espèces isolées en fonction de nature des prélèvements révèle qu'*E. coli* occupe la 1<sup>ère</sup> place parmi les entérobactéries dans tous les prélèvements et particulièrement pour les quatre types suivants : poussin ponte, poulet de chair, fiente et poussin chair avec respectivement des taux de : 80,95%, 71,82%, 70,73%, 58,53% (figure N° 17).

La dominance du germe *E. coli* dans ces types de prélèvements peut être expliquée par son implication directe aux différentes infections et indirectement aux surinfections colibacillaires, car *E. coli* est rarement un agent d'infection primaire ; il s'agit plutôt d'une bactérie opportuniste, comme elle peut aussi exprimer son pouvoir pathogène suite à l'intervention des facteurs déclenchant qui peuvent être d'ordre viral, bactérien ou simplement de stress (Borne , 1998 ; Donval, 2006).

Aussi chez la volaille, le plus important réservoir des *E. coli* est le tractus digestif, dont 10 à 15 % de la population colibacillaire appartient à des sérotypes potentiellement pathogènes. Les concentrations sont de l'ordre de 10<sup>6</sup> colibacilles par gramme de matière fécale. Les plus grandes concentrations ont été retrouvées chez les animaux de moins de trois semaines, essentiellement au niveau du tractus digestif postérieur (Gross, 1994 ; Dho-moulin et Fairbrother, 1999).

Le germe *E. coli* est suivi par *Proteus* spp. qui contamine à son tour les prélèvements de surface et les fientes avec respectivement des pourcentages de 29,25% et 27,30%. À noter que les souches d'*Enterobacter* spp. prédominent dans les prélèvements de surface par rapport aux autres types de prélèvement, soit 25%. Cela évoque clairement la mauvaise pratique d'hygiène ou le non-respect du protocole de désinfection vis-à-vis de ces germes dans certains centres avicoles étudiés.

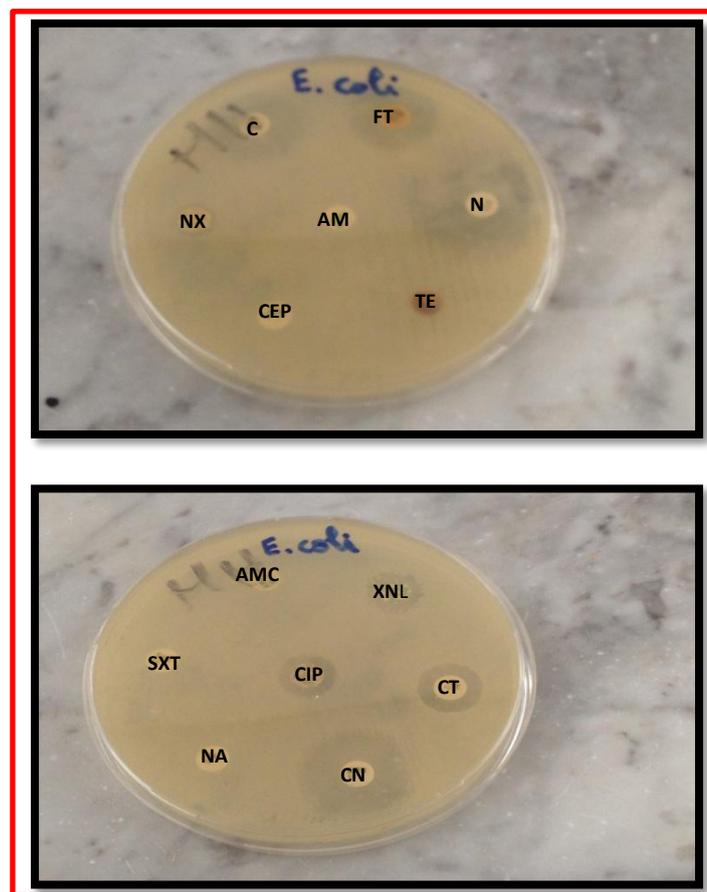
Dans notre étude, il a été enregistré aussi six contaminations salmonelliques, qui ont été isolées à partir les prélèvements de surface, poussin ponte, poussin chair, poulet de chair et poule pondeuse avec respectivement des pourcentages de 2,38%, 4,76%, 2,43%, 1,58 et 4%.

Pour la première contamination, cela pourrait indiquer la persistance de certains sérovars entre deux bandes successives. Il est bien connu que les prélèvements de poussières peuvent nous renseigner sur l'état de contamination des précédentes bandes d'élevages (Arnold *et al.*, 2009). Et pour les autres contaminations, plusieurs auteurs ont rapporté que certains facteurs de stress tels que : les températures élevées au sein des poulaillers, le cycle de production d'œufs, la mue, le transport peuvent causer l'excrétion de *Salmonella* (Van de Giessen *et al.*, 2006 ; Humphrey, 2006 ; Golden *et al.*, 2008).

D'un autre côté, la proportion de prélèvements positifs dans notre étude est très faible. En effet, seulement 06 isollements positifs sur un total de 315 analysés (1,9%). Ce résultat est en accord avec les études menées dans l'est Algérien par Elgroud en 2009 sur la filière chair et Bouzidi en 2013 sur la filière ponte avec une fréquence d'isolement positif de *Salmonella* de l'ordre de 1,66% et 0,68% respectivement. Cela pourrait être expliqué par le faible degré d'excrétion de *Salmonella* au moment de l'échantillonnage et/ ou l'excrétion intermittente de *Salmonella* par les oiseaux infectés (Van Immerseel *et al.*, 2004). Elle pourrait être également due à une compétitivité entre différents germes saprophytes qui inhiberait ainsi la multiplication des germes pathogènes et ce par modification du milieu car ces derniers sont plus exigeants que les germes saprophytes (Valanconny *et al.*, 2001).

#### 1.4. Résultats de l'antibiogramme :

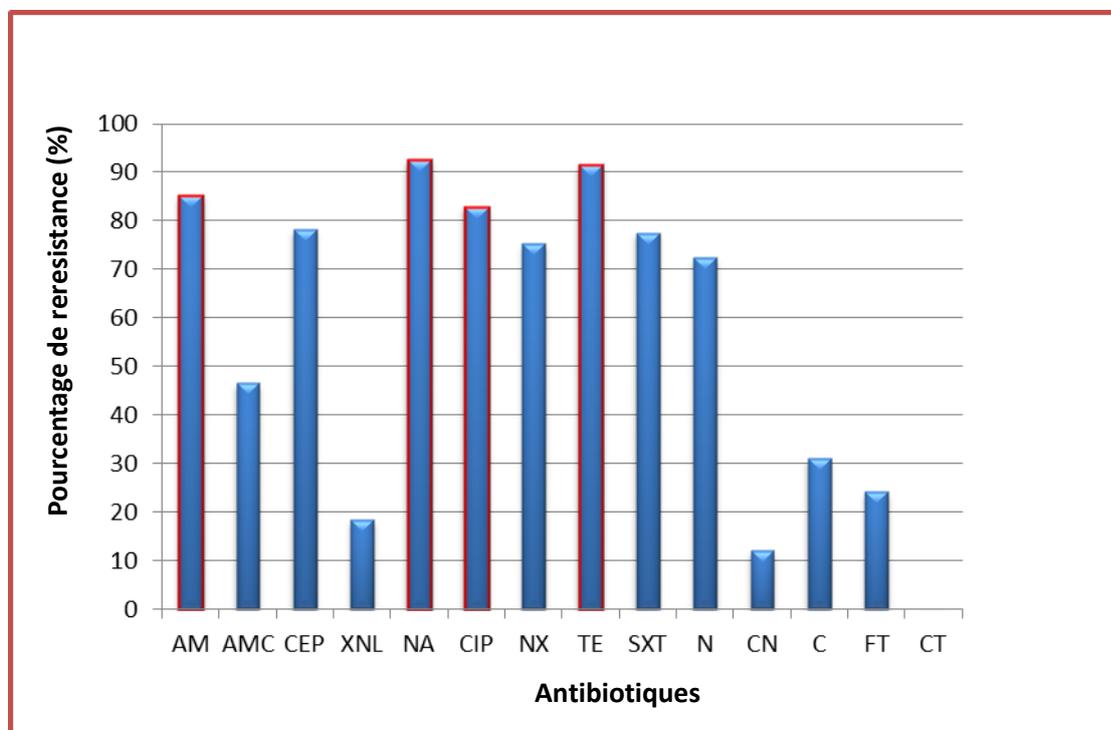
##### 1.4.1. Antibiorésistance des souches d'*E.coli* :



**Figure N°18** : Résultat de l'antibiogramme d'une souche d'*E. coli* (résistante à 10 antibiotiques : AMC, XNL, AM, CEP, NA, CIP, NX, TE, SXT et N ; et sensible à 04 antibiotiques : CT, FT, C et CN) (BOUTAIBA BENKLAOUZ, 2018)

Les résultats des tests de sensibilité des souches d'*E. coli* aux antibiotiques ont montré des taux de résistance élevés contre la plupart des antibiotiques testés (figure N°18).

Les niveaux de résistance aux antibiotiques sont indiqués dans la figure N°19.



**Figure N°19:** Pourcentage de résistance des souches d'*E. coli*.

AMP : Ampicilline, AMC : Amoxicilline+acide clavulanique, XNL : Cefotiofur, CEP : Cefalotine, NA : Acide nalidixique, NX : Norfloxacine, CIP : Ciprofloxacine, TE : Tétracycline, SXT : Triméthoprim+Sulfaméthoxazole, N : Néomycine, CN : Gentamycine, CT : Colistine, FT : Nitrofurantoïne, C : Chloramphénicol.

Le taux de résistance le plus élevé a été enregistré vis-à-vis le NA dont le pourcentage s'élève à 92,52 %, suivi de TE (91,37 %), AM (85,05 %), CIP (82,75%), N (80,68 %), CEP (78,16 %), SXT (77,58 %), NX (75,28 %), AMC (46,55 %), C (31,03 %), FT (24,13 %) et XNL (18,39%); le plus faible niveau de résistance a été observé contre la CN (12,06 %). Le seul antibiotique efficace contre toutes les souches testées était la colistine.

En plus les antibiotiques d'utilisation traditionnelle, il a été clairement remarqué que la résistance des isolats d'*E. coli* a concerné aussi les antibiotiques de première intention (les bêta-lactamines, les fluoroquinolones, les aminoglycosides et les sulfamides).

Les taux de résistance aux antibiotiques de première ligne testés dans cette étude étaient plus élevés que ceux rapportés précédemment en Algérie (Hammoudi et Aggad, 2008),

avec des pourcentages de résistances de 82%, 47%, 42% et 6% vis-à-vis le TE, AM, SXT et ENR respectivement.

Ainsi ils étaient nettement supérieurs que ceux enregistrés en Nigéria (Okorafor *et al.*, 2019). vis-à-vis le TE, AM, SXT et CIP avec des taux de 86,7%, 80%, 46,7% et 26,7% respectivement.

Les colibacilles isolés dans notre étude ont présentés aussi une haute fréquence de résistance vis-à-vis la néomycine (N : 80,68%), comparant par une autre étude menée par Benameur en 2011 dans la même région avec une fréquence de 26,56% (Benameur, 2011) ; Cette progression serait probablement due à la large utilisation de cet antimicrobien dans les régions étudiées.

La résistance élevée aux antibiotiques de première ligne dans notre étude est troublante ; Cela pourrait être en raison de leur utilisation incontrôlée, à des fins thérapeutiques, chez les volailles et/ou du fait qu'ils sont prescrits sans préalable teste de sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme).

Concernant la gentamycine, le taux de résistance est de 12,06 %. Il est à peu près similaire à celui signalé par Saberfar *et al.* en 2008 (12 %) et supérieur à ceux obtenus par Aggad *et al.* et Resapath, en 2010 (3 %). La gentamycine est généralement une molécule n'est pas trop prescrit en aviculture.

Les pourcentages de résistance des souches d'*E. coli* vers le nitrofurantoin et le chloramphénicol sont de 24,13% et 31,03% respectivement. Cela peut s'expliquer par l'utilisation et la vente non réglementaire de ces produits non homologués en Algérie.

Un faible taux de résistance des colibacilles est enregistré vis-à-vis le ceftiofur (18,39%), sans doute, en raison de l'introduction très récente de cette molécule dans les antibiothérapies appliquées aux élevages dans les régions étudiées. Ces résultats sont supérieurs à ceux rapportés par Kechih en 2010 au niveau des laboratoires vétérinaires d'EL Tarf et de Draa Benkhedda avec respectivement des pourcentages de 4% et 0%. Alors que la slovak Drugdová a rapporté en 2013 un taux de résistance des colibacilles de 40% sur une étude de deux ans concernant la filière chair, ceci en relation avec une utilisation plus large et plus ancienne des céphalosporines dans ce pays.

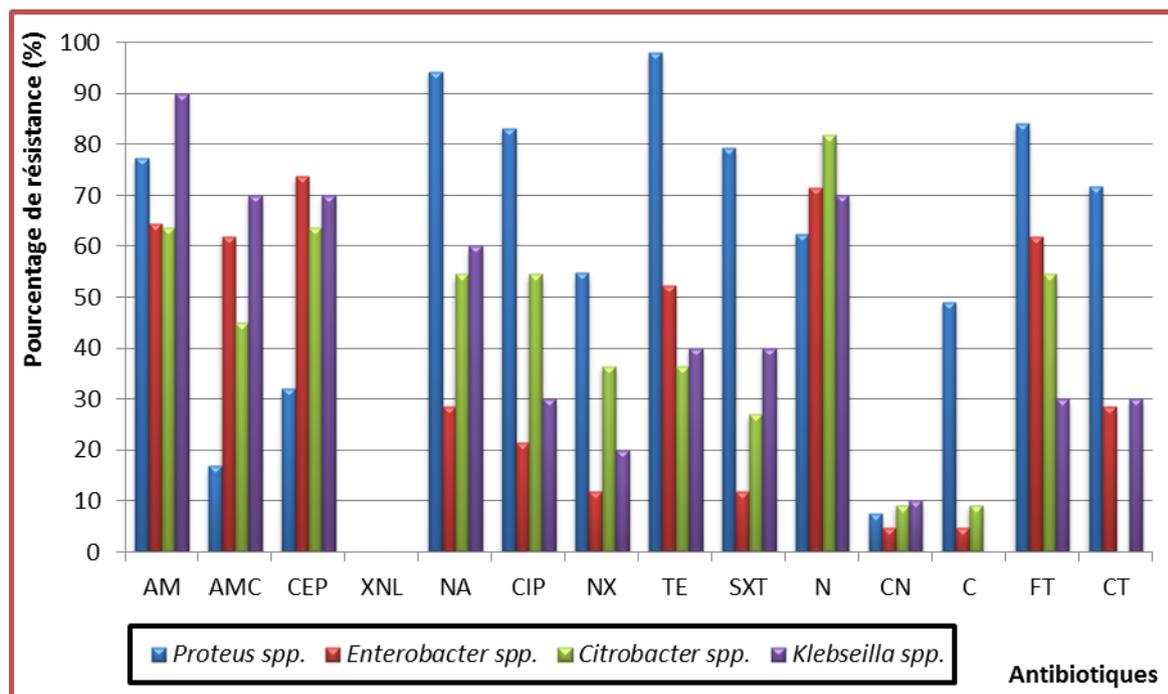
Les colistines se sont montrés les antibiotiques les plus actifs sur toutes les souches testées, soit un taux de sensibilité 100%.

### 1.4.2. Antibiorésistance des souches d'entérobactéries non-*E. coli* :

Quatre espèces d'entérobactéries non-*E. coli* ont été prédominantes : *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. et *Klebseilla* spp. . Les autres espèces étaient moins représentées.

#### 1.4.2.1. Antibiorésistance des souches d'entérobactéries non-*E. coli* prédominantes:

Les niveaux de résistance des souches non-*E.coli* prédominantes aux antibiotiques sont indiqués dans la figure N°20.



**Figure 20:** Pourcentage de résistance des souches d'entérobactéries non-*E. coli* prédominantes

Les résultats de la présente étude ont révélé que la plupart des isolats d'entérobactéries non-*E.coli* étaient résistants à la majorité des antibiotiques testés.

En effet, les isolats de *Proteus* spp. ont montré un niveau élevé de résistance à certains antimicrobiens, en particulier TE : 98,94 % (n = 52), NA : 94,93 % (n = 50), FT : 84,90 % (n = 45), CIP : 83,01 % (n= 44), SXT : 79,24% (n= 42), AM : 77,35% (n= 41), CT : 71,69% (n= 38).

Parmi les souches d'*Enterobacter* spp., la proportion la plus élevée de résistance était vers CEP : 73,80% (n=31), suivi de N : 71,43 % (n= 30), AM : 61,24% (n= 27), FT et AMC : 61,90% (n= 26), TE : 52,38% (n= 22).

Aussi *Citrobacter* spp. a montré une résistance élevée à N : 81,81% (n= 9), AM et CEP : 63,63% (n= 7), FT, NA et CIP : 54,54% (n= 6). La résistance de *Klebseilla* spp. à AM, CEP, N, NA, TE, SXT et CIP ont été respectivement observés chez 90 % (n = 9), 70 % (n=7), 70 % (n = 7), 60 % (n = 6 ), 40 % (n=4 ), 40 % (n=4 ) et 30 % (n=3 ) des isolats. Alors que tous les isolats d'entérobactéries non-*E. coli* examinés dans ce travail étaient sensibles au ceftiofur (XNL).

La résistance des souches d'entérobactéries non-*E. coli* à plusieurs antibiotiques de première ligne comme les bêtalactamines (AM, CEP, AMC), quinolone et fluoroquinolone (NA, CIP), aminoglycoside (N) , tétracycline (TE), est surprenante, au contraire quant à la résistance aux antibiotiques des souches d'*E. coli* provenant de volailles dans la même région (Boutaiba Benklaouz *et al.*, 2020). Les résultats de notre étude étaient proches à ceux précédemment rapportés dans l'ouest Algérien (Ahmed Ammar *et al.*, 2017) avec les pourcentages suivants : [*Proteus mirabilis* (TE: 100%, NA: 81%, ENR: 77%); *Enterobacter cloacae* (TE: 84%, NA: 77%, ENR: 53%) et *Klebsiella pneumonia* (TE: 77%, NA: 100%, ENR: 77%)].

La forte résistance à la tétracycline rapportée dans cette étude peut s'expliquer par l'usage abusif de cet ancien antibiotique dans les élevages avicoles de la région ; cela était aussi rapporté en Indonésie (Yulistiani *et al.*, 2017).

Cette étude a également révélé que les isolats prédominants d'enterobactéries ont présenté des proportions de résistance élevées aux bêta-lactamines telles que AM, CEP et AMC, ce qui est en accord avec une autre étude menée en Ethiopie (Bushen *et al.*, 2021) avec des pourcentages de: [*Klebseilla pneumonie* (AM: 85.70 %, AMC: 64.30%) et *Proteus mirabilis* (AM: 83.30 % , AMC: 58.30%)]. Ces molécules sont des bêta-lactamines classiques qui ont une large utilisation à des fins thérapeutiques et prophylactiques chez les volailles.

Les fréquences élevées de résistance aux quinolones et fluoroquinolones ont aussi été rapportées en 2018 dans les mêmes provinces (Benameur *et al.*, 2018). Depuis l'introduction des quinolones en médecine vétérinaire durant les années 80, par les molécules de première génération (Acide Nalidixique), puis celles de deuxième et troisième génération ou bien les fluoroquinolones (Ciprofloxacine, Norfloxacine et Enrofloxacine notamment), leur utilisation a connu un essor grandissant grâce à leur large spectre d'activité qui s'est élargi d'une génération à l'autre.

Notons également une augmentation du taux de résistance des souches de *Proteus* spp. vis-à-vis de la colistine (71,69%) et le nitrofurantoïne (84,90%) due à une résistance naturelle à ces antibiotiques (CA-SFM / EUCAST, 2014), (annexe N°12).

#### 1.4.2.2. Antibiorésistance des souches de *Salmonella* spp. :

**Tableau N°07** : pourcentages de résistances des souches de *salmonella* spp.

Antibiotiques	Nombre de souche (pourcentage) [n(%)]
AM	0(0%)
AMC	0(0%)
CEP	0(0%)
XNL	0(0%)
NA	6(100%)
CIP	1(16,66%)
NX	3(50%)
TE	3(50%)
SXT	1(16,66%)
N	3(50%)
CN	0(0%)
C	0(0%)
FT	3(50%)
CT	0(0%)

La résistance des salmonelles à la néomycine, la tétracycline, le norfloxacine et le nitrofurantoïne est assez commune et a concerné 50% (n=3) des souches isolées, tandis que 100% des salmonelles (n=6) ont résisté à l'acide nalidixique et seulement un isolat était résistant à la ciprofloxacine.

Cette importante résistance à l'acide nalidixique n'est pas très surprenante, au regard de l'augmentation importante des résistances à cette molécule observée dans beaucoup de pays au cours de ces dernières années (Aarestrup *et al.*, 2007).

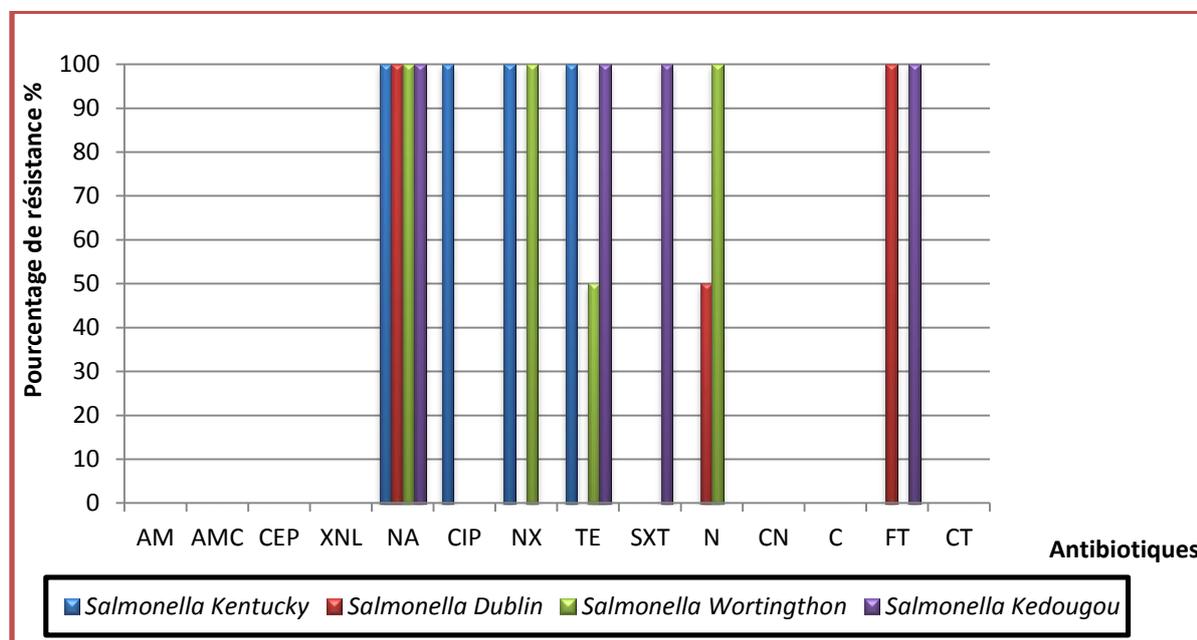
Les tétracyclines sont des anciennes molécules, de large spectre, traditionnellement utilisées en première intention. La large prescription de ces molécules en aviculture, a mis en jeu leur efficacité en face la plupart des bactéries. Cette résistance est assez connue et serait généralement due à un gène plasmidique qui peut être acquis assez facilement par les bactéries.

La résistance aux tétracyclines a été rapportée dans plusieurs études concernant la volaille et les produits avicoles (Manie *et al.*, 1998 ; Nayak *et al.*, 2004 ; Elgroud , 2009 ; Bouzidi, 2013).

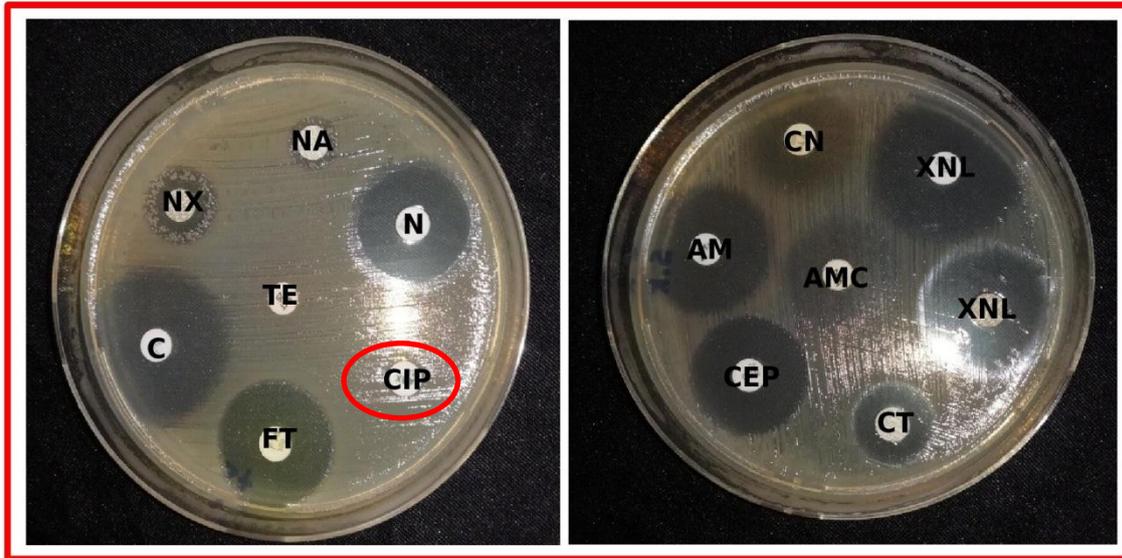
La présence d'isolats résistants aux fluoroquinolones est beaucoup plus inquiétante, car ces molécules d'antibiotiques sont parmi les derniers recours pour le traitement des salmonelloses humaines sévères. Cela pourrait être lié à l'utilisation non prudente de ces molécules, pourtant assez chères.

Fort heureusement, aucune résistance n'a été enregistrée aux bêta-lactamines [ampicilline, amoxicilline +acide clavulanique et céphalosporines (ceftiofur, céfalotine)], aminosides (gentamycine), phénicolés (chloramphénicol) et colistine. Alors qu'en 2013 le 14<sup>ème</sup> rapport du réseau de surveillance de l'antibiorésistance de l'OMS en Algérie a signalé des taux de résistances des salmonelles élevés par rapport à ceux de notre étude avec de 26,4% , 5,4%, 2,4%, 11,7%, 5,4%, pour l'ampicilline, l'amoxicilline +l'acide clavulanique, le céfotaxime, le triméthoprime + sulfaméthoxasole et le chloramphénicol respectivement ; néanmoins avec une sensibilité totale vis-à-vis de la gentamycine. Ces résultats peuvent être expliqués par l'utilisation modérée de ces antimicrobiens.

La pression de sélection exercée sur les souches bactériennes par les différentes utilisations d'antibiotiques selon les praticiens et les endroits ; en plus, l'instabilité intrinsèque de l'ADN extra-chromosomique pourraient expliquer l'hétérogénéité des isolats quant à leurs profils de résistance.



**Figure N°21** : Sensibilité aux antibiotiques testés des serotypes salmonelliques.



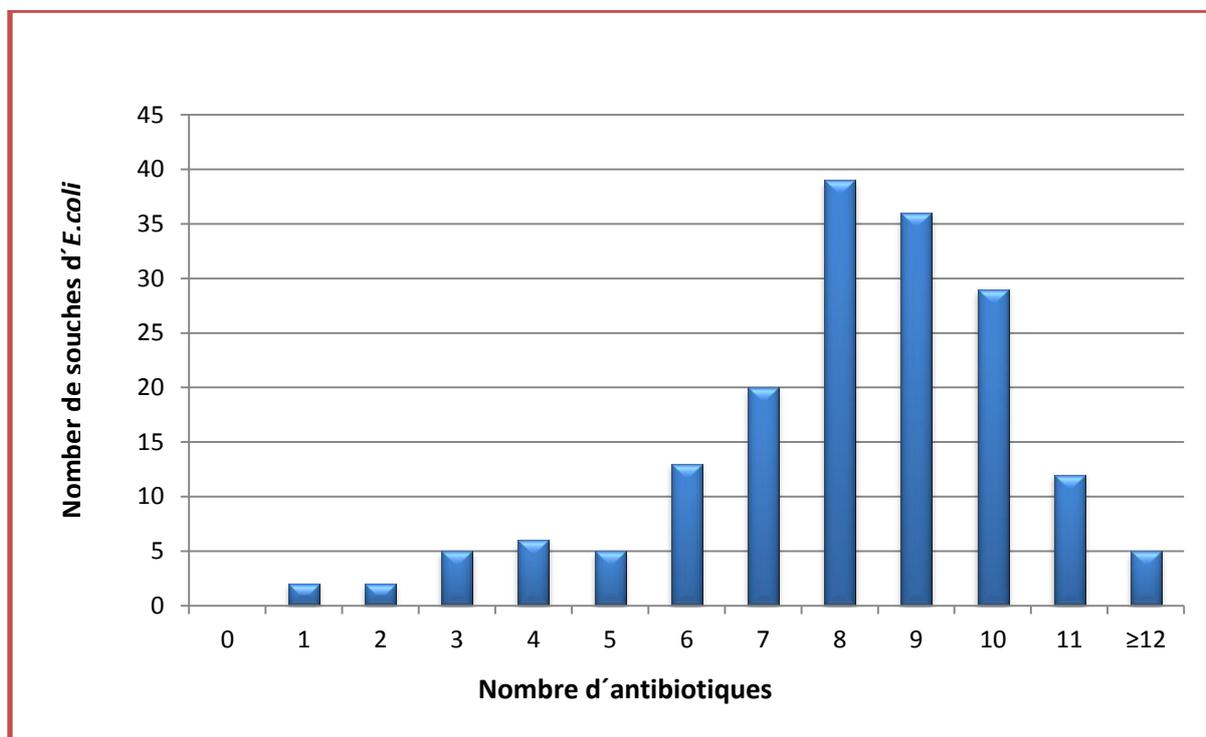
**Figure N°22:** Sensibilité d'une souche de *Salmonella kentucky* aux antibiotiques.

**(BOUTAIBA BENKLAOUZ, 2018)**

Seulement le sérovars *Kentucky* était résistant à la ciprofloxacine (fluroquinolone de 2<sup>ème</sup> génération)( figure N°21 et N°22 ). Ce résultat corrobore avec plusieurs études qui ont rapporté l'émergence du sérotype *Kentucky* résistant aux fluoroquinolones à travers plusieurs pays tels que la France (Weill *et al.*, 2006), Slovénie (Majtán *et al.*, 2006), Ethiopie (Molla *et al.*, 2006 ; Aragaw *et al.*, 2007), Belgique (Collard *et al.*, 2007), Maroc (Bouchrif *et al.*, 2008) et Algérie (Bouzidi *et al.*, 2013). L'enquête épidémiologique de l'institut Pasteur de paris a montré l'isolement de ce clone de *S. Kentucky* résistant à la ciprofloxacine chez la volaille dans trois pays d'Afrique (Ethiopie, Maroc, et le Togo) (Le Hello *et al.*, 2011), suggérant ainsi la volaille comme vecteur important de la dissémination de ce clone.

### 1.4.3. Multirésistance des souches d'entérobactéries :

#### 1.4.3.1. Multirésistance des souches d'*E. coli* :



**Figure N°23** : multirésistance des souches d'*E. coli*

100% (n = 174) d'isolats d'*E. coli* ont été trouvés résistants à au moins un antibiotique, alors que plus de deux tiers des isolats étaient résistants à au moins huit antibiotiques (69,54%, n= 121) et presque la moitié des souches concernaient neuf antibiotiques ou plus (47,12%, n= 82) (figure N°23). Ces pourcentages sont largement supérieurs à ceux signalés par Benameur en 2011 dans le même zoning, qui sont de 100%, 19,81%, 7,75% pour au moins 1, 8, 9 antibiotiques respectivement.

170 souches d'*E. coli*, (97,70%), ont présenté un profil de multirésistance dans notre étude ; ce qui est supérieur à celui enregistré, dans l'ouest Algérien, par Aggad et Benameur avec des pourcentages de 45%, 92,20%, respectivement, (Aggad *et al.*, 2010 ; Benameur, 2011). Cette évolution de multirésistance peut être expliquée par l'utilisation massive de plusieurs antimicrobiens durant la même bande d'élevage, ce qui exerce une pression de sélection sur les colibacilles qui deviennent multirésistants.

1.4.3.2. Multirésistance des souches d'entérobactéries non-*E. coli* :Tableau N°08 : pourcentage de multirésistance des souches d'entérobactéries non-*E. coli*.

Les souches d'entérobactéries	Nombre d'antibiotiques									Les souches multirésistantes (%)
	0	1	2	3	4	5	6	7	≤8	
<i>Proteus</i> spp. (n=53)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	8 (15,09)	2 (3,77)	7 (13,20)	6 (11,32)	30 (56,60)	53 (100)
<i>Enterobacter</i> spp.(n=42)	0 (0,00)	1 (2,38)	3 (7,14)	6 (14,28)	4 (9,52)	12 (28,57)	3 (7,14)	4 (9,52)	9 (21,42)	38 (90,47)
<i>Citrobacter</i> spp. (n=11)	0 (0,00)	1 (9,09)	1 (9,09)	1 (9,09)	1 (9,09)	2 (18,18)	0 (0,00)	1 (9,09)	4 (36,36)	9 (81,81)
<i>Klebsella</i> spp. (n=10)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (20,00)	3 (30,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (20,00)	3 (30,00)	10 (100)
<i>Serratia</i> spp. (n=8)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (25,00)	0 (0,00)	1 (12,50)	1 (12,50)	1 (12,50)	1 (12,50)	2 (25,00)	6 (75,00)
<i>Salmonella</i> spp. (n=6)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (16,66)	1 (16,66)	1 (16,66)	2 (33,33)	1 (16,66)	0 (0,00)	0 (0,00)	5 (83,33)
<i>Yersinia</i> spp. (n=4)	0 (0,00)	1 (25,00)	0 (0,00)	1 (25,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (25,00)	1 (25,00)	3 (75,00)
<i>Edwarseilla</i> spp. (n=4)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (25,00)	0 (0,00)	3 (75,00)	4 (100)
<i>Hafnia</i> spp. (n=2)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (50,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (50,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (50,00)
<i>Providencia</i> spp. (n=1)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (100)	1 (100)
<b>Total (n=141)</b>	<b>0 (0,00)</b>	<b>3 (2,12)</b>	<b>8 (5,67)</b>	<b>11 (7,80)</b>	<b>18 (12,76)</b>	<b>19 (13,47)</b>	<b>14 (9,92)</b>	<b>15 (10,63)</b>	<b>53 (37,58)</b>	<b>130 (92,19)</b>

Toutes les souches d'entérobactéries non-*E. coli* étaient résistantes à au moins un antibiotique. Un niveau élevé d'isolats 130 (92,19 %) qui ont démontré une multirésistance à au moins trois antibiotiques (tableau N°09). Nos résultats corroborent avec ceux de l'étude menée par Benameur *et al.* en 2018 dans la même région avec un pourcentage de 92,09%.

La résistance à trois antibiotiques ou plus a été observée dans 53 (100%) isolats de *Proteus spp.*, suivi par 38 (90.47%), 10 (100%), 9 (81,81%), 6 (75%), 5 (83,33%), 3 (75%), 4 (100%), 1 (50%) et 1 (100%) isolats de *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Citrobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Salmonella spp.*, *Yersinia spp.*, *Edwardsiella spp.*, *Hafnia spp.* et *Providencia spp.* respectivement (tableau N° 01). Cela indique que l'utilisation abusive et intempestive des antibiotiques, (la mauvaise indication, le non-respect de la durée de thérapie et les mauvaises combinaisons d'antibiotiques), est probablement à l'origine de la forte incidence des souches multirésistantes (BMR) (Harris *et al.*, 2015; Reygaert, 2018).

En plus de ce qui précède, la prescription des antimicrobiens sans antibiogramme peut être la cause principale des échecs thérapeutiques, ce qui peut conduire au développement de gènes résistances aux antibiotiques et à la sélection d'un nombre croissant de clones d'entérobactéries multirésistantes.

#### 1.4.5. Détection des souches BLSE:

Au total, nous avons relevé la présence de 32 souches (10,15%) productrice de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu, appartiennent de l'espèce *E. coli*, les autres espèces étaient en totalité sensible aux céphalosporines de troisième génération (figure N°24).

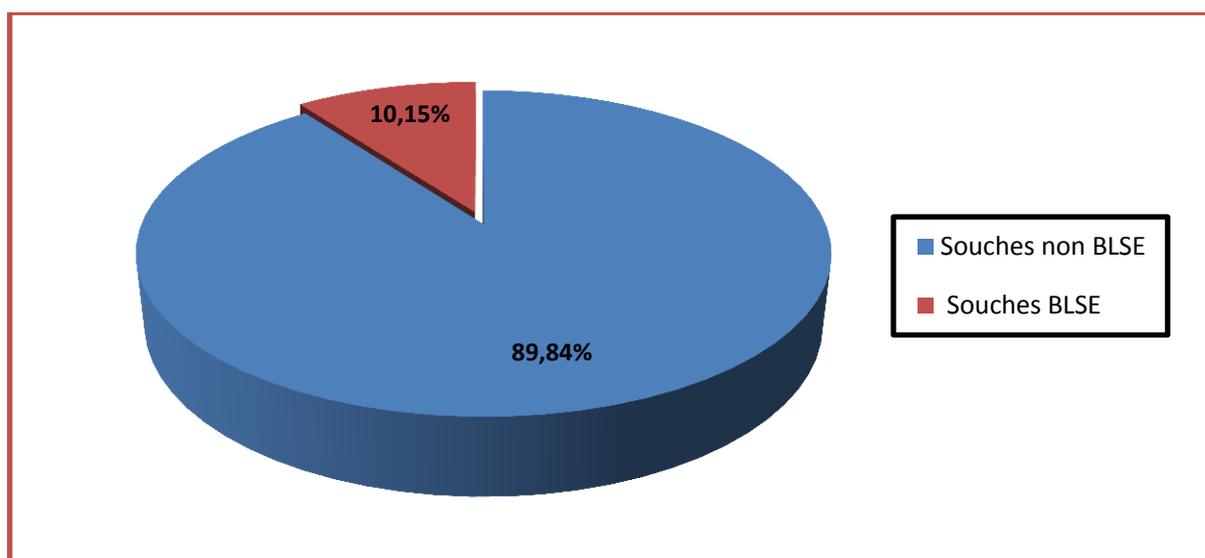
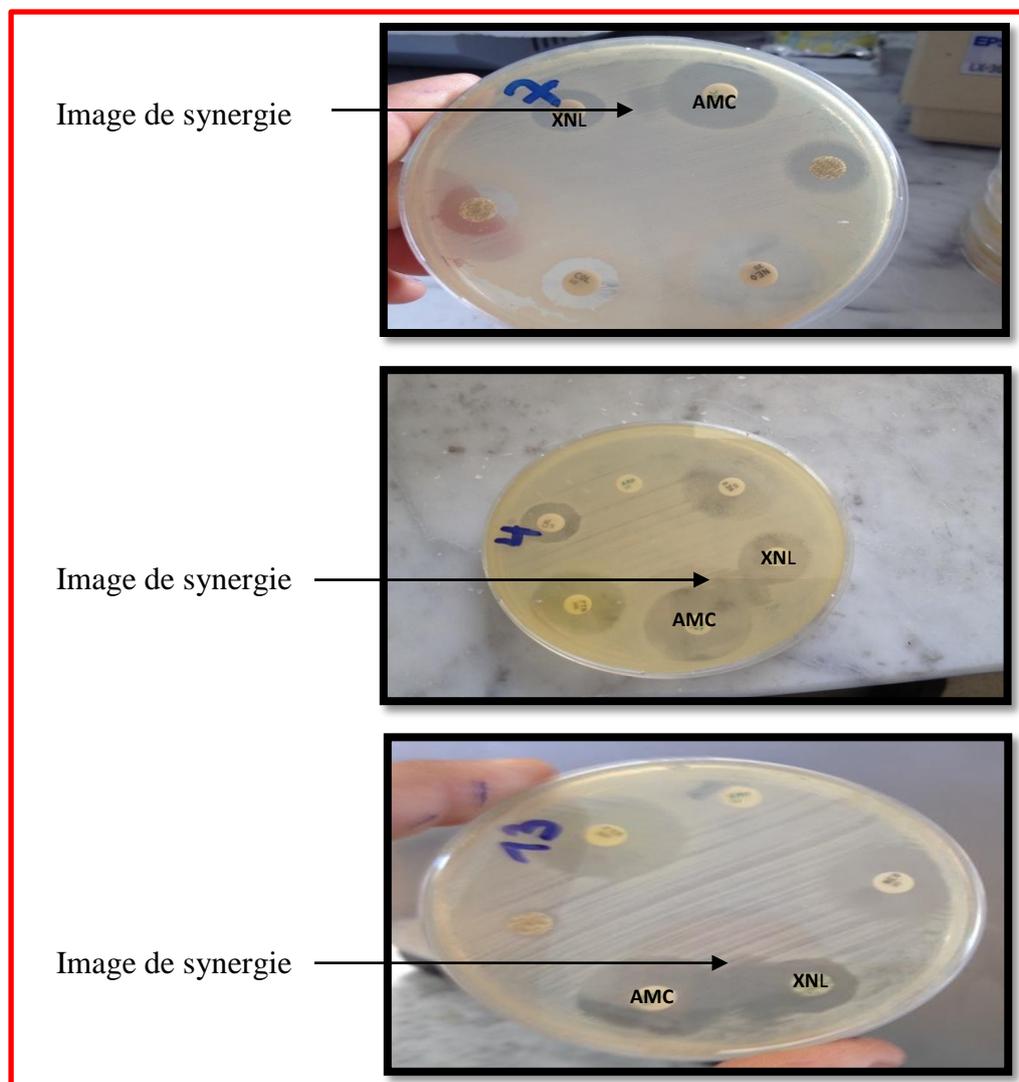


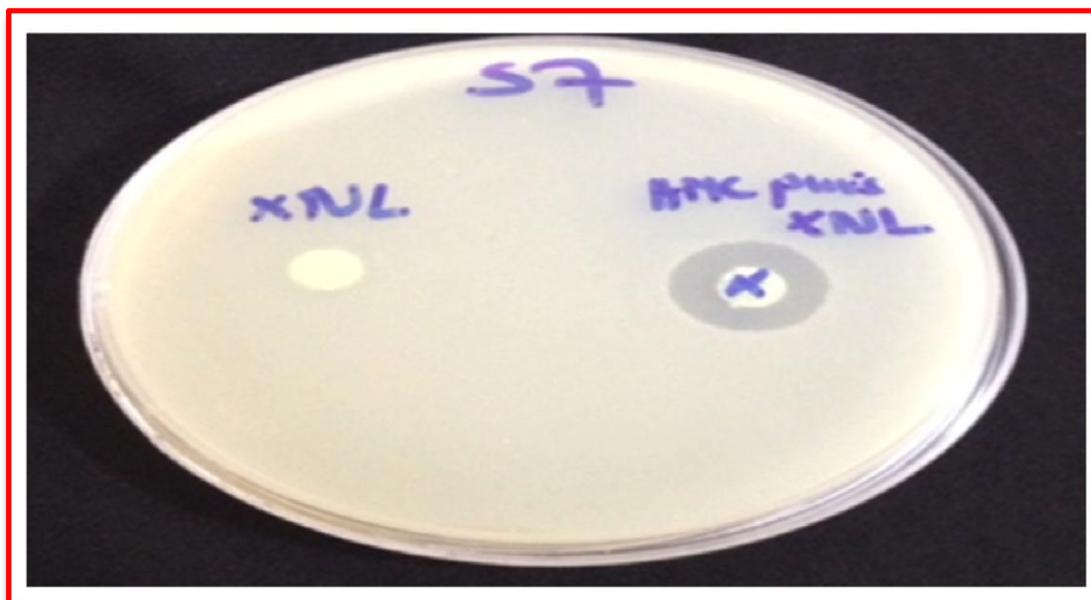
Figure N°24 : Fréquence des souches BLSE

Dans notre travail, 32 souches d'*E. coli* ont présenté des diamètres réduits vis-à-vis le céphalosporine de troisième génération (XNL), avec manifestation d'une image du bouchon de champagne lors du test de synergie (figure N° 25). Après confirmation par le test de double disque (figure N°26), toutes les souches étaient confirmées comme productrices de BLSE avec un pourcentage de 10,15%.

Ce pourcentage est largement inférieur à celui rapporté par Belmahdi *et al.* en 2016 au niveau des élevages de poulet de chair dans la région de Béjaia (32,78%). Cet grand écart est expliqué par l'apparence des méthodes d'isolement des souches d'*E. coli*, car Belmahdi *et al.* ont utilisé la méthode d'isolement sélective par l'addition de C3G au milieu d'enrichissement ce qui augmente les chances d'isoler un pourcentage assez élevé des souches productrices de BLSE.

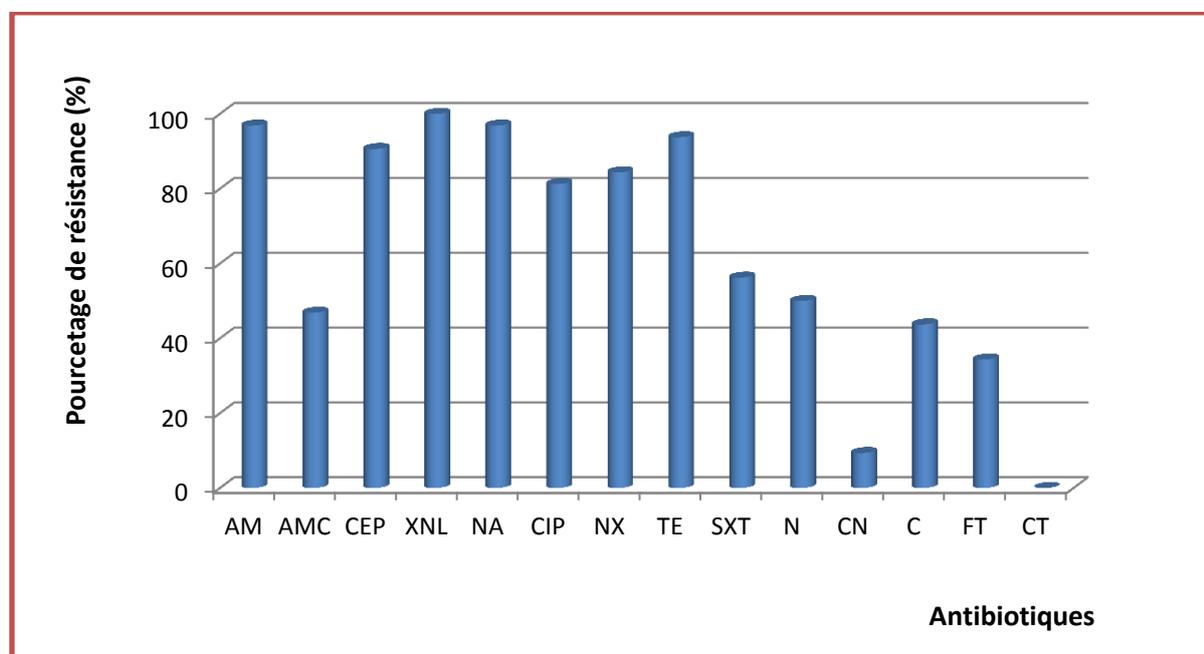


**Figure N°25** : Test de synergie positif des souches d'*E. coli* BLSE (image du bouchon de champagne) (BOUTAIBA BENKLAOUZ, 2020)



**Figure N°26 :** Test de double disque positif : à gauche disque d'XNL et à droite disque d'XNL après la diffusion d'un disque d'AMC pendant une heure (La déférence entre les deux disques est  $\gg$  5 mm) (BOUTAIBA BENKLAOUZ, 2020).

#### 1.4.6. Sensibilité des souches productrices de BLSE aux antibiotiques :



**Figure N°27 :** Pourcentages de résistances des souches productrices de BLSE aux différents antibiotiques.

En plus de leur résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération [XNL (100%)], les souches *E. coli* BLSE ont présenté des résistances croisées vis-à-vis des autres bêta-lactamines, [AM (96,87%), CEP (90,63%), et AMC (46,87)] et des résistances associées vis-à-vis des autres classes d'antibiotiques tel que : quinolones, fluoroquinolones, tétracyclines, sulfamides, et aminosides [NA (96,87%), TE (73,75%), NX (84,37%), CIP (81,25%), SXT (56,25%) et N (50%)] (figure N°27). Ces hauts niveaux de résistance en vers les antibiotiques de première intention peuvent mettre les vétérinaires praticiens et les aviculteurs dans des situations inquiétantes suite aux échecs thérapeutiques engendrés voire les impasses thérapeutiques ; Ce qui est peut-être en rapport avec l'utilisation abusive d'antibiotiques à large spectre. D'un autre côté, il est actuellement prouvé que l'utilisation des antibiotiques, notamment les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération dans un but thérapeutique est le facteur de risque le plus important dans le développement des résistances bactériennes (Rubin et Samore, 2002), qui est devenue un problème majeur de santé publique.

Des taux de résistance moyennes ont été enregistrés vis-à-vis l'AMC (46,87%), C (43,75) et FT (34,37%) ; peut être due à l'utilisation modérée de ces antibiotique dans la région étudiée.

Un taux faible de résistance a été enregistré vis-à-vis le CN (9,37%) ce qui est expliqué par la non prescription de cette molécule en aviculture.

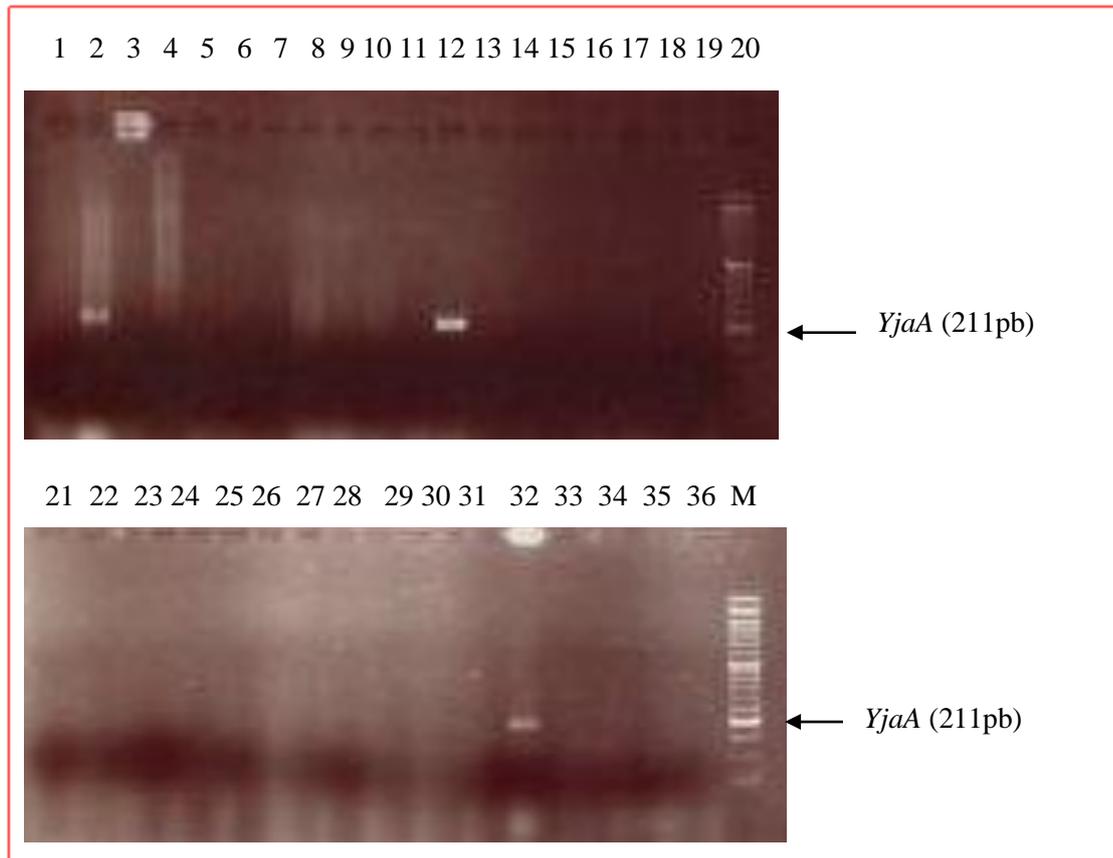
La colistine s'est montré l'antibiotique le plus actif sur toutes les souches BLSE testées, soit un taux de sensibilité 100%. Cela indiquant sa place en premier choix dans le traitement des infections sévères à bactéries multirésistantes.

D'une manière générale, l'ensemble des résultats phénotypiques de notre étude va dans le sens d'une augmentation des niveaux de résistance aux antibiotiques de première intention, notamment les bêta-lactamines, les quinolones et les fluoroquinolones. A cet effet, une caractérisation génotypique des souches d'entérobactéries résistantes à ces antibiotiques est nécessaire.

## 2. Caractérisation génotypique des souches BLSE :

### 2.1. Résultats des groupes phylogénétiques d'*E. coli* BLSE:

Les résultats de l'amplification des gènes des groupes phylogénétiques sont représentés dans la figure N°28.



**Figure N°28 :** Gels d'électrophorèse de PCR des gènes des groupes phylogénétiques (A, B1, B2 et D) ; gène *YjaA* (211pb) (Laboratoire de recherche bactériologique -institut de recherche vétérinaire de Tunis, 2022).

**M:** Marqueur de taille 50 pb. **Puit 20:** témoin positif. **Puits 2, 12 et 32:** souches contenant le gène *YjaA*. **Puits 1 et 36 :** témoins négatifs.

L'interprétation des résultats des groupes phylogénétiques d'*E. coli* BLSE est portée dans le tableau N° 09.

**Tableau N° 09 :** Interprétation des résultats des groupes phylogénétiques d'*E. coli* BLSE.

Nombre d'isolats	<i>Chu A</i>	<i>YjaA</i>	<i>TspE4C2</i>	Phylogroupes	Sous-types
29	-	-	-	A	A0
03	-	+	-	A	A1

L'amplification d'un fragment du gène "*YjaA*" de taille de 211 pb a été enregistrée chez trois isolats (figure N°25), ils sont donc des *E. coli* de phylogroupe A et donc de sous-type A1 ; Pour le reste des isolats (29), ils étaient dépourvus de tous les gènes de groupes phylogénétiques, alors ils sont des *E. coli* de phylogroupe A et de sous-type A0.

En conclusion, Tous les isolats d'*E. coli* BLSE isolés dans notre étude appartiennent au phylogroupe "A".

Certaines souches d'*E. coli* peuvent causer une grande variété de maladies intestinales et extra-intestinales, telles que diarrhée, infections des voies urinaires, septicémie et méningite (Orskov *et al.*, 1992). Des analyses phylogénétiques ont montré que les souches d'*E. coli* appartiennent à quatre groupes phylogénétiques principaux : A, B1, B2 et D; et que les souches extra-intestinales virulentes appartiennent principalement au groupe B2 et, dans une moindre mesure, au groupe D (Bingen *et al.*, 1998 ; Boyd *et al.*, 1998 ; Picard *et al.*, 1999 ; Johnson et Stell, 2000), alors que la plupart des souches commensales appartiennent au groupe A (Clermont *et al.*, 2000).

À la lumière de cette classification, on conclut que nos colibacilles BLSE sont des souches commensales ; cela peut être expliqué par leurs origines de prélèvements à partir des sujets sains (poulet de chair adulte, poulette démarrée, poussin chair, poussin ponte, œuf à couver), notamment dans les différents contrôles de salmonelloses aviaires.

Une étude récente a été menée au niveau du centre Algérien, rapportant l'existence de deux phylogroupes d'*E. coli* BLSE d'origine aviaire : A et B1 dans le poulet de chair (Chenouf *et al.*, 2020).

Une autre étude en Tunisie chez l'être humain en bonne santé a prouvé la dominance des souches d'*E. coli* BLSE phylogroupes B1 (36,36%) et A (27,27%) (commensales) par rapport aux autres phylogroupes D (18,18%) et B2 (9,09%), ce qui incrimine l'être humain sain comme réservoir des souches BLSE (Ben Sallem *et al.*, 2012).

Cette bactérie est très rencontrée en médecine vétérinaire, chez les ruminants et chez les volailles dont les poulets de chair, et elle est commune de la flore intestinale et commensale dans la plupart de ces animaux de boucherie (Bogaard et Stobberingh, 2000).

L'expression de nos isolats du phénotype BLSE explique clairement leurs acquisitions de ce mécanisme de résistance par le biais du transfert horizontal à partir d'autres souches résistantes.

En plus, *E. coli* peut servir d'indicateur pour l'acquisition de la résistance aux antibiotiques par rapport aux divers organismes entériques. D'autre part, *E. coli* est de plus en plus associé à une large résistance principalement par la production de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) ou AmpC  $\beta$ -lactamases (Smet *et al.*, 2009). Cette résistance a été observée dans les souches provenant de toutes les espèces animales, mais elle est significativement plus élevée chez les souches isolées à partir de la production avicole intensive à travers le monde (Diarrassouba *et al.*, 2007 ; Kojima *et al.*, 2009 ; Bortolaia *et al.*, 2010).

## 2.2. Résultats de caractérisation génotypique des gènes de résistance aux antibiotiques:

Les résultats de la caractérisation moléculaire des isolats BLSE sont portés dans les tableaux N°10 et N°11.

**Tableau N° 10 :** fréquence des gènes de résistance chez les souches d'*E. coli* BLSE d'origine aviaire.

Gène	Gènes de BLSE							Gènes de résistance aux quinolones et fluoroquinolones			
	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>					<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>aac</i> (6)- <i>Ib-cr</i>
			CTX-M-1	CTX-M-2	CTX-M-8	CTX-M-9	CTX-M25				
<b>Fréquence</b>	<b>08</b>	<b>00</b>	<b>08</b>	<b>00</b>	<b>00</b>	<b>07</b>	<b>00</b>	<b>00</b>	<b>00</b>	<b>00</b>	<b>03</b>
<b>N (%)</b>	<b>(25%)</b>		<b>(25%)</b>			<b>(21,87%)</b>					<b>(9,37%)</b>

N : nombre de souches.

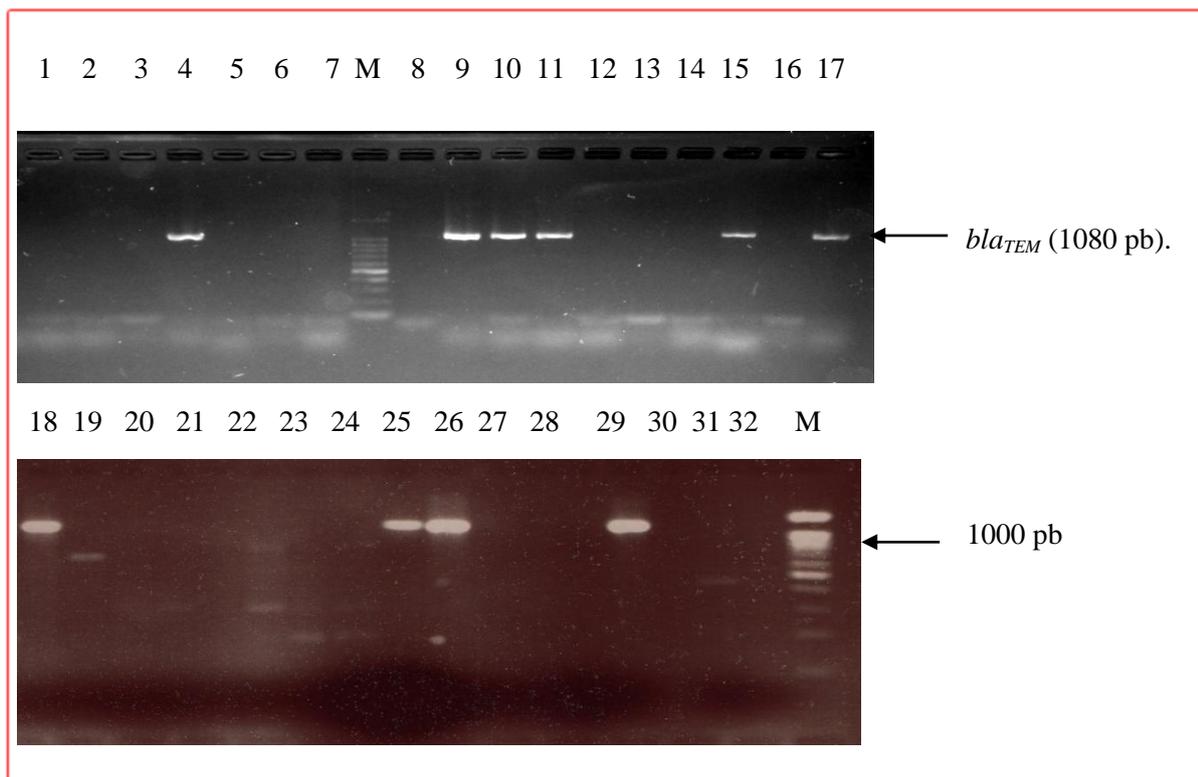
Tableau N° 11 : Caractéristiques des souches d'*E. coli* BLSE.

Code	Origine	Identification (Phylogroupe)	Profil de résistance	Gènes bla	<i>qnrA/B/S, aac (6')-Ib-cr</i>
S1	Poulet de chair	<i>E. coli</i> (A)	SXT, NA, TE, CEP, AMC, XNL, N, AM, CIP, NX	CTX-M-1 + TEM	-
S7	Poule pondeuse	<i>E. coli</i> (A)	CT, NA, TE, CEP, XNL, N, AM, CIP, NX	CTX-M-1	-
S12	Poussin chair	<i>E. coli</i> (A)	NA, TE, CEP, XNL, AM, CIP, NX	CTX-M-1	-
S54	Poussin chair	<i>E. coli</i> (A)	SXT, NA, TE, CEP, XNL, AM, CIP, NX	CTX-M-9 + TEM	-
S55	Poule pondeuse	<i>E. coli</i> (A)	SXT, NA, TE, CEP, XNL, N, AM	CTX-M-1	-
S56	Poussin chair	<i>E. coli</i> (A)	SXT, NA, TE, CEP XNL, AM	-	<i>aac (6')-Ib-cr</i>
S57	Œufs à couver	<i>E. coli</i> (A)	SXT, NA, TE, CEP XNL, AM, CIP, NX	CTX-M-9	-
S58	Poussin ponte	<i>E. coli</i> (A)	SXT, NA, TE, CEP, AMC, XNL, N. AM, CIP, NX	CTX-M-1	-
S60	Poussin chair	<i>E. coli</i> (A)	SXT, NA, TE, CEP, XNL, N, AM, CIP, NX	CTX-M-1	-
S61	Poulette Repro - chair	<i>E. coli</i> (A)	SXT, NA, TE, CEP, AMC, XNL, N, AM, CIP, NX, FT	-	<i>aac (6')-Ib-cr</i>
S62	Poule pondeuse	<i>E. coli</i> (A)	SXT, NA, TE, CEP, XNL, N, AM, CIP, NX	TEM	-
S66	Poule pondeuse	<i>E. coli</i> (A)	NA, TE, CEP, XNL, AM, CIP, NX	CTX-M-9	-
S84	Poule pondeuse	<i>E. coli</i> (A)	CT, SXT, NA, TE, CEP, AMC, XNL, AM, CIP, NX	TEM	-
S104	Poussin ponte	<i>E. coli</i> (A)	SXT, NA, TE, CEP, AMC, XNL, AM, CIP, NX, FT	TEM	-
S114	Poussin chair	<i>E. coli</i> (A)	NA, TE, CEP, AMC, XNL, N, AM, CIP, NX, FT	CTX-M-9	-
S115	Poulet de chair	<i>E. coli</i> (A)	SXT, NA, TE, CEP, AMC, XNL, N, AM, CIP, NX	CTX-M-1 + TEM	-
S130	Poussin chair	<i>E. coli</i> (A)	SXT, NA, TE, CEP, AMC, XNL, N, AM, CIP, NX, FT	CTX-M-9	-
S131	Poussin chair	<i>E. coli</i> (A)	NA, TE, AMC, XNL, AM, CIP, NX, FT, C	CTX-M-9	<i>aac (6')-Ib-cr</i>
S132	Poussin chair	<i>E. coli</i> (A)	SXT, NA, TE, CEP, XNL, AM, CIP, NX, FT, C	CTX-M-9	-
S141	Poulet de chair	<i>E. coli</i> (A)	NA, TE, CEP, AMC, XNL, AM, CIP, NX	CTX-M-1 + TEM	-
S142	Œufs à couver	<i>E. coli</i> (A)	NA, TE, CEP, XNL, AM, CIP, NX	TEM	-

Sur 32 isolats d'*E. coli* BLSE, seulement 19 souches ont été trouvés héberger les gènes *bla* (TEM, CTX-M-1 et CTX-M-9) ; et 03 isolats ont été détectés porteur du déterminant *aac(6')-Ib-cr* , le reste des souches (11 souches) ont été dépourvues des gènes de résistance recherchés dans notre étude. Leur expression du phénotype BLSE peut être expliquée par l'hébergement de d'autres gènes qui code pour d'autres variantes de BLSE.

### 2.2.1. Résultat de l'amplification du gène "*bla*<sub>TEM</sub>":

Les résultats de l'amplification du gène "*bla*<sub>TEM</sub>" sont représentés dans la figure N°29.



**Figure N°29** : Gels d'électrophorèse de PCR du gène *bla*<sub>TEM</sub> (1080 pb) (Laboratoire de recherche bactériologique -institut de recherche vétérinaire de Tunis, 2022).

**M**: Marqueur de taille 100 pb. **Puits 17 et 18**: souches témoins *bla*<sub>TEM</sub> positifs. **Puits 4, 9, 10, 11, 15, 25, 26 et 29** : souches contenant le gène *bla*<sub>TEM</sub> (respectivement : S1, S54, S62, S84, S104, S115, S141 et S142). **Puits 1 et 32** : témoins négatifs.

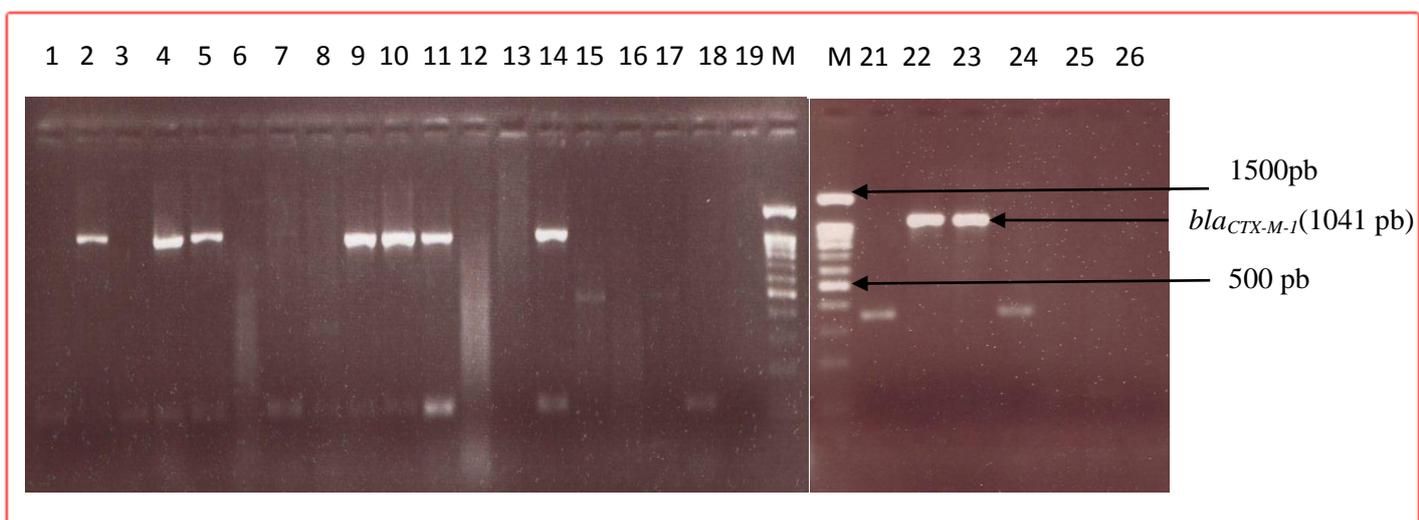
08 isolats (25%), parmi les souches d'*E. coli* BLSE, ont été détectés porteurs du gène *bla<sub>TEM</sub>* dans notre étude.

Ce résultat est largement inférieur à celui rapporté par l'étude de Belmahdi *et al.* dans les élevages de poulet de chair dans l'ouest Algérien, avec un pourcentage de 100% quant à l'expression de leur souches d'*E. coli* du gène *bla<sub>TEM-1</sub>* (Belmahdi *et al.*, 2016). Cet grand écart de pourcentages est expliqué par l'apparence des milieux d'isolements des colibacilles entre les deux études, et cela par l'ajout d'une concentration de 2 mg/ml de ceftazidime (C3G) qui exerce une sélection accrue des colibacilles résistants.

Cependant, il est nettement supérieur à celui enregistré par Benameur *et al.* dans la même région que celle de notre étude avec un taux de 2,70%, des souches d'*E. coli* qui hébergent le gène *bla<sub>TEM-1</sub>* isolées à partir les ovaires de poulet repro-chair (Benameur *et al.*, 2019) ; cela explique clairement la progression de dissémination de cet ancien gène dans la région.

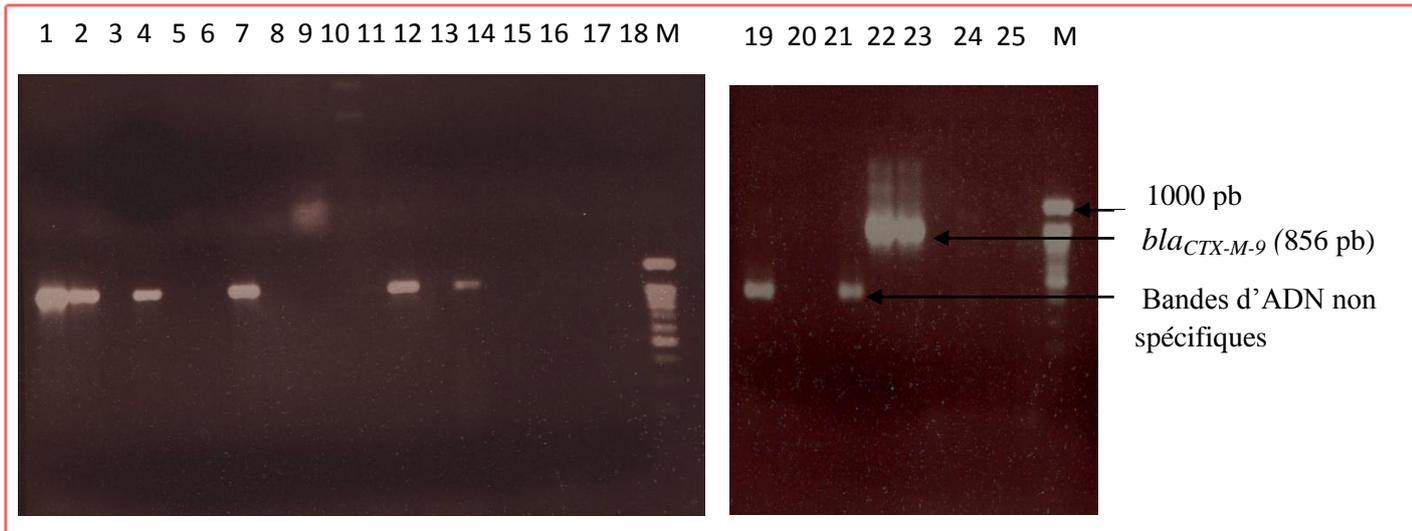
### 2.2.2. Résultat de l'amplification du gène "*bla<sub>CTX-M</sub>*" :

Après amplification et séquençage de ce gène, il a été mis en évidence de seulement deux variantes : CTX-M-1 et CTX-M-9, les autres variantes (CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-25) n'ont été pas trouvés dans nos isolats BLSE.



**Figure N°30** : Gels d'électrophorèse de PCR du gène *bla<sub>CTX-M-1</sub>* (1041 pb) (Laboratoire de recherche bactériologique -institut de recherche vétérinaire de Tunis, 2022).

**M**: Marqueur de taille 100 pb. **Puits 2**: souche témoin *bla<sub>CTX-M-1</sub>* positif. **Puits 4, 5, 9, 10, 11, 14, 22 et 23** : souches contenant le gène *bla<sub>CTX-M-1</sub>* (respectivement : S1, S7, S12, S55, S58, S60, S115 et S141). **Puits 1**: témoin négatif.



**Figure N°31** : Gels d'électrophorèse de PCR du gène *bla*<sub>CTX-M-9</sub> (856 pb) (Laboratoire de recherche bactériologique -institut de recherche vétérinaire de Tunis, 2022).

**M:** Marqueur de taille 100 pb. **Puits 1:** souche témoin *bla*<sub>CTX-M-9</sub> positif. **Puits 2, 4, 7, 12, 14 22 et 23** : souches contenant le gène *bla*<sub>CTX-M-9</sub> (respectivement : S54, S57, S66, S114, S130, S131 et S132). **Puits 25:** témoin négatif.

08 isolats (25%) et 07 isolats (21,87%), parmi les souches d'*E. coli* BLSE, ont été trouvés héberger les gènes *bla*<sub>CTX-M-1</sub> et *bla*<sub>CTX-M-9</sub> respectivement (figure N°30 et N°31).

Nos résultats sont inférieurs à ceux rapportés dans d'autres études sur des souches d'*E. coli* isolées à partir des élevages de poulet de chair.; (Gundran *et al.*, 2019) en Philippines avec des taux des gènes *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (72.46%), *bla*<sub>CTX-M-2</sub> (65.22%) et *bla*<sub>CTX-M-9</sub> (52.17%); Aussi, (Solà-Ginés *et al.*, 2015) en Espagne avec des pourcentages des gènes *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (54,76%), *bla*<sub>CTX-M-14</sub> (42.85%) mais avec faible pourcentage pour *bla*<sub>CTX-M-9</sub> (2.38%).

Alors, ils sont supérieurs à ceux réalisés par Chenouf *et al.* dans la région de Djelfa avec les pourcentages suivants : *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (23,07%), *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (23,07%), *bla*<sub>CTX-M-55</sub> (7,69%).

Depuis son émergence en 1984 chez une souche de *Klebsiella pneumoniae* (Paterson *et al.*, 2005), le gène *bla*<sub>CTX-M</sub> est en perpétuelle dissémination, non seulement chez l'être humain (Valverde *et al.*, 2004), mais aussi chez les différentes espèces animales (Kojima *et al.*, 2002; Carattoli *et al.*, 2005) et dans l'environnement (Pitout *et al.*, 2005).

Les deux variantes du gène *bla*<sub>CTX-M</sub> (CTX-M-1 et CTX-M-9) ont été trouvées en association avec le gène *bla*<sub>TEM</sub> en 04 isolats dans la spéculation chair; En effet, les souches:

S1, S2, S141 isolées à partir les sujets de poulet de chairs ont été trouvées héberger l'association CTX-M-1 et TEM ; encore l'isolat : S54 isolé à partir les sujets de poussins chairs était porteur de l'association CTX-M-9 et TEM (Tableau N°11) . La dissémination de ce type d'association dans les établissements avicoles chair à déférente tranches d'âges dans la région de l'ouest Algérien, indique clairement l'utilisation abusive et irraisonnée de plusieurs bétalactamines dans les mêmes bandes d'élevages ; Cela mettant en cause la mauvaise indication, la mauvaise durée et les mauvaises combinaisons de ces molécules. En plus de ca, le type d'élevage au sol de la filière chair participe largement dans cette dissémination par le manque de conditions d'hygiène.

### 2.2.3. Résultat de l'amplification du gène "*qnr*" et "*aac(6')-Ib-cr*" :

#### 2.2.3.1. Le gène "*qnr*" :

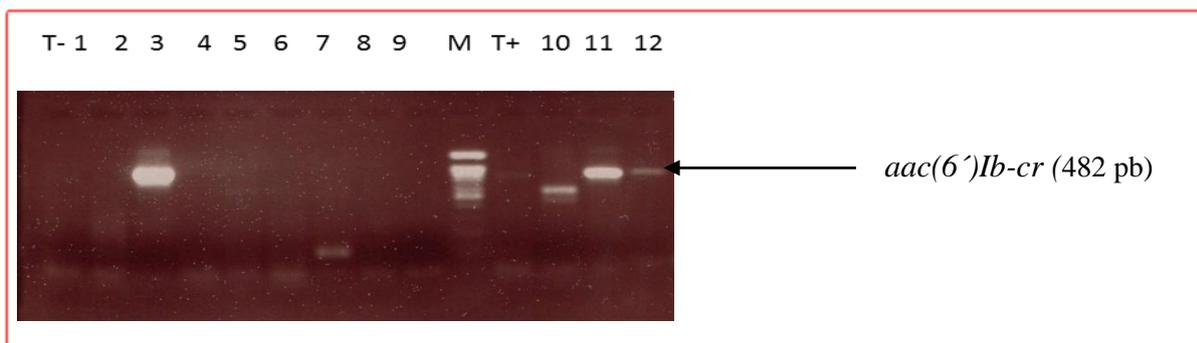
Aucun isolat parmi nos souches d'*E. coli* BLSE n'a été trouvé héberger l'un des gènes *qnr* (*qnrA*, *qnrB* et *qnrS*).

Pour les gènes *qnrA* et *qnrB* , nos résultats est en accord avec ceux rapportés par Benameur dans la même région d'étude en 2011, tandis que ce dernier a détecté pour la première fois en Algérie deux isolats d'*E. coli* BLSE et *Enterobacter cloacae* non productrice de BLSE d'origine aviaire porteurs du gène *qnrS* (Benameur *et al.*, 2018).

En outre, *qnrA* a été récemment identifié dans des souches d'*E. coli* d'origine aviaire productrices de BLSE (Belmahdi *et al.*, 2016), et *qnrS1* et *qnrB5* dans des souches d'*E. coli* productrices de BLSE isolées à partir d'animaux de compagnie (Yousfi *et al.*, 2016).

#### 2.2.3.2. Le gène "*aac(6')-Ib-cr*" :

Les résultats de l'amplification du gène "*aac(6')Ib-cr*" sont représentés dans la figure N°32.



**Figure N°32** : Gels représentatifs d'électrophorèse de PCR du gène *aac(6')Ib-cr* (482 pb) (Laboratoire de recherche bactériologique -institut de recherche vétérinaire de Tunis, 2022).

**M:** Marqueur de taille 100 pb. **Puit 1:** souche témoin *aac(6')Ib-cr* négatif. **Puits 3, 12 et 13 :** souches contenant le gène *aac(6')Ib-cr* (respectivement : S56, S61 et S131). **Puits 10:** témoin positif.

03 isolats (9,37%), parmi les souches de *E. coli* BLSE, ont été détectés héberger le gène *aac(6')Ib-cr* dans notre étude ; un de ces isolats était trouvé en association avec le gène *bla<sub>CTX-M-9</sub>*.

L'*aac(6')Ib-cr* (*cr* pour la résistance à la ciprofloxacine) est un variant de l'*aac(6')Ib* qui est responsable à la résistance aux aminosides (la kanamycine, la tobramycine et l'amikacine) avec deux substitutions d'acides aminés par rapport au type sauvage permettant pour acétyler et ensuite réduire l'activité de la norfloxacine et de la ciprofloxacine (Park *et al.*, 2006 ; Robicsek *et al.*, 2006a; Vetting *et al.*, 2008).

Notre résultat est légèrement supérieur à celui annoncé par Aworh *et al.*, dans leur étude en Nigeria sur le poulet de chair et l'environnement avicole avec un pourcentage de souches d'*E. coli* porteuse du gène *aac(6')Ib-cr* (5,40%) (Aworh *et al.*, 2020).

Aucune étude en Algérie n'a démontré, jusqu'à maintenant, la présence de souches d'*E. coli* BLSE d'origine aviaire qui hébergent le gène *aac(6')Ib-cr* ; en effet, cette étude vient de décrire pour la première fois en Algérie une souche d'*E. coli* BLSE porteuse de ce mécanisme plasmidique de résistance aux quinolones en plus de ça en association avec le gène *bla<sub>CTX-M-9</sub>*.

Par ailleurs, autre étude en milieu hospitalier dans la région d'Anaba, a trouvé pour la première fois en Algérie une souche d'*Enterobacter cloacae* résistante aux fluoroquinolones porteuse de deux mécanismes plasmidiques de résistance aux quinolones : *qnr B1* et *aac(6')Ib-cr* (Meradi *et al.*, 2011).

Aussi, l'étude de Shabana *et al.* en Egypte sur les animaux d'élevages (ovins et caprins) a dénoncée l'association des gènes de résistance dans des souches d'*E. coli* BLSE vis à vis trois classes d'antibiotiques : céphalosporines (*CTX-Ms*), quinolones (*qnrA-qnrB-qnrS*) et aminoglycosides (*rmtB*).

D'autre part des études menées en: Algérie (Meradi *et al.*, 2011), Egypte (Hassan *et al.*, 2012) et Marok (Jamali *et al.*, 2014) ont démontré l'habilité de la co-transférabilité du gène *aac(6')Ib-cr* avec d'autre gènes *bla<sub>CTX-M</sub>* et *qnr* via des plasmides conjugatifs de haut poids moléculaire( $\geq 125$ Kb) portés par des souches d'*E. coli*.

Beaucoup d'études basées sur des approches moléculaires ont montré l'association entre les déterminants de la résistance aux quinolones et la production de BLSE en milieu

communautaire (Poirel *et al.*, 2006 ; Robicsek *et al.*, 2006b ; Avgustin *et al.*, 2007 ; Fihman *et al.*, 2008 ).

L'hébergement de souche d'*E. coli* du phylogroupe A (commensale) de deux gènes codant pour deux mécanismes de résistance (céphalosporines et fluoroquinolones) c'est un indice de la complexité de la situation quant à l'antibiorésistance dans l'aviculture dans l'ouest Algérien.

Certes, l'exposition des bactéries commensales aux antibiotiques soulève la possibilité du développement de souches résistantes capables de transférer les gènes de résistance à une souche virulente (Tenover et McGowan, 1996). En effet, Le transfert horizontal des gènes de résistance aux antibiotiques peuvent se produire entre des bactéries de différentes sources, ou entre des bactéries résistantes et des bactéries sensibles de même provenance (Johnson *et al.*, 2008).

L'un des problèmes de santé publique les plus importants est la présence de souches commensales présentant des gènes de résistance aux antibiotiques surtout en association, car elles peuvent transmettre ces derniers aux souches virulentes ce qui peut engager le pronostic vitale des êtres humains d'une part et causer des pertes économiques considérables dans le patrimoine animalier d'autre part, et cela à cause des échecs voire des impasses thérapeutiques.

Une très bonne relation a été établie entre la présence des gènes BLSE (de type TEM et CTX) dans les isolats et la résistance de ceux-ci aux C3G. Cela n'a pas été le cas pour les quinolones et fluoroquinolones, où la majorité des gènes ciblés n'ont pas été découverts ; il est probable que cette résistance soit codée par des gènes que nous n'avons pas recherchés dans cette étude (des mécanismes de résistance supplémentaires tels que des mutations dans les gènes chromosomiques *gyrA* et *gyrC* ou la présence d'autres mécanismes de résistances aux quinolones à médiation plasmidique (PMQR) impliquant différentes pompes d'efflux (QepA, OqxAB et QacBIII).

En outre, nous pensons que cette relation aurait pu être obtenue si un grand nombre d'isolats avait été examiné.

**CONCLUSION,**  
**RECOMMENDATIONS ET**  
**PERSPECTIVES**

## CONCLUSION, RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES

---

### CONCLUSION, RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES :

La résistance aux antibiotiques est devenue un véritable problème de santé animale, notamment en aviculture, à travers le monde et particulièrement en Algérie, avec l'émergence et la diffusion des souches bactériennes multi-résistantes. Le présent travail, réalisé sur une période de quatre ans, avait pour objectif général de caractériser phénotypiquement les souches d'entérobactéries multirésistantes d'origine aviaire et génotypiquement les souches productrices de BLSE dans la région de l'ouest Algérien. L'étude a porté sur 315 souches d'entérobactéries, dont 32 portent le phénotype BLSE, isolées de divers échantillons provenant de divers établissements avicoles localisés dans six wilaya de l'ouest Algérien.

La caractérisation phénotypique des souches a montré une diversité pour les espèces d'entérobactéries quant à leur identification avec une dominance de l'espèce *E. coli* suivi par *Shigella* spp. et *Enterobacter* spp., en plus l'espèce *Salmonella* spp. à travers la dissémination de quatre sérotypes : *S.kentucky*, *S.worthington*, *S. kedougou* et *S.dublin*.

Des niveaux de résistances alarmants, ont été enregistrés, des souches d'*E. coli* vis-à-vis la majorité des antibiotiques testés notamment ceux de première intention (bêta-lactamines, quinolones, fluoroquinolones et aminosides) et anciens molécules (tétracyclines).

Le surprenant dans cette étude c'est que les souches d'entérobactéries non-*E. coli* ont aussi présenté des hauts niveaux de résistance aux antimicrobiens de première intention cités ci-dessus.

Ce travail nous a rapporté aussi l'isolement du sérotype *S.kentucky* résistant à la ciprofloxacine (*S. Kentucky* CIP-R), qui a été récemment trouvé comme clone émergent dans certains pays du nord-Africain.

Les résultats obtenus étaient pour le moins alarmants dans la mesure où la majorité des souches d'entérobactéries étaient multi-résistantes à presque tous les antibiotiques d'importance critique en médecine vétérinaire.

La caractérisation moléculaire a démontré que la totalité de souches d'*E. coli* appartiennent au phylogroupe A (souches commensales). En plus, ces isolats BLSE étaient porteurs des gènes : *aac (6')-Ib-cr*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX-M-1</sub>* et *bla<sub>CTX-M-9</sub>*.

Pour la 1<sup>ère</sup> fois en Algérie, ce gène *aac (6')-Ib-cr* a été trouvé chez une souche d'*E. coli* BLSE d'origine aviaire et en association avec le gène *bla<sub>CTX-M-9</sub>*.

Les résultats de notre étude sur la présence d'un clone d'*E. coli*, chez les sujets de poussin chair d'un jour, porteur de l'association de deux gènes, *aac (6')-Ib-cr* et *bla<sub>CTX-M-9</sub>*, responsables à la résistance aux fluoroquinolones et aux C3G, antibiotiques de premier

## CONCLUSION, RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES

---

recours en médecine vétérinaire et la présence des souches d'*E. coli* productrices de BLSE de type CTX-M-1 et TEM dans les organes de poulets de chair sont des indices claires pour la dissémination de la multi-résistance dans les différents niveaux de la filière avicole chair en Algérie.

D'une manière générale, l'ensemble des résultats obtenus au cours de notre étude va dans le sens d'une augmentation des niveaux de la multi-résistance.

A la lueur des conclusions de cette étude, il nous paraît nécessaire de suggérer l'adoption de certaines mesures qui permettraient de lutter contre l'émergence et la persistance des résistances bactériennes aux antibiotiques qui présentent une menace réelle pour la santé publique :

### **i. Organisation de l'élevage :**

- Sensibiliser à l'importance de l'application des mesures de biosécurité, pour limiter la fréquence d'utilisation des antibiotiques en élevage. A ce titre, le respect de bonnes pratiques d'hygiène au niveau des établissements avicoles représente un outil important de progression ;
- Encourager la rénovation des locaux d'élevage, en diminuant les freins administratifs, permettant une meilleure maîtrise des points critiques en matière de sécurité sanitaire pour l'élevage ;
- Prendre en compte la taille de l'élevage et la densité animale dans l'évaluation du risque d'évolution des infections et dans la détermination des moyens humains et techniques pour assurer la maîtrise des risques sanitaires dans l'élevage ;
- Prendre en compte l'alimentation comme facteur clé de la maîtrise de l'état de santé général des cheptels ;
- Encourager les recherches sur les schémas génétiques prenant en compte les qualités de robustesse et de rusticité.

### **ii. Outils de diagnostic :**

- Développer des outils de diagnostic rapide adaptés à la problématique de l'antibiorésistance, comme des kits permettant de distinguer les affections de requérir un traitement antibiotique des autres, les tests moléculaires ;

## CONCLUSION, RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES

---

- Renforcement des capacités des laboratoires nationaux dans le domaine du suivi de la résistance aux antimicrobiens et de la détection des résidus d'agents antimicrobiens dans les produits alimentaires et l'environnement.

### iii. Antibiotiques :

- Ré-évaluer les posologies des AMM d'anciens antibiotiques. Ces ré-évaluations pourront conduire à des augmentations de posologies qu'il faudrait pouvoir compenser par des limitations de durées de traitement validées. Plusieurs études scientifiques, mises en relation les unes avec les autres, suggèrent en effet que la diminution de la durée des traitements antibiotiques pourrait constituer un levier d'action prometteur pour réduire l'émergence de résistances dans les flores commensales, sans perte d'efficacité contre les infections. Des études devraient être réalisées pour optimiser les durées de traitement en antibiothérapie vétérinaire ;
- Le retrait de certains antibiotiques, qui connaissent des niveaux alarmants de résistance, dans le traitement des pathologies aviaires en Algérie tels que ceux signalé dans la présente étude (tétracycline, ampicilline, acide nalidixique ) ou du moins d'en encadrer l'usage ;
- L'utilisation prudente et responsable des antibiotiques qui restent efficaces chez les animaux, comme la colistine, en rendant leur prescription obligatoire par le vétérinaire ;
- La lutte contre l'utilisation non réglementaire de certains antibiotiques qui sont interdits dans la filière des animaux de rente en Algérie tels que le chloramphénicol et la nitrofurantoïne ;
- Sensibiliser les éleveurs et les professionnels des filières avicoles aux enjeux liés à l'observance des traitements et au respect des posologies afin d'éviter le problème de l'antibiorésistance et les risques associés ;

Ces recommandations devraient être considérées avec intérêt dans la mesure où elles rejoignent le plan mondial de l'OMS qui souligne la nécessité d'adopter une approche « One Health » pour combattre la résistance aux antibiotiques.

La mise en place des systèmes de surveillance en continu de la consommation d'antibiotiques et de la résistance aux antibiotiques en médecine vétérinaire ainsi que la diffusion des données entre les différents secteurs au niveau national constitue également l'un de nos objectifs futurs.

## CONCLUSION, RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES

---

En outre, le développement de nouveaux antibiotiques, l'optimisation des méthodes diagnostiques et le développement des solutions alternatives au traitement antibiotique (vaccins, peptides antibactériens, bactériophages...) restent des pistes intéressantes pour faire face au problème de la résistance aux antibiotiques.

**RÉFÉRENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## Références bibliographiques

---

### Références bibliographiques :

- Aarestrup, F.M., Hendriksen, R.S., Lockett, J., Gray, K., Teates, K., Mc Dermott, P.F., White, D.G., Hasman, H., Sorensen, G., Bangtrakulnonth, A., Pornreongwong, S., Pulsrikarn, C., Angulo, F.J. and Gerner-Smidt, P. (2007) International spread of multidrugresistant *Salmonella Schwarzengrund* in food products. *Emerg. Infect. Dis*; 13: 726-731.
- Aarestrup, F.M. (2005) Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*; 96: 271–281.
- Abraham, E.P., and Chain, E. (1940) An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*; 146: 837.
- AFSSA, (2006) Rapport du groupe de travail “Antibiorésistance”. [En ligne]. Maisons-Alfort : AFSSA, 214 pages. Disponible sur : [Uwww.anses.fr/Documents/SANT-Ra-ABR.pdf](http://www.anses.fr/Documents/SANT-Ra-ABR.pdf).
- Agabou, A., Lezzar, N., Ouchenane, Z., Khemissi, S., Satta, D., Sotto, A., Lavigne, J.P. and Pantel, A. (2015) Clonal relationship between human and avian ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* isolates in North-Eastern Algeria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 35: 227-234.
- Aggad, H., Ahmed Ammar, Y., Hammoudi, A. and Kihal, M. (2010) Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis. *Glob. Vet.*; 4: 303-306.
- KACI, A. et Boukella, M. (2007) La filière avicole en Algérie : structures, compétitivité, perspectives. Cahiers du CERAD n°8182, pages: 129-153.
- Ahmed Ammar, Y., Moulay, M., Bouzid, R., Benameur, Q. and Aggad, A. (2017) Bacterial Resistance of Enterobacterea isolates in Western Algeria. *J. Appl. Environ. Biol. Sci.*, 7(1): 140-145.
- Alanis, A.J. (2005) Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch. Med. Res.*, 36:697-705.
- Ambler, R.P. (1980) The structure of  $\beta$ -lactamases. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.*; 289: 321- 331.
- Ambrozic Avgustin, J., Keber, R., Zerjavic, K., Orazem ,T. and Grabnar, M. (2007) Emergence of the quinolone resistance-mediating gene *aac(6')-Ib-cr* in extended-spectrum $\beta$ -lactamase-producing *klebsiella* isolates collected in Slovenia between 2000 and 2005. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 51: 4171–3.

## Références bibliographiques

---

- Andriole, V.T. (2005) The quinolones: past, present, and future. Clin. Infect. Dis., 41 Suppl 2: 113-119.
- ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) (2014) Risques d'émergence d'antibiorésistances liés aux modes d'utilisation des antibiotiques dans le domaine de la santé animale, Anses : rapport d'expertise collective Saisine Maisons-Alfort, le 11 avril 2014 - 218 pages.
- Aragaw, K., Molla, B., Muckle, A., Cole, L., Wilkie, E., & Poppe, C. (2007) The characterization of *Salmonella* serovars isolated from apparently healthy slaughtered pigs at Addis Ababa abattoir, Ethiopia. Preventive Veterinary Medicine; 82, 252–261.
- Arlet, G., and Philippon, A. (2003) Les nouvelles  $\beta$ -lactamases à l'aube du troisième millénaire. Rev Franç Lab.; 352: 41-55.
- Arlet, R. (2006) Les nouvelles BLSE Conférence Hôpital Tenon. Université Pierre et Mari Curie.  
Disponible:<http://www.microbeedu.org/mecanisme/conference/garicai.pdf>.
- Arnold, M.E., Carrique-Mas, J. J. and Davies, R.H. (2009) Sensitivity of environmental sampling methods for detecting *Salmonella enteritidis* in commercial laying flocks relative to the within-flock prevalence. Epidemiol. Infect.; 138: 330-339.
- Avril, J.M., Dabernat, H. et Monteil, D.H. (2000) Bactériologie clinique. 3ème Ed. Ed Ellipses. Paris. 602 P.
- Baba Ahmed-Kazi Tani, Z., Decré, D., Genel, N., Boucherit-Otmani, Z., Arlet, G. and Drissi, M. (2013) Molecular and epidemiological characterization of enterobacterial multi-drug-resistant strains in Tlemcen Hospital (Algeria) (2008–2010). Microb. Drug. Resist., 19:185-190.
- Ball, P. (2000) Quinolone generations : natural history or natural selection? Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 46 : 17-24.
- Banque mondiale, (2016) Drug-resistant infections: A threat to our economic future. Part VI. Antimicrobial use in animals and AMR, pp. 65-78. Banque mondiale, Washington, D.C., 20433.
- Barrial, K., and Scotet, J. (2006) Classification raisonnée des  $\beta$ -lactamases chez les bacilles Gram négatif. Perspective d'évolution. Tigaud de bactériologie; 3-10.
- Belmahdi, M., Bakour, S., Al Bayssari, C., Touati, A. and Rolain, J.M. (2016) Molecular characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase- and plasmid *AmpC*-producing

## Références bibliographiques

---

- Escherichia coli* strains isolated from broilers in Béjaïa, Algeria. J. Glob. Antimicrob. Resist.; 6: 108-112.
- Benameur, Q. (2011) Antibiorésistance des entérobactéries d'origine aviaire. Mémoire de magister; 87 P. Université de Tiaret, Algérie.
- Benameur, Q., Ben-Mahdi, M.H., Boutaïba Benklaouz, M., Tali-Maamar, H., Assaous, F., Guettou, B. and Rahal, K. (2016) Analysis of high levels of multidrug resistant *Escherichia coli* from healthy broiler chickens in Western Algeria. Afr. J. Microbiol. Res.; 10: 1792-1797.
- Benameur, Q., Guemour, D., Hammoudi, A., Aoudia, K., Aggad, H., Humblet, M.H. and Saegermang, C. (2014) Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from chickens in West of Algeria. Int. J. Sci. Basic. Appl. Res.; 13: 366-370.
- Benameur, Q., Tali-Maamar, H., Assaous, F., Guettou, B., Tahrat, N., Aggoune, N., Rahal, K. and Ben-Mahdi, M.H. (2018) Isolation of *Escherichia coli* carrying the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *qnrS1* genes from reproductive organs of broiler breeders and internal contents of hatching eggs, J. Vet. Med. Sci.; 80(10): 1540–1543.
- Benameur, Q., Tali-Maamar, H., Assaous, F., Guettou, B., Boutaïba Benklaouz, M., Rahal, K. and Ben-Mahdi, M.H. (2018) Characterization of quinolone-resistant Enterobacteriaceae strains isolated from poultry in Western Algeria: First report of *qnrS* in an *Enterobacter cloacae*. Vet. World.; 11: 469-473.
- Benameur, Q., Tali-Maamar, H., Assaous, F., Guettou, B., Rahal, K. and Ben-Mahdi, M.H. (2019) Detection of multidrug resistant *Escherichia coli* in the ovaries of healthy broiler breeders with emphasis on extended-spectrum  $\beta$ -lactamases producers, Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases; 64 (2019) 163–167.
- Bennett, P.M. (2008) Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. Br. J. Pharmacol.; 153 Suppl, 1:S347-57.
- Ben Sallem, R., Ben Slama, K., Jouini, A., Gharsa, H., Klibi, N., Boudabous, A. and Torres, C. (2012) Prevalence and characterisation of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates in healthy volunteers in Tunisia, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. ; 31:1511–1516.
- Berche, P. (2016). Histoire de la biologie moléculaire. Feuillet de Biologie/N° 333, p 49.
- Bidet, P. et Bingen, E. (2007) Enterobacteriaceae. In : Denis, F., Ploy, M.C., Martin, C., Bingen, E. et Quentin, R. Bactériologie médicale: Techniques usuelles. Ed Elsevier Masson; Paris. ; P: 295-322.

## Références bibliographiques

---

- Bingen, E.B., Picard, N., Brahimi, S., Mathy, P., Desjardins, J., Elion, and E., Denamur. (1998) Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. *J. Infect. Dis.*; 177:642–650.
- Bonnet, R. (2004) Growing group of extended-spectrum-beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 48: 1–14.
- Borne, P.M. (1998) Les colibacilloses avicoles: des bactéries toujours à l'affût. *Afrique Agriculture*; 83 P.
- Bouchrif, B., Karraouan, B., Ennaji, M.M. and Timinouni, M. (2008) Quinolones-resistant *Salmonella* spp. in Casablanca – Morocco. *Médecine et maladies infectieuses* ; 38 : 615–616.
- Boutaiba Benklaouz, M., Aggad, H. and Benameur, Q. (2020) Resistance to multiple first-line antibiotics among *Escherichia coli* from poultry in Western Algeria. *Veterinary World*; 13(2): 290-295;
- Boutal, H. (2017) Développement et validation de tests de détection rapide de la résistance aux antibiotiques. *Immunologie*. Université Paris-Saclay., Français. <NNT : 2017SACLS499>. <tel-01715103>.
- Bouzidi, N. (2013) L'épidémiologie des infections des élevages de poules pondeuses des régions d'annaba et el-tarf par les salmonelles : Sous-typage moléculaire et Mécanismes de résistance aux antibiotiques des souches isolées. Thèse doctorat ; 188 P. Algérie.
- Boyd, E.F. and Hartl, D.L. (1998) Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution. *J. Bacteriol.* 180:1159–1165.
- Bradford, P.A. (2001) Extended-spectrum beta-lactamases in the 21<sup>st</sup> century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.*; 14: 933-51.
- Brisse, S. and Verhoef, J. (2001) Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*; 51: 915-924.
- Bryskier, A. (1999) Antibiotiques. Agent antibactériens et antifongiques. *Ellipses* ; Paris. p : 54 : 436-445.

## Références bibliographiques

---

- Bush, K., Tanaka, S.K., Bonner, D.P. and Sykes, R.B. (1985) Resistance caused by decreased penetration of beta-lactam antibiotics into *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents*; 27: 555–560. doi:10.1128/AAC.27.4.555.
- Bushen, A., Tekalign, E. and Abayneh, M. (2021) Drug- and Multidrug-Resistance Pattern of Enterobacteriaceae Isolated from Droppings of Healthy Chickens on a Poultry Farm in Southwest Ethiopia. *Infect. Drug Resist.*; 14: 2051-2058 <https://doi.org/10.2147/IDR.S312185>;
- David Schneider, (2008) Conduite du serotypage des *Salmonella* , Source : *Bactéries et environnement* PELMONT.
- Campbell, E.A., Korzheva., N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A. and Darst, S.A. (2001) Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell.*; 104: 901-912.
- Cantón, R., Akova, M., Carmeli, Y., Giske, C., Glupczynski, Y. and Gniadkowski, M. (2012) Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.*; 18: 413–431.
- Carattoli , A., Lovari ,S., Franco, A., Cordaro, G., Di Matteo, P. and Battisti, A. (2005) Extended-spectrum b-lactamases in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 49: 833-835.
- Carbonelle, B., Denis, F., Marmonier, A., Pinon, G. et Vargues, R. (1987) Bactériologie médicale. Techniques usuelles. SIMEP SA, Paris,: 87-98 ; 121-136.
- CA-SFM (2014) Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Sur le lien : <http://www.sfm.asso.fr/>.
- Cattoir, V., Poirel, L., Rotimi, V., Soussy, C.J. and Nordmann, P. (2007) Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J. Antimicrob. Chemother.*; 60: 394-7.
- Cavaco, L.M., Hasman, H., Xia, S., and Aarestrup, F.M. (2009) *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar *Kentucky* and *Bovismorbificans* strains of human origin. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 53: 603-608.
- Cavé, H., Acquaviva, C., Bièche, I., Brault, D., de Fraipont, F., Fina, F., Loric, S., Maisonneuve, L., Namour, F. et Tuffery, S. (2003) La RT-PCR en diagnostic clinique. *Annales de biologie clinique*. Novembre-Décembre ; volume 61, N°6: 635-44.

## Références bibliographiques

---

- Chabou, S., Leulmi, H., Davoust, B., Aouadi, A. and Rolain, J.M. (2017) Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase and carbapenemase-encoding genes in poultry feces from Algeria and Marseille, France. *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, 13: 28-32.
- Chaudhary, A.S. (2016) A review of global initiatives to fight antibiotic resistance and recent antibiotics' discovery. *Acta. Pharm. Sin. B.*; 6: 552-556.
- Clermont, O., Bonacorsi, S. and Bingen, E. (2000) Rapid and simple determination of *Escherichia coli* phylogenetic groups. *Appl. Microbiol.*; 66: 4555-4558.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2015) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-fifth Informational Supplement document M100S25. 25th ed. CLSI, Wayne, PA.
- Coignard, B., (2019) Antibiorésistance : la situation en France et dans le monde, Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine, Volume 203, Issues 3–4, 2019, Pages 159-169, ISSN 0001-4079, <https://doi.org/10.1016/j.banm.2019.02.006>.
- Collard, J.M., Bertrand, S., Dierick, K., Godard, C., Wildemauwe, C. and Vermeersch, K. (2007) Drastic decrease of *Salmonella Enteritidis* isolated from humans in Belgium in 2005, shift in phage types and influence on foodborne outbreaks. *Epidemiology and Infection*; 1–11.
- Courvalin, P. (1994) Transfer of antibiotic resistance genes between Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents. Chemother.*; 38:1447-1451.
- Datta, N. and Kontomichalou, P. (1965) Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature*; 208: 239-241.
- De Lastours, V. and Fantin, B. (2014) Resistance to fluoroquinolones in 2013: What are the consequences in internal medicine? *Rev. Méd. Inter.*; 35: 601-608.
- Denis, F., Ploy, M-C., Martin, C. *et al.* (2007). *Bactériologie médicale*. Ellipses. . 2<sup>ème</sup> Edition. 573 p.
- Dho-Moulin, M. and Fairbrother, J.M. (1999) Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.*; 30: 299- 316.
- Diallo, A.A. (2013) *Escherichia coli* pathogènes et résistantes aux antibiotiques dans les effluents d'origine humaine et animale : Prévalence et caractérisation avant et après traitement épuratoire. Thèse, Université Toulouse III - Paul Sabatier.
- Djeffal, S., Bakour, S., Mamache, B., Elgroud, R., Amir Agabou, A., Chabou., S., Sana Hireche S., Bouaziz, O., Rahal, K. and Jean-Marc Rolain, J.M. (2017) Prevalence

## Références bibliographiques

---

- and clonal relationship of ESBL-producing *Salmonella* strains from humans and poultry in northeastern Algeria. *BMC Veterinary Research*; 13:132.
- Donval, J. C. (2006) Les infections à *Escherichia coli* chez les poules pondeuses. *Filières Avicoles*; 120-123.
- Dortet, L., Bonnin, R., Jousset, A., Gauthier, L. et Naas, T. (2016) Émergence de la résistance à la colistine chez les entérobactéries : une brèche dans le dernier rempart contre la pan-résistance ! *J. Anti-Infect.*, 18:139-159.
- Doyle, M.P. (2006) Antimicrobial resistance: implications for the food system. *Compr. Rev. Food Sci. Food. Saf.* ; 5:71-137.
- Drame, B. (2001) Microméthode d'identification et d'étude de la sensibilité des entérobactéries : Intérêts thérapeutiques. *Thèse Pharm.*, Dakar ; n° 86.
- Drawz, S.M., Bonomo, R.A. (2010) Three decades of  $\beta$ -Lactamase inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.*; 23:160-201.
- Drugdová, Z. and Kmet', V. (2013) Prevalence of  $\beta$ -lactam and fluoroquinolone resistance, and virulence factors in *Escherichia coli* isolated from chickens in Slovakia. *Biologia* ; volume 68, [Issue 1](#), pp 11–17.
- Egli, A., Greub, G., Suter-Riniker, F. et Schrenzel, J. (2018) Méthodes pour la détermination des résistances aux antibiotiques. *Swiss. Med. Forum.* ; 18(46):950–956.
- Elgroud, R. (2009) Contaminations du poulet de chair par les salmonelles non typhiques en élevages et abattoirs de la wilaya de Constantine : Caractérisations phénotypiques et génotypiques par ERIC-PCR, IS-PCR et PFGE. Thèse doctorat ; 148 P. Algérie ;
- Escobar-Paramo P., Grent K., Le Menac'h A., Rode L., Salgado E., Amorin C., Gouriou S., Picard B., Cérif Rahimy M., Andremont A., Denamur E. and Ruimy R. (2004). Large scale population structure of commensal *Escherichia coli* isolates. *App. Env. Microbiol* ; 70: 5698-5700.
- FAO (2005) Aviculture source de profit et plaisir; division des systèmes de soutien à l'agriculture. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. Rome, 21 pages.
- Fauchère, J.L. et Avril, J.L. (2002) Bactériologie générale et médicale. Ed Ellipses ; Paris. 368 P.
- Fendukly, F., Karlsson, I., Hanson, H.S., Kronvall, G. and Dornbusch, K. (2003) Patterns of mutations in target genes in septicemia isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* with resistance or reduced susceptibility to

## Références bibliographiques

---

- ciprofloxacin. *APMIS.* ;111:85766.doi: 10.1034/j.16000463.2003.1110904.x. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)];
- Fihman, V., Lartigue, M. F., Jacquier, H. *et al.* (2008) Appearance of *aac(6')-Ib-cr* gene among extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in a French hospital. *J. Infect.*; 56: 454–9.
- Lavilla, S., Gonzales-Lopez, J., Sabate, M., Garcia-Fernandez, A., Larrosa, M.N., Bartolome, R. M. *et al.* (2008) Prevalence of *qnr* genes among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. *J. Antimicrob. Chemother.*; 61: 291–5.
- Fischbach, M.A. and Walsh, C.T. (2009) Antibiotics for emerging pathogens. *Science*; 325 (5944): 1089-1093.
- Gariyban, L. and Avashia, N. (2013) Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J. Invest. Dermatol.*; 133(3): e6. doi:10.1038/jid.1.
- Gay, K., Robicsek, A., Strahilevitz, J., Park, C.H., Jacoby, G., Barrett, T.J., Medalla, F., Chiller, T.M. *et al.* (2006) Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*. *Clin. Infect. Dis.*; 43: 297-304.
- Geser, N., Stephan, R., and Hachler, H. (2012) Occurrence and characteristics of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC. Vet. Res.*; 8:21.
- Gharout-Sait, A., Touati, A., Benallaoua, S., Guillard, T., Brasm, T.J. and de Champs, C. (2012) CTX-M from community acquired urinary tract infections in Algeria. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 6: 5306-5313.
- Golden, N.J., Marks, H.M., Coleman, M.E., Schroeder, C.M., Bauer, N.E.Jr. & Schlosser, W.D. (2008) Review of induced molting by feed removal and contamination of eggs with *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*. *Veterinary Microbiology* ; 131: 215–228.
- Grall, N., Andremont, A. et Armand-Lefèvre, L. (2011) Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse. *Journal des Anti-infectieux*; 13 : 87-102.
- Green *et al.* (2010) A Draft Sequence of the Neandertal Genome. *Science*, Vol 328, Issue: 5979: 710-722, DOI: 10.1126/science.11880214 2402 195.
- Gross, W.G. (1994) Diseases due to *Escherichia coli* in poultry. In: GYLES C.L. (Eds), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. Cab. international: Wallingford; 237-259.

## Références bibliographiques

---

- Haeggman, S., Löfdahl, S., Paauw, A., Verhoef, J., and Brisse, S. (2004) Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 48: 2400-2408.
- Halfaoui, Z., Menoueri, N.M. and Bendali, L.M. (2017) Serogrouping and antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from broiler chicken with colibacillosis in center of Algeria. *Vet. World.*, 10(7): 830-835.
- Hall, R.M., Collis, C.M., (1995) Mobile gene cassettes and integrons: Capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol. Microbiol.*; 15: 593–600. doi:10.1111/j.1365- 2958.1995.tb02368.x
- Hammond, D.S., Schooneveldt, J.M., Nimmo, G.R., Huygens, F. and Giffard, P.M. (2005) *bla<sub>SHV</sub>* genes in *Klebsiella pneumoniae*: different allele distributions are associated with different promoters within individual isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 49: 256-263.
- Hammoudi, A. and Aggad, H. (2008) Antibioresistance of *Escherichia coli* strains isolated from chicken colibacillosis in Western Algeria. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 32: 123-126.
- Harris, P., Paterson, D. and Rogers, B. (2015) Facing the challenge of multidrug-resistant gram-negative bacilli in Australia. *M.J.A.*; 202 (5): 243–247. doi:10.5694/mja14.01257.
- Hassan, W.M., Hashim, A. and Domany, R. (2012) Plasmid mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, and *qep* in ESBL-producing *Escherichia coli* clinical isolates from Egypt. *Indian J. Med. Microbiol.*; 30: 442-7.
- Hassen, B., Abbassi, M.S., Ruiz-Ripa, L., Mama, O.M., Ibrahim, C., Benlabidi, S., Hassen, A., Torres, C. *et al.* (2021) Genetic characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae from biological industrial waste water treatment plant in Tunisia with detection of the colistin-resistance *mcr-1* gene. *FEMS Microbiol Ecol*; 97:fiaa231.
- Heather, J.M. & Chain, B. (2016) The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1-8. DOI: 10.1016/j.ygeno.2015.11.003.
- Honoré, S., Lascols, C., Malin, D., Targaouchi, R., Cattoir, V., Legrand, P., Soussy, C.J., Cambau, E. (2006) Emergence et diffusion chez les entérobactéries du nouveau mécanisme de résistance plasmidique aux quinolones *qnr* (résultats hôpital Henri-Mondor 2002-2005). *Pathol. Biol.*, 54: 270-279.

## Références bibliographiques

---

- Humphrey, T. (2006) Are happy chickens safer chickens? Poultry welfare and disease susceptibility. *Br. Poult. Sci*; 47: 379-391.
- Chardon, H. et Brugere, H. (2014) Usages des antibiotiques en élevage et filières viandes, Cahiers sécurité sanitaire santé animale, Centre d'Information des Viandes (CIV) Paris, France.
- Iabadene, H., Messai, Y., Alouache, S., Arlet, G. and Bakour, R. (2010) Mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines et aux quinolones d'*Enterobacter* dans les hôpitaux d'Alger. *Revue Tunisienne d'Infectiologie*, 4 : 24 p.
- Iabadene, H., Messai, Y., Ammari, H., Ramdani-Bouguessa, N., Lounes, S., Bakour, R. and Arlet, G. (2008) Dissemination of ESBL and *Qnr* determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria. *J. Antimicrob. Chemother.* ; 62: 133-136.
- Jacoby, G.A., and Munoz-Price, L.S. (2005) The new  $\beta$ -lactamases. *N. Engl. J. Med.*; 352: 380- 391.
- Jarlier, V., Nicolas, H., Fournier, G., and Philippon, A. (1988) Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.*; 10: 867-878.
- Johnson, J.R., and Stell, A.L. (2000) Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J. Infect. Dis.*; 181:261–272.
- Johnson, T.J. *et al.* (2008) Comparison of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* ; 74 : 7043–7050.
- Joly, B. et Reynaud, A. (2002) Entérobactéries : Systématique et méthodes de diagnostic. Ed TEC & DOC et Ed médicales Inter Nationales. Paris ; 356 P.
- Jouini, A., Vinué, L., Slama, K., B., Sáenz, Y., Klibi, N., Hammami, S., Boudabous, A. and Torres, C. (2007) Characterization of CTX-M and SHV extended-spectrum beta-lactamases and associated resistance genes in *Escherichia coli* strains of food samples in Tunisia. *J. Antimicrob. Chemother* ; 60: 1137-41.
- Kaci, A. et Boukella, M. (2007) La filière avicole en Algérie : structures, compétitivité, perspectives. Cahiers du CREAD n°8182, pages: 129-153.
- Kaltenboeck B., Wang, C. (2005). Advances in real-time PCR: application to clinical laboratory diagnostics. *Adv. Clin. Chem.*; 40:219–59.

## Références bibliographiques

---

- Kechih, B. (2010) Données du réseau de surveillance de résistance aux antibiotiques en Algérie. Available on : <http://www.sante.dz/aarn>.
- Klein, E.Y., Thomas, P., Van Boeckel, T.P., Eena, M., Martinez, E.M., Pant, S., Gandra, S., Levin, S.A., Goossens, H., Laxminarayan, R. (2018) Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. PNAS, 115(15): 3463-3470.
- Knothe, H., Shah, P., Krcmery, V., Antal, M. 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.
- Kojima, A., Ishii, Y., Ishihara, K., Esaki, H., Asai, T., Oda, C., Tamura, Y., Takahashi, T. and Yamaguchi, K. (2005) Extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: report from the Japanese veterinary antimicrobial resistance monitoring program. Antimicrob. Agents Chemother.; 49: 3533-3537.
- Kong, K.F., Schneper, L. and Mathee, K. (2010) Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. APMIS. Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand., 118:1-36.
- Köser, C.U., Holden, M.T., G., Ellington, M.J., Cartwright, E.J.P., Brown, N.M., Ogilvy-Stuart, A.L., Hsu, L.Y., Chewapreecha, C., Croucher, N.J., Harris, S.R., Sanders, M., Enright, M.C., Dougan, G., Bentley, S.D., Parkhill, J., Fraser, L.J., Betley, J.R., Schulz-Trieglaff, O.B., Smith, G.P. and Peacock, S.J. (2012) Rapid Whole-Genome Sequencing for Investigation of a Neonatal MRSA Outbreak. N. Engl. J. Med.; 366: 2267–2275.
- Meradi, L., Djahoudi, A., Abdi, A., Bouchakour, M., Perrier Gros Claude, J.D., Timinouni, M. (2011) Résistance aux quinolones de types *qnr*, *aac (6')-Ib-cr* chez les entérobactéries isolées à Annaba en Algérie. Pathologie Biologie ; 5 : e73–e78.
- Lamoril, J., Ameziane, N., Deybach, J., C., Bouizegarène, P. and Bogard, M. (2008) DNA sequencing technologies: A revolution in motion. Part one. Immuno-anal. Biol. spécial.; 23: 260-279.
- Larouche, G. (2001) Les quinolones : des années soixante à aujourd'hui, Pharm actuel ; 34: 7p.
- Le Hello, S., Hendriksen, R.S., Doublet, B., Fisher, I., Nielsen, E.M., *et al.* (2011) International spread of an epidemic population of *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 resistant to ciprofloxacin. J. Infect. Dis.; 204: 675–684.

## Références bibliographiques

---

- Ligon, B.L. (2004) Sir Howard Walter Florey-the force behind the development of penicillin. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* 15(2): 109-114.
- Livermore, D.M. (1995) "Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Antimicrob. Chemother.*; 59(2): 165-174.
- Livermore, D.M. (2003) "Bacterial Resistance: Origins, Epidemiology, and Impact," An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.*; 36(1): 11– 23.
- Livermore, D.M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G.M., Arlet, G., Poirel, L., and Woodford, N. (2007) CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J. Microbiol. Rev.*; 8(4): 557-584.
- Jamali, L., Haouzane, F., Bouchakour, M., Oufrid, S., Ghazlane, Z., El Mdaghri, N., Nadifi, S. and Timinouni, M. (2014) Prévalence des gènes de résistance plasmidique aux quinolones chez des entérobactéries communautaires isolées au Maroc. *International Journal of Innovation and Scientific Research ; ISSN 2351-8014 Vol. 11 No. 2 Nov. 2014, pp. 387-399*
- MADR (2017) Ministère de l'Agriculture et de Développement Rural, Algérie. Rapport annuel.
- MADR (Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural), (2011) Statistiques agricoles, séries A et B. Alger, Algérie.
- Majtán, V., Majtán, T., Majtán, J., Szabóová, M. & Majtánová, L. (2006) *Salmonella enterica* serovar *Kentucky*: Antimicrobial resistance and molecular analysis of clinical isolates from the Slovak Republic. *Japanese Journal of Infectious Diseases*; 59: 358–362.
- Manie, T., Khan, S., Brozel, V.S., Veith, W.J., and Gouws, P.A. (1998) Antimicrobial resistance of bacteria isolated from slaughtered and retail chickens in South Africa. *Letter Applied Microbiology*; 26: 253–258.
- Mao, J.C.H. and Putterman, M. (1968) Accumulation in Gram-positive and Gram-negative bacteria as a mechanism of resistance to erythromycin. *J. Bacteriol.*; 95:1111-1117.
- Martinez, J.L. (2009) The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc. Biol. Sci.*; 276:2521-2530.
- Martinez, J., L. and Baquero, F. (2002) Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*; 15:647–79.

## Références bibliographiques

---

- Martinez-Martinez, L., Pascual, A. and Jacoby, G.A. (1998) Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*; 351: 797-9.
- Medeiros, A.A. (1984)  $\beta$ -lactamases. *Bnt. Med. Buli*; 40: 18-27.
- Meguenni, N., Le Devendec, L., Jouy, E., Le Corvec, M., Bounar-Kechih, S., Rabah Bakour, D. and Kempf, I. (2015) First Description of an Extended-Spectrum Cephalosporin- and Fluoroquinolone- Resistant Avian Pathogenic *Escherichia coli* Clone in Algeria. *Avian. Dis.*, 59: 20-23.
- Meradi, L., Djahoudi, A., Abdi, A., Bouchakour, M., Claude, J.D. and Timinouni, M. (2011) *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* types quinolone resistance among Enterobacteriaceae isolated in Annaba, Algeria. *Pathol. Biol.*, 59:73-78.
- Merens, A. et Servonnet, A. (2010) Mécanismes et épidémiologie de la résistance aux fluoroquinolones en 2010. *Rev. Fran. Labo.*, 422 :33-41.
- Molla, B., Berhanu, A., Muckle, A., Cole, L., Wilkie, E., Kleer, J., *et al.* (2006) Multidrug resistance and distribution of *Salmonella* serovars in slaughtered pigs. *Journal of Veterinary Medicine*; 53, 28–33.
- Mullis, K.B. (1987). Process for amplifying nucleic acid sequences, United States Patent 4683202.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnol. Read. Mass.*; 24 : 17–27.
- Muylaert, A., Mainil, J.G. (2012) Résistances bactériennes aux antibiotiques : les mécanismes et leur « contagiosité ». *Ann. Méd. Vét.* ; 156:109-123.
- Naiemi, N.A., Duim, B., Savelkoul, P.H., Spanjaard, L., De Jonge, E., Bart, A., Vandebroucke-Grauls, C.M., and de Jong, M.D. 2005. Widespread transfer of resistance genes between bacterial species in an intensive care unit: implications for hospital epidemiology. *J. Clin. Microbiol.*; 43(9): 4862-4864.
- Nandi, S., Maurer, J.J., Hofacre, C. *et al.*, (2004) Gram-positive bacteria are a major reservoir of Class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*; 101: 7118-7122.
- Nayak, R., Stewart, T., Wang, R.F., Lin, J., Cerniglia, C.E. and Kenney, P.B. (2004) Genetic diversity and virulence gene determinants of antibiotic-resistant *Salmonella* isolated from preharvest turkey production sources. *Int. J. Food Microbiol* ; 91: 51–62.

## Références bibliographiques

---

- Nordmann, P. and Poirel, L. (2002) Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin. Microbiol. Infect.*; 8:321-331.
- O'Neill, O.J. (2014) Antimicrobial Resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations .[https://amr-review.org/sites/default/files/AMR\\_Review\\_Paper\\_Tackling\\_crisis\\_for\\_the\\_health\\_and\\_wealth\\_of\\_nations\\_1.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/AMR_Review_Paper_Tackling_crisis_for_the_health_and_wealth_of_nations_1.pdf).
- Okeke, I.N., Laxminarayan, R., Bhutta, Z.A., Duse, A.G., Jenkins, P., O'Brien, T.F., Pablos-Mendez, A. and Klugman, K.P. (2005) Antimicrobial resistance in developing countries. Part I: recent trends and current status. *Lancet. Infect. Dis.*; 5 : 481–493. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70189-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70189-4).
- OFAL, (2010) Observatoire des Filières Avicoles d'Algérie. Filière et marchés des produits avicoles en Algérie. Rapport, ITELV, Algérie ; 117p.
- Okorafor, O.N., Anyanwu, M.U., Nwafor, E.O., Anosa, G.N. and Udegbonam, R.I. (2019) Multidrug-resistant enterobacteria colonize commercial day-old broiler chicks in Nigeria. *Vet. World*, 12(3): 418-423.
- OMS, (2014) Standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire) 7<sup>ème</sup> Edition ; 179 P. Available on : <http://www.sante.dz/aarn/index.htm>.
- OMS, (2015) Plan d'action mondial pour combattre la résistance aux antimicrobiens. Organisation mondiale de la santé, Genève, Suisse. Consultable à l'adresse : [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/193736/1/9789241509763\\_fr.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/193736/1/9789241509763_fr.pdf?ua=1).
- OMS, (2018) *Salmonella* (infections à, non typhiques) ; [https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))
- ONAB Infos périodique d'informations bimestriel du groupe industriel ONAB, n°3, juillet août 2004 P. 2.
- Orskov, F., and I. Orskov (1992) *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can. J. Microbiol.*; 38: 699–704.
- Paauw, A., Flute, A., Verhoef, J. and Leverstein-Van Hall, M. A. (2004) Major Outbreak with Plasmid-Mediated, *qnr* Encoded, Quinolone Resistance. ICAAC, Poster C2-1898.
- Pagès, J.M., James, C.E. and Winterhalter, M. (2008) The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.*; 6:893-903.

## Références bibliographiques

---

- Paladino, J.A., Sunderlin, J.L., Singer, M.E., Adelman, M.H. and Schentag, J.J. (2008) Influence of extended-spectrum  $\beta$ -lactams on gram-negative bacterial resistance. *Am. J. Health. Syst. Pharm.*, 65:1154-1159.
- Park, C.H, Robicsek, A, Jacoby, G.A, Sahm, D. and Hooper, D.C. (2006) Prevalence in the United States of *aac(6′)-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* ; 50: 3953-3955. doi: 10.1128/AAC.00915-06.
- Paterson, D.L., and Bonomo, R.A. (2005) Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.*; 18: 657-686.
- Picard, B., Garcia, J.S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., Elion, J. and Denamur, E. (1999) The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extra-intestinal infection. *Infect. Immun.*; 67: 546–553.
- Piso, R.J., Kach, R., Pop, R. *et al.*, (2017) A cross-sectional study of colonization rates with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in four Swiss refugee centres. *PLoS. One.*; 12(1):e0170251.
- Pitout, J.D., Nordmann, P., Laupland, K.B and Poirel, L. (2005) Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum  $\beta$ - lactamases (ESBLs) in the community. *J. Antimicrob. Chemother.*; 56:52-59.
- Ploy, M.C., Gassama, A., Chainier, D., & Denis, F. (2005) Les intégrons en tant que support génétique de résistance aux antibiotiques. *Immuno-Analyse & Biologie Spécialisée* ; 20(6), 343–352. doi:10.1016/j.immbio.2005.10.001.
- PNAS ([Proceedings of the National Academy of Sciences](https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1717295115)), Revue Américaine, Publiée lundi 26 mars 2018; <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1717295115>.
- Poirel, L., Leviandier, C. and Nordmann, P. (2006) Prevalence and genetic analysis of plasmid mediated quinolone resistance determinants *Qnr A* and *Qnr S* in Enterobacteriaceae isolates from a French university hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 50: 3992–7.
- Poirel, L., Liard, A., Rodriguez-Martinez, J., M. and Nordmann, P. (2005) Vibrionaceae as a possible source of *Qnr*-like quinolone resistance determinants. *J. Antimicrob. Chemother.*; 56: 1118-21.
- Poole, K. (2005) Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.*; 56: 20-51.
- Poole, K. (2004) Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell. Mol. Life Sci.*, 61: 2200-2202.

## Références bibliographiques

---

- Périchon, B., Courvalin, P. and Galimand, M. (2007) Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by *QepA*-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 51(7): 2464-9.
- Quatorzième rapport d'évaluation (2012-2013) Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. Projet de l'Organisation Mondiale de la Santé. 216 p. disponible en : [www.sante.dz/aarn/index](http://www.sante.dz/aarn/index)
- Rahal, K., Belouni, R., and Benslimani, A. (2005) Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale. *Rec de L'OMS*. 4<sup>ème</sup> édition. Algérie. 46-52.
- Resapath (2010) Données du réseau d'épidémiologie-surveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales en France.  
Available on : <https://www.resapath.anses.fr/>
- Reygaert, W.C. (2018) An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *A.I.M.S. Microbiol.*; 4(3):482–501. doi:10.3934/microbiol.2018.3.482.
- Robicsek, A., Jacoby, G.A. and Hooper, D.C. (2006a) The worldwide emergence of plasmid mediated quinolone resistance. *Lancet. Infect. Dis*; 6: 629–40.
- Rodriguez-Martinez, J.M, Poirel, L., Pascual, A. and Nordman, P. (2006) Plasmid mediated quinolone resistance in Australia. *Microb. Drug. Resist.*; 12(2): 99–102.
- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Macielag, M., Abbanat, D., Park, C.H, *et al.* (2006b) Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common Aminoglycoside acetyltransferase. *Nat.Med.* ; 12: 83–8. doi: 10.1038/nm1347.
- Robicsek, A., Sahm, D., Jacoby, G. and Hooper, D. (2005) Broader distribution of plasmid mediated quinolone resistance in the United State, 49: 3001-3003.
- Rodriguez-Villalobos, H., and Struelens, M.J. (2006) Résistance bactérienne par  $\beta$ -lactamases à spectre étendu: implications pour le réanimateur. *Rev. Réanimation*; 15 (3): 205–213.
- Rodríguez-Martínez, J.M., Velasco, C., García, I., Cano, M.E., Martínez-Martínez, L. and Pascual, A. (2007) Mutant prevention concentrations of fluoroquinolones for Enterobacteriaceae expressing the plasmid-carried quinolone resistance determinant *qnrA1*. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 51(6): 2236-9.
- Rossolini, G.M., D'Andrea, M.M. and Mugnaioli, C. (2008) The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Infect.*, 1: 33-41.
- Rubin, M.A. and Samore M. H. (2002) Antimicrobial Use and Resistance. *Curr. Infect. Dis. Rep.*; 4: 491-497.

## Références bibliographiques

---

- Saberfar, E., Pourakbari, B., Chabokdavan, K. and Taj Dolatshani, F. (2008) Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from Iranian broiler chicken, 2005-2006. *J. Appl. Poultry Res.*; 17: 302-304.
- Sadikalay, S. (2018). Influence des rejets humains et animaux sur la diffusion de l'antibiorésistance à l'homme, aux animaux et à l'environnement, en Guadeloupe. Thèse doctorat (202 pages), Université des Antilles, France.
- Sanders, P., Bousquet-Melou, A., Chauvin, C. et Toutain, P.L. (2011) Utilisation des antibiotiques en élevage et enjeux de santé publique. *INRA Prod. Anim.*, 24, 199-204.
- Sanger F., Air G.M., Barrell B.G., Brown N.L., Coulson A.R., Fiddes C.A. and Hutchison C.A. (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*; 265: 687-695.
- Schmieder, R. and Edwards, R. (2012) Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. *Future Microbiol. England*; 7(1):73-89.
- Schwaber, M.J, and Carmeli, Y. (2007) Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *J. Antimicrob. Chemother.*; 60: 913-920.
- Shivaprassad, H. L. (2003) Pullorum disease and fowl typhoid. In: *Diseases of poultry*. 11<sup>th</sup> ed. eds. Saif, Y. M. et col. Iowa state press. USA.: 567-582.
- Singh ,S.B. and Barrett, J.F. (2006) Empirical antibacterial drug discovery – foundation in natural products. *Biochem. Pharmacol.*; 71: 1006-1015.
- Siguier, P., Filée, J. and Chandler, M., (2006) Insertion sequences in prokaryotic genomes. *Curr.Opin. Microbiol.*; 9: 526-531. doi:10.1016/j.mib.2006.08.005
- Sommer, M.O.A., Dantas, G. and Church, G.M. (2009) Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science.* ; 325:1128-1131.
- Soussy, C.J. (2006) Quinolones et bactéries à GRAM négatif. In. Courvalin, P., Leclerk, R., Bingen, E. *Antibiogramme*. Paris. ESKA: 2<sup>ème</sup> édition. Chapitre 21. P: 261-277.
- Stordeur, P. et Mainil, J. (2002) La colibacillose aviaire. *Ann. Méd. Vét.*; 146: 11-18.
- Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., Robicsek, A. (2009) Plasmid-mediated quinolone resistance: A multifaceted threat. *Clin. Microbiol. Rev.*, 22: 664-689.

## Références bibliographiques

---

- Szarecka, A., Lesnock, K. R., Ramirez-M, C. A., Nicholas, H. B. and Wymore, T. (2011) The Class D  $\beta$ -lactamase family: residues governing the maintenance and diversity of function protein engineering. *Design & Selection*; vol. 24 no. 10 pp. 801–809.
- Talarmin, A. (2016) Résistance aux antibiotiques des entérobactéries en Guadeloupe : importance en milieu communautaire et diffusion environnementale. *Microbiologie. Université des Antilles (Thèse)*.
- Tenover, F.C. and McGowan, J.E. (1996) Reasons for the Emergence of Antibiotic Resistance, *The American Journal of the Medical Sciences*; Volume 311: 9-16.
- Thomson, K. S. and Moland, E. S. (2000) The new  $\beta$ -lactamases of Gram negative bacteria at the dawn of the new millennium. *Microbes Infect.*; 2: 1225–1235.
- Touati, A., Brasme, L., Benallaoua, S., Gharout, A., Madoux, J. and De, C.C. (2008) First report of *qnrB*-producing *Enterobacter cloacae* and *qnrA*-producing *Acinetobacter baumannii* recovered from Algerian hospitals. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 60: 287-290.
- Tran, J.H., Jacoby, G.A. and Hooper, D.C. (2005) Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 49: 118-25.
- Uhel, F. et Zafrani, L. (2019) Commission de la recherche translationnelle de la Société de réanimation de langue française. Nouvelles techniques de biologie moléculaire. *Méd. Intensive Réa*. DOI: 10.3166/réa-0119.
- Unemo, M. and Nicholas, R.A. (2012) Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhoea. *Future Microbiol. England*; 7(12): 1401–22.
- Valancony, H., Fournier, G., Drouin, P., Toux, J.Y. and Colin, P. (2001) Disinfection of cage layer houses contaminated with *Salmonella Enteritidis*. *British Poultry Science*; 42: 539-40.
- Valverde A, Coque T.M, Sánchez-Moreno, M.P, Rollán, A., Baquero, F. and Canto'n, R. (2004) Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae during nonoutbreak situations in Spain. *J. Clin. Microbiol.*; 42: 4769-4775.
- Van Bambeke, F., Michot, J.M., Van Eldere, J. and Tulkens, P.M. (2005) Quinolones in 2005: an update. *Clin. Microbiol. Infect.*; 11: 256-280.
- Van Bambeke, F., Mingeot-Leclercq, M.P., Glupczynski, Y. and Tulkens, P.M. (2017) Mechanisms of action, p. 1162-1180.e1. In *Infectious Diseases*. Elsevier.

## Références bibliographiques

---

- Van Boeckel, T.P., Gandra, S., Ashok, A., Caudron, Q., Grenfell, B.T., Levin, S.A. and Laxminarayan, R. (2014) Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet. Infect. Dis.*; 14: 742–750. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70780-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70780-7).
- Van de Giessen, A.W., Bouwknegt, M., Dam-Deisz, W.D.C., Van Pelt, W., Wannet, W.J. B. and Visser, G. (2006) Surveillance of *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in poultry production flocks in The Netherlands. *Epidemiol. Infect.*; 134: 1266-1275.
- Van Immerseel, F., De Buck, J., Pasmans F., Bohez, L., Boyen F., Haesebrouck, F. and Ducatelle, R. (2004) Intermittent long-term shedding and induction of carrier birds after infection of chickens early posthatch with a low or high dose of *Salmonella enteritidis*. *Poult. Sci.*; 83: 1911-1916.
- Vetting, M.W, Park, C.H, Hegde ,S.S., Jacoby, G.A, Hooper, D.C. and Blanchard, J.S. (2008) Mechanistic and structural analysis of aminoglycoside N-acetyltransferase *aa(6')-Ib* and its bifunctional, fluoroquinolone-active *aac(6')-Ib-cr* variant. *Biochemistry.* ; 47: 9825–35.
- Villate, D. (1997) Manuel pratique : Maladies des volailles, Editions France Agricole ; 235-240 ; 242-257.
- Von Wintersdorff, C.J.H., Penders, J., Van Niekerk, J.M., Mills, N.D., Majumder, S., Van Alphen, L.B. *et al.* (2016) Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front Microbiol. Switzerland*; 7:173.
- Walsh, C. (2003) Antibiotics actions, origins, resistance. American Society for Microbiology press, Washington, D.C.
- Walsh, T. R. (2006) Combinatorial genetic evolution of multiresistance. *Curr. Opin. Microbiol.*; 9: 476-482.
- Wax, R.G, Lewis, K., Salyers, A. & Taber, H. (2008) Bacterial resistance to antimicrobials, 2<sup>nd</sup> edition. CRC press, Floride, USA.
- Weill, F.X, Demartin, M., Tandé, D., Espie, E., Rakotoarivony, I. and Grimont, P.D. (2004) Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase (SHV-12 like)-producing strains of *Salmonella enterica* serotypes *Babelsberg* and *Enteritidis* isolated in France among infants adopted from Mali. *Clin. Microb.*; 42: 2432-7.
- Weill, F.X., Guesnier, F., Guibert, V., Timinouni, M., Demartin, M., Polomack, L., and Grimont, P.A. (2006) Multidrug resistance in *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* from humans in France (1993 to 2003). *J. Clin. Microbiol.*; 44:700-708.

## Références bibliographiques

---

- Westermeier, R. (1997) *Electrophoresis in Practice: a Guide to Methods and applications of DNA and Protein Separation*, VCH, Weinheim.
- WHO (World Health Organization) (2017) Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. 1-7.
- WHO, (2014) Public Health Importance of Antimicrobial Resistance. World Health Organization., [https://www.who.int /drugresistance/AMR\\_Importance/en/](https://www.who.int /drugresistance/AMR_Importance/en/).
- Woodford N, Fagan E.J. and Ellington, M.J. (2005) Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.*; 57: 154-5.
- Yala, D., Merad, A.S., Mohamedi, D et Ouar Korich, M.N. (2001) Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb* n°91.
- Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S., Kimura, K., Shibata, N., Kato, H., *et al.* (2007) New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, *QepA*, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* ; 51: 3354–60. doi: 10.1128/AAC.00339-07.
- Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S. and Arakawa, Y. (2008) Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 52:1564-6.
- Yao D., Yu, F., Qin, Z., Chen, C., He, S., Chen, Z., Zhang, X. and Wang, L. (2010). Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolates causing skin and soft tissue infections (SSTIs). *BMC Infect. Dis.*; 10:133. Doi: 10.1186/1471-2334-10-133.
- Yousfi, M., Mairi, A., Touati, A., Hassissene, L., Brasme, L., Guillard, T. and De Champs, C. (2016) Extended spectrum  $\beta$ -lactamase and plasmid mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* fecal isolates from healthy companion animals in Algeria. *J. Infect. Chemother.*; 22: 431-435.
- Yulistiani,R., Praseptianga, D., Sudibya, S., Raharjo, D. and Shirakawa, T. (2017) Prevalence of Antibiotic-resistance Enterobacteriaceae strains Isolated from Chicken Meat at Traditional Markets in Surabaya, Indonesia. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering* 193: 012007.
- Zogheib, E. et Dupont, H. (2005) *Entérobactéries multirésistantes*. Elsevier SAS. Conférences d'actualisation; 153-165.

# **ANNEXES**

# Annexes

---

## Annexes

### Annexe N° 01 : Composition des milieux utilisés

#### 1. Milieu de pré-enrichissement :

##### L'eau peptonée tamponnée :

Composition :

-Peptone	10 g
-Chlorure de sodium(NaCl)	5 g
-Hydrogénophosphate disodique dodécahydraté (Na HPO-12HO)	9 g
(ou hydrogénophosphate disodique anhydre (Na HPO)	3,5g
-Dihydrogénophosphate de potassium (KHPO)	1,5 g
- Eau distillée	1000 ml

#### 2. Milieu d'enrichissement :

##### SFB : Bouillon sélénite de cystine :

-Tryptone	5 g
-Lactose	4 g
-Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12H <sub>2</sub> O	10 g
-L-cystine	10 mg
-Bisélénite de sodium	4 g
-Eau distillée	1000 ml

pH (25°C) final = 7,0 ± 0,1

#### 3. Milieux d'isolements :

##### A-Gélose Hecktoen :

Composition :

-Peptone	12 g
-Extrait de levure	3 g
-Sels biliaires	9 g
-Lactose	12 g
-Saccharose	12 g
-Salicine	2 g
-Chlorure de sodium(NaCl)	5 g
-Thiosulfate de sodium	5 g
-Citrate ferrique ammoniacal	1,5 g
-Bleu de bromothyl	65 mg

## Annexes

---

-Fuschine acide 40 mg à	100 mg
-Agar	13,5 g
- Eau distillée	1000 ml

### **B-Gélose nutritive :**

Composition :

-Peptone	15 g
-Extrait de viande	1 g
-NaCl	5 g
-Agar	15 g
-Eau distillée	1000 ml
-PH 7	

### **C-Gélose Mac Conkey :**

Composition :

-Gelysate	17 g
-Polypeptone	3 g
-Lactose	10 g
-Sels biliaires	5 g
-Chlorure de sodium	5 g
-Gélose	12,5 g
-Rouge neutre	0,04 g
-PH 7,4	

### **4. Milieu pour l'antibiogramme :**

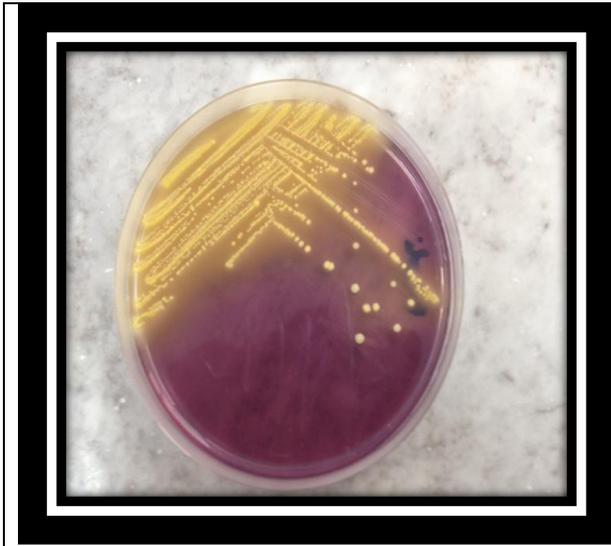
#### **Mueller Hinton :**

Composition :

-Extrait de viande	3 g
-Hydrlysate acide de caseine	17,5 g
-Amidon	1,5 g
-Agar	16 g
-Eau distillée	1000ml

## Annexes

### Annexe N° 02 : Caractères culturaux d'*E. coli*

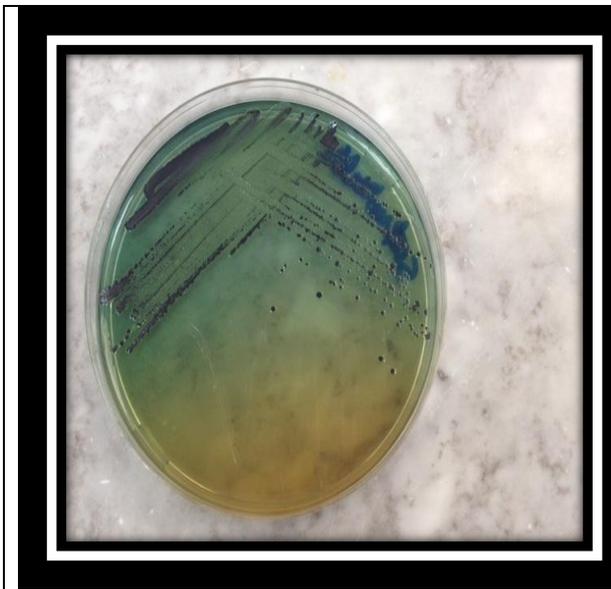


Les colonies d'*E. coli* sur milieu BCP sont jaunes lisse à bords réguliers



Les colonies d'*E. coli* sur milieu Mac-conkey sont lactose +, roses, rondes à aspect lisse

### Annexe N° 03 : Caractères culturaux de *Salmonella* spp.



Les colonies de *Salmonella* spp. sur milieu Hektoen (HK) sont apparus rondes, lisses (Smooth : S) à bords réguliers et un diamètre de 2 à 3 mm, vertes à nuances bleuâtres et à centres noirs



Les colonies de *Salmonella* spp. sur milieu Mac-conkey sont apparus lisses, à bord réguliers et de couleur crème

## Annexes

**Annexe N° 04 :** L'aspect des entérobactéries après coloration de Gram (-)

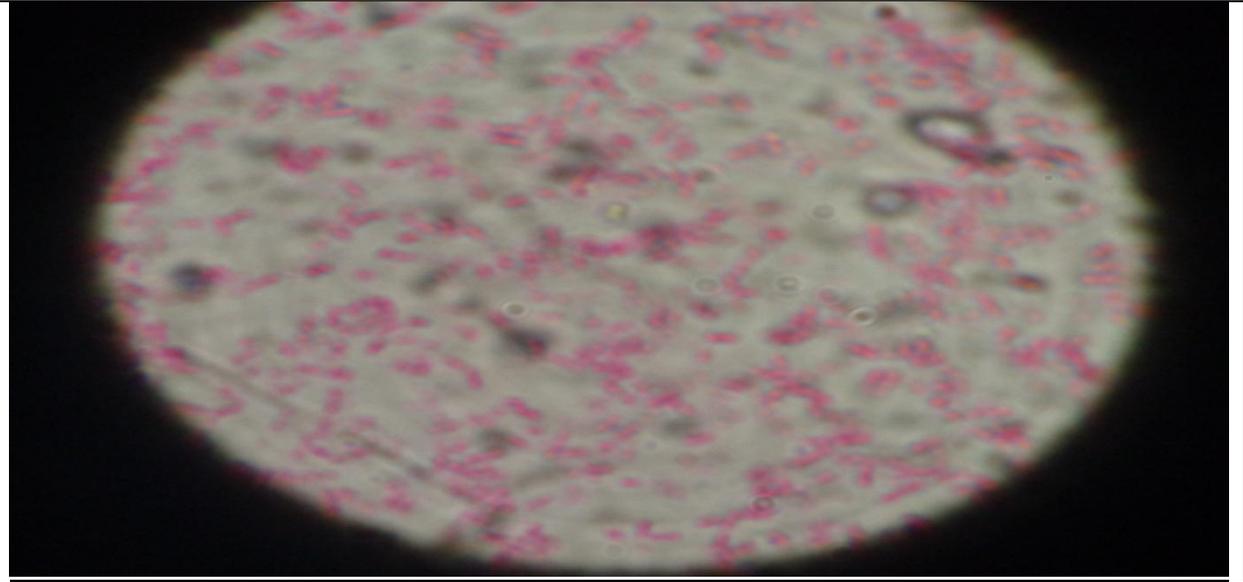


Image de visualisation microscopique des entérobactéries à Gram (-)

**Annexe N° 05 :** Test d'oxydase



Test d'oxydase négatif (aucun virage au couleur).



Test d'oxydase positif (virage de couleur vers le violet).

# Annexes

**Annexe N° 06 :** Profils biochimique d'*E. coli* et de *Salmonella* spp. sur galerie API 20E



Profils biochimique d'*E. coli* sur galerie API 20E



Profils biochimique de *Salmonella* spp. sur galerie API 20 E

# Annexes

---

## Annexe N°07 : Table de lecture de galerie API20E

TABLEAU D'IDENTIFICATION / IDENTIFICATION TABLE / PROZENTTABELLE / TABLA DE IDENTIFICACION / TABELLA DI IDENTIFICAZIONE / QUADRO DE IDENTIFICAÇÃO

ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ / IDENTIFIKATIONSTABEL / IDENTIFIERINGSTABELL / TABELA IDENTYFIKACYJNA

% de réactions positives après 18-24 / 48 h à 36°C ± 2°C / % of positive reactions after 18-24 / 48 hrs. at 36°C ± 2°C / % der positiven Reaktionen nach 18-24 / 48 h bei 36°C ± 2°C /

% de las reacciones positivas después de 18-24 / 48 H a 36°C ± 2°C / % di reazioni positive dopo 18-24 / 48 ore a 36°C ± 2°C / % de reacções positivas após 18-24 / 48 h a 36° C ± 2° C /

% θετικών αντιδράσεων μετά από 18-24 / 48 ώρες στους 36°C ± 2°C / % positiva reaktioner efter 18-24 / 48 timmar vid 36°C ± 2°C / % af positive reaktioner efter 18-24 / 48 timer ved 36°C ± 2°C /

# Annexes

API 20 E	V4.1	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
<i>Buttiauxella agrestis</i>		100	0	0	85	25	0	0	0	0	0	0	100	100	0	1	99	0	92	99	100	0
<i>Cedecea davisae</i>		99	89	0	99	75	0	0	0	0	89	0	100	100	10	0	0	100	0	100	1	0
<i>Cedecea lapagei</i>		99	99	0	0	75	0	0	0	0	90	0	100	99	0	0	0	0	1	100	1	0
<i>Citrobacter braakii</i>		50	45	0	99	75	81	1	0	4	0	0	100	100	1	100	100	1	91	99	99	0
<i>Citrobacter freundii</i>		90	24	0	0	75	75	1	0	1	0	0	100	99	25	99	99	99	82	40	99	0
<i>Citrobacter koseri/amalonicus</i>		99	75	0	100	97	0	1	0	99	0	0	100	100	25	99	99	1	1	98	99	0
<i>Citrobacter koseri/fameri</i>		99	2	0	100	25	0	1	0	99	0	0	100	100	1	99	99	99	80	99	99	0
<i>Citrobacter youngae</i>		100	50	0	1	80	80	0	0	1	0	0	100	100	0	95	100	1	0	25	100	0
<i>Edwardsiella hoshinae</i>		0	0	100	99	50	94	0	0	99	0	0	100	100	0	0	1	100	0	0	1	0
<i>Edwardsiella tarda</i>		0	0	100	99	1	75	0	0	99	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>		99	0	99	98	82	0	1	0	0	85	0	99	99	99	99	99	99	99	99	99	0
<i>Enterobacter amnigenus 1</i>		99	25	0	99	40	0	0	0	0	75	0	100	100	0	1	100	99	99	99	99	0
<i>Enterobacter amnigenus 2</i>		99	80	0	99	80	0	0	0	0	75	0	100	100	0	99	100	1	99	99	99	0
<i>Enterobacter asburiae</i>		100	25	0	99	80	0	0	0	0	10	0	100	99	25	100	0	99	0	100	100	0
<i>Enterobacter cancerogenus</i>		100	75	0	99	99	0	0	0	0	89	0	100	100	0	1	100	1	1	100	100	0
<i>Enterobacter cloacae</i>		98	82	1	92	90	0	1	0	0	85	0	99	99	12	90	85	96	90	99	99	0
<i>Enterobacter gergoviae</i>		99	0	32	100	75	0	99	0	0	90	0	100	99	23	1	100	99	100	99	100	0
<i>Enterobacter intermedius</i>		99	0	0	99	1	0	0	0	0	2	0	100	97	0	88	99	40	100	99	99	0
<i>Enterobacter sakazakii</i>		100	96	0	91	94	0	1	0	25	91	10	100	100	75	8	99	99	99	99	99	0
<i>Escherichia coli 1</i>		90	1	74	70	0	1	3	0	89	0	0	99	98	1	91	82	36	75	3	99	0
<i>Escherichia coli 2</i>		26	1	45	20	0	1	1	0	50	0	0	99	90	1	42	30	3	3	1	70	0
<i>Escherichia fergusonii</i>		96	1	99	100	1	0	0	0	99	0	0	100	99	1	0	87	0	1	99	99	0
<i>Escherichia hermannii</i>		100	0	1	100	1	0	0	0	99	0	0	100	100	0	0	99	25	0	99	99	0
<i>Escherichia vulneris</i>		100	30	50	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	1	95	7	95	95	99	0
<i>Ewingella americana</i>		98	0	0	0	75	0	0	0	0	95	1	99	99	0	0	1	0	1	50	1	0
<i>Hafnia alvei 1</i>		75	0	99	98	50	0	10	0	0	50	0	99	99	0	1	99	0	0	25	99	0
<i>Hafnia alvei 2</i>		50	0	99	99	1	0	1	0	0	10	0	99	98	0	1	1	1	0	0	1	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>		99	0	80	0	89	0	78	0	99	80	0	100	100	99	100	99	99	100	100	100	0
<i>Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae</i>		94	18	25	1	18	0	1	0	0	1	0	99	96	57	66	58	20	80	97	85	0
<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>		99	0	73	0	86	0	75	0	0	90	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	0
<i>Klebsiella pneumoniae ssp rhinoscleromatis</i>		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	100	90	90	75	75	1	99	10	0
<i>Kluyvera spp</i>		95	0	25	99	60	0	0	0	80	0	0	100	99	0	25	93	89	99	99	99	0
<i>Leclercia adecarboxylata</i>		99	0	0	0	0	0	1	0	99	0	1	100	99	0	2	100	66	99	99	100	0
<i>Moellerella wisconsensis</i>		97	0	0	0	40	0	0	0	15	1	0	100	1	0	0	0	100	99	0	0	0
<i>Morganella morganii</i>		1	0	10	98	1	1	99	93	99	0	0	99	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Pantoea spp 1</i>		85	1	0	0	13	0	1	0	1	9	1	100	99	1	26	1	98	26	59	61	0
<i>Pantoea spp 2</i>		99	1	0	0	99	0	1	0	53	62	4	100	99	36	82	90	98	81	99	99	0
<i>Pantoea spp 3</i>		99	1	0	0	21	0	1	0	1	86	15	100	99	34	1	97	93	23	65	97	0
<i>Pantoea spp 4</i>		86	1	0	0	29	0	1	0	59	1	1	99	100	10	32	99	72	89	99	99	0
<i>Proteus mirabilis</i>		1	0	0	99	50	75	99	98	1	1	82	98	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Proteus penneri</i>		1	0	0	0	1	20	100	99	0	0	50	99	0	0	0	0	100	0	1	0	0
<i>Proteus vulgaris group</i>		1	0	0	0	12	83	99	99	92	0	74	99	1	1	0	1	89	0	66	1	0
<i>Providencia alcalifaciens/rustigianii</i>		0	0	0	0	80	0	0	100	99	0	0	99	1	1	0	0	1	0	0	1	0
<i>Providencia rettgeri</i>		1	1	0	0	74	0	99	99	90	0	0	98	82	78	1	50	25	0	40	1	0
<i>Providencia stuartii</i>		1	0	0	0	85	0	30	98	95	0	0	98	3	80	0	0	15	0	0	0	0
<i>Rahnella aquatilis</i>		100	0	0	0	50	0	0	1	0	99	0	100	100	0	98	99	100	97	100	98	0
<i>Raoultella ornithinolytica</i>		100	0	99	99	99	0	85	0	100	65	0	100	100	99	100	100	100	100	100	100	0
<i>Raoultella terrigena</i>		100	0	99	6	52	0	0	0	0	75	0	99	99	99	99	99	100	100	100	99	0
<i>Salmonella choleraesuis ssp arizonae</i>		98	75	97	98	75	99	0	0	1	0	0	100	99	0	99	99	1	78	0	99	0
<i>Salmonella choleraesuis ssp choleraesuis</i>		0	15	99	99	6	64	0	0	0	0	0	100	0	0	98	99	0	20	0	0	0

# Annexes

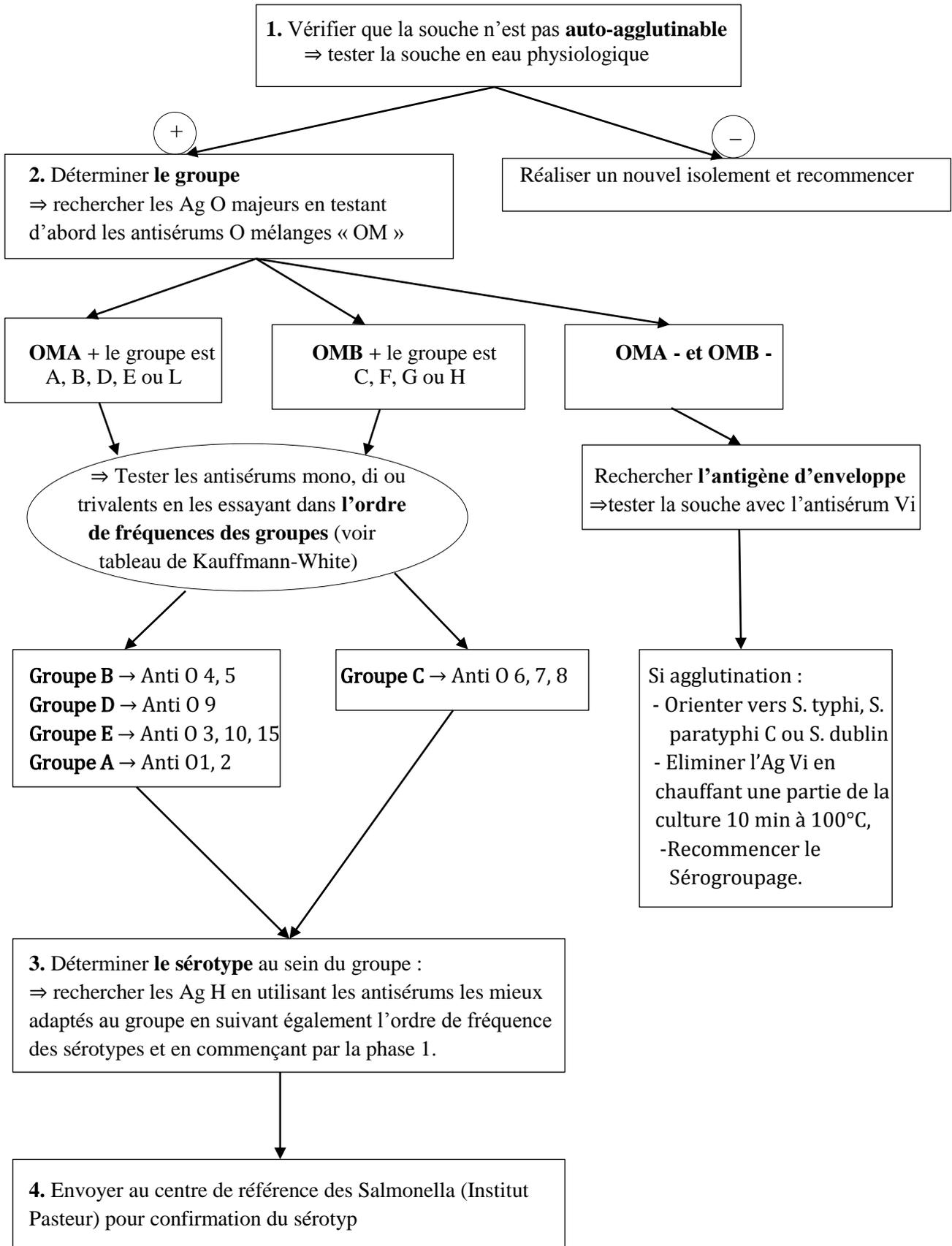
<i>Salmonella ser.Gallinarum</i>	0	1	100	1	0	25	0	0	0	0	0	100	99	0	0	1	0	0	0	100	0
----------------------------------	---	---	-----	---	---	----	---	---	---	---	---	-----	----	---	---	---	---	---	---	-----	---

API 20 E V4.1	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
<i>Salmonella ser.Paratyphi A</i>	0	5	0	99	0	1	0	0	0	0	0	100	99	0	99	98	0	96	0	99	0
<i>Salmonella ser.Pullorum</i>	0	1	75	100	0	85	0	0	0	0	0	100	100	0	0	100	0	0	0	75	0
<i>Salmonella typhi</i>	0	1	0	0	0	8	0	0	0	0	0	100	99	0	99	0	0	99	0	0	0
<i>Salmonella spp</i>	1	56	82	65	0	0	0	1	0	1	99	100	40	99	86	1	90	1	99	1	1
<i>Serratia ficaria</i>	99	0	0	0	100	0	0	0	0	40	90	100	100	50	99	74	99	99	100	99	0
<i>Serratia fonticola</i>	99	0	73	99	75	0	0	0	0	0	0	100	100	97	100	99	30	99	99	99	0
<i>Serratia liquefaciens</i>	95	1	98	98	80	0	2	0	0	59	65	100	99	80	98	2	99	72	97	97	0
<i>Serratia marcescens</i>	94	0	95	95	96	0	25	0	1	70	87	100	99	85	98	1	99	68	97	25	0
<i>Serratia odorifera 1</i>	95	0	95	99	95	0	0	0	99	50	99	100	99	99	99	99	99	99	99	99	0
<i>Serratia odorifera 2</i>	95	0	96	1	95	0	0	0	99	50	99	100	99	99	99	99	1	99	99	95	0
<i>Serratia plymuthica</i>	99	0	0	0	65	0	0	0	0	65	50	100	90	70	70	1	99	85	98	98	0
<i>Serratia rubidaea</i>	99	0	30	0	92	0	1	0	0	71	82	99	99	75	1	3	99	95	99	99	0
<i>Shigella spp</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	29	0	0	99	63	0	7	7	1	20	0	50	0
<i>Shigella sonnei</i>	96	0	0	93	0	0	0	0	0	0	0	99	99	0	1	75	1	1	0	99	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	80	0	0	90	0	0	98	0	50	5	0	99	99	25	98	1	99	4	75	75	0
<i>Yersinia frederiksenii/intermedia</i>	99	0	0	75	1	0	99	0	99	1	0	100	99	25	99	99	99	1	99	99	0
<i>Yersinia kristensenii</i>	80	0	0	80	0	0	99	0	97	0	0	100	99	10	99	0	0	0	99	99	0
<i>Yersinia pestis</i>	68	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	99	99	0	70	0	0	0	30	30	0
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	98	0	0	0	1	0	99	0	0	0	0	99	97	0	0	75	0	50	25	50	0
<i>Aeromonas hydrophila gr. 1</i>	98	90	25	1	25	0	0	0	85	25	90	99	99	1	3	5	97	1	75	75	100
<i>Aeromonas hydrophila gr. 2</i>	99	97	80	1	80	0	0	0	85	80	97	97	99	9	9	1	80	1	75	5	100
<i>Aeromonas salmonicida ssp salmonicida</i>	1	60	1	0	0	0	0	0	1	0	75	50	54	0	0	0	0	0	1	0	100
<i>Grimontia hollisae</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	94	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	100
<i>Photobacterium damsela</i>	1	99	75	0	1	0	98	0	0	10	1	50	0	0	0	0	1	0	0	0	100
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	95	99	100	100	0	0	0	0	100	0	0	99	0	99	0	0	0	0	0	0	100
<i>Vibrio alginolyticus</i>	0	0	98	75	60	0	1	0	100	10	75	99	100	0	1	0	100	0	10	1	100
<i>Vibrio cholerae</i>	1	1	97	75	0	0	0	0	99	58	92	98	98	0	0	0	94	0	5	0	100
<i>Vibrio fluvialis</i>	95	99	0	0	1	0	0	0	80	0	75	75	80	0	1	0	75	0	36	75	100
<i>Vibrio mimicus</i>	99	0	99	99	50	0	0	0	99	1	99	99	99	0	0	0	0	0	0	0	100
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0	0	100	99	50	0	1	0	100	1	75	100	99	0	0	1	1	0	12	50	100
<i>Vibrio vulnificus</i>	99	0	91	90	25	0	0	0	99	1	99	99	75	0	0	0	1	0	90	0	99
<i>Pasteurella aerogenes</i>	99	0	0	80	0	0	99	0	0	0	0	99	0	97	0	1	99	0	0	75	75
<i>Pasteurella multocida 1</i>	4	0	0	25	0	0	0	0	99	0	0	29	1	0	1	0	75	0	0	0	99
<i>Pasteurella multocida 2</i>	7	0	0	45	0	0	0	0	99	0	0	44	99	0	99	0	99	0	0	0	89
<i>Pasteurella pneumotropica/ Mannheimia haemolytica</i>	60	0	1	10	0	0	25	0	15	7	3	35	12	12	12	1	35	1	2	1	80
<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	0	0	0	0	51	0	1	0	0	5	5	99	0	0	0	0	0	99	1	99	0
<i>Bordetella/Alcaligenes/Moraxella spp *</i>	0	0	0	0	52	0	14	1	0	25	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	95
<i>Burkholderia cepacia</i>	50	0	25	16	78	0	0	0	0	1	43	60	1	0	0	0	13	0	7	20	90
<i>Chromobacterium violaceum</i>	0	99	0	0	75	0	0	0	14	0	99	99	0	0	0	0	10	0	0	0	99
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	5	0	0	0	12	0	90	0	75	0	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	77	0	0	0	20	0	1	0	85	0	90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99
<i>Eikenella corrodens</i>	0	0	75	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
<i>Myroides /Chryseobacterium indologenes</i>	0	0	0	0	50	0	75	0	0	1	75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	15	0	0	0	30	0	25	1	0	15	0	1	0	0	0	0	0	0	0	10	90
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	89	0	0	92	0	25	0	0	1	75	50	0	0	0	0	1	10	1	25	97
<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	0	75	0	0	75	0	0	0	0	10	27	25	0	0	0	0	0	25	1	20	99
<i>Pseudomonas luteola</i>	86	75	0	0	94	0	0	0	0	25	13	84	0	1	0	1	1	15	1	85	0
<i>Pseudomonas oryzae/habitans</i>	0	0	0	0	89	0	0	0	0	25	1	10	0	1	0	1	0	10	0	45	0



# Annexes

**Annexe N°08 :** Conduite du sérotypage des *Salmonelles* (David Schneider, 2008).



## Annexes

**EXTRAIT DU TABLEAU DE KAUFFMANN-WHITE :**  
FORMULES ANTIGENIQUES DES SEROTYPES DE *SALMONELLA* LES PLUS FREQUENTS EN  
FRANCE

Mélange O	Groupe (fréquence en France)	Nom usuel	Antigènes O	Antigènes H	
				Phase 1	Phase 2
OMA	B (54,3 %)	<i>Paratyphi B</i>	<u>1</u> , 4, [5], 12	b	1, 2
		<i>Wien</i>	<u>1</u> ,4, 12, <u>27</u>	b	1, w
		<i>Stanley</i>	<u>1</u> ,4, [5], 12, <u>27</u>	d	1, 2
		<i>Duisburg</i>	<u>1</u> ,4, 12, <u>27</u>	d	e, n, z15
		<i>Saintpaul</i>	<u>1</u> ,4, [5], 12, <u>27</u>	e, h	1, 2
		<i>Reading</i>	<u>1</u> ,4, [5], 12	e, h	1, 5
		<i>Chester</i>	<u>1</u> ,4, [5], 12	e, h	e, n, x
		<i>Derby</i>	<u>1</u> ,4, [5], 12	f, g	[1, 2]
		<i>Agona</i>	<u>1</u> ,4, 12	f, g, s	-
		<i>Typhimurium</i>	<u>1</u> ,4, [5], 12	i	1, 2
		<i>Brandenburg</i>	<u>1</u> ,4, [5], 12	i, v	e, n, z15
		<i>Heidelberg</i>	1,4, 12	r	1, 2
		<i>Coeln</i>	4, [5], 12	y	1, 2
		<i>Essen</i>	4, 12	g, m	-
				<i>Abortusovis</i>	c
OMB	C (17,5 %) C1	<i>Paratyphi C</i>	6, 7 [Vi]	c	1, 5
		<i>Choleraesuis</i>	6, 7	c	1, 5
		<i>Isangi</i>	6, 7	d	1, 5
		<i>Livingstone</i>	6, 7	d	1, w
		<i>Eimsbuttel</i>	6, 7, <u>14</u>	d	1, w
		<i>Montevideo</i>	6, 7	g, m, s	-
		<i>Oranienburg</i>	6, 7	m, t	-
		<i>Thompson</i>	6, 7	k	1, 5
		<i>Infantis</i>	6, 7	r	1, 5
	C2	<i>Muenchen</i>	6, 8	d	1, 2
		<i>Manhattan</i>	6, 8	d	1, 5
		<i>Newport</i>	6, 8	e, h	1, 2
		<i>Blockley</i>	6, 8	k	1, 5
		<i>Lichtfild</i>	6, 8	l, v	1, 2
<i>Bovismorbificans</i>	6, 8	r	1, 5		
OMA	D (17,3%)	<i>Typhi</i>	9, 12 [Vi]	d	-
		<i>Enteritidis</i>	1, 9, 12	g, m	-
		<i>Dublin</i>	1, 9, 12	g, p	-
		<i>Gallinarum</i> (volailles)	<u>1</u> , 9, 12	-	-
		<i>Panama</i>	1, 9, 12	l, v	1, 5
		<i>Strasbourg</i>	[9], 46	d	1, 7
OMA	E (7%) E1	<i>Muenster</i>	3, 10	e, h	1, 5
		<i>Anatum</i>	3, 10	e, h	1, 6
		<i>Meleagridis</i>	3, 10	e, h	1, w
		<i>London</i>	3, 10	l, v	1, 6
		<i>Give</i>	3, 10, [15]	l, v	1, 7
	E4	<i>Senftenberg</i>	1, 3, 19	g, [s], t	-
OMB	G (2%)	<i>Kedougou</i>	<u>1</u> , 13, 23	i	1, w
		<i>Worthington</i>	<u>1</u> , 13, 23	z	1, 5
OMA	A (0,26 %)	<i>Paratyphi A</i> (Afrique, Asie)	<u>1</u> , 2, 12	a	-

## Annexes

- Facteurs entre crochets : peuvent être absents sans que le sérotype soit changé.
- Facteurs O soulignés : liés à la conversion phagique (lysogénique).

**Annexe N° 09 :** Tableau de liste des antibiotiques à testés pour les entérobactéries dans le domaine vétérinaire (OMS, 2014).

Famille	Antibiotique	Charge (µg)
Béta-lactamines	Ampicilline	10
	Amoxicilline +acide clavulanique *	(20/10)
	céfalotine	10
	Ceftiofur* / Céfotaxime	30
Tétracyclines	Tétracycline	30
Quinolones	Fluméquine / Acide nalidixique	30
	Enrofloxacin	5
	Marbofloxacin	5
	Norfloxacin	10
	Danofloxacin	5
Aminosides	Néomycine / kanamycine	30
	Gentamycine**	10
Polypeptides	Colistine	10
Sulfamides	Sulfisoxazole	30
	Triméthoprim +Sulfaméthoxazole	1,25/ 23,75
Furanes	Nitrofurantoin**	300
Phénicolés	Chloramphénicol**	30

\* Antibiotique testé seulement pour la recherche des béta-lactamases

\*\* Antibiotique testé uniquement dans le cadre de l'épidémiologie-surveillance

## Annexes

**Annexe N° 10 :** Tableau de lecture des valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibitions pour entérobactéries (Espèce aviaire) (OMS, 2014).

**Conditions du test :**

**Milieu :** Gélose Muller-Hinton

**Inoculum :** Colonies en suspension, 0,5 Mc Farland

Antibiotiques testés	Charge des disques (µg)	Diamètres critiques (mm)		
		R	I	S
Ampicilline	10	≥13	14-16	≤17
Amoxicilline +acide clavulanique	(20/10)	≥13	14-17	≤18
Céfalotine	10	≥14	15-17	≤18
Ceftiofur / Céfoxime	30	≥17	18-20	≤21
Tétracycline	30	≥14	15-18	≤19
Fluméquine / Acide nalidixique	30	≥13	14-18	≤19
Enrofloxacin	5	≥16	17-20	≤21
Marbofloxacin	5	≥14	15-19	≤20
Norfloxacin	10	≥12	13-16	≤17
Danofloxacin	5	-	-	≤22
Néomycine / kanamycine	30	≥13	14-17	≤18
Gentamycine	10	≥12	13-14	≤15
Colistine	10	-	-	-
Sulfisoxazole	30	≥12	13-16	≤17
Triméthoprim +Sulfaméthoxazole	1,25/ 23,75	≥10	11-15	≤16
Nitrofurantoin	300	≥14	15-16	17
Chloramphénicol	30	≥12	13-17	18

## Annexes

---

**Annexe N° 11:** Valeurs limites des diamètres des zones d'inhibition pour la souche de référence utilisée pour le contrôle de qualité « Souche *E. coli* ATTC 25922 » (OMS, 2014).

Antibiotiques testés	Charge des disques (µg)	Diamètres critiques (mm)
Ampicilline	10	16-22
Amoxicilline +acide clavulanique	(20/10)	18-24
Céfalotine	10	15-21
Ceftiofur	30	26-31
Céfotaxime	30	29-35
Tétracycline	30	18-25
Acide nalidixique	30	22-28
Enrofloxacin	5	32-40
Marbofloxacin	5	29-37
Danofloxacin	5	29-36
kanamycine	30	17-25
Gentamycine	10	19-26
Colistine	10	11-17
Sulfisoxazole	30	15-23
Trimethoprim +Sulfaméthoxazole	1,25/ 23,75	23-29
Nitrofurantoin	300	20-25
Chloramphénicol	30	21-27

## Annexes

**Annexe N° 12 :** Résistance naturelle chez les principales espèces d'entérobactéries selon Le CA-SFM / EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) en octobre 2014.

Espèces	AM	AMC	C1G	CN	TE	CT	FT
<i>Klebsiella</i> spp.	R						
<i>Escherichia hermanii</i>	R						
<i>Citrobacter koseri</i>	R						
<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	R				
<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R				
<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	R	R				
<i>Hafnia. alvei</i>	R	R	R				
<i>Serratia marcescens</i>	R	R	R			R	
<i>Proteus mirabilis</i>					R	R	R
<i>Proteus vulgaris</i> , et <i>proteus penneri</i>	R		R		R	R	R
<i>Morganella morganii</i>	R	R	R		R	R	R
<i>Providancia stuartii</i>	R	R	R	R	R	R	R
<i>Providancia rettgeri</i>	R	R	R		R	R	R
<i>Yersinia enterocolitica</i>	R	R	R				

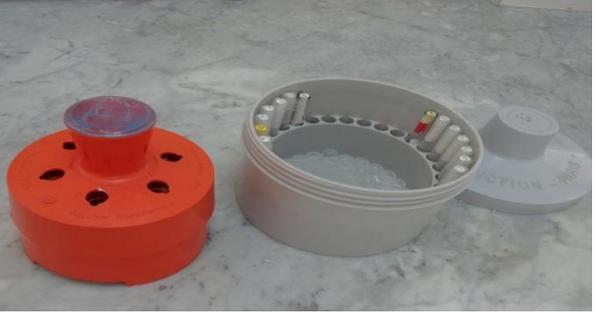
R : résistance naturelle ; AM : aminopénicillines ; AMC : amoxicilline + acide clavulanique ;

C1G : céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération ; CN : gentamycine ; TE : tétracyclines ; CT :

colistine ; FT : nitrofuranes.

## Annexes

### Annexe N° 13: Photos de quelques matériels utilisés

	
<p><b>Etuve (pour incubation)</b></p>	<p><b>Densitomètre (0,5 Mc farland)</b></p>
	
<p><b>Agitateur type vortex (pour homogénéisation)</b></p>	<p><b>Distributeur des disques d'antibiotiques</b></p>

## Resistance to multiple first-line antibiotics among *Escherichia coli* from poultry in Western Algeria

Meki Boutaiba Benklaouz<sup>1,2</sup>, Hebib Aggad<sup>1,2</sup> and Qada Benameur<sup>3</sup>

1. Department of Veterinary Sciences, Veterinary Sciences Institute, Ibn Khaldoun University, Tiaret, Algeria;
2. Laboratory of Hygiene and Animal Pathology, Veterinary Sciences Institute, Ibn Khaldoun University, Tiaret, Algeria;
3. Nursing Department, Faculty of Natural Sciences and Life, Abdelhamid Ibn Badis University, Mostaganem, Algeria.

**Corresponding author:** Qada Benameur, e-mail: [qada.benameur@univ-mosta.dz](mailto:qada.benameur@univ-mosta.dz)

**Co-authors:** MBB: [meki1327@yahoo.com](mailto:meki1327@yahoo.com), HA: [h\\_aggad@yahoo.com](mailto:h_aggad@yahoo.com)

**Received:** 07-10-2019, **Accepted:** 08-01-2020, **Published online:** 15-02-2020

**doi:** [www.doi.org/10.14202/vetworld.2020.290-295](http://www.doi.org/10.14202/vetworld.2020.290-295) **How to cite this article:** Boutaiba Benklaouz M, Aggad H, Benameur Q (2020) Resistance to multiple first-line antibiotics among *Escherichia coli* from poultry in Western Algeria, *Veterinary World*, 13(2): 290-295.

### Abstract

**Background and Aim:** *Escherichia coli* can cause a number of serious infections both in human and veterinary medicine. Their management is increasingly complicated by the emergence and dissemination of multiresistance to various first-line antimicrobial agents. This study aimed to evaluate the resistance level to the commonly used antibiotics, with a focus on the first-line antimicrobial agents, in *E. coli* strains isolated from poultry in Western Algeria.

**Materials and Methods:** *E. coli* culture was done on MacConkey agar and their identification was determined by AP20E system. For susceptibility testing, disk diffusion method to 14 antimicrobials, including first-line antibiotics, was used according to Kirby–Bauer disk diffusion method in Mueller-Hinton agar and the results were interpreted according to the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines. *E. coli* isolates were considered as multidrug resistance (MDR) when found resistant to at least one antimicrobial agent of three different families of antibiotics. Double-disk synergy and combination disk tests were used for initial screening and confirmation for extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) production, respectively.

**Results:** A total of 145 *E. coli* strains were isolated in this study. High resistance levels to various antibiotics, including commonly used first-line antimicrobial agents, were recorded in this study. The highest resistance level was observed against nalidixic acid (90.34%, n=131), followed by tetracycline (86.89%, n=126), ampicillin (82.75%, n=120), enrofloxacin (80.68%, n=117) and neomycin (80.68%, n=117), trimethoprim/sulfamethoxazole (73.79%, n=107), norfloxacin (72.41%, n=105) and cephalothin (72.41%, n=105), amoxicillin/clavulanic acid (51.72%, n=75), chloramphenicol (22.75%, n=33), nitrofurantoin (17.24%, n=25), gentamicin (13.10%, n=19), and ceftiofur (3.44%, n=5). Moreover, resistance to multiple first-line antibiotics was also demonstrated in the present study. Overall, 139 out of 145 isolates (95.86%) demonstrated MDR (resistant to at least three antibiotics). In addition, five *E. coli* isolates (3.44%) were confirmed to be ESBL producers.

**Conclusion:** The alarming rate of *E. coli* resistant to multiple first-line antibiotics in poultry demands intensified surveillance. These results call for taking drastic measures to preserve antibiotic effectiveness and reduce the emergence risks of extensively drug-resistant and pandrug-resistant *E. coli* isolates.

**Keywords:** Algeria, *Escherichia coli*, extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, first-line antibiotics, multidrug resistance, poultry.

### Introduction

*Escherichia coli* is an important cause of community and nosocomial-acquired infections, especially urinary tract infections, bloodstream infections, surgical site infections, pneumonia, and sepsis [1]. It is also considered as a major pathogen of worldwide importance in commercially produced poultry [2]. These bacteria are mainly responsible for causing colibacillosis, which is economically relevant to poultry producers, as it leads to high mortality and poor egg quality in broilers and laying hen flocks, respectively [3].

Antimicrobials play an important role in animal and human health care. A wide range of antimicrobial agents is used to treat community and hospital infections caused by *E. coli*. Most antimicrobials used for animals are also used in human medicine [4]. However, many antimicrobials used in human medicine are not approved for use in animals. Some of the currently available antimicrobials (fluoroquinolones, aminoglycosides, and third- and fourth-generation cephalosporins) are listed as veterinary critically important antimicrobials and are also considered to be highly important medicines for humans according to the Report of the 22<sup>nd</sup> meeting of the World Health Organization Expert Committee [5]. Acquired resistance to such antibiotics increases the clinical impact of infections due to *E. coli* and complicates their management in both human and veterinary medicine [6]. *E. coli* infections are of clinical concern because this species is becoming progressively more resistant to currently available antimicrobials [7-9] and

Copyright: Boutaiba Benklaouz, et al. Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

especially with the emergence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing isolates. The importance of infections due to multidrug-resistant (MDR) *E. coli* has been increasingly recognized in recent years and they are associated with increased morbidity and mortality [10].

One suspected source of drug-resistant *E. coli* in humans is the use of antimicrobial drugs in agriculture [11]. Irresponsible use of antibiotics in intensive livestock farming is an important factor that can play a crucial role in the selection of antibiotic-resistant bacteria. Indeed, the prevalence of highly antibiotic-resistant *E. coli* was recorded in poultry more frequently than other food-producing animals [12]. Therefore, avian *E. coli* could be considered as an epidemiological indicator for antimicrobial resistance monitoring which becomes necessary to preserve public health [13] and to guide the empirical use of antibiotics [14]. Thus, monitoring *E. coli* for antimicrobial resistance might also provide predictive information on antimicrobial resistance in potentially pathogenic bacteria [15]. A large number of studies have been performed in different parts of the world, focused on the analysis of the prevalence of MDR *E. coli* in poultry [7,12,15]. Such surveillance should be localized and updated as often as possible because resistance trends can vary even between regions in the same city [14], and especially in countries, where antibiotic usage is not strictly regulated.

This study aimed to evaluate the levels of resistance to the commonly used antibiotics, with a focus on first-line antimicrobial agents, in *E. coli* isolates from poultry and to investigate the presence of ESBL-producing isolates.

## Materials and Methods

### Ethical approval

No ethical approval was needed to realize this work.

### Study area

This work was carried out in several regions located in the west of Algeria: Chlef, Mostaganem, Relizane, Tiaret, Mascara, and Tissemsilt.

### Study period and sampling

From January 2017 and March 2019, a total of 290 samples were received to the Laboratoire Vétérinaire Régional de Mostaganem, Algeria. The samples were obtained from different hatcheries and poultry farms as part of routine care and they consisted of broiler and layer breeders, broilers, laying hens, and farm swabs.

### Bacterial strains

After sampling, birds were immediately transported to the laboratory and were aseptically necropsied for the collection of internal organs (liver, pericardium, and spleen). Farm swabs and fecal samples were also used for bacterial isolation. The samples were examined using a previously described method

[16], with slight modifications. Briefly, 1 g of sample (internal organs, farm swabs, or fecal samples) was mixed with 9 mL of buffered peptone water (Pasteur Institute of Algeria), vortexed, and incubated overnight at 37°C. To isolate *E. coli*, a drop of broth was streaked on MacConkey agar medium (Biochemica, Spain) and incubated overnight at 37°C. The strains were identified using the analytical profile index 20E system (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) that involves 21 miniaturized biochemical tests.

### Antimicrobial susceptibility testing

The antimicrobial susceptibility testing was done by Kirby–Bauer disk diffusion method in Mueller-Hinton Agar (MHA) using the following disks (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France): Ampicillin (AM, 10  $\mu$ g), amoxicillin/clavulanic acid (AMC, 20/10  $\mu$ g), cephalothin (CEP, 30  $\mu$ g), XNL (XNL, 30  $\mu$ g), nalidixic acid (NA, 30  $\mu$ g), enrofloxacin (ENR, 5  $\mu$ g), norfloxacin (NX, 10  $\mu$ g), tetracycline (TE, 30  $\mu$ g), trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT, 1, 25/23, 75  $\mu$ g), neomycin (N, 30  $\mu$ g), gentamicin (CN, 10  $\mu$ g), chloramphenicol (C, 30  $\mu$ g), nitrofurantoin (FT, 300  $\mu$ g), and colistin (CT, 50  $\mu$ g). Antimicrobial susceptibility data were interpreted in compliance with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines [17,18]. *E. coli* ATCC 25922 was used as a reference strain.

### Screening of MDR and potential ESBL production

In this study, *E. coli* isolates were considered as MDR when resistance to at least one antimicrobial agent of three different families of antibiotics was observed. Screening for ESBL production was done by double-disk synergy test as previously described [19] by filing AMC disk to 30 mm (center to center) of a XNL disk on MHA. The test was considered as positive when a decreased susceptibility to XNL was observed in combination with a champagne cork aspect (a clear-cut enhancement of the inhibition zone of XNL in front of the clavulanate-containing disk). Isolates showing a phenotype of resistance (or reduced susceptibility) to the third-generation cephalosporins without clear synergy were identified as potential ESBL producers, as recommended by CLSI guidelines, which will require further confirmation test.

### Combination disk diffusion ESBL confirmation test

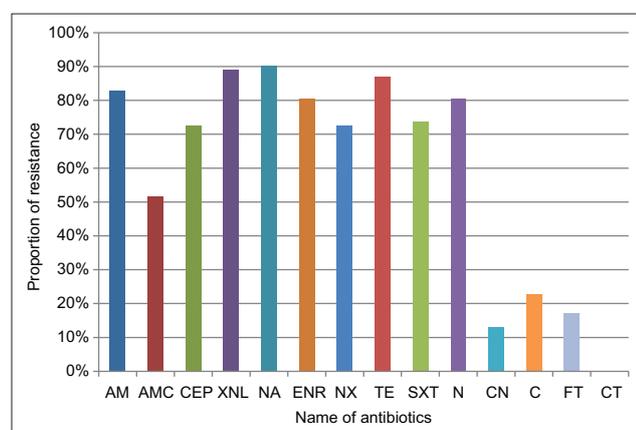
Isolates presumed to be ESBL producers were subjected to a Combination Disk Test (CDT), following CLSI guidelines, using XNL disk alone, and in combination with clavulanic acid, disk applied onto an MHA plate streaked with a 0.5 McFarland bacterial suspension. The inhibition zone diameters were then measured after incubation of 18 h at 37°C. Isolates were considered as ESBL producers when an increase of  $\geq 5$  mm in the inhibition zone of the combination disks in comparison to that of the XNL disk alone was observed [18]. *E. coli* ATCC 25922 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) was used as a reference strain.

## Results and Discussion

### Antimicrobial resistance

From 290 samples received in the Laboratoire Vétérinaire Régional de Mostaganem, Algeria, 145 *E. coli* strains were isolated. All the isolates were screened for susceptibility to a panel of 14 antimicrobials, including commonly used first-line agents. In Algeria, the currently first-line available options for treating severe infections due to *E. coli* in poultry include fluoroquinolones, aminoglycosides, and SXT and in certain cases, penicillins. In this study, antimicrobial susceptibility testing results showed high resistance rates against most of the antibiotics tested. The antibiotic resistance levels are shown in Figure-1. Resistance to NA was most common (90.34%, n=131), followed by TE (86.89%, n=126), AM (82.75%, n=120), ENR (80.68%, n=117) and N (80.68%, n=117), SXT (73.79%, n=107), NX (72.41%, n=105), CEP (72.41%, n=105), AMC (51.72%, n=75), C (22.75%, n=33), FT (17.24%, n=25), and CN (13.10%, n=19) and the lowest resistance level was observed against XNL (3.44%). CT remained effective against all the tested isolates. The resistance rates to the first-line agents tested in this study were higher than those previously reported in Algeria [20,21], as well as in other countries [22,23]. The high resistance rates to currently used first-line antibiotics in our country are troubling. This could be due to their uncontrolled use in poultry, due to the fact that they are administered to whole flocks rather than individual animals, and/or due to the fact that they are prescribed without prior *in vitro* antimicrobial susceptibility testing.

*E. coli* isolates present also a high level of resistance against TE. The high frequency of TE resistance in *E. coli* from chickens agrees with the findings of other studies on antibiotic resistance in *E. coli* [24,25]. TE is a traditional used first-line antibiotic for many domestic animals and the high proportion of TE



**Figure-1:** Antimicrobial resistance rates of *Escherichia coli* strains isolated from poultry. TE=Tetracycline, AM=Ampicillin, CEP=Cephalothin, AMC=Amoxicillin/clavulanic acid, XNL=Ceftiofur, N=Neomycin, CN=Gentamicin, SXT=Trimethoprim-sulfamethoxazole, NA=Nalidixic acid, ENR=Enrofloxacin, NX=Norfloxacin, CT=Colistin, FT=Nitrofurantoin, C=chloramphenicol.

resistance probably reflects the long history of using this antibiotic for treatment and prophylactic purposes [26]. Resistance to TE is plasmid-mediated, with a wide variety of genetic determinants [27]. This makes it more possible for a susceptible bacterium to acquire resistance factors by conjugation or by transformation as was previously demonstrated [28].

Among *E. coli* isolates, the frequency of resistance to the first-generation cephalosporin CEP occurred at a rate of 72.41%. This molecule is not usually used as a first choice and the high proportion of resistance to this antimicrobial could be the result of coselection phenomenon.

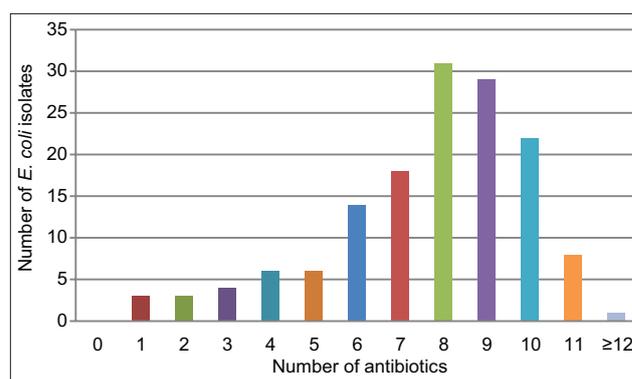
Our study recorded moderate resistance levels to C and FT. These agents are prohibited in food-producing animals in Algeria. Persistence of resistance to these antibiotics has also been reported previously [18], and this might be the result of coselection phenomenon by mobile resistance elements carrying multiple antimicrobial resistance genes [29].

### MDR

All *E. coli* strains isolated in this study were resistant to at least one antibiotic and the majority of them (95.86%, n=139) demonstrated MDR to at least three unrelated antimicrobials. Furthermore, 21.37% were resistant to more than nine antimicrobials. Nine isolates were found to be resistant to more than 10 antibiotics out of 14 antibiotics tested (Figure-2). Most MDR isolates showed resistance to multiple first-line antibiotics that included ENR, SXT, N, and AM as indicated in Table-1. Interestingly, the most common patterns were profiles F, G, and H with a percentage of 14.48%, 12.41%, and 11.03%, respectively. The high frequency of MDR *E. coli* found in the present study might be a result of the common use of combinations of antibiotics and of broad-spectrum antibiotics in the study area, as previously discussed [16].

### ESBL-producing isolates

Susceptibility testing detected five strains resistant to XNL (3.44%). These isolates were then confirmed by CDT as ESBL producers. ESBL-producing *E. coli* have become a worldwide problem after their first detection in Europe in the 1980s [30]. In the past decade, many studies have alerted about the



**Figure-2:** Multidrug-resistant *Escherichia coli* strains isolated from poultry.

**Table-1:** The most frequent antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* isolates (n=145).

Resistance patterns	Designation	Number of strains (%)
NA, TE, ENR	A	3 (2.06)
NA, TE, ENR, AM	B	2 (1.37)
NA, TE, ENR, AM, SXT	C	4 (2.75)
NA, TE, ENR, AM, SXT, NX	D	5 (3.44)
NA, TE, ENR, AM, SXT, NX, AMC, N	E	9 (6.20)
NA, TE, ENR, AM, SXT, NX, AMC, CEF	F	21 (14.48)
NA, TE, ENR, AM, SXT, NX, AMC, CEF, N	G	18 (12.41)
NA, TE, ENR, AM, SXT, NX, AMC, CEF, N, C	H	16 (11.03)
NA, TE, ENR, AM, SXT, NX, CEP, N, C, CN	I	4 (2.75)
NA, TE, ENR, AM, SXT, NX, CEP, N, C, CN, FT	J	2 (1.37)
NA, TE, ENR, AM, SXT, NX, CEP, CN, FT, C	K	2 (1.37)
NA, TE, ENR, AM, SXT, NX, CEP, N, C	L	2 (1.37)
Total		88 (60.68)

TE=Tetracycline, AM=Ampicillin, CEP=Cephalothin, AMC=Amoxicillin/clavulanic acid, XNL=Ceftiofur, N=Neomycin, CN=Gentamicin, SXT=Trimethoprim-sulfamethoxazole, NA=Nalidixic acid, ENR=Enrofloxacin, NX=Norfloxacin, FT=Nitrofurantoin, C=Chloramphenicol

widespread dissemination of ESBL-producing *E. coli* in food-producing animals [31]. The use of third-generation cephalosporins is uncommon in Algerian poultry production [32]. However, several recent studies have documented the occurrence of cephalosporin-resistant *E. coli* in poultry [33,34]. The presence of ESBL-producing *E. coli* in broiler chickens in our country may be the result of the selection of ESBL-producing *E. coli* clones by an abusive use of other antibiotics (quinolones) in certain poultry sectors and has spread horizontally or by their selection in breeders and their vertical transmission in the poultry production pyramid as previously suggested [35]. Indeed, cephalosporin-resistant *E. coli* have been recently reported from the ovaries of healthy broiler breeders in our country [36].

ESBL-positive *E. coli* isolates demonstrated coresistance against most of the commonly used first-line antibiotics (Table-2). Association with resistance to non- $\beta$ -lactam antibiotics has also been previously reported in ESBL-positive *E. coli* isolates [34], and this was most often related with plasmid-encoded antibiotic resistance. ESBLs encoding genes in Enterobacteriaceae are often localized on plasmids carrying genes encoding resistance to other families of antibiotics including aminoglycosides and fluoroquinolones [37].

The results of the present study are of immense concern because some *E. coli* strains are pathogenic and are responsible for a number of serious infections in both human and veterinary medicine. Recent findings describe that resistant organisms or their genes can be transmitted from animals to humans by direct

**Table-2:** Multidrug resistance of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates.

Antibiotic	S1	S2	S3	S4	S5
AM	R	R	R	R	R
AMC	R	S	R	S	S
CEP	R	R	R	R	R
XNL	R	R	R	R	R
NA	R	R	R	R	R
ENR	R	S	R	R	R
NX	R	S	S	R	R
TE	R	R	R	R	R
SXT	R	S	S	R	R
N	R	S	S	S	S
CN	S	S	S	S	S
C	S	S	S	R	S
FT	S	S	S	R	S
CT	S	S	S	S	S

TE=Tetracycline, AM=Ampicillin, CEP=Cephalothin, AMC=Amoxicillin/clavulanic acid, XNL=Ceftiofur, N=Neomycin, CN=Gentamicin, SXT=Trimethoprim-sulfamethoxazole, NA=Nalidixic acid, ENR=Enrofloxacin, NX=Norfloxacin, CT=Colistin, FT=Nitrofurantoin, C=Chloramphenicol

contact, through the food chain, or through environmental contamination [38]. Indeed, it has been suggested that *E. coli* isolates from poultry are genetically related to human pathogenic *E. coli* [39]. Wu *et al.* [40] reported that among animal isolates subjected to multilocus sequence typing (MLST) (n=258), only 1.2% (n=3) were more than 70% similar to human isolates in gene profiles and shared the same MLST clonal complex with the corresponding human isolates.

Based on the results of this study, the first-line antibiotics that are regularly used for empiric therapy of serious infections, such as the fluoroquinolones, are become not effective against MDR *E. coli*. Therefore, the treatment of infections due to these bacteria will remain a challenge to veterinarians because the number of antimicrobial agents reliably effective against the majority of MDR *E. coli* isolated in this study is very limited. This suggests worse clinical outcomes in poultry production, resulting in significant health and welfare concerns and economic losses. Therefore, reasonable use of antibiotics, the adoption of biosecurity measures, and adequate vaccination protocols in poultry production pyramid are becoming mandatory. Furthermore, the valorization of the existing alternatives to antibiotics, including plant extracts [41] and essential oils [42-44], and continuous development of new alternatives to antibiotics are needed to reduce antibiotic usage in food-producing animals.

## Conclusion

The alarming rate of *E. coli* isolates resistant to almost all of the commonly used first-line antibiotics was detected in this study. These results will contribute to describe the updated resistance epidemiological status of *E. coli* in the study area that helps veterinarians to target their treatment choices better. This finding underscores the need to monitor bacteria

resistant to the currently used first-line antibiotics in poultry production in other regions in the country as their emergence is an important health concern among most in the food safety community. These results call for taking drastic measures to preserve antibiotic effectiveness and reduce the emergence risks of extensively drug-resistant and pandrug-resistant *E. coli*. Therefore, better prevention of *E. coli* infections and careful choice of antibiotics based on the surveillance programs is necessary to avoid treatment failures and to prevent transmission of antimicrobial residues from poultry production to human food chain. More responsible use of antimicrobials in humans and animals is paramount to make sure antimicrobials remain effective.

### Authors' Contributions

MBB carried out the main research works and analyzed the main data in the experiments. HA has supervised the laboratory work. QB drafted and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### Acknowledgments

The staff of the Laboratoire Vétérinaire Régional de Mostaganem (Dr. Kebir Ahmed, the Director of the Lab, Dr. Sebai Ali, Dr. Bouziri Abduldjalal, and Ms. Benkhamkham Naziha) is gratefully acknowledged for their technical assistance. This study was supported by internal funding.

### Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Publisher's Note

Veterinary World remains neutral with regard to jurisdictional claims in published institutional affiliation.

### References

- Pitout, J.D. (2012) Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: An update on antimicrobial resistance, laboratory diagnosis and treatment. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.*, 10(10): 1165-1176.
- Hammerum, A.M. and Heuer, O.E. (2009) Human health hazards from antimicrobial-resistant *Escherichia coli* of animal origin. *Clin. Infect. Dis.*, 48(7): 916-921.
- Tivendale, K.A., Logue, C.M., Kariyawasam, S., Jordan, D., Hussein, A., Li, G., Wannemuehler, Y. and Nolan, L.K. (2010) Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able to cause meningitis in the rat model of human disease. *Infect. Immun.*, 78(8): 3412-3419.
- Page, S.W. and Gautier, P. (2012) Use of antimicrobial agents in livestock. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 31(1): 145-188.
- WHO/MVP/EMP/IAU/2019.10 The Selection and Use of Essential Medicines Report of the 22<sup>nd</sup> WHO Expert Committee.
- Gupta, K., Hooton, T.M. and Stamm, W.E. (2001) Increasing antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community-acquired urinary tract infections. *Ann. Intern. Med.*, 135(1): 41-50.
- Benameur, Q., Ben-Mahdi, M.H., Boutaiba Benklaouz M., Tali-Maamar, H., Assaous, F., Guettou, B. and Rahal, K. (2016) Analysis of high levels of multidrug-resistant *Escherichia coli* from healthy broiler chickens in Western Algeria. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 10(42): 1792-1797.
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (2018) The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. *EFSA J.*, 16(2): 5182.
- Hesp, A., Veldman, K., Goot, J., Mevius, D. and Schaik, G. (2019) Monitoring antimicrobial resistance trends in commensal *Escherichia coli* from livestock, the Netherlands, 1998 to 2016. *Euro. Surveill.*, 24(25): 1800438.
- Rottier, W., Ammerlaan, H. and Bonten, M. (2012) Effects of confounders and intermediates on the association of bacteraemia caused by extended-spectrum b-lactamase-producing Enterobacteriaceae and patient outcome: A meta-analysis. *J. Antimicrob. Chemother.*, 67(6): 1311-1320.
- Johnson, J.R., Sannes, M.R., Croy, C., Johnston, B., Clabots, C., Kuskowski, M.A., Bender, J., Smith, K.E., Winokur, P.L. and Belongia, E.A. (2007) Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* from humans and poultry products, Minnesota and Wisconsin. *Emerg. Infect. Dis.*, 13(6): 838-846.
- Rasheed, M.U., Thajuddin, N., Ahamed, P., Teklemariam, Z. and Jamil, K. (2014) Antimicrobial drug resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from food sources. *Rev. Inst. Med. Trop São Paulo.*, 56(4): 341-346.
- Kaesbohrer, A., Schroeter, A., Tenhagen, B.A., Alt, K., Guerra, B. and Appel, B. (2012) Emerging antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* with public health relevance. *Zoonoses. Public Health*, 59(2): 158-165.
- O'Brien, T.F. and Stelling, J.M. (2006) Monitoring antimicrobial resistance. In: Amabile-Cuevas CF, editor. Antimicrobial Resistance in Bacteria. Horizon Bioscience, Norfolk, UK. p123-148.
- Aarestrup, F.M., Bager, F., Jensen, N.E., Madsen, M., Meyling, A. and Wegener, H.C. (1998) Resistance to antimicrobial agents used for animal therapy in pathogenic, zoonotic and indicator bacteria isolated from different food animals in Denmark: A baseline study for the Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring Programme (DANMAP). *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand.*, 106(7): 745-770.
- Benameur, Q., Tali-Maamar, H., Assaous, F., Guettou, B., Boutaiba Benklaouz M., Rahal, K. and Ben-Mahdi, M.H. (2018) Characterization of quinolone-resistant Enterobacteriaceae strains isolated from poultry in Western Algeria: First report of *qnrS* in an *Enterobacter cloacae*. *Vet. World*, 11(4): 469-473.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2015) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-fifth Informational Supplement document M100S25. 25<sup>th</sup> ed. CLSI, Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2017) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twenty-seventh Informational Supplement Document M100-S27. 27<sup>th</sup> ed. CLSI, Wayne, PA.
- Jarlier, V., Nicolas, M.H., Fournier, G. and Philippon, A. (1988) Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in Enterobacteriaceae: Hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.*, 10(4): 867-878.
- Hammoudi, A. and Aggad, H. (2008) Antibioresistance of *Escherichia coli* strains isolated from chicken colibacillosis in Western Algeria. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 32(2): 123-126.
- Aggad, H., Ammar, Y.A., Hammoudi, A. and Kihal, M. (2010) Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis. *Glob. Vet.*, 4(3): 303-306.
- Okorafor, O.N., Anyanwu, M.U., Nwafor, E.O., Anosa, G.N. and Udegbunam, R.I. (2019) Multidrug-resistant enterobacteria colonize commercial day-old broiler chicks in Nigeria. *Vet. World*, 12(3): 418-423.

23. Younis, G., Awad, A. and Mohamed, N. (2017) Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial susceptibility of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broiler chickens, *Vet. World*, 10(10): 1167-1172.
24. Halfaoui, Z., Menoueri, N.M. and Bendali, L.M. (2017) Serogrouping and antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from broiler chicken with colibacillosis in center of Algeria. *Vet. World*, 10(7): 830-835.
25. Amer, M.M., Mekky, H.M., Amer, A.M. and Fedawy, H.S. (2018) Antimicrobial resistance genes in pathogenic *Escherichia coli* isolated from diseased broiler chickens in Egypt and their relationship with the phenotypic resistance characteristics. *Vet. World*, 11(8): 1082-1088.
26. Tadesse, D.A., Zhao, S., Tong, E., Ayers, S., Singh, A., Bartholomew, M.J. and McDermott, P.F. (2012) Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950-2002. *Emerg. Infect. Dis.*, 18(5): 741-749.
27. Prescott, J.F., Baggot, J.D. and Walker, R.D. editors. (2000) Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. 3<sup>rd</sup> ed. Iowa State Press, Ames.
28. Miles, T.D., McLaughlin, W. and Brown, P.D (2006) Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens and humans. *BMC Vet. Res.*, 2(7): 1-9.
29. Harada, K., Asai, A., Kojima, A., Ishihara, K. and Takahashi, T. (2006) Role of coresistance in the development of resistance to chloramphenicol in *Escherichia coli* isolated from sick cattle and pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 67(2): 230-235.
30. Tansarli, G.S., Poulidakos, P., Kapaskelis, A. and Falagas, M.E. (2014) Proportion of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing isolates among *Enterobacteriaceae* in Africa: Evaluation of the evidence - a systematic review. *J. Antimicrob. Chemother.*, 69(5): 1177-1184.
31. Marshall, B.M. and Levy, S.B. (2011) Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. *Clin. Microbiol. Rev.*, 24(4):718-733.
32. Standardisation de L'antibiogramme à L'échelle Nationale (Médecine Vétérinaire et Humaine) (2011) 6<sup>th</sup> ed, SAEN, Algeria.
33. Chabou, S., Leulmi, H., Davoust, B., Aouadi, A. and Rolin, J.M. (2018) Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase and carbapenemase-encoding genes in poultry feces from Algeria and Marseille, France. *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, 13(6): 28-32.
34. Belmahdi, M., Bakour, S., Al Bayssari, C., Touati, A. and Rolain, J.M. (2016) Molecular characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and plasmid AmpC-producing *Escherichia coli* strains isolated from broilers in Béjaïa, Algeria. *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, 6(9): 108-112.
35. Dierikx, C.M., Van der Goot, J.A., Smith, H.E., Kant, A. and Mevius, D.J. (2013) Presence of ESBL AmpC-producing *Escherichia coli* in the broiler production pyramid: a descriptive study. *PLoS One*, 8(11): e79005.
36. Benameur, Q., Tali-Maamar, H., Assaous, F., Guettou, B., Rahal, K. and Ben-Mahdi, M.H. (2019) Detection of multidrug-resistant *Escherichia coli* in the ovaries of healthy broiler breeders with emphasis on extended-spectrum  $\beta$ -lactamases producers. *Comp Immunol, Microbiol Infect Dis.*, 64(6): 163-167.
37. Perez, F. and Bonomo, R.A. (2012) Can we really use beta-lactam/beta-lactam inhibitor combinations for the treatment of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria? *Clin. Infect. Dis.*, 54(2): 175-177.
38. Iglesias, A., Nebot, C., Miranda, J.M., Vázquez, B.I. and Cepeda, A. (2012) Detection and quantitative analysis of 21 veterinary drugs in river water using high-pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Environ. Sci Pollut R.*, 19(8): 3235-3249.
39. Vincent, C., Boerlin, P., Daignault, D., Dozois, C.M., Dutil, L., Galanakis, C., Reid-Smith, R.J., Tellier, P.P., Tellis, P.A., Ziebell, K. and Manges, A.R. (2010) Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Emerg. Infect. Dis.*, 16(1): 88-95.
40. Wu, G., Day, M.J., Muriel, T., Mafural, M.T., Nunez-Garcia, J., Fenner, J.J., Sharma, M., Van Essen-Zandbergen, A., Rodríguez, I., Dierikx, C., Kadlec, K., Schink, K., Wain, J., Helmuth, R., Guerra, B., Schwarz, S., Threlfall, J., Woodward, M.J., Woodford, N., Coldham, N. and Mevius, D. (2013) Comparative analysis of ESBL-positive *Escherichia coli* isolates from animals and humans from the UK, the Netherlands and Germany. *PLoS One*, 8(9): e75392.
41. Aghraz, A., Albergamo, A., Benameur, Q., Salvo, A., Larhsini, M., Markouk, M., Gervasi, T. and Cicero, N. (2020), Polyphenols contents, heavy metals analysis and *in-vitro* antibacterial activity of extracts from *Cladanthus arabicus* and *Bubonium imbricatum* of Moroccan Origin. *Nat. Prod. Res.*, 34(1): 63-70.
42. Aghraz, A., Benameur, Q., Gervasi, T., Aitdra, L., Ben-Mahdi, M.H., Larhsini, M., Markouk, M. and Cicero, N. (2018) Antibacterial activity of *Cladanthus arabicus* and *Bubonium imbricatum* essential oils alone and in combination with conventional antibiotics against Enterobacteriaceae isolates. *Lett. Appl. Microbiol.*, 67(2): 175-182.
43. Benameur, Q., Gervasi, T., Pellizzeri, V., Pfluchtová, M., Tali-Maamar, H., Assaous, F., Guettou, B., Rahal, K., Gruřová, D., Dugo, G., Marino, A. and Ben-Mahdi, M.H. (2018) Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* essential oil alone and in combination with cefotaxime against *bla*<sub>ESBL</sub> producing multidrug-resistant Enterobacteriaceae isolates. *Nat. Prod. Res.*, 33(18): 2647-2654.
44. Pfluchtová, M., Gervasi, T., Benameur, Q., Pellizzeri, V., Gruřová, D., Campone, L., Sedlák, V. and Cicero, N. (2018) Antimicrobial activity of two *Mentha* species essential oil and its dependence on the different origin and chemical diversity. *Nat. Prod. Commun.*, 13(8): 1051-1054.

\*\*\*\*\*

## ISOLATION AND PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF MULTIDRUG RESISTANCE NON-*E. COLI* ENTEROBACTERIACEAE FROM POULTRY IN WESTERN ALGERIA: RESISTANCE TO MANY FIRST-LINE ANTIMICROBIAL AGENTS

Meki Boutaiba Benklaouz<sup>1,2,\*</sup>, Hebib Aggad<sup>1,2</sup>, Qada Benameur<sup>3</sup>

<sup>1\*</sup>University of Tiaret, Veterinary Sciences Institute, Department of Veterinary Sciences, Tiaret, 14000, Algeria;

<sup>2</sup>University of Tiaret, Veterinary Sciences Institute, Laboratory of Hygiene and Animal Pathology, Tiaret, 14000, Algeria;

<sup>3</sup>Abdelhamid Ibn Badis University, Faculty of Natural Sciences and Life, Department of Nursing Sciences, Mostaganem, 27000, Algeria;

Corresponding Author Meki Boutaiba Benklaouz; e-mail: [meki1327@yahoo.com](mailto:meki1327@yahoo.com);

Co-Authors Hebib Aggad, e-mail: [h\\_aggad@yahoo.com](mailto:h_aggad@yahoo.com);

Qada Benameur, e-mail: [qada.benameur@univ-mosta.dz](mailto:qada.benameur@univ-mosta.dz);

Received April 2022; Accepted May 2022; Published June 2022;

DOI: <https://doi.org/10.31407/ijeess12.330>

Received April 2022; Accepted May 2022; Published June 2022;

DOI: <https://doi.org/10.31407/ijeess12.330>

### ABSTRACT

This study aimed to evaluate the antimicrobial resistance to the commonly used antibiotics with particular attention to the first-line antimicrobial agents and to investigate the multidrug resistance levels of non-*E. coli* Enterobacteriaceae from poultry in Western Algeria. Enterobacteriaceae culture was done on MacConkey agar and their identification was determined by AP20E kit, *Salmonella*-positive isolates serotyping were performed according to Kauffmann-White-Le Minor's scheme. For susceptibility testing, the Kirby-Bauer disk diffusion method to a panel of 14 antibiotics was used according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. A total of 141 non-*E. coli* Enterobacteriaceae isolates (53 *Proteus spp.*, 42 *Enterobacter spp.*, 11 *Citrobacter spp.*, 10 *Klebsiella spp.*, 8 *Serratia spp.*, 6 *Salmonella spp.*, 4 *Yersinia spp.*, 4 *Edwardsiella spp.*, 2 *Hafnia spp.* and one *Providencia spp.*) were isolated in this study. Four different serotypes of *Salmonella* strains were identified in this work. The predominant isolates exhibited high levels of resistance to various first-line antibiotic classes, notably betalactams, quinolones. Only the serotype *Salmonella Kentucky* was resistant to ciprofloxacin. All the strains isolated in this study were resistant to at least one antibiotic. Overall, 130 out of 141 isolates (92,19 %) demonstrated multidrug resistance (MDR). The dramatic increase in the rates of resistance to various first-line antimicrobial agents and the rapid spread of MDR in non-*E.coli* Enterobacteriaceae isolates of poultry origin can have major implications for public and animal health that should be approached urgently and pro-actively.

**Keywords:** multidrug resistance, non-*E. coli* enterobacteriaceae, first-line antimicrobial agents, poultry, Algeria.

## INTRODUCTION

Poultry production can face many constraints, especially microbial contaminations such as Gram-negative bacteria, which have a serious implications for public health and the surrounding environment (Skóra et al., 2016). Gram-negative bacteria of the Enterobacteriaceae family are important causes of urinary tract infections (UTIs), bloodstream infections, hospital- and healthcare-associated pneumonias, and various intra-abdominal infections. Within this family, *E. coli* is a frequent cause of UTIs, *Klebsiella spp.* and *Enterobacter spp.* are important causes of pneumonia, and all of the Enterobacteriaceae have been implicated in bloodstream infections and in peritonitis, cholangitis, and other intra-abdominal infections. Poultry and their products are considered the main vehicle for pathogenic bacteria such as *Salmonella (S.)* serovars, *E. coli* and *Klebsiella spp.* that cause foodborne infections in humans (EFSA, 2008; Sukumaran et al., 2012; Yadav et al., 2015). Enterobacteriaceae infections are of clinical concern, because several of the most important members of this family are becoming progressively more resistant to currently available antimicrobials (Paterson, 2006; Denton, 2007; Kilonzo-Nthenge et al., 2013; Benameur et al., 2014). Members of family Enterobacteriaceae, such as *E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, and *Salmonella*, have been reported for developing antimicrobial resistance (Cortes et al., 2010; Ansari et al., 2014). Antimicrobial resistance in bacteria from the family Enterobacteriaceae is an essential sign of the occurrence of resistant bacterial strains in the community (Ojo et al., 2012). The abusive use of antibiotics in intensive livestock farming can be an important factor of the selection of antibiotic-resistant bacteria. Farm animals exposed to an antimicrobial agent for prolonged periods develop a microbial flora resistant to the agent (Swartz, 2002), which play a crucial role on the occurrence of MDR. Emergence of multidrug-resistant bacteria is of particular concern because of their potential for widespread dissemination and acquisition of additional resistance genetic elements (Karlowsky, 2003). The importance of infections due to multidrug resistant (MDR) Enterobacteriaceae has been increasingly recognized in recent years (Mercedes et al., 2013). Infections caused by multidrug-resistant Enterobacteriaceae are associated with increased morbidity and mortality than those caused by their susceptible counterparts (Bushen et al., 2021). This is mainly related to delay in providing active therapy, and also the bacterial infections increasingly failing to first-line and “last-resort” antibiotic therapies (Murray et al., 2021).

In different regions of Algeria, many published data reported alarming antimicrobial resistance levels of *E. coli* in poultry (Hammoudi and Aggad, 2008; Aggad et al., 2010; Messai et al., 2013; Benameur et al., 2016). Recent findings described clear evidence of direct transmission of multidrug-resistant *E. coli* isolates from food-producing animals or food to humans (Magiorakos et al., 2012; Adelowo et al., 2014; Bryan et al., 2020; Ramadan et al., 2021). However, few data were found in other Enterobacteriaceae species. The main goal of the present study was to evaluate the levels of antimicrobial resistance, notably to first-line antimicrobial agents, in non-*E. coli* Enterobacteriaceae strains from poultry and to investigate the presence of multidrug resistance.

## MATERIALS AND METHODS

Between January 2017 and December 2019, a total of 290 samples were collected from poultry farms and hatcheries located in six provinces, namely: Mascara, Mostaganem, Relizane, Tiaret, Tissemsilt, and Chlef. The samples consisted of healthy and diseased broiler and layer breeders, one day-old broiler and layer chicks, broilers, laying hens, and farm swabs. The samples were transported to the Laboratoire Vétérinaire Régional de Mostaganem, Algeria, and processed immediately for bacterial isolation.

Birds were necropsied immediately upon arrival in the laboratory using aseptic techniques. Internal organs (liver, spleen, or pericardium), fecal samples and farm swabs were used for bacterial isolation. The samples were examined using a previously described method (Benameur et al., 2018), with slight modifications. Briefly, one mL of sample was mixed with nine mL of buffered peptone water (Pasteur Institute of Algeria) vortexed and incubated overnight at 37 °C. Then, a drop of broth was streaked on MacConkey agar medium (Biochemica, Spain) and incubated overnight at 37 °C. The Enterobacteriaceae strains were identified biochemically using the API 20E system (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France).

The antimicrobial susceptibility testing was done by Kirby Bauer disc diffusion method in Mueller Hinton agar (MHA), and the results were interpreted according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (CLSI, 2015; CLSI, 2017). Fourteen commercially available antimicrobial disks (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) were tested: amoxicillin/clavulanic acid AMC (20/10 µg), ampicillin (AM, 10 µg), ceftiofur (XNL, 30 µg), cephalotin (CEP, 30 µg), nalidixic acid (NA, 30 µg), norfloxacin (NX, 10 µg), ciprofloxacin (CIP, 5 µg), tetracycline (TE, 30 µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT, 1, 25/23, 75 µg), neomycin (N, 30 µg), gentamicin (CN, 10 µg), colistin (CT, 50 µg), chloramphenicol (C, 30 µg) and nitrofurantoin (FT, 300 µg). *E. coli* ATCC 25922 was used as a quality control strain.

In this study, the multidrug-resistant isolate was defined as expressing phenotypic resistance to three or more antibiotic classes (Magiorakos et al., 2012).

## RESULTS AND DISCUSSIONS

From 290 samples received in the Laboratoire Vétérinaire Régional de Mostaganem, Algeria, one hundred forty one non-*E. coli* Enterobacteriaceae strains were isolated. *E. coli* isolates were not included in this study. The most predominant isolated bacteria was *Proteus spp.* followed by *Enterobacter spp.* then *Citrobacter spp.* and *Klebsiella spp.* However, the number of the other isolated Enterobacteriaceae species was very low (figure 1).

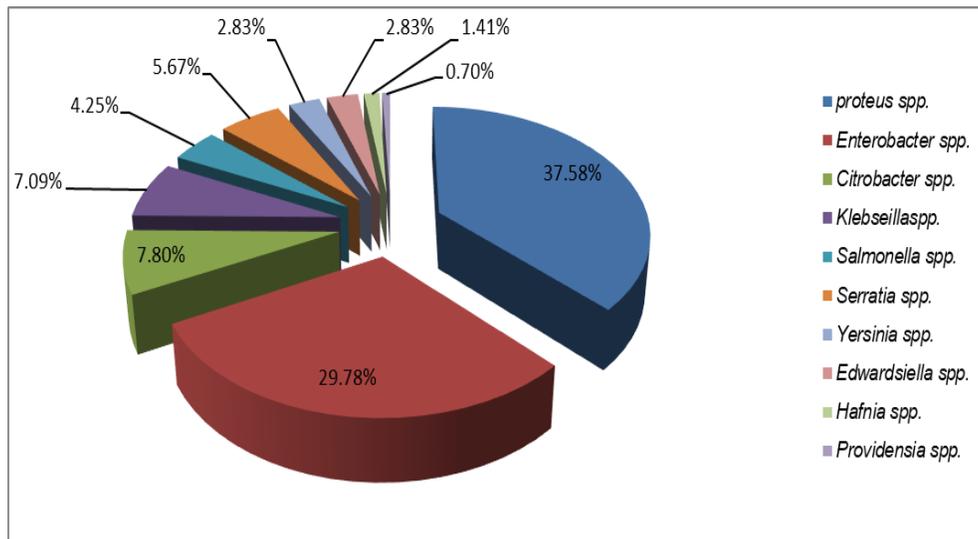


Figure 1. Percentage of non-*E. coli* Enterobacteriaceae isolates recovered from poultry

The percentages of Enterobacteriaceae species isolated in the current study are different to those reported in the previous study conducted in same regions (Benameur et al., 2018). In the last study, it reported that the predominant isolate is *Enterobacter* followed by *Klebsiella* then *Proteus*; these enterobacteriaceae are considered as poultry intestinal microfloras. Nevertheless, they can be implicated as opportunistic pathogens (Adebowale and Adeyemo, 2018). In other hand, they can found in nature, as for *proteus*, which are usually dispersed everywhere as saprophytes and are mostly found in manure, soil, human and animal feces (Senior, 1997); While *Enterobacter* are prototrophic in nature and are commonly found on a number of different plants and seeds (Francine and Patrick, 2006).

Six isolates were confirmed as *Salmonella* stains in this study, that belonging mainly to four different serotypes (*Kentucky*, *Dublin*, *Worthington* and *Kedougou*). The *Salmonella spp.* rate isolation is very low (4,25%, n=6). This could be explained by the low degree of excretion of *Salmonella* at the time of sampling and / or the intermittent excretion of *Salmonella* by infected birds (Van Immerseel, 2004). It could also be due to competitiveness between different saprophytic germs which inhibit the multiplication of pathogenic germs by modifying the environment because they are more demanding than saprophytic organisms (Valancony et al., 2001).

Isolation of multiple pathogens on different farms in the studied areas also points to the poor sanitary conditions and biosecurity measures on many poultry farms in Algeria.

The traditional first-line available options for treating serious infections caused by Enterobacteriaceae include penicillins, cephalosporins, monobactams, carbapenems, fluoroquinolones, and in certain situations, aminoglycosides. The frequency of resistance to these first-line agents has been rising worldwide in human Enterobacteriaceae isolates during the last years (Mercedes et al., 2013) and now reach high proportions in many areas of the world. In veterinary medicine, many studies have been determined the prevalence of antimicrobial resistance and antimicrobial resistance patterns in *E. coli* and *Salmonella* in many countries around the world. However, few data are available among other Enterobacteriaceae members. The results of the present study revealed that the most of the Enterobacteriaceae isolates were resistant to the majority of tested antibiotics as is summarized in figure 2.

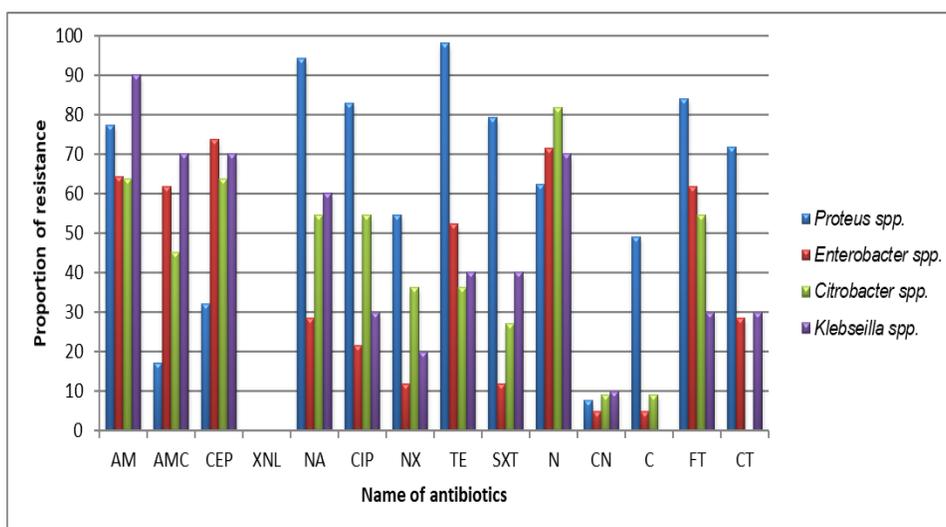


Figure 2. Antibiotic resistance of predominant non-*E.coli* Enterobacteriaceae isolates

AM=Ampicillin, CEP=Cephalothin, AMC=Amoxicillin/clavulanic acid, XNL=Ceftiofur, NA=Nalidixic acid, CIP=Ciprofloxacin, NX=Norfloxacin, TE=Tetracycline, SXT=Trimethoprim-sulfamethoxazole, N=Neomycin, CN=Gentamicin, C=Chloramphenicol, FT=Nitrofurantoin, CT=Colistin.

*Proteus* spp. isolates showed a high resistance level to particular antimicrobials, especially TE 98,94% (n=52), NA 94,93% (n=50), FT 84,90% (n=45), CIP 83,01% (n= 44), SXT 79,24% (n= 42), AM 77,35% (n= 41), CT 71,69% (n= 38). Amid *Enterobacter* spp. isolates, the highest proportion of resistance was toward CEP 73,80% (n=31), followed by N 71,43 % (n= 30), AM 61,24% (n= 27), FT and AMC 61.90% (n= 26), TE 52,38% (n= 22). Also *Citrobacter* spp. isolates exhibited a high resistance to N 81,81% (n= 9), AM and CEP 63,63% (n= 7), FT, NA, and CIP 54,54% (n= 6). Resistance of *Klebsiella* spp. to AM, CEP, N, NA, TE, SXT, and CIP was, respectively, observed in 90% (n=9), 70%(n=7), 70% (n=7), 60% (n=6), 40% (n=4 ), 40%(n=4 ) and 30%(n=3 ) of the isolates. While all the Enterobacteriaceae isolates examined in this work were susceptible to ceftiofur (XNL). The resistance of non *E.coli* Enterobacteriaceae strains to many first-line agents as betalactams (AM, CEF, AMC), quinolone and fluoroquinolone (NA, CIP), Tetracycline (TE), Aminoglycoside (N) is surprising, in contrary about the antibiotic resistance of *E.coli* strains from poultry in the same region (Boutaiba Benklaouz et al., 2020). The results of our study were higher than those previously reported in Algeria (Ahmed Ammar et al., 2017).

The high resistance to tetracycline reported in this study can be explained by abusive use of this ancient antibiotic in poultry farms in the study region and in another hand, by the lack of legislative restrictions of its use for therapy, prophylaxis, or growth promotion in Algeria. This percentage is higher than that reported in Indonesia (Yulistiani et al., 2017).

This study also revealed that predominant isolates from poultry showed high resistance properties toward betalactamins as AM, CEP and AMC which are in agreement with other study conducted in Ethiopia (Bushen et al., 2021). These molecules are antimicrobials of first and second generation of betalactamins that have a large use for therapeutic and disease prevention purposes in poultry.

The enterobacteriaceae isolates present also a high level of resistance against quinolones, witch concord with the results those previously reported in the same provinces (Benameur et al.,2018). The high resistance rate of quinolone-resistant Enterobactreaceae from poultry in Algeria was troubling, maybe due to the routine application of the quinolone (NA) at subtherapeutic doses for prophylactic and therapeutic purposes in broilers, and the fluoroquinolones (ciprofloxacin) for the prevention of early chick mortality. The increase in antimicrobial resistance, observed in Enterobacteriaceae isolates, may result from the clonal selection of organisms that tolerate sublethal antimicrobial doses and that present greater fitness under conditions of selective pressure, or from the spreading of resistance genetic determinants through horizontal gene transfer.

Our study recorded moderate resistance levels to some antibiotics which are prohibited in veterinary medicine in Algeria, such as nitrofurantoin and chloramphenicol. Persistence of resistance to these antibiotics has also been observed previously (Senior, 1997); this could be explained by co-selection of mobile resistance elements for the nitrofurantoin and chloramphenicol-resistance (Francine and Patrick, 2006).

Table 1. Mutli-drug resistance in non-*E.coli* Enterobacteriaceae strain isolates from poultry

Enterobacteriaceae strains	Number of antibiotics									Multi-drug resistant Strains (%)
	0	1	2	3	4	5	6	7	≤8	
<i>Proteus spp.</i> (n=53)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	8 (15,09)	2 (3,77)	7 (13,20)	6 (11,32)	30 (56,60)	53 (100)
<i>Enterobacter spp.</i> (n=42)	0 (0,00)	1 (2,38)	3 (7,14)	6 (14,28)	4 (9,52)	12 (28,57)	3 (7,14)	4 (9,52)	9 (21,42)	38 (90,47)
<i>Citrobacter spp.</i> (n=11)	0 (0,00)	1 (9,09)	1 (9,09)	1 (9,09)	1 (9,09)	2 (18,18)	0 (0,00)	1 (9,09)	4 (36,36)	9 (81,81)
<i>Klebsiella spp.</i> (n=10)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (20,00)	3 (30,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (20,00)	3 (30,00)	10 (100)
<i>Serratia spp.</i> (n=8)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (25,00)	0 (0,00)	1 (12,50)	1 (12,50)	1 (12,50)	1 (12,50)	2 (25,00)	6 (75,00)
<i>Salmonella spp.</i> (n=6)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (16,66)	1 (16,66)	1 (16,66)	2 (33,33)	1 (16,66)	0 (0,00)	0 (0,00)	5 (83,33)
<i>Yersinia spp.</i> (n=4)	0 (0,00)	1 (25,00)	0 (0,00)	1 (25,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (25,00)	1 (25,00)	3 (75,00)
<i>Edwardsiella spp.</i> (n=4)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (25,00)	0 (0,00)	3 (75,00)	4 (100)
<i>Hafnia spp.</i> (n=2)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (50,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (50,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (50,00)
<i>Providencia spp.</i> (n=1)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (100)	1 (100)
<b>Total (n=141)</b>	<b>0</b> (0,00)	<b>3</b> (2,12)	<b>8</b> (5,67)	<b>11</b> (7,80)	<b>18</b> (12,76)	<b>19</b> (13,47)	<b>14</b> (9,92)	<b>15</b> (10,63)	<b>53</b> (37,58)	<b>130</b> (92,19)

All *Salmonella* serotypes exhibited resistance to quinolone (NA) but only the serotype *Kentucky* was resistant to fluoroquinolone (CIP) (figure 3). This result is in line with findings for *Salmonella* isolates from food animals and humans in Eastern Algeria (Djeffal et al., 2017). In other hand, several reports have mentioned *S. Kentucky* CIP-R isolates that have been identified from different sources (animals, food, the environment and humans) and geographic locations (Le Hello, 2013). Moreover, a *Kentucky* ciprofloxacin-resistant serotype was isolated in France from a patient who had previously visited Algeria (Weill and Le Hello, 2011). The presence of *salmonella* isolates resistant to fluoroquinolones in poultry is much more worrying, as these antibiotic molecules are among the last resort for the treatment of severe human salmonellosis.

Emergence of MDR bacteria, especially Enterobacteriaceae, has increased in recent years. In this study, all the Enterobacteriaceae strains were resistant to at least one antibiotic. High level of Enterobacteriaceae isolates 130 (92.19%) demonstrated multidrug resistance to at least three unrelated antimicrobial agents. Our result concord with other study in the same region (Benameur et al., 2018).

Resistance to three or more antibiotics was found in 53 (100%) isolates of *Proteus spp.*, followed by 38 (90.47%), 10 (100%), 9 (81,81%), 6 (75%), 5 (83,33%), 3 (75%), 4 (100%), 1(50%) and 1(100%) isolates of *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Citrobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Salmonella spp.*, *Yersinia spp.*, *Edwardsiella spp.*, *Hafnia spp.* and *Providencia spp.* respectively, as shown in table 1.

This indicates that the abusive and indiscriminant use of these antibiotics, such as wrong indication, wrong duration and wrong antibiotic combinations, is probably the origin of the high incidence of MDR strains (Harris et al., 2015; Reygaert, 2018). In addition to the above, their use without prior antibiotic sensitivity testing of bacterial isolates, may lead to the development of a pool of antibiotic-resistant genes and to the selection of increasing numbers of resistant Enterobacteriaceae clones.

Antibiotics resistance patterns of the predominant Enterobacteriaceae strains isolated in this study were frequent and divers as shown in table 2 and 3.

Table 2. The most frequent antibiotic resistance patterns of *Proteus spp.* isolates (n=53)

Resistance patterns	Designation	Number of strains (%)
TE NA	A	2(3,77)
TE NA CIP	B	8(15,09)
TE NA CIP SXT FT	C	1(1,88)
TE NA CIP SXT FT CT	D	7(13,20)
TE NA CIP SXT FT CT AMP	E	2(3,77)
TE NA CIP SXT FT CT AMP N NX	F	4(7,54)
TE NA CIP SXT FT CT AMP N NX C CEF	G	3(5,66)
TE NA CIP SXT FT CT AMP N NX C CEF	H	2(3,77)
TE NA CIP SXT FT CT AMP N NX C CEF CN	I	1(1,88)
TE NA CIP AMP FT CT	J	1(1,88)

Table 3. The most frequent antibiotic resistance patterns of *Enterobacter spp.* isolates (n=42).

Resistance patterns	Designation	Number of strains (%)
CEF AMP	A	1(2,38)
CEF AMP N	B	2(4,76)
CEF AMP N FT	C	5(11,90)
CEF AMP N FT TE	D	7(16,66)
CEFAMP N FT TE AMC NA	E	2(4,76)
CEF AMP N FT AMC	F	1(2,38)
CEF AMP NX N AMC SXT TE CIP	G	3(7,14)
AMP NX TE CN NA AMC N CIP	H	1(2,38)
CEF N TE C	I	2(4,76)
N CT	J	2(4,76)

The most common multidrug resistant profiles among *proteus spp.* were profile B and D with percentage of 15,09% and 13,20% respectively; which were resistant to tetracycline, nalidixic acid, trimethoprim-sulfamethoxazole, ciprofloxacin, nitrofrantoin and colistin. Concerning *enterobacter spp.* stains were profile C and D with percentage of 11,90% and 16,66% respectively; which were resistant to tetracycline, cephalotin, ampicillin, neomycin and nitrofrantoin. Resistance of predominant MDR enterobacteriaceae isolates to first line-antibiotic such as penicillins and fluoroquinolones in poultry in western Algeria is constantly increasing. This rising in resistance to various last-resort agents makes difficult to select an empirical therapy (Livermore et al., 2008; Canton et al., 2012). Prudent use practices should include restricting the access for use of antimicrobials that are considered to be important for human medicine in animal production (WHO, 2017).

Multidrug resistant poultry pathogens may result in treatment failure, leading to economic losses, but also be a source of resistant bacteria/genes (including zoonotic bacteria) that may can be a risk to public health.

The development of new antimicrobial agents is among the urgent recommendations proposed to take action in the public health and veterinary farming domains by limiting the inappropriate exposure of bacteria to antibiotics in order to slow down a natural evolution toward resistance and its spread in the downstream environment in a One Health context (WHO, 2015; WHO, 2017).

Few data are available on the pattern of antimicrobial resistance and multidrug resistance in Enterobacteriaceae other than *E. coli* and *Salmonella spp.* from food producing animals. Regional and local descriptions of antibiotic resistance add to the global view of antimicrobial resistance. The study provides an insight into the prevalence of antibiotic resistance in a largest country in Africa.

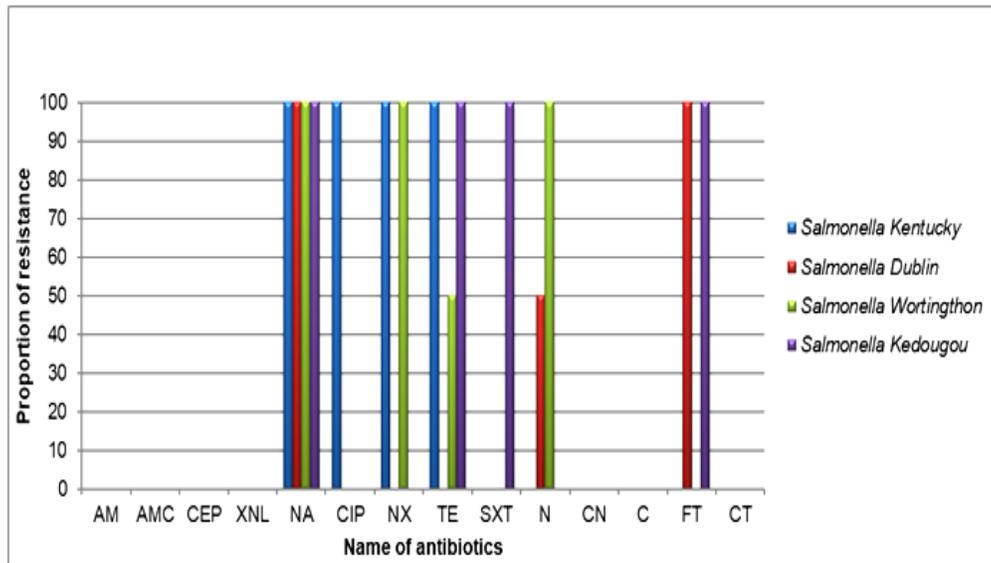


Figure 3. Antimicrobial resistance among *Salmonella serotypes*

## CONCLUSION

- In summary, the present study reported the presence of various potentially pathogenic and multidrug resistance non-*E. coli* Enterobacteriaceae from poultry in western Algeria.
- We believe that such this alarming rate of resistance to various first-line antimicrobial agents in poultry in the region is linked to the abusive and uncontrolled use of antibiotics in poultry that cause the increasing treatment failure.
- Therefore, the more information on the role of environmental microbiomes in the rise of antibiotic resistance, the creative approaches to the discovery of novel antibiotics and their controlled introduction to therapy in poultry management are among the solutions that are becoming urgent and mandatory.

**Acknowledgments.** The authors appreciate the staff of the practitioners and officials veterinarians for providing sampling. A special thanks to the staff of the regional veterinary laboratory of Mostaganem for technical assistance.

## REFERENCES

1. Skóra J., Matusiak K., Wojewódzki P., Nowak A., Sulyok M., Ligocka A., Okrasa M., Hermann J. and Gutarowska B. (2016) [Evaluation of Microbiological and Chemical Contaminants in Poultry Farms](#). Int. J. Environ. Res. Public Health.; 13(2): 192. doi: 10.3390/ijerph13020192;
2. EFSA, (2008) Foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard, Draft Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards (Question No EFSA– Q-2007- 089), Draft endorsed on 6 March, 2008;
3. Sukumaran, D.P., Durairaj S. and Hatha A. M. (2012) Antibiotic resistance of *Escherichia coli* serotypes from Cochin Estuary. Interdiscip. Perspect. Infect. Dis. P 7;
4. Yadav, K.K., Adhikari, N., Khadka, R., Pant, A.D. and Shah, B. (2015) Multidrug resistant Enterobacteriaceae and extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli*: A cross-sectional study in national kidney center, Nepal. Antimicrob. Resist. Infect. Control.; 4: 42;
5. Paterson, D. L., (2006) Am. J. Med.; 119: 520–528;
6. Denton, M., (2007) Int. J. of Antimicrobial Agents; 29-22;
7. Kilonzo-Nthenge, A., Rotich, E. and Nahashon, S.N. (2013) Evaluation of drug-resistant Enterobacteriaceae in retail poultry and beef. Poult. Sci.; 92: 1098-1107;
8. Benameur, Q., Guemour, D., Hammoudi, A., Aoudia, K., Aggad, H., Humblet, M.H. and Saegermang, C. (2014) Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from chickens in West of Algeria. Int. J. Sci. Basic Appl. Res.; 13: 366-370;
9. Cortes, P., B. Vanessa, M. Azucena, D. Ghizlane, E. B. Jesus, B. Miguel, A. Antonia L.Cecilia, N. Ferran, P. A. María, B. German, B. Jorge, and L. Montserrat. (2010) Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. Appl. Env. Microbiol.; 6: 2799-2805;
10. Ansari, A.R.M.I.H., Rahman, M.M., Islam, M.Z., Das, B.C., Habib, A., Belal, S.M.S.H. and Islam, K. (2014) Prevalence and antimicrobial resistance profile of *Escherichia coli* and *salmonella* isolated from diarrheic calves. J. Anim. Health Prod.; 2 (1): 12-15;
11. Ojo, Oe., G. O. Olatunde, A. Michael, O. James, O. K. Olugbenga, and A. O. Mufutau. (2012) Antibiogram of Enterobacteriaceae from free-range chickens. Vet. Archiv.; 82:577–589;
12. Swartz, M. N. (2002), Human diseases caused by foodborne pathogens of animal origin. Clin. Infect. Dis.; 34: S111-S122;
13. Karlowsky, J. A., M. E. Jones, C. Thornsberry, I. R. Friedland, and D. F. Sahn.; (2003) Trends in antimicrobial susceptibilities among Enterobacteriaceae isolated from hospitalized patients in the United States from 1998 to 2001. Antimicrob. Agents Chemother.; 47:1672-1680;
14. Mercedes, D.V., Jesu´s, S.D., A´lvaro, P. and Jesu´s, R.B. (2013) Clinical management of infections caused by multidrug-resistant Enterobacteriaceae, Ther. Adv. Infect. Dis.; 1(2): 49-69;
15. Bushen, A., Tekalign, E. and Abayneh, M., (2021) Drug- and Multidrug-Resistance Pattern of Enterobacteriaceae Isolated from Droppings of Healthy Chickens on a Poultry Farm in Southwest Ethiopia. Infect. Drug Resist.; 14:2051-2058 <https://doi.org/10.2147/IDR.S312185>;
16. Murray, M., Salvatierra, G, Dávila-Barclay, A., Ayzanoa, B, Castillo-Vilcahuaman, C., Huang, M., Pajuelo, M.J., Lescano, A.G., Cabrera, L., Calderón, M., Berg, D.E., Gilman, R.H. and Tsukayama, P. (2021) Market Chickens as a Source of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in a Peri-Urban Community in Lima, Peru. Front. Microbiol.; 12:635871. doi: 10.3389/fmicb.2021.635871;
17. Hammoudi, A. and Aggad, H. (2008) Antibioresistance of *Escherichia coli* strains Isolated from chicken colibacillosis in Western Algeria. Turk. J. Vet. Anim. Sci.; 32: 123-126;
18. Aggad, H., Ammar, Y.A., Hammoudi, A. and Kihal, M. (2010) Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis. Glob. Vet.; 4: 303-306;
19. Messai, C.R., Khelef, D., Boukhors, K., Radji, N., Goucem, R. and Hamdi, T., (2013). Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens affected by colibacillosis in Setif. Afr. J. Microbiol. Res.; 7(21), pp. 2668-2669;
20. Benameur, Q., Ben-Mahdi, M.H., Benklaouz, M.B., Tali-Maamar, H., Assaous, F., Guettou, B. and Rahal, K. (2016) Analysis of high levels of multidrug resistant *Escherichia coli* from healthy broiler chickens in Western Algeria. Afr. J. Microbiol. Res.; 10: 1792-1797 ;

21. Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., et al. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.*; 18, 268–281. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x;
22. Adelowo, O.O., Fagade, O.E. and Agersø, Y.( 2014) Antibiotic resistance and resistance genes in *Escherichia coli* from poultry farms, Southwest Nigeria. *Journal of Infections in Developing Countries*; 8:1103-1112;
23. Bryan, A. W., Dishon, M. M. and Bram A.D. V.B. (2020) Quantifying the transmission of antimicrobial resistance at the human and livestock interface with genomics. *Clinical Microbiology and Infection*; 26:1612-1616;
24. Ramadan, H., Soliman,A.M., Hiott, L.M., Elbediwi. M., Woodley, T.A., Chattaway, M.A., Jenkins. C., Frye, J.G. and Jackson, C.R. (2021) Emergence of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Producing CTX-M, MCR-1, and FosA in Retail Food from Egypt. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*; 11:681588. doi: 10.3389/fcimb.2021.681588;
25. Benameur, Q., Tali-Maamar, H., Assaous, F., Guettou, B., Boutaiba Benklaouz, M., Rahal, K. and Ben-Mahdi, M.H. (2018) Characterization of quinolone-resistant Enterobacteriaceae strains isolated from poultry in Western Algeria: First report of *qnrS* in an *Enterobacter cloacae*. *Veterinary World*; 11(4): 469-473;
26. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2015) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-fifth Informational Supplement document M100S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute;
27. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2017) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twenty-seventh Informational Supplement Document M100-S27. 27th ed. CLSI, Wayne, PA;
28. Yulistiani,R., Praseptiangga, D., Sudibya, S., Raharjo, D.and Shirakawa, T.(2017) Prevalence of Antibiotic-resistance Enterobacteriaceae strains Isolated from Chicken Meat at Traditional Markets inSurabaya, Indonesia. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering* 193 (2017) 012007;
29. Adebowale, O. and Adeyemo, O. (2018) Characterization of bacterium types isolated from commercial laying hen farms in Ogun State Nigeria. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*; 71 (3): 137-141, doi: 10.19182/remvt.31642;
30. Senior, B.W. (1997). Media and tests to simplify the recognition and identification of members of the Proteaceae. *J. Med. Microbiol.*; 46: 39-44. <http://dx.doi.org/10.1099/00222615-46-1-39>;
31. Francine. G. and Patrick. A.D.G. (2006). Chapter 3.3.9, Prokaryotes, the Genus *Enterobacter*; 6: 197-214.
32. Van Immerseel, F., De Buck, J., Pasmans, F., Bohez, L., Boyen, F., Haesebrouck, F. and Ducatelle, R. (2004) Intermittent long-term shedding and induction of carrier birds after infection of chickens early posthatch with a low or high dose of *Salmonella enteritidis*. *Poult. Sci.*; 83: 1911-1916;
33. Valancony, H., Fournier, G., Drouin, P., Toux, J. Y. and Colin, P. (2001) Disinfection of cage layer houses contaminated with *Salmonella Enteritidis*. *British Poultry Science*; 42: 539-40;
34. Boutaiba Benklaouz, M., Aggad, H. and Benameur, Q. (2020) Resistance to multiple first-line antibiotics among *Escherichia coli* from poultry in Western Algeria. *Veterinary World*; 13(2): 290-295;
35. Ahmed Ammar, Y., Moulay, M., Bouzid, R., Benameur, Q. and Aggad. H. (2017) Bacterial Resistance of Enterobacteraea isolates in Western Algeria. *J. Appl. Environ. Biol. Sci.*; 7(1)140-145;
36. Djeflal, S., Bakour, S., Mamache, B., Elgroud, R., Amir Agabou, A., Chabou., S., Sana Hireche S., Bouaziz, O., Rahal, K. and Jean-Marc Rolain, J.M. (2017) Prevalence and clonal relationship of ESBLproducing *Salmonella* strains from humans and poultry in northeastern Algeria. *BMC VeterinaryResearch*; 13:132;
37. Le Hello, S. (2013). The global establishment of a highly-fluoroquinolone resistant *Salmonella enterica* serotype *Kentucky* ST198 strain. *Front. Microbiol.* 18 December 2013, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00395>;
38. Weill, F.X. and Le Hello, S. (2011) Annual activity report: National Reference Center for *Salmonella* CNR.
39. Harris P, Paterson D and Rogers B. (2015) Facing the challenge of multidrug-resistant gram-negative bacilli in Australia. *M.J.A.*; 202(5):243–247. doi:10.5694/mja14.01257;
40. Reygaert, W.C. (2018) An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *A.I.M.S. Microbiol.*; 4(3):482–501. doi:10.3934/microbiol.2018.3.482;

41. Livermore, D., Hope, R., Brick, G., Lillie, M., Reynolds, R. and BSAC (2008) Working Parties on Resistance Surveillance. Non-susceptibility trends among Enterobacteriaceae from bacteraemias in the UK and Ireland, 200106. J Antimicrob Chemother 62(Suppl. 2): ii41ii54 ;
42. Canton, R., Akova, M., Carmeli, Y., Giske, C., Glupczynski, Y., Gniadkowski, M. et al. (2012) Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. Clin. Microbiol. Infect.; 18: 413-431;
43. World Health Organization (2017) Critically Important Antimicrobials for Human Medicine, 5th Revision. Available from: <http://www.who.int/foodsafety/publications/antimicrobials-fifth/en/>;
44. World Health Organization (2015) Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. Available online at: <http://www.emro.who.int/health-topics/drug-resistance/global-action-plan.html> (accessed October 14, 2019).
45. World Health Organization (2017) Global Framework for Development & Stewardship to Combat Antimicrobial Resistance. Available online at: [http://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/UpdatedRoadmap-Global-Framework-for-Development-Stewardship-to-combatAMR\\_2017\\_11\\_03.pdf?ua=1](http://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/UpdatedRoadmap-Global-Framework-for-Development-Stewardship-to-combatAMR_2017_11_03.pdf?ua=1) (accessed October 14, 2019).