



1019THV-1

REPUBLICQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE D'ENSEINGEMENT SUPERIEUR ET DE
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES
UNIVERSITE SAAD DAHLAB -BLIDA 1-



Projet de fin d'étude
Pour l'obtention du diplôme de docteur vétérinaire

Thème :

**Antibioresistance et Béta-lactamase chez Escherichia
Coli à partir du poulet de chair**

Réalisé par :

❖ IRATNI KAHINA

JURY :

Promotrice : KECHIH.S. Médecin vétérinaire principal
Présidente: HAMMAMI. N. Maître Assistant ISV BLIDA
Examineur : SALHI.O. Maître Assistant ISV BLIDA

Année universitaire 2014/2015

Dédicace

Je dédie ce travail :

A mes chers parents Grace à leurs tendres encouragements et leurs grands sacrifices, ils ont pu créer le climat affectueux et propice à la poursuite de mes études.

Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération et mes profonds sentiments envers eux. Je pris le bon Dieu de les bénir, de veiller sur eux, on espérant qu'ils seront toujours fier de moi.

A mes chers frères : Fayçal Smail et sœur : Melissa qui me donnent le courage et l'esprit d'étude,

A mes tante : Samia et Hakima, et toute la famille

IRATNI

Ce travail n'existerait sans vous qu'il soit le témoignage de mon amour le plus s'insère

A mes proches amis Wisem, Farah, Nawal, Souhila

Ainsi a tous mes collègues de promo qui ont partagés ensemble des moments inoubliable au cours de cursus.

A tous ceux qui me sont chers et que j'ai oublié involontairement de citer.

A tous mes enseignements tout au long de mes études.

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Remerciement

Au terme de cette étude, il me revient de remercier vivement tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réussite de ce travail

Je remercie avant tout (الله) de sa grâce.

je remercie en particulier,

Dr Kechih Saliha, Responsable du service bactériologie médicale au niveau du laboratoire vétérinaire régional de Draa Ben Khadda; pour ces précieux conseils, sa compréhension et sa patience.

Que DIEU vous accorde longue vie et prospérité.

Les membres de jury

Mme Hammami .N .qui nous a fait l'honneur de présider notre jury.

Mr Salhi .O . Que nous remercions d'avoir accepté de faire partie de notre jury. Nous tenons à lui exprime toute notre gratitude.

A tous les enseignants et enseignantes du primaire à l'université qui m'ont accompagné durant cette périple et donne le plus possible d'eux même pour aller de l'obscurité a

A tous ceux qui me sont chers et que j'ai oublié
involontairement de citer.

A tous mes enseignements tout au long de mes études.

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la
réalisation de ce travail.

KAHINA

La liste des abréviations

- AM:** ampicilline
- AMC:** amoxicilline + acide
- ATM:** aztréonam
- C:** chloramphénicol
- C1G :** céphalosporine de première génération
- C2G :** céphalosporine de deuxième génération
- C3G :** cephalosporine de troisième generation
- CAZ :** ceftazidime
- CF :** céphalotine
- CRO :** ceftriaxone
- CS :** colistine
- CTX :** cefotaxime
- E :** erythromycine
- ENR :** enrofloxacin
- FT :** nitrofurantoïne
- GM :** gentamycine
- N :** néomycine
- NA :** acide nalidixique
- OX :** oxacilline
- P :** pénicilline
- SXT:** triméthoprime/sulfaméthoxazole
- TE :** tétracycline
- UB :** flumequine
- VA :** vancomycine
- XNL :** céftiofur

BLSE : β -lactamases à spectre élargi

CARB : carbénicillinase

CTX-M: céfotaximase-Munich

DBK: Draa Ben Khedda

EDTA : acide éthylène-diamine-tétracétriq

INMV : Institute National de Médecine Vétérinaire

IPA : Institute Pasteur d'Algérie

LVR : laboratoire vétérinaire régional

ONPG : ortho-nitrophényle- β -D-galactopyranoside

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OXA : oxacillinase

R : rugueux

S: lisse

SHV: sulfhydryl-variable

TEM: temoneira

Liste des Tableaux

Partie expérimentale	Pages
TABLEAU01 : Les principaux caractères biochimiques d'<i>Escherichia Coli</i>.....	18
TABLEAU02 : les souches d'<i>Escherichia coli</i> purifiées, leurs nombre et leurs origines..	23
TABLEAU03 : les différents caractères de colonie de germe purifié (<i>Escherichia Coli</i>).23	23
TABLEAU04 : pourcentages de résistance et de sensibilité d'<i>Escherichia coli</i>.....	29

Liste des figures

Figure n°1 : Test de synergie photo prise au laboratoire régional de DBK.....	22
Figure n°2 : Test de sensibilité réalisé sur une souche d' <i>Escherichia coli</i>	28
Figure n°3 : Pourcentage de résistance et de sensibilité des souches d' <i>Escherichia coli</i> aux antibiotiques testés.....	30

Résumé :

L'objectif de ce travail est l'étude de la caractérisation de la résistance de souches d'Escherichia Coli isolée à partir du poulet de chair des β -lactamines, et la recherche des BLSE.

Cette étude nous a permis d'instauré un protocole globale sur les démarches à suivre lors d'un traitement avec les antibiotiques selon les cas constaté et les exigences de la situation afin de mieux choisir l'antibiotique efficace et éviter les résistances consécutives .

Mots clés : antibiotiques, Antibioresistance, BLSE, E. coli

Abstract:

The purpose of this review is to the study characterisation of stand *Escherichia Coli* isolate from chicken broiner of β -lactamines, and reherch the BLSE.

This study has established us a comprehensive Protocol on what to do when trated with antibiotics is according to the recorded cases and they require; pents of the situation to better choose effective and ovoid antibiotic resistance poultry farming.

الملخص:

الغرض من هذا الاستعراض تلخيص لمحة عامة عن استخدام المضادات الحيوية هو مجال تربية الدواجن بما في ذلك حالة المقاومة للمضادات الحيوية لوحظ بعد استخدام المضادات الحيوية بطريقة معقولة وبشكل عشوائي. وقد أنشأت هذه الدراسة لنا بروتوكول شامل حول ما يجب القيام به عند التعامل مع المضادات الحيوية وفق الحالات المسجلة ، وأنها بحاجة إليه لاختيار أفضل مضاد حيوي فعال للدواجن. الكلمات المفتاح المضادات الحيوية ب اس ض المضادات الحيوية

Sommaire

Introduction1

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les entérobactéries

1-Habitat2
2-Caractères cultureux2
3-Caractères morphologique.....2
4-caractères antigéniques3

Chapitre II: Généralités sur les antibiotiques.....4

1-Définition des antibiotiques.....4
2-Caractéristique des antibiotiques.....4
2.1-Toxicité sélective.....4
2.2-Spectre d'activité.....4
2.3-Activité antibactériennes.....4
3-La classification et le mode d'action des antibiotiques.....5

Chapitre III : La résistance bactérienne.....6

1-Définition de l'Antibioresistance.....6
2-La résistance naturelle6
3-La résistance acquise.....6
4-Les principaux mécanismes de l'Antibioresistance.....7

Chapitre IV : La résistance aux β -lactamines par la sécrétion des β -lactaminases.....8

1-Généralité sur les β -lactamines.....8
2-Mécanisme hydrolytiques des β -lactaminases.....8
3-La classification des β -lactaminases.....11
4-Généralités sur les BLSE.....11
5-Les principaux types de BLSE11

6-Les inhibiteurs de β -Lactaminases.....	12
7-La synergie entre β -Lactamines et les inhibiteurs de β -Lactaminases.....	12

Partie expérimentale

1-L'objectif.....	13
2-Matériel et Méthodes	13
12.1-Matériel.....	13
2.1.1-Matériel biologique.....	13
2.1.2-Matériel de laboratoire.....	13
2.2-Méthodes.....	14
2.2.1-identification des germes	14
2.2.2-Etude de l'Antibioresistance	19
2.2.3-La recherche des BLSE chez les entérobactéries.....	21
3-Résultats et interprétation	22
3.1-Résultats.....	22
3.1.1-Identification de l'espèce bactérienne purifiée.....	23
3.1.2-Tests de sensibilité aux antibiotiques (antibiogrammes).....	23
3.1.3-Test de recherche des BLSE (tests de synergie).....	23
3.1.4-Méthodes de détection des BLSE.....	23
2.1.5-Test de confirmation ou technique du double disque.....	26
3.1.6-Contrôle de qualité.....	27
3.2-Discussion.....	30
3.2.1-Tests de sensibilité aux antibiotiques (antibiogrammes).....	30
3.2.2-Recherche des BLSE	30
Conclusion.....	31

Introduction

Introduction :

L'intensification de la production en élevage avicoles a augmenté considérablement le risque d'apparition de pathologies divers ;maladies virales et bactériennes en particulier.la conséquence de telle situation est, le besoin de plus en plus croissant aux méthodes de prévention, ainsi qu'aux moyens de traitement .la thérapeutique antibiotique ou, antibiothérapie constitue un des moyens les plus souvent mis en œuvre .

Malgré que l'émergence de l'Antibioresistance, chez les bactéries d'origine animale, constitue un danger pour la santé humaine. Le nombre de travaux réalisés sur l'Antibioresistance des bactéries d'origine animale est beaucoup plus faible par rapport au nombre de travaux réalisés Sur les bactéries d'origine humaine.

Chez les entérobactéries les β -lactamases constituent le principal mécanisme de résistance vis-à-vis des β -lactamines. Les espèces de cette famille sont, en effet, des bactéries à gram négatif ayant un caractère ubiquitaire. Elles se caractérisent également, par leur grande capacité à acquérir une résistance vis-à-vis des différentes familles d'antibiotique, ainsi que leur capacité à résister aux céphalosporines de troisième génération (C3G) par la production des β -lactamases à spectre élargie (BLSE).

Notre travail comporte une partie, correspond à une synthèse bibliographique dans laquelle sont abordés des généralités sur les antibiotiques et leur usage en élevage de rentes, les conséquences de cet usage.

L'objectif de mon étude est la caractérisation de la résistance de souches d'entérobactéries chez le poulet de chaire et la recherche des BLSE.

Partir bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les entérobactéries

La création de la famille des *enterobacteriaceae* a été proposée par RAHN en 1937 (JOLY et REYNAUD, 2003 ; EUZEBY, 2005). Même si le nom de famille est toujours maintenu, le classement des bactéries au niveau de cette famille a beaucoup évolué. Les espèces bactériennes appartenant aux entérobactéries ont une forte similitude (JOLY et REYNAND, 2003). Elles sont non sporulées, chimio-organotrophes et elles ont à la fois un métabolisme respiratoire et fermentatif (EUZEBY, 2005).

1-Habitat

Les entérobactéries sont souvent retrouvées dans le tube digestif de l'homme et celui de l'animal, le sol, l'eau et sur les plantes (EUZEBY, 2005 ; FRENEY et CROZE, 2007).

2-Caractères cultureux

Les espèces de cette famille se développent facilement sur les milieux ordinaires. Le temps moyen de division de ces bactéries, est compris entre 20 et 40 mn. On distingue trois types de colonies :

- S (lisse), colonies bombées, rondes, bords nets, surface lisse et brillante ;
- R (rugueux), colonies sèches, plates et contour irrégulier. Ce type de colonies correspond à des bactéries vieilles ou anormales ;
- M (muqueux), colonies plus grandes que celles habituelles, leur diamètre peut atteindre 10 mm, elles ont une consistance gélatineuse et une tendance à la confluence.

3-Caractères morphologiques

Les bactéries de cette famille sont des bacilles à Gram négatif, de 2 à 3 μm de longueur et de 0,6 μm de largeur (JOLY et REYNAND, 2003). La plupart de ces espèces sont mobiles grâce à une ciliature péri triche (EUZEBY, 2005). Cependant, certaines d'entre elles, comme celles de genre *klebsielle*, celles du genre *Shigella* et *yersinia pestis*, sont immobiles. Les espèces mobiles présentent des flagelles de 15 à 20 μm de longueur et de 20 nm de diamètre.

4-Caractères antigéniques

Les germes appartenant à cette famille possèdent tous des antigènes de paroi. De plus, la plupart d'entre eux présentent des antigènes communs. Certains de ces germes possèdent l'antigène K et ceux qui sont mobiles possèdent en plus des antigènes flagellaires.

5-Caractères biochimique

Les espèces de cette famille sont aérobies-anaérobies facultatives ; le plus souvent fermentent le D-glucose avec production de gaz. Elles réduisent les nitrates en nitrites, à l'exception de quelques souches d'*Erwinia* et de *Yersinia*. Elles sont oxydas-négatives et catalase-positives, à l'exception de quelques souches de *shigella dysenteriae*.

- Antibiotiques inhibant la synthèse des acides nucléiques (rifamycines, quinolones, et nitro-imidazoles).
- Antibiotiques actifs sur la synthèse des folates (sulfamides /trimethoprime) (LECLERC et, 1994 ; WEBER, 2007).

Chapitre II : Généralités sur les antibiotiques

1-Définition des antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances d'origine microbienne, synthétique ou semi-synthétique qui, même à des très faibles concentrations, inhibent ou tuent certains micro-organismes (SINGLETON, 2005).

2-Caractéristiques des antibiotiques

2.1-Toxicité sélective

Les antibiotiques se caractérisent par la toxicité sélective qui leur permet de tuer ou d'inhiber les germes pathogènes en portant le moins possible préjudice à l'hôte (PRESCOTT et, 2003). D'après PERRY et al. (2004), cette sélectivité est due à des différences dans les processus physiologique fondamentaux des cellules sensibles et des cellules insensibles.

2.2-Spectre d'activité

Le spectre d'activité est l'ensemble des espèces bactériennes sur les quelles l'antibiotique est actif (LECLERC et al. 1994 ; DELARRAS, 2007).

2.3-Activité antibactérienne

Les antibiotique sont soit bactéricides, soit bactériostatiques (TARTORA et al.2003).

- La bactériostase ou effet bactériostatique : est l'effet inhibiteur d'un antibiotique vis-à-vis des bactéries.
- La bactéricidie ou effet bactéricide : est l'effet létal d'un antibiotique vis-à-vis des bactéries (DELARRAS, 2007).

3-Classification et modes d'action des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être classés selon leur site d'action en :

- Antibiotique actifs sur la paroi bactérienne (β -lactamines, fosfomines et glycopeptides) ;
- Antibiotiques actifs sur les enveloppes membranaires (polymyxines)
- Antibiotiques inhibant la synthèse des proteines (aminosides, tétracycline, phénicoles, macrolides, lincosamides et strptogramines) ;

- Antibiotiques inhibant la synthèse des acides nucléiques (rifamycines, quinolones, et nitro-imidazoles).
- Antibiotiques actifs sur la synthèse des folates (sulfamides /trimethoprime) (LECLERC et, 1994 ; WEBER, 2007).

Chapitre III : L'Antibiorésistance

1-Définition de l'Antibiorésistance

Une souche bactérienne est dite résistante à un antibiotique donné quand elle est capable de se développer en présence d'une concentration en cet antibiotique significativement plus élevée que celle habituellement active sur les souches de cette espèce (LECLERC, 1995).

2-Résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque à un antibiotique est essentiellement due à la présence de gènes chromosomiques ; elle est donc commune à toutes les bactéries d'une même espèce. Elle peut être due à des particularités structurales s'opposant à l'action de l'antibiotique sur sa cible comme la présence d'une membrane externe chez les bactéries à Gram négatif les rendant naturellement résistantes aux antibiotiques de poids moléculaire élevé comme les glycopeptides. Elle peut être aussi due à des particularités métaboliques spécifiques : le bacille de la tuberculose par exemple n'est sensible qu'à un nombre restreint d'antibiotiques en raison de son métabolisme original. La résistance naturelle peut enfin être médiée par l'expression constitutive ou induite d'une enzyme d'inactivation ou par la mise en œuvre d'un processus d'échappement vis-à-vis de l'antibiotique. (Alpha Amadou DIALLO).

Dans tous les cas, la résistance naturelle fait partie des caractères normaux de l'espèce ; elle détermine le niveau de sensibilité « basal » des bactéries et définit le phénotype sauvage d'une espèce. C'est la résistance de classe. Elle est constitutive et touche toute une famille d'antibiotiques.

3-Résistance acquise

Ce terme est utilisé pour désigner le résultat d'un processus permettant à des bactéries d'une espèce originellement sensible de devenir résistante à un ou plusieurs antibiotiques. L'acquisition de ces résistances est déterminée par des modifications génétiques consécutives à des mutations ponctuelles ou à l'acquisition « de novo » de gènes de résistance exogènes. La capacité de multiplication très rapide des bactéries favorise la sélection d'événements génétiques favorables et la possibilité d'échange d'information même entre espèces lointaines leur conférant un très grand pouvoir d'adaptation aux contraintes du milieu. L'évolution des

mécanismes de résistance aux antibiotiques, et notamment aux β -lactamines illustre parfaitement ce phénomène. (Alpha Amadou DIALLO).

2-Les principaux mécanismes de l'Antibioresistance

2.1-La réduction de la perméabilité membranaire

La diminution de la perméabilité membranaire chez les bactéries à Gram négatif, se fait par la perte ou le dysfonctionnement de l'une des protéines constituant les porines, qui laissent diffuser les antibiotiques de faible masse moléculaire (LAVIGNE, 2007).

2.2- Le rejet de l'antibiotique à l'extérieur de la cellule bactérienne

Certaines bactéries, comme *Escherichia coli*, ont dans leur membrane plasmidique des pompes effluentes, qui permettent souvent aux bactéries d'expulser les antibiotiques vers le milieu extérieur.

2.3-La modification de la cible

La résistance d'une bactérie à un antibiotique donné, peut se faire par la modification de la cible de cet antibiotique. Ainsi, l'affinité des ribosomes pour le chloramphénicol peut être réduite par la modification de l'ARNr 23S sur lequel il se fixe.

2.4-L'utilisation d'une voie alternative

La résistance bactérienne à certains antibiotiques, peut se faire par l'utilisation d'une voie alternative pour éviter la séquence inhibée par ces antibiotiques (PRESCOTT et al., 2003).

2.5-Augmentation de la production du métabolite cible

Certaines bactéries augmentent la vitesse de production du métabolite cible et contrecarrent ainsi l'inhibition due à l'antibiotique (PRESCOTT et al. 2003 ; SINGLETON, 2005). Par exemple, quelques bactéries augmentent la vitesse de production de l'acide folique et contrecarrent ainsi l'inhibition due aux sulfamides (PRESCOTT et al. 2003).

Chapitre IV : La résistance aux β -lactamines par la sécrétion des β -lactamases

1-Généralité sur les β -lactamines

Les β -lactamases sont des enzymes d'une extrême diversité ; en effet, plus de 300 ont été caractérisées (PHILIPPON et ARLET, 2006). Ces enzymes hydrolysent les β -lactamines et confèrent de la résistance à plusieurs bactéries pathogènes (SHIZUCO et al. 2000). Elles se caractérisent par leur activité sur divers substrats (LABIA, 1990) et elles constituent le mécanisme de résistance naturelle et acquise aux β -lactamines (PHILIPPON et ARLET, 2006). Ces enzymes sont sécrétées dans le périplasme des bactéries à Gram négatif et dans le milieu extérieur des bactéries à Gram négatif. Cependant, de rares cas de liaison à la membrane cytoplasmique ont été signalés. Les mycobactéries ont une forte proportion de l'enzyme dans la couche d'acides mycolique (CHARLIER et al., 1998).

2-Mécanisme hydrolytiques des β -lactamases

Les β -lactamases inactivent les β -lactamines par hydrolyse du cycle β -lactame (CHARLIER et al., 1998 ; LABIA, 1999 ; GANGOUE PIEBOJI, 2007). Ce dernier est commun à toutes les molécules de cette famille (LABIA, 1999).

3-La classification des β -lactamases

Les β -lactamases sont très diversifiées. Pour cela, plusieurs classifications ont été proposées. Cependant, la classification d'Amber et celle de Bush-Jacoby-Medeiros sont les plus utilisées.

3.1-La classification d'Amber

En 1980, Amber a proposé une classification moléculaire, impliquant la connaissance de la structure primaire des β -lactamases (LABIA, 1999). Cette classification renferme quatre classes qui sont : la classe A, B, C, et D (LABIA, 1999 ; PHILIPPON et ARLET, 2006). Les enzymes appartenant aux classes A, C et D ont une serine active, alors que celles appartenant à la classe B, nécessitent les ions Zn^{++} pour leur activité (PHILIPPON et ARLET, 2006).

3.1.1-La classe A

Les β -lactamases de la classe A sont des enzymes à médiation chromosomique ou plasmidique. Elles se caractérisent par leur inhibition par l'acide clavulanique (VIDON et BOURDIN, 2005), et sont représentées principalement par les pénicillinas qui ont une activité élevée sur les pénicillines, mais elles sont aussi actives vis-à-vis des céphalosporines de première génération (C1G).

➤ Les principaux types de β -lactamases constituant la classe A

L'enzyme de référence est la *pénicillinas* de *staphylococcus aureus*. Grâce à l'homogénéité des enzymes de la classe A, les résultats obtenus sur l'enzyme de référence sont souvent extrapolables aux autres enzymes de cette classe (LABIA, 1999).

- **Les β -lactamases de type TEM (TEMONEIRA)**

Plus de 100 β -lactamases de type TEM ont été décrites (AL-JASSER, 2006). Les plus rencontrées sont nommées TEM-1 et TEM-2. Ces deux enzymes diffèrent par un seul acide aminé. En effet, l'enzyme TEM-1 possède une glutamine en position 39 ; alors que, l'enzyme TEM-2 possède une lysine dans la même position. Cette substitution d'acide aminé est à l'origine de la différence du point isoélectrique de ces deux enzymes. Il existe également une enzyme nommée TEM-13.

Cette enzyme a le même point isoélectrique que celui de TEM-2 dont elle dérive ; elle possède également des propriétés catalytiques voisines de TEM-1 et de TEM-2. Diverses autres β -lactamases ont été caractérisées et sont dites TEM-like enzymes.

- **Les β -lactamases de type SHV (SULFHYDRYL VARIABLE)**

Ces enzymes se rencontrent souvent chez les espèces appartenant au genre *Klebsiella*. L'enzyme la plus connue et la plus fréquemment rencontrée est SHV-1. Cette enzyme présente 68% d'homologie avec les β -lactamases de type TEM.

- **Les β -lactamases de type CARB (CARBENICILLINASES)**

Les carbénicillinas sont des β -lactamases de type CARB ayant une activité vis-à-vis de la carbénicilline. Les β -lactamases des types CARB, TEM et SHV possèdent deux cystéines homologues liées par un pont disulfure (LABI, 1999).

3.1.2-La classe B

Cette classe est composée de métallo-enzymes à médiation chromosomique ou plasmidique. Elles sont insensibles à l'acide clavulanique (VIDON et BOURDIN, 2005). Ces métallo-enzymes possèdent une activité hydrolytique importante sur les carbapénèmes.

3.1.3-La classe C

Elle est constituée de céphalosporinases. Celles-ci, confèrent aux bactéries, une grande résistance vis-à-vis des CIG et une résistance variable vis-à-vis des céphalosporines de deuxième génération (C1G) (LABIA, 1999). Les enzymes de cette classe sont le plus souvent à médiation chromosomique et sont insensible à l'acide clavulanique (VINDON et BOURDIN, 2005).

3.1.4-La classe D

Cette classe est représentée par des pénicillinases de type oxacillinase (OXA) (LABIA, 1999 ; VINDON et BOURDIN, 2005). Elles ont une activité hydrolytique importante vis-à-vis de l'oxacilline et de ses dérivés (LABIA, 1999).

3.2-La classification de Bush-Jacoby-Medeiros

La classification de Bush-Jacoby-Medeiros est basée sur le profil de substrat et le profil d'inhibition.

4-Généralités sur les BLSE

Les β -lactamases à spectre élargie ou étendu désignent des enzymes « β -lactamine » produites par les entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *acinetobacter spp* entraînant la diminution de l'activité des C3G et des monobactam, mais n'ont aucune activité vis-à-vis des céphamycines et des carbapénèmes (AMMARI et al., 2008 ; ABOUN et al., 2008). Ces enzymes dérivent par mutation des β -lactamases connues depuis longtemps comme : TEM, SHV, (LABIA, 1999 ; DUBOUIX et MARTY, 2004). Elles sont d'origine plasmidique et elles se caractérisent par la modification de leur site actif ; cette modification entraîne une modulation de l'activité de ces β -lactamases (DUBOUIX et MARTY, 2004).

Il existe plusieurs types de BLSE. Cependant, celles appartenant aux types TEM, SHV, CTX-M (CéfOTAXIMASE-MUNICH) et OXA sont les plus importantes et les plus connues (VINDON et BOURDIN, 2005). A l'exception des BLSE de type OXA dérivant des β -lactamases de la classe D de la classification d'AMBER, toutes les autres BLSE dérivent des β -lactamase de la classe A (MAPAR, 2008).

5-Les principaux types de BLSE

5.1-Les BLSE de type TEM

Les BLSE de type TEM dérivent de TEM-1, qui est la β -lactamase la plus fréquemment rencontrée chez les bacilles à Gram négatif. Ces BLSE sont généralement retrouvées chez les espèces du genre *klebsielle* et *Escherichia coli*.

5.2-Les BLSE de type SHV

Ces enzymes dérivent de SHV-1 qui fait partie des β -lactamases de type SHV. Elles sont habituellement retrouvées chez les *klebsiella sp* et *Escherichia coli*.

5.3-Les BLSE de type CTX-M

Les BLSE de type CTX-M sont, le plus souvent, retrouvées chez les *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* et *klebsiella pneumoniae* (VIDON et BOURDIN, 2005). Elles sont généralement caractérisées par leur activité hydrolytique qui est plus importante envers le céfotaxime que le ceftazidime (VIDON et BOURDIN, 2005 ; MAPAR, 2008).

5.4-Les BLSE de type OXA

Ces enzymes dérivent des β -lactamas de type OXA (OXA-10, OXA-13,.....). Elles sont retrouvées principalement chez *Pseudomonas aeruginosa*, mais elles sont aussi retrouvées chez les *entérobactéries* (MAPAR, 2008).

6-Les inhibiteurs de β -Lactaminas

Certains inhibiteurs jouent le rôle de substrat avec l'enzyme. Il y a hydrolyse de l'inhibiteur et régénération de l'enzyme. Ces inhibiteurs sont appelés : inhibiteurs compétitifs réversibles. Ainsi, les pénicillines M et les C3G sont des inhibiteurs compétitifs réversibles vis-à-vis des céphalosporinases. D'autres inhibiteurs, sont responsables d'une inhibition compétitive irréversible. En effet, ces inhibiteurs sont fragmentés en différents composés qui se fixent sur des sites de l'enzyme autres que le site actif. L'enzyme est donc inactivée et l'inhibiteur est appelé inhibiteur suicide. Ainsi, l'acide clavulanique, le sulbactam et le tazobactam sont des inhibiteurs compétitifs irréversibles vis-à-vis de nombreuses BLSE.

7-La synergie entre β -lactamines et les inhibiteurs de β -lactaminas

Certains inhibiteurs de β -lactamases peuvent être utilisés en association avec quelques β -lactamines. En effet, en contact des bactéries, ces inhibiteurs et ces antibiotiques entrent en compétition pour se fixer sur les sites actifs des β -lactamases. Du fait que, ces inhibiteurs présentent généralement une meilleure affinité pour les β -lactamases, les β -lactamines peuvent s'échapper à l'action de ces enzymes, mais la concentration de ces inhibiteurs doit être suffisante pour inactiver toutes les molécules de β -lactamases produites par ses bactéries. Dans le cas où cette concentration est insuffisante, les molécules d'enzymes libres hydrolysent le même nombre de molécules d'antibiotique. Ainsi, si la vitesse d'hydrolyse de ces enzymes est faible, les β -lactamines restantes peuvent exercer leur activité antibactérienne (KAZMIERCZAK, 1999).

partie expérimental

Partie expérimental

1-l'objectif :

L'objectif de ce travail est l'étude de la caractérisation de la résistance de souches d'*Escherichia Coli* isolée à partir du poulet de chair des β -lactamines, et la recherche des BLSE.

Cette partie expérimentale a été réalisée au niveau de laboratoire vétérinaire régional de DBK à Tizi-Ouzou durant 8 semaines.

2-Matériel et méthodes

12.1-Matériel

2.1.1-Matériel biologique

Pour 350 prélèvements d'organes de volailles ont été effectués pour la recherche d'*Escherichia coli* ; dont 50 souches d'*E. Coli* ont été isolés.

L'antibiogramme ont été effectués et 5 BLSE ont été diagnostiqués et confirmés par les méthodes conventionnelles.

2.1.2-Matériel de laboratoire

Produits et réactifs

- Alcool 95° ;
- Disque d'antibiotiques, d'ONPG et d'oxydase ;
- Eau distillée ;
- Eau physiologique ;
- Etalon de 0,5 Mc Farland ;
- Fushine ;
- L'huile d'immersion ;
- Lugol ;
- Peroxyde d'hydrogène ;
- Réactif de Kovacs ;
- Réactif Voges Prauskauer : α -naphtol et KOH ou NaOH.
- Violet de gentiane.

Verrerie

- Boîtes de pétri stériles ;
- Flacons de différents volumes (225 ml, 500 ml et 1000ml) ;
- Lames et lamelle ;
- Pipettes de différents volumes (0,5 ml et 1 ml) ;
- Pipettes pasteur ;
- Tubes à vis stériles ;
- Tubes vacutainers.

Autres matériels

- Anse de platine à boucle et fil droit ;
- Ciseaux et écouvillons stériles ;
- Minuterie électronique ;
- Pinces ;
- Plateaux métallique et portoirs.

2.2-Méthodes

2.2.1-Identification des germes

2.2.1.1-Etude macroscopique

Dans cette étude, nous commençons d'abord par la purification, qui se réalise par repiquages successifs sur milieu Hektoen ou Mac Conkey jusqu'à l'obtention de colonies pures. Pour chaque repiquage, l'incubation se fait à 35°C pendant 18 à 24h. Après purification, nous effectuons l'étude des caractères des germes (formes de colonies, couleur, diamètre et l'aspect de la surface).

2.2.1.2-Etude microscopique

Elle est représentée par l'observation microscopique des cellules bactériennes qui ont subi la coloration différentielle de Gram.

➤ La coloration de Gram

Elle permet de diviser le monde bactérien en deux groupes distinct qui sont bactéries à Gram négatif et bactéries à Gram positif. Elle nous renseigne également, sur la pureté de souches bactériennes. Cette technique nous permet aussi d'étudier la morphologie bactérienne (forme, disposition). La technique de « Gram » comporte les étapes suivantes :

- Préparer le frottis bactérien ;
- Recouvrir avec le violet de gentiane et laisser agir pendant une minute, puis rejeter le colorant en excès et rincer à l'eau ;
- Fixer la préparation avec le Lugole pendant une minute et rincer à l'eau ;
- Décolorer à l'alcool à 95° pendant 30 secondes et rincer à l'eau courante ;
- Recouvrir la lame avec un deuxième colorant (fushine) pendant une minute et rincer à l'eau ;
- Sécher la lame à l'air chaud et observer au microscope (objectif à immersion) au grossissement $\times 100$.

Les germes à Gram positif se colorent en violet, alors que les Gram négatif se colorent en rose.

2.2.1.3-Etude biochimique

Les tests biochimiques ont comme objectif la distinction entre les bactéries d'espèces et de genre différents. Cette distinction se réalise par la détermination des différences entre leurs métabolismes (SINGLETON, 1999).

Tableau n°1 ci-dessous montre les principaux caractères biochimiques des *Escherichia Coli*.

2.2.1.3.1-Recherche des enzymes respiratoires

➤ Recherche de la catalase

Le test de la catalase consiste à mettre en contacte les cellules bactériennes avec le peroxyde d'hydrogène ; la présence de l'enzyme (catalase) se traduit par l'apparition de bulles de gaz (oxygène) (SINGLETON, 2005).

➤ Recherche de l'oxydase

Les bactéries sont mises dans un tube contenant 0,5 ml d'eau physiologique stérile. Un disque « OX », imprégné de N, N, N, N-tétraméthyl-1,4-phénylénediamine, est ensuite ajouté dans cette suspension. Dans le cas où le test est positif, il ya formation de

l'indophénol et la couleur de la suspension devient alors violacée après 30 à 60 secondes. Cette couleur persiste pendant 15 mn environ. Dans le cas inverse, la coloration de la suspension ne change pas (DELARRAS, 2007).

2.2.1.3.2-Métabolisme des glucides

- **Test ONPG (ortho-nitrophényle- β -D-galactopyranoside)**

Le test ONPG a comme objectif, la détection de la présence de la β -D-galactosidase dans une cellule bactérienne donnée (SINGLETON, 2005).

Des bactéries prélevées à partir d'un milieu lactosé gélosé, sont mises dans 0,5 ml d'eau distillé stérile. Un disque d'ONPG est ensuite ajouté à cette suspension. L'incubation se fait au bain marie à 37°C pendant 15 à 30 mn. Le test positif se traduit par l'apparition d'une couleur jaune (DELARRAS, 2007).

- **Test au rouge de méthyle (RM)**

Le milieu Clark et Lubs estensemencé par le germe à tester et incubé à 35-37°C pendant 48h.

Une à deux gouttes de la solution de rouge de méthyle, sont ensuite ajoutées à deux ml du milieu d'incubation. La réaction positive se traduit par une teinte rouge, alors que, la réaction négative se manifeste par une teinte jaune.

- **Test de Voges-Proskaur (VP)**

Un volume de 5 ml du milieu Clark et Lubs estensemencé avec deux gouttes d'une suspension bactérienne d'opacité équivalente à 0,5 Mc Farland et incubé à 35-37°C pendant 48h. La lecture se fait après l'addition de 0,5 ML d' α -naphtol à 6% et de 0,5 ml de KOH 4M ou de NaOH à 1 ml du milieu d'incubation. Le test positif se traduit

par l'apparition d'une coloration rouge en surface au bout de 10 à 15 mn (RENAUD et al. 2007).

Métabolisme des peptides

- **Test de l'indole**

Ce test met en évidence la production de l'indole à partir de tryptophane (SINGLETON, 1999). Le milieu eau peptonée exempt d'indole est ensemencé avec le germe à étudier et incubé à 37°C pendant 24 à 48h. La lecture se fait après l'addition de 0,5 ml du réactif de Kovacs à la culture bactérienne. Le test positif se traduit par l'apparition de la coloration rouge à la surface du milieu (DELARRAS, 2007).

- **Test de l'urée**

L'objectif de ce test est la détermination de l'existence ou de l'absence de l'uréase. Le milieu urée indole est ensemencé à partir d'une culture pure sur milieu gélosé et incubé à 37°C pendant 24h. La présence de l'uréase est indiquée par l'apparition d'une couleur rouge violacée dans le milieu.

2.2.1.3.3-Etude des substrats énergétiques

- **Test de Kligler-Hajna (KIA)**

Il permet de mettre en évidence la fermentation du glucose (avec ou sans production de gaz), la fermentation du lactose et la production d'hydrogène sulfuré (H²S). L'ensemencement du milieu Kligler-Hajna, est suivi d'une incubation de 24 h à 37°C. La production d'H²S se traduit par l'apparition d'une coloration noire.

La fermentation du glucose est indiquée par le virage du culot au jaune, alors que le virage de la pente au jaune est la conséquence de la fermentation du lactose. La production de gaz lors de la fermentation du glucose se traduit par l'apparition de bulles de gaz dans la masse gélosée (ANONYME, 2003).

- **Test de mannitol mobilité**

Le milieu mannitol mobilité est ensemencé par une pique centrale et incubé à 36-38°C pendant 18 à 24h. Le virage de l'indicateur de Ph du rouge au jaune est un indice de la

fermentation du mannitol. La création d'un trouble du milieu indique que le germe à étudier est mobile, alors que l'absence de ce trouble est un indice de l'immobilité du germe.

➤ **Test de Citrate de Simmons**

La propriété recherchée par ce test est la capacité d'un germe donné à utiliser le citrate de sodium comme seule source de carbone et d'énergie. Le milieu Agar Citrate de Simmons est ensemencé et incubé à 36-38°C pendant 24h. Le test positif se traduit par le virage de l'indicateur de Ph du vert au bleu (DELARRAS, 2007).

Le tableau suivant nous montre les principaux caractères biochimiques des *Escherichia Coli*.

Tableau n°1 : Les principaux caractères biochimiques des *Escherichia coli* purifiées (BRENNER, 1984 ; LE MINOR ET RICHARD 1993 cités par JOLY et REYNAUD, 2003).

Germe / caractère	<i>Escherichia coli</i>
Mannitol	+
Lactose	+
Glucose	+
Gaz	+
H ² S	-
Uréase	-
Indole	+
Citrate de Simmons	-
Voges-Prauskauer	-
Rouge de méthyle	+
Test ONPG	+

2.2.2-Etude de l'Antibioresistance

2.2.2.1-Antibiogrammes

Les antibiogrammes sont réalisés par la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques sur gélose Muller-Hinton.

Technique

➤ Milieu

La gélose Muller-Hinton est liquéfiée, coulée dans des boîtes de pétri sur une épaisseur de 4 mm et séchée avant l'utilisation.

➤ Inoculum

Préparer une suspension bactérienne, en mettant des colonies prélevées à partir d'une culture pure 18 h dans 5 à 10 ml de l'eau physiologique stérile 0,9%. La valeur de la densité optique de cette suspension doit être comprise entre 0,08 et 0,1 à 625 nm. La densité de l'inoculum, peut être ajustée en ajoutant de l'eau physiologique dans le cas où elle est trop élevée, ou bien de la culture bactérienne dans le cas inverse.

➤ Ensemencement

Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, l'essorer pour le décharger au maximum et le frotter sur la totalité de la gélosée, de haut en bas en stries serrées.

L'opération de frottement doit être répétée deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de pivoter l'écouvillon sur lui-même et de le faire passer sur la périphérie de la gélose.

Remarque :

Le temps qui s'écoule entre la fin de la préparation de l'inoculum et l'ensemencement, ne doit pas dépasser 15mn.

➤ **Application des disques d'antibiotiques**

A l'aide d'un distributeur, les disques d'antibiotiques, dont le diamètre est équivalent à 6mm, sont déposés sur la surface de la gélose. Chacun d'entre eux, pressé à l'aide d'une pince bactériologique stérile pour assurer de son application. L'incubation se fait à 35°C pendant 18 h.

➤ **Lecture**

La lecture se fait en deux étapes :

- Mesurer les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse ;
- Classer les souches bactériennes en sensible, intermédiaires ou résistante, en comparant les diamètres de ces zone d'inhibition.

2.2.2.2-Le contrôle de qualité

Le contrôle de qualité a comme objectif, l'assurance et la vérification de :

- La précision et la fiabilité de la technique des tests de sensibilité ;
- La performance des milieux et des disques d'antibiotiques utilisés ;
- La performance du personnel effectuant les tests et la lecture.

➤ **La procédure de contrôle**

Le contrôle de qualité doit se faire en permanence, une fois par semaine et à chaque nouveau lot de Muller Hinton et /ou d'antibiotiques. Il se fait par l'utilisation des souches

de références. Les conditions opératoires réunies pour la réalisation des antibiogrammes sur les souches purifiées, sont les mêmes que celles réunies pour la réalisation des tests de contrôles de qualité. La lecture des résultats, se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.

2.2.3-La recherche des BLSE chez les entérobactéries

➤ Test de synergie

• Technique

Le test de synergie se réalise sur le milieu Muller-Hinton. Pour la plupart des entérobactéries, on dépose un disque d'amoxicilline + acides clavulanique, dont la charge est de 20/10 µg, à 3 cm, entre à centre de l'un des disques d'antibiotiques appartenant aux C3G. L'incubation se fait à 35°C pendant 18h. chez quelque espèces d'entérobactéries, comme *proteus mirabilis*, la recherche des BLSE se fait de la même manière, mais la distance séparant le centre du disque d'amoxicilline + acide clavulanique et le centre de chacun des disques des C3G utilisés, est de 4 à 4,5 cm (ABOUN et al., 2008).

La liste des antibiotiques utilisés pour la recherche des BLSE chez les *Escherichia Coli*, Leurs abréviations, ainsi que leurs charges sont représenté dans le tableau suivant.

- **Lecture**

La production des BLSE peut se traduire par l'apparition d'une image de synergie ou bouchon de champagne entre le disque d'amoxicilline + acide clavulanique et celui de l'une des C3G utilisées (ABOUN et al. 2003). Mais, dans le cas de l'absence de l'image de synergie, la production de BLSE sera suspectée devant toute diminution du diamètre au tour des disques des C3G utilisées (ABOUN et al. 2008).

3-Résultats et interprétation

L'objectif de notre travail est l'étude et la caractérisation de la résistance de souche d'*Escherichia coli* vis-à-vis des β -lactamines, et la recherche des BLSE.

3.1-Résultats

Nous avons pu purifier et identifier quelques souches d'*Escherichia coli*. Ces souches sont obtenues à partir du soucier du service bactériologique du laboratoire vétérinaire de DBK.

Le Tableau n°3 et n°4

Tableau n°3 : les souches d'*Escherichia coli* purifiées, leurs nombre et leurs origines

Souche	Nombre	Origine	Nombre de souches
<i>Escherichia coli</i>	50	Aviaire	350

Tableau n°4 : les différents caractères de colonie de germe purifié (*Escherichia Coli*)

Caractères	Diamètre	Forme	Couleur	Aspect de la surface
Germes				
<i>Escherichia coli</i>	1 à 2 mm	Ronde, bord régulier, plate	Jaune saumon	lisse

3.1.1-Résultats de la coloration de Gram

Après la coloration de Gram et l'obtention au microscope optique, au grossissement $\times 1000$, les souches purifiées se révèlent des bacilles à Gram négatif.

3.1.2-Test de sensibilité aux antibiotiques (antibiogrammes)

La figure 1, représente l'un des tests de sensibilité réalisé sur une souche d'*Escherichia coli*.

Rechercher une BLSE :

On recherchera une BLSE devant un diamètre inférieur aux valeurs suivantes :

- ❖ Cefotaxime (CTX ≤ 27 mm),
- ❖ Ceftazidime (CAZ ≤ 22 mm),
- ❖ Ceftriaxone (CRO ≤ 25 mm)
- ❖ Aztréonam (ATM ≤ 27 mm).

Méthodes de détection de la BLSE :

Test de synergie (selon Jarlier et Coll.) :

Principe :

Les BLSE dérivées des enzymes de classe A (Ambler) sont inhibées par les inhibiteurs de β -lactamases (acide clavulanique, Sulbactam et Tazobactam).

Technique :

La recherche de la BLSE se fait dans les conditions standards de l'antibiogramme en déposant un disque d'amoxicilline+acide clavulanique (AMC 20/10 μ g) à 30mm centre à centre d'un disque de C3G (Cefotaxime : CTX 30 μ g ou Ceftriaxone : CRO 30 μ g). Incuber 18H à 35° C.

Remarque : cette technique permet la mise en évidence des TEM et SHV.

Pour les autres BLSE de classe A (CTX-M, CMT, ...)

Le test de synergie doit être fait dans les mêmes conditions standards de l'antibiogramme en déposant un disque d'AMC à 30mm centre à centre d'un disque de : CAZ, CTX ou CRO et

ATM en raison de l'existence de phénotypes de résistance différents (céfotaximase ou Ceftazidimase ...).

Lecture :

La production d'enzyme peut se traduire par l'apparition d'une image de synergie ou bouchon de champagne entre les disques :

- AMC et CTX
- AMC et CAZ
- AMC et ATM.

Recommandation:

Chez *P. mirabilis*, *P. penneri*, *P. vulgaris*, *Morganella Morganii*, *Providencia stuartii*, les BLSE s'expriment à bas niveau ; dans ce cas, le test de synergie est optimisé en disposant les disques à une distance de 40 à 45mm au lieu de 30mm.

Absence de synergie :

En l'absence d'une image de synergie, la production de BLSE sera suspectée devant toute diminution du diamètre autour des disques de C3G.

Elle peut être due à :

- 1- La synthèse d'une BLSE de type CMT (Complexe Mutants TEM)
 - 2- L'association de plusieurs mécanismes : BLSE + Case hyper produite (entérobactérie).
- 1- La recherche de CMT : se fera en rapprochant les disques CTX- AMC de 20mm et 25mm au lieu de 30mm.
 - 2- La détection des BLSE chez les souches hyper productrices de Case est facilitée par:

La recherche d'une **synergie** entre AMC et Céfépime (CFP 30µg) ou Cefpirome (CPO 30µg SFM), car ce sont des molécules stables à l'action de la Case hyperproduite (recommandations du CA-SFM-2010).

Ou

L'inactivation de la Case en incluant de la Cloxacilline (0,25mg/ml - 0,30mg/ml) dans la gélose pour les entérobactéries du groupe 3.

3-L'usage de disque ou de bandelette E-test combinant une C3G et un inhibiteur enzymatique.

Risque d'erreur d'interprétation :

Chez *Klebsiella Oxytoca*, *P. vulgaris*, *P. penneri*, *Citrobacter koseri*, le test de synergie est positif avec Aztréonam et / ou Ceftriaxone, mais reste négatif avec Ceftazidime dont l'activité est conservée, signe d'hyperproduction de β -lactamases naturelle chromosomique ou Aztréonamase.

3.1.5-Test de confirmation ou technique du double disque

Ce test devra être fait systématiquement devant :

- L'absence de synergie avec diminution des diamètres des C3G
- La présence d'une résistance aux molécules suivantes : ampicilline, Ticarcilline, Céfazoline avec un diamètre <6mm, par contre l'AMC présente un diamètre d'inhibition.

Technique :

Ce test se fait dans les conditions standard de l'antibiogramme.

- Appliquer les disques d'antibiotiques :
 - Pour les entérobactéries :
Déposer un disque d'AMC et un disque de C3G (CTX ou CRO) à une distance de 30mm (centre à centre).

Partie expérimental

- Laisser diffuser les antibiotiques pendant une heure, à la température ambiante (sur la paillasse) la boîte sera déposée le couvercle vers le haut.
- Après 1H d'incubation, ôter le disque d'AMC (ou de TCC) et le remplacer par un disque de CTX ou CRO (ou CAZ).
- Incuber la boîte 18 H à 35°C.

Lecture et interprétation :

Le test du double disque est positif quand le diamètre d'inhibition du C3G, appliqué après diffusion du disque AMC ou TCC, est $\geq 5\text{mm}$ par rapport au diamètre d'inhibition du disque de C3G.

Exemple : diamètre de la CAZ = 16 mm ; diamètre de AMC + CAZ = 21mm donc souche BLSE(+)

L'interprétation du test consiste à répondre :

- Pour les entérobactéries : souche résistante à toutes les β -lactamines sauf pour les Céphamycines (céfoxitine) et l'Imipenème.

Contrôle de qualité :

Les mêmes techniques seront réalisées en parallèle pour les souches :

- *E. coli* ATCC 25922 non productrice de BLSE.
- *K. pneumoniae* ATCC 700603 productrice de BLSE.

Test à la Cloxacilline :

Principe :

Pour certaines souches de bacilles à Gram négatif, il est parfois difficile de distinguer sur l'antibiogramme habituel les hypersécrétions de Case (CHN) des BLSE.

La Cloxacilline, ajoutée au milieu pour l'antibiogramme (MH), inhibe in vitro les Cases et reste inefficace sur les pénicillinases des bacilles à Gram négatif

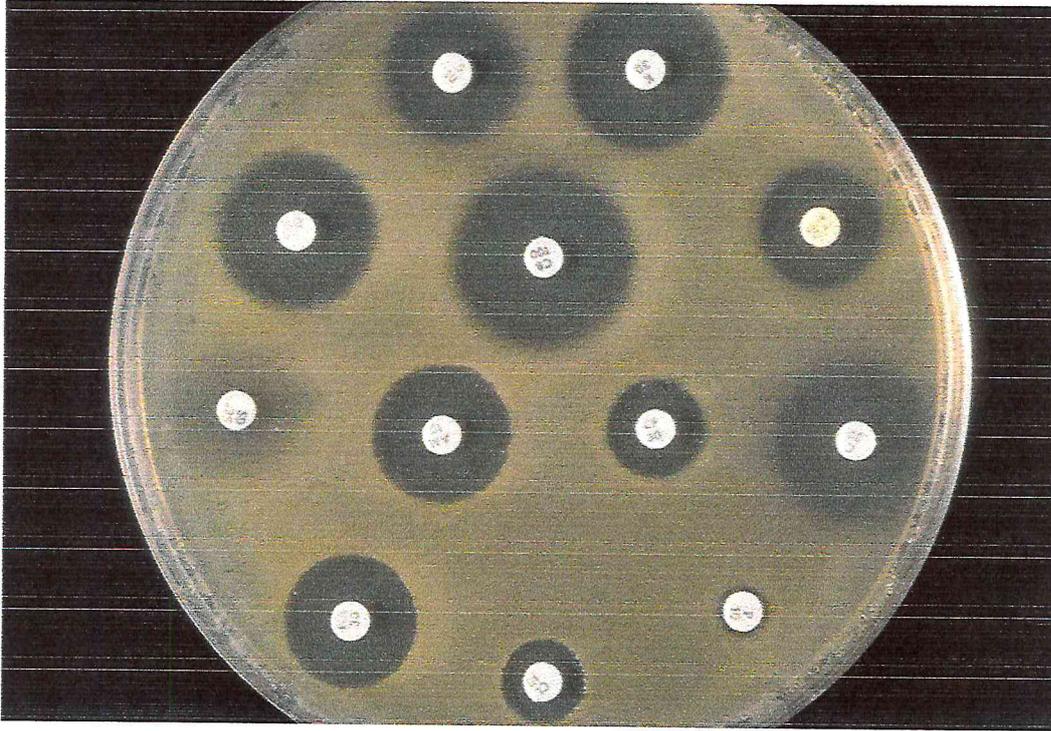


Figure 2 : Test de sensibilité réalisé sur une souche d'*Escherichia coli* (photo prise au laboratoire vétérinaire de DBK).

Le taux de résistance et de sensibilité des souches d'*Escherichia coli* germe purifiés vis-à-vis des antibiotiques testés, représentés dans le tableau n°5

Tableau n°4 : pourcentages de résistance et de sensibilité d'*Escherichia coli*

Germe	<i>Escherichia coli</i>	
Nombre de souches	50	
Pourcentage	(R + 1) %	S %
Antibiotique		
Ampicilline	50	50
Amoxicilline + acide clavulanique	50	50
Céftiofur	00	100
Céfalotine	41,67	58,33
Néomycine	41,67	58,33
Trimethoprime/sulfamethoxazole	41,67	58,33
Tétracycline	100	00
Acide nalidixique	33,33	66,67
Flumequine	8,33	91,67
Colistine	00	100
Chloramphénicol	00	10
Enrofloxacin	8,33	91,67
Nitrofurantoin	41,67	58,33

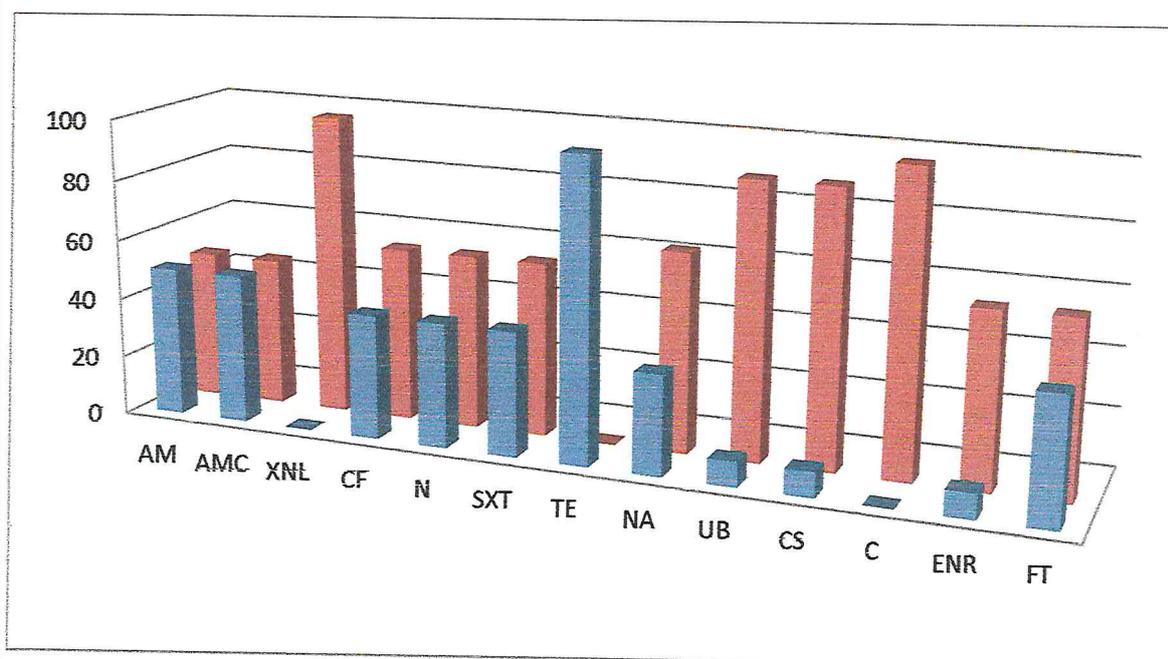


Figure n°3 : Pourcentage de résistance et de sensibilité des souches d'*Escherichia coli* aux antibiotiques testés.

Le taux de résistance des souches d'*Escherichia coli* vis-à-vis de la tétracycline est de 100% l'ampicilline et l'amoxicilline + acide clavulanique (5%), le triméthoprim/sulfaméthoxazole, la néomycine, la céfalotine et le nitrofurantoin (41,67 %), l'acide nalidixique (33,33 %), la flumequine et l'Enrofloxacin (8,33%). Ces souches sont sensibles au céftiofur, la colistine et le chloramphénicol.

2.2.2-Recherche des BLSE

Contrairement au nombre de travaux réalisés sur la recherche des BLSE produites par des souches bactériennes d'origine humaine, très peu de travaux sont réalisés sur la recherche des BLSE produites par des souches bactériennes d'origine animal.

Escherichia coli d'origine aviaire

Présence de quelques BLSE qui ont été détecté par les testes de synergie que nous avons effectués.

Conclusion

Conclusion :

Notre étude réalisée sur 50 souches d'Escherichia coli qui ont été isolés chez le poulet de chair, appartenant à la famille des entérobactéries, a permis de révéler l'existence de certaines résistances un ou plusieurs antibiotiques. En effet, l'espèce Escherichia coli étudié a manifesté des résistances vis-à-vis des antibiotiques les plus utilisés (l'ampicilline, l'amoxicilline + acide clavulanique, la céftiofur, l'Enrofloxacin).

Bien que l'usage des antibiotiques en alimentation animal, soit interdit en Algérie depuis Avril 2007 et que certains antibiotiques soient suspendus de l'homologation (Nitrofurantoin et chloramphénicol), cette étude, à l'instar d'autre études ont signalé des résistances vis-à-vis de ces antibiotiques. Ce qui prouve que ces molécules sont encore utilisées en élevage animal

Les résultats des tests de synergie se sont avérés positif avec isolation de 5 BLSE. En effet, la littérature a décrit que la fréquence de gènes responsables de la résistance aux C3G chez bactéries d'origine animal est faible.

Afin de minimiser les risques que représente l'utilisation excessive d'antibiotiques en élevage animal, il faut tenir compte des mesures suivantes :

- Le respect de la réglementation par les éleveurs et par les vétérinaires ;
- Le diagnostic précis et le bon choix de l'antibiotique par le vétérinaire ;
- Le respect des doses d'antibiotique par les vétérinaires, ainsi que la durée des traitements ;
- Le respect des délais d'attentes légales avant l'abattage ;
- La minimisation de l'usage des C3G en milieu vétérinaire, car c'est cet usage qui est à l'origine de l'apparition des souches bactériennes productrices des BLSE.
- La surveillance permanente et efficace de l'Antibioresistance dans le milieu vétérinaire.

Références bibliographiques

- ABOUN A. (2003).** Etude de la résistance des bactéries aux antibiotiques en milieu vétérinaire ; in « surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques, 5^{ème} rapport d'évaluation, Octobre 2003, projet de l'OMS ».
- ABOUN A. (2004).** Contrôle de qualité de l'antibiogramme et étude de la résistance des bactéries ; aux antibiotique en milieu vétérinaire ; in « Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques, 6^{ème} rapport d'évaluation, Octobre 2004, projet de l'OMS ».
- ABOUN A. (2005).** Etude de la résistance des bactéries aux antibiotiques en milieu vétérinaire ; in « Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotique, 7^{ème} rapport d'évaluation, Novembre 2005, projet de l'OMS ».
- ABOUN A., BAIT S., BELAZOUZ T., BELGUENDOZ N., BENELKADI S., BENMOHAMED S., CHABANE SARI N., KECHIH S., KORICHI M.N., KOUTCHOUKALI N. Et ZEMBRI. TAHRAT N. (2008).** Standardisation de l'antibiogramme en médecine vétérinaire à l'échelle national selon les recommandations de l'OMS., 4^{ème} éd.
- ABOUN A., BAIT S., BELGUENDOZ N., BENLKADI S., CHABANE SARI N., KECHIH S., KOUTCHOUKALI N., BELAZOUZ T., KORICHI M. N., ZEMBRI TAHRAT N., et ASSAOUS F. (2005).** Standardisation de l'antibiogramme en médecine vétérinaire à l'échelle national selon les recommandations de l'OMS., 3^{ème} éd.
- ABOUN A., BENELKADI S., KECHIH S., KOUTCHOUKALI N., LAFER O. et METALLAOUI N. (2003).** Standardisation de l'antibiogramme en médecine vétérinaire à l'échelle national selon les recommandations de l'OMS., 2^{ème} éd.
- 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
- AL-JASSER A.M. (2006).** Extended-Spectrum β -lactamases (ESBLs): a global problem.
Kuwait medical journal, 38 (3), pp 171-185.
- AMMARI H., BELOUNI R., BENSLIMANI A., KORICHI M.N., MERAD A.S., NAIM M., MISSOUM M.F.K., RAHAL K., RAMDANI BOUGUessa N., SMATI F., TALI**

- MAAMAR H. et TAHRAT ZEMBRI N. (2008).** Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS., 5ème éd.
- ANONYME. (2003).** Milieux de culture réactifs de laboratoire. IPA.
- AUBRY-DAMON H., GRNET K., NDIAYE SALL P., D., CORDEIRO E., RIGAUD E., VALENCIANO M., LIENARD M., DELZESCAUX D., DESENCLOS J.C et ANDREMONT A. (2001).** Résistance aux antibiotiques des bactéries commensales isolées chez les éleveurs de porc.
- BOUCHARDON A., BRISABOIS A., CHASLUS-DANCLA F., COLIN P., DABERNAT H., GUILLEMONT D., LECLERCQ R., MEGRAUD F., SCHLEMMER B. et TOUTAIN P.L. (2006).** diffusion de la résistance à l'homme et conséquences pour la santé publique ; in « usage vétérinaires des antibiotiques, résistances bactérienne et conséquences pour la santé humaine ». AFSSA.
- BRISABOIS A., KEMPF I., MEUNIER D., MILLEMANN Y., SANDERS P. et TOUTAIN P.L. (2006).** Impact de l'usage des antibiotiques sur la résistance chez l'animal (incluant la surveillance de la résistance bactérienne chez l'animal) ; in « usage vétérinaire des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humain ».
- BUSH K., JACOBY G.A. et MEDEIROS A.A. (1995).** A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, N°6? Vol. 39, pp. 1211-1233.
- CARDINAL E., PERRIER J.D., AIDARA A., TALL F., COUDERT C., GUEYE I.L. et KONTE M. (2000).** Identification d'une nouvelle salmonelle multirésistante dans une viande de poulet de chair au Sénégal. *Revue Elev. Méd. vêt. Pays trop.* 53 (1), pp. 5-8 ;
- CASIN I., BRISABOIS A., BERGER N., BREUIL J. et COLLATZ E. (1996).** *Resistance phenotype and genotype of 182 ampicillin-resistant Salmonella typhimurium strains of human and animal origin. Medicine et maladies infectieuses*, Vol. 26, pp. 426-430.
- CHARLIER P., COYETTE J., DEHARENG D., DIVE G., DUEZ C., DUSART J., FONZE E., FRAIPONT C., FRERE J.M., GALLEN M., GOFFIN C., JORIS B., LAMOTTE-BRASSEUR J. et NGUEN-DISTECHE M. (1998).** Résistance bactérienne aux β -lactamines. *Médecine/ science*, N°5, Vol. 14, pp. 544-555.

- CHAUVIN C., COLLIN P., GUILLOT J.F., LAVAL A., MILLEMANN Y., MOULIN G et PELLANNE I. (2006).** Usage des antibiotiques chez l'animal ; in « usage vétérinaire des antibiotiques, résistance bactérienne e conséquences pour la santé humaine ».AFSSA.
- COLEMAN D. (2004).** Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (PICRA). Agence de santé publique de canada.
- COURVALIN P (2008).**La résistance des bactéries aux antibiotiques : combinaisons de mécanismes biochimiques et génétiques. Bull. Acad. Vét, N°1, pp.7-12.
- DELARRAS C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Ed. TEC & DOC, Lavoisier, Paris.
- DUBOUX A. et MARTY N ? (2004).** Détection des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu par biologie moléculaire : avantage, limites, Elsevier Masson SAS, N°3, Vol.6, pp. 193-201.
- EUZEBY J.P. (2005).** Enterobacteriaceae, « Enterobacteriales ». Dictionnaire de Bactériologie vétérinaire.
- FISCH A. (1999).** Phénicoles ; in « antibiotiques agents antibactériens et antifongique ».Ed. Ellipses, Paris.
- FRENYE J. et CROZE M. (2007).** Enterobacteriaceae : généralités ; in « précis de bactériologie clinique ». Ed. ESKA. 2ème éd., Paris.
- GANGOUE PIEBOJI J. (2007).** Caractérisation des β -lactamases et leur inhibition par les extraits de plantes médicinales. Thèse de doctorat en Biochimie, Universitaire de Liège.
- GUERIN J.L. et BOISSIEU C. (2008).** Les colibacillooses ou infections à Escherichia coli. Ecole National vétérinaire, Toulouse.
- HADJBAR S., HALIL H. et SENOUSSE C. (2006).** Etude phénotypique de l'Antibioresistance de quelques entérobactéries responsables d'infections chez la volaille (Gallus gallus). Mémoire d'obtention du diplôme d'ingénieur d'Etat en biologie. Département de biochimie-microbiologie, Facultatif des sciences Biologiques et des sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou.

- JOLY B. et REYNAUD A. (2003).** Entérobactéries : systématique et méthodes de diagnostic. Ed. TEC & doc, Lavoisier, Paris.
- KAZMIERCZAK A. (1999).** Inhibiteur de β -lactamases ; in « antibiotiques agents antibactériens et antifongiques ». Ed. Ellipses, Paris.
- LABIA R. (1999).** Résistance bactérienne aux β -lactamines par production de β -lactamases ; in « Antibiotiques agents antibactériens et antifongiques ». Ed. Ellipses, Paris.
- LAVIGNE J.P. (2007).** Effet des antibiotiques et mécanismes de résistance. Faculté de médecine mont-pelcier, Nîmes.
- LECLERC H. (1995).** Morphologie-structure ; in « microbiologie générale : la bactérie et le monde bactérien ». Ed. Doin, Paris.
- LECLERC H., A MEYER A. et DEIANA J. (1994).** Cours de microbiologie générale : nouveau programme. Ed Doin, Paris.
- LOUNAS S. et HADJAB L. (2009).** Caractérisation de l'Antibioresistance et recherche des β -lactamases chez certaines entérobactéries d'origine aviaire. Mémoire d'obtention du diplôme d'ingénieur d'Etat en biologie. Département de biochimie-microbiologie, faculté des sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.
- MAPAR. (2008).** Les nouvelles β -lactamases à spectre étendu (BLSE). *Pathologie infectieuse en réanimation*, pp. 203-204.
- MATAGNE A., LAMOTTE-BRASSEUR J. et FRERE J.M. (1998).** Catalyse properties of class a β -lactamases: efficiency and diversity. *Biochem. J*, 330, pp. 581-598;
- MOUBAREK C., BOURGEOIS N. et DOUCET-POPULAIRE F. (2003).** L'utilisation des antibiotiques en pratiques vétérinaire et ses risques pour la santé humaine. *Environnement, Risque & Santé*, N°2, Vol. 2, pp. 97-104.
- NADEAU M., COTE G. et HIGGINS R. (2000).** Surveillance de l'Antibioresistance chez des bactéries d'origine aviaire et porcine de 1993 à 1999 au Québec. *Le Médecin vétérinaire de Québec*, N° 4, Vol.30, pp 193-199.

- PERRY J.J., STARLEY J.T et LORY S. (2004).** Microbiologie : cours et questions de révision. Ed. Dunod, Paris.
- PHILIPPON A. et ARLT G. (2006).** β -lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel ! Annales de biologie Clinique, N°1, Vol. 64, pp. 37-51.
- POLY M.C., LAMBERT T., GASSAMA A. et DENIS F. (2000).** Place des intégrons dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques. Annales de Biologie Clinique, N°4, Vol. 58, pp. 439-444.
- PRESCOTT L.M., HARLY J.P. ET KLEIN D.A. (2003).** Microbiologie. Ed. De Boeck Université. 2ème éd., Bruxelles.
- RENAUD F., BORREL T. et MARMONIER A. (2007).** Identification conventionnelle ; in « Précis de bactériologie clinique ».Ed. ESKA. 2ème éd., Paris.
- SCHAECHTER M. et EISENSTEIN B.I. (1999).** Génétique des bactéries ; in « Microbiologie et pathologie infectieuse ». Ed. De Boeck Université, Paris, Bruxelles.
- SHZUKO I., HARUKO K., JUNKO O., NAOKI M., SHINZABURO M., SHIN H., TETSUO S. et KOJI O. (2000).** Amino acid substitution in a variant of IMP-1 metallo- β -lactamases. Antimicrobien agent and chemotherapy, N°8, Vol. 44, pp. 2023-2027.
- SIMMONET M. (1988).** Structure, mode d'action des antibiotiques et mécanismes de Resistances bactérienne; in « Bactériologie : les bactéries des infections humaines ». Ed. Flammarion, Médecine-sciences. 1ère éd., Paris
- SIMMONET M. (1995).** Les agents antimicrobiens ; in « Microbiologie : la bactérie et le monde bactérien ». Ed. Doin, Paris.
- SINGLETON P. (1999).** Bactériologie. Ed. Dunod. 4ème éd., Paris.
- SINGLETON P. (2005).** Bactériologies. Ed. Dunod. 6ème éd., Paris.
- TORTORA G.J., FUNKE B.R. et CASE C.L. (2003).** Introduction à la microbiologie. Ed. ERPI, Québec.
- TRICIA D.M., WAYNE M. et PAUL D.B. (2006).** Antimicrobial resistance of Escherichia coli isolates from broiler chickens and humans. *BMC Veterinary Research*, N°7, Vol. 2.

VEYSSIER P. (1999). Aminoglycosides aminocyclitols; in « Antibiotiques agents antibactériens et antifongiques ». Ed. Ellipses, Paris.

VINDON O. et BOUDIN C. (2005). β -lactamases à spectre étendu (BLSE).

WEBER M. (2007). L'antibiogramme en pratique courante ; in « Précis de bactériologie clinique ». Ed. ESKA. 2^{ème} éd., PARIS ;

YALA D., MERAD A.S., MOUMEDI D. et OUAR KORICH M.N. (2001). Résistance bactérienne aux antibiotiques. *Médecine du Mghreb*, N°91, pp. 13-14.