République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Echahid Cheikh Larbi Tebessi –Tébessa-
Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Appliquée
Domaine des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master
En : Sciences biologiques.
Option : Microbiologie appliquée.

Par :
M^elle^. Lemita Saffa & M^elle^. Djabri Touka

Intitulé :

Phénotypes de résistance aux β-lactamines des souches d'entérobactéries isolées de la viande du poulet

Devant le jury :

Mme. AZIZI Nassima	MCB	Université de Tébessa	Présidente
Mme. DEBABZA Manel	Professeur	Université de Tébessa	Rapporteuse
Mr. MECHAI Abdelbasset	Professeur	Université de Tébessa	Co-Rapporteur
Mme. Touaitia Rahima	MCB	Université de Tébessa	Examinatrice

Date de soutenance : 09 / 06 / 2025



قَالُوا۟ سُبْحَٰنَكَ لَا عِلْمَ لَنَآ إِلَّا مَا عَلَّمْتَنَآ ۖ إِنَّكَ أَنتَ ٱلْعَلِيمُ ٱلْحَكِيمُ ﴿٣٢﴾

(سورة البقرة)

Remerciement

Avant toute chose, nos plus vifs remerciements vont à ALLAH, pour nous avoir accordé la force, la patience et la persévérance nécessaires à l'accomplissement de ce travail ; Alhamdoulilah.

Nous exprimons notre profonde gratitude et notre sincère reconnaissance à notre encadrante, Pr. Debabza Manel, Professeure en microbiologie à l'Université de Tébessa, pour son accompagnement bienveillant, son investissement constant et sa précieuse disponibilité tout au long de ce mémoire. Sa confiance, ses conseils éclairés et son soutien moral ont été d'un apport inestimable. Grâce à son engagement et à son professionnalisme, nous avons pu mener à bien ce travail dans les meilleures conditions.

Nos remerciements s'adressent également à notre co-directeur de mémoire, Pr. Mechai Abdelbasset, pour son encadrement rigoureux, ses remarques constructives et ses orientations pertinentes qui ont enrichi considérablement notre réflexion et notre démarche scientifique.

Nous remercions chaleureusement Dr. Azizi Nassima et Dr. Touaitia Rahima, membres du jury, pour avoir accepté d'évaluer notre travail, pour leur bienveillance et l'intérêt porté à notre recherche.

Nos remerciements les plus sincères vont aussi à Mme Imane, technicienne du laboratoire N°02 – Bloc B, pour sa disponibilité, sa gentillesse et son aide précieuse durant toute la période de réalisation des travaux pratiques.

Nous tenons également à exprimer notre reconnaissance à l'ensemble des enseignants qui nous ont accompagnés tout au long de notre parcours universitaire, en particulier ceux du département de microbiologie, pour la qualité de leur enseignement et leur engagement pédagogique.

À vous tous, un grand merci du fond du cœur pour votre soutien, vos encouragements et vos efforts dévoués.



Dédicace

Alhamdoulillah, qui m'a guidée et soutenue tout au long de ce chemin. Sans Sa volonté, je ne serais jamais arrivée jusque-là. **Alhamdoulillah**.

À la source de ma force, à mon cher père **Bouzid**, tu as toujours été mon pilier, mon inspiration, mon roc inébranlable. Tu as été, tu es, et tu resteras le meilleur des pères, un compagnon loyal et un soutien fidèle. Merci pour ton amour, ta présence, et ton dévouement sans faille. Je te dédie ce travail avec tout mon amour et ma gratitude profonde.

À celle qui a consacré sa vie pour moi, ma chère mère **Louiza**, toi qui as veillé, élevé, aimé sans compter. Tu es l'incarnation du courage, de la tendresse et de la foi. Tu es et resteras la meilleure des mères, un refuge de douceur et de force. Merci pour tes prières, ton amour infini et ton encouragement constant. Ce travail t'est dédié avec tout mon cœur.

À mes frères, **Khaled et Adel**, compagnons de toujours, vous avez été mes soutiens les plus solides, mes confidents et mes moteurs dans les moments difficiles. Vous avez cru en moi, vous m'avez portée par votre affection et votre présence. Merci d'avoir été là, toujours.

À toi, présence discrète et précieuse, qui as su rester près de moi tout au long de ce chemin… Ta confiance, ton soutien indéfectible et ton aide silencieuse ont été des lumières dans mes pas. Du fond du cœur, merci infiniment.

Aux deux plus beaux enfants du monde, **Hiba Errahmen et Abderraouf**, qui illuminent ma vie de leur innocence et leur amour.

À ma sœur de cœur, celle que la vie m'a offerte, **Yousra,** merci pour tout. Ton amitié, ta fidélité et ton soutien comptent plus que les mots ne peuvent l'exprimer.

À ma collègue et partenaire de mémoire, **Touka,** merci pour ta compréhension, ton soutien constant et ta collaboration précieuse.

À celles et ceux que la vie m'a généreusement accordés comme compagnons fidèles : **Rahma, Sara, Nermine, Imane, Insaf, Lamis et Kawther**. Merci pour votre amour sincère, votre présence lumineuse et vos encouragements inestimables.

À tous ceux qui m'aiment sincèrement, ce travail vous est dédié. Merci d'être là. Que ALLAH vous garde à mes côtés.

Safa



Dédicace

À ceux qui ont été les lumières guidant mon chemin, À mes chers parents,

Votre amour a été mon refuge, vos prières ma force silencieuse. À travers chaque épreuve, votre soutien indéfectible a illuminé ma route. Cet accomplissement vous revient autant qu'à moi.

À mes frères et sœurs,

Vos rires m'ont réchauffée, votre présence m'a donnée de la force. Dans votre joie, j'ai puisé le courage de continuer.

À mes enseignants,

Qui ont éclairé mon parcours avec sagesse et patience, Merci de m'avoir fait confiance et d'avoir nourri ma curiosité. Chaque leçon a laissé une empreinte qui m'a rapprochée de ce moment.

À cette âme silencieuse en arrière-plan, Qui n'a pas eu besoin beaucoup de mots pour laisser une trace profonde, À celui dont le soutien fut discret, mais sincère...Merci d'avoir été là, à ta manière unique.

Et par-dessus tout,

À la version de moi-même qui n'a jamais abandonné, Qui a tenu bon, qui a travaillé malgré l'épuisement et le doute, Je te vois, je te rends hommage. Tu as porté des rêves sur des épaules fatiguées et tu as continué d'avancer. C'est ta victoire, ton moment.

À toutes les nuits où je pensais ne jamais y arriver,

Me voilà.

Et pour cela, je dis : Alhamdoulillah.

Touka

Résumé

La résistance des entérobactéries aux antibiotiques a rapidement évolué, en particulier, aux β-lactamines, largement utilisées dans l'élevage avicole. L'objectif principal de cette étude est la caractérisation des phénotypes de résistance aux β-lactamines des souches d'entérobactéries isolées de la viande de poulet.

L'isolement sélectif des entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3ème génération et celles résistantes aux carbapénèmes, a été réalisé sur gélose MacConkey supplémentée respectivement en céfotaxime et en imipénème, puis suivi d'une identification par la galerie API 20E. Les tests phénotypiques utilisés dans la détection des β-lactamases sont : les tests de synergie et du double disque pour les β-lactamases à spectre étendu (BLSE), le test AmpC pour les céphalosprinases et les tests de Hodge modifié, Carba NP, mCIM et eCIM pour les carbapénémases.

Vingt-huit souches d'entérobactéries ont été isolées dont *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* et *Klebsiella oxytoca* étaient les plus fréquentes. Les tests de détection des β-lactamases ont révélé 10 souches BLSE (35,71 %), 14 AmpC (50 %) et 5 carbapénémases (17,85 %) dont 10,71 % de type métallo-β-lactamase (MBL) et 7,14 % de type sérine. Le taux de résistance aux β-lactamines testées était élevé, notamment à l'amoxicilline-acide clavulanique (71,43 %).

Au total, 22 des 28 souches (78,57 %) produisaient au moins une β-lactamase, dont 28,58 % exprimaient une AmpC, 25 % une BLSE et 25 % co-exprimaient deux β-lactamases (carbapénémase + AmpC/ BLSE ou AmpC+ BLSE).

Les résultats de cette étude ont montré la présence de souches d'entérobactéries produisant différents types de β-lactamases dans la viande de poulet, ce qui peut contribuer à la diffusion de ces bactéries résistantes, menaçant la santé publique. La surveillance de la résistance aux antibiotiques dans les produits avicoles est donc devenue essentielle avec le contrôle de l'utilisation des antibiotiques dans l'aviculture.

Mots clés : Entérobactéries, viande de poulet, résistance aux β-lactamines, β-lactamase à spectre étendu (BLSE), céphalosporinase (AmpC), carbapénèmases.

Abstract

The resistance of *Enterobacteriaceae* to antibiotics has rapidly evolved, particularly to β-lactams, which are widely used in poultry farming. The main objective of this study is to characterize the β-lactam resistance phenotypes of enterobacteria strains isolated from chicken meat.

Selective isolation of enterobacteria resistant to third-generation cephalosporins and carbapenems was performed on MacConkey agar supplemented with cefotaxime and imipenem, respectively, followed by identification using the API 20E system. Phenotypic tests used for β-lactamase detection included synergy and double-disk tests for extended-spectrum β-lactamases (ESBLs), the AmpC test for cephalosporinases, and the modified Hodge, Carba NP, mCIM, and eCIM tests for carbapenemases.

Twenty-eight *Enterobacteriaceae* strains were isolated, of which *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae ssp. pneumoniae, and Klebsiella oxytoca* being the most common identified species. β-lactamase detection tests revealed 10 ESBL-producing strains (35.71%), 14 AmpC strains (50%), and 5 carbapenemases (17.85%), including 10.71% metallo-β-lactamase (MBL) and 7.14% serine. The resistance rate to the tested β-lactams was high, particularly to amoxicillin-clavulanic acid (71.43%).

Overall, 22 out of 28 strains (78.57%) produced at least one β-lactamase, with 28.58% expressing AmpC, 25% expressing ESBL, and 25% co-expressing two β-lactamases (carbapenemase + AmpC/ESBL or AmpC + ESBL).

The results of this study highlight the presence of *Enterobacteriaceae* strains producing different types of β-lactamases in chicken meat, which may contribute to the dissemination of resistant bacteria, posing a threat to public health. Monitoring antibiotic resistance in poultry products has therefore become essential, with control antibiotic use in poultry farming.

Keywords: Enterobacteriaceae, chicken meat, β-lactam resistance, extended-spectrum β-lactamase (ESBL), cephalosporinase (AmpC), carbapenemases.

ملخص

مقاومة البكتيريا المعوية للمضادات الحيوية تطورت بسرعة، وخاصة ضد البيتالاكتام، التي تُستخدم على نطاق واسع في تربية الدواجن. تهدف هذه الدراسة بشكل رئيسي إلى تحديد الأنماط الظاهرية لمقاومة البيتالاكتام في عزلات بكتيرية معوية مستخرجة من لحم الدجاج .

تم عزل البكتيريا المعوية المقاومة للسيفالوسبورينات من الجيل الثالث وللكاربابينيمات باستخدام وسط MacConkey المُضاف إليه سيفوتاكسيم (CTX) وإيميبينيم(IMP) على التوالي ، تبع ذلك تحديد الأنواع باستخدام الاختبارات البيوكيميائية API 20E. تضمنت الاختبارات الظاهرية للكشف عن البيتالاكتاماز اختبارات التآزر واختبار القرص المزدوج للكشف عن البيتالاكتاماز ذو الطيف الممتد (BLSE)، واختبار AmpC للكشف عن السيفالوسبرياز، بالإضافة إلى اختبار Hodge المُعدل واختبارات Carba NP ، mCIM و eCIM لتحديد الأنزيمات الكاربابينيمية .

تم التحصل على 28 سلالة من البكتيريا المعوية، حيث كانت الأنواع الأكثر انتشارًا هي *Escherichia coli* ، *Klebsiella pneumoniae ssp pneumonia* و *Klebsiella oxytoca* . أظهرت اختبارات الكشف عن البيتالاكتاماز أن 10 سلالات (35.71%) تحمل النمط BLSE، و14 سلالة (50%) تحمل AmpC ، و5 سلالات (17.85%) تحمل كاربابينيماز، منها 10.71% من النوع المعدني (MBL) و7.14% من النوع السيريني (Sérine). كانت معدلات المقاومة للبيتالاكتامات مرتفعة، لا سيما تجاه أموكسيسيلين-حمض الكلافولانيك (71.43%).

بشكل عام، 22 من أصل 28 سلالة (78.57%) أظهرت إنتاج بيتالاكتاماز واحد على الأقل ، حيث عبّرت 28.58% عن AmpC، و25% عن BLSE، بينما 25% اظهرت تعبيرا مزدوجا عن اثنين من البيتا-لاكتاماز (كاربابينيماز + AmpC/BLSE أو AmpC + BLSE).

أبرزت نتائج الدراسة وجود سلالات بكتيرية معوية منتجة لأنواع مختلفة من البيتالاكتاماز في لحم الدجاج، مما قد يساهم في انتشار هذه البكتيريا المقاومة، ويشكل تهديدًا للصحة العامة. لذا، أصبح من الضروري مراقبة مقاومة المضادات الحيوية في المنتجات الدواجن، مع التحكم في استخدام المضادات الحيوية في قطاع تربية الدواجن .

الكلمات المفتاحية : البكتيريا المعوية، لحم الدجاج، مقاومة البيتالاكتام، البيتالاكتاماز ذو الطيف الممتد (BLSE)، السيفالوسبرياز (AmpC)، الكاربابينيماز.

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Valeur nutritionnelle pour 100 g de viande de poulet.	**03**
02	Principaux caractères biochimiques des Entérobactéries.	**10**
03	Diamètres critiques correspondants aux antibiotiques utilisés.	**41**
04	Interprétation des résultats du test Carba NP.	**51**
05	Interprétation des résultats des tests mCIM et eCIM combinés.	**54**
06	Résultats de culture sur géloses MC additionnées d'antibiotiques.	**55**
07	Caractères culturaux des différents types de colonies observés.	**56**
08	Résultats d'identification biochimique des isolats par API20E.	**58**
09	Nombre et pourcentage des souches selon les espèces.	**63**
10	Espèces isolées dans des études nationales similaires.	**64**
11	Espèces isolées dans des études internationales similaires.	**64**
12	Souches positives au test de synergie.	**67**
13	Résultats du test de double disque des souches positives au test de synergie.	**68**
14	Résultats des tests de détection des BLSE	**69**
15	Pourcentage des souches BLSE+ selon les espèces.	**70**
16	Diamètres pour FOX des souches suspectées de produire de céphalosporinases.	**73**
17	Diamètres pour IMP des souches suspectées de produire de carbapénèmases.	**73**
18	Répartition des souches productrices de céphalosporinase selon les espèces.	**77**
19	Résultats des tests mCIM et eCIM pour les souches testées	**81**
20	Souches expriment deux β-lactamases	**85**

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Etapes de l'abattage du poulet et sources de contamination associées.	**05**
02	Représentation catégorielle des principaux genres d'entérobactéries associés à divers écosystèmes.	**08**
03	Aspect des cultures de différentes espèces d'entérobactéries sur géloses spéciale.	**09**
04	Structure et aspect microscopique des *Enterobacteriaceae*.	**11**
05	Mode d'action des β-lactamines.	**14**
06	Mécanismes de résistance aux antibiotiques associés à la modification des porines.	**19**
07	Structure générale et fonction des pompes d'efflux RND.	**20**
08	L'action enzymatique d'une β-lactamase sur les pénicillines.	**21**
09	Classification des β-lactamases selon les méthodes d'Ambler et de Bush-Jacoby-Medeiros.	**22**
10	Schéma récapitulatif du protocole de travail.	**26**
11	Transport des échantillons dans une glacière.	**27**
12	Protocole du pré-enrichissement.	**28**
13	Préparation des solutions d'antibiotiques.	**30**
14	Addition des antibiotiques à la gélose MacConkey.	**31**
15	Etape de l'isolement sélectif.	**32**
16	Etape de purification.	**33**
17	Etape de conservation des isolats.	**33**
18	Repiquage des isolats conservés.	**34**
19	Préparation de l'inoculum.	**35**
20	Préparation de la galerie API 20^{E}.	**36**
21	Inoculation de la galerie API 20^{E}.	**36**
22	Démarche de recherche des BLSE.	**38**
23	Protocole de test de synergie.	**40**
24	Etapes de test du double disque.	**43**
25	Interprétation de test du double disque.	**44**
26	Screening des souches.	**44**
27	Protocole du test AmpC.	**46**

Liste des figures (suite).

N°	Titre	Page
28	Protocole du test de Hodge modifié.	**48**
29	Protocole du test Carba NP.	**50**
30	Protocole mCIM et eCIM.	**52**
31	Protocole de mCIM / eCIM (la suite).	**53**
32	Aspects macroscopiques observés.	**56**
33	Aspects microscopiques des BGN isolés.	**57**
34	API 20E de l'isolat E7 CTX C2 (*Escherichia coli*).	**61**
35	API 20E de l'isolat E5 CTX C2 (*Klebsiella pneumoniae*).	**61**
36	API 20E de l'isolat E10 CTX C1 (*Klebsiella oxytoca*).	**61**
37	API 20E de l'isolat E11 IMP C1 (*Hafnia alvei*).	**61**
38	API 20E de l'isolat E2 CTX/IMP C1 (*Proteus mirabilis*).	**61**
39	API 20E de l'isolat E2 IMP C2 (*Proteus vulgaris*).	**61**
40	API 20E de l'isolat E12 IMP C1 (*Serratia odorifera*).	**61**
41	API 20E de l'isolat E13 IMP C1 (*Serratia fonticola*).	**61**
42	API 20E de l'isolat E11 CTX C1 (*Raoultella omithinolytica*).	**61**
43	API 20E de l'isolat E2 CTX C2 "1" (*Salmonella choleraesuis ssp arizonae*).	**61**
44	API 20E de l'isolat E9 IMP C1 (*Citrobacter freundii*).	**61**
45	API 20E de l'isolat E12 CTX C2 (*Morganella morganii*).	**61**
46	Tests de synergie positifs.	**67**
47	Tests du double disque positifs.	**69**
48	Histogramme représentatif de la sensibilité des souches aux β-lactamines testées.	**74**
49	Tests AmpC positifs.	**76**
50	Tests de Hodge modifié positifs.	**79**
51	Résultats du test Carba NP.	**80**
52	Résultats des tests mCIM et eCIM.	**82**
53	Répartition des souches isolées selon les β-lactamases détectées.	**84**

Liste des annexes

Annexe N°	Titre
01	Teneur en minéraux et vitamines dans 100 g de viande de poulet.
02	Classification proposée des membres actuels de la famille *Enterobacteriaceae.*
03	Résistances naturelles aux β- lactamines des genres/espèces d'entérobactéries.
04	Liste de matériel utilisé (Verrerie, instruments et consommable, appareillage, réactifs et colorants).
05	Composition et préparation des milieux de culture utilisés pour 1 litre de milieu.
06	Dates et lieux de prélèvement des échantillons de viande de poulet.
07	Protocole Standard de coloration de Gram.
08	Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20^{E}.
09	Protocole de préparation de l'étalon de turbidité McFarland 0,5.
10	Protocole de préparation des solutions du test Carba NP.
11	Diamètres des zones d'inhibition pour CTX et CAZ des souches BLSE±.

Liste des abréviations

% : Pourcentage.

°C : Degré Celsius.

AMC : Amoxicilline + Acide clavulanique.

AmpC : Céphalosporinase de type AmpC.

AmpC : Céphalosporinase plasmidique ou chromosomique.

AMR : Antimicrobial Resistance (Résistance aux antimicrobiens).

APC : Antibiotiques Promoteurs de Croissance.

API 20E : Analytical Profile Index pour les entérobactéries.

BLSE : Bêta-Lactamases à Spectre Étendu.

CARBA NP : Carbapénèmase Nordmann-Poirel.

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

CAZ: Ceftazidime.

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Cm^2: Centimètre carré.

CPE: Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae.*

CTX: Céfotaxime.

DO: Densité optique.

eCIM: EDTA-Modified Carbapenem Inactivation Method.

EPC : Entérobactéries Productrices de Carbapénémases.

ERC : Entérobactéries Résistantes aux Carbapénèmes.

ERC3G : Entérobactéries Résistantes aux Céphalosporines de 3e Génération.

Ex : Exemple.

FEP : Cefepime.

FOX : Cefoxitine.

g : Gramme.

GLU : Glucose.

GN : Gélose nutritive.

H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène.

H_2S : Sulfure d'hydrogène.

IMP : Imipénème.

IND : Indole.

LPS : Lipopolysaccharide.

MBL : Métallo-β-lactamases.

mCIM : Modified Carbapenem Inactivation Method.

MFP : Membrane Fusion Protein.

MH : Mueller-Hinton.

Mm : Millimètre.

NO_2 : Nitrites.

PLP : Protéines de Liaison à la Pénicilline.

R : Résistant.

rRNA : Ribosomal Ribonucleic Acid (Acide ribonucléique ribosomal).

S : Sensible.

Spp : Species.

TDA : Tryptophane Désaminase.

VP : Voges-Proskauer.

µm : Micromètre.

$ZnSO_4$: Sulfate de zinc.

Table des matières

Remerciement

Dédicace

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des annexes

Liste des abréviations

Table des matières

Introduction

Chapitre 01: Synthèse bibliographique

1.Viande de poulet 3

1.1. Définition 3

1.2. Valeur nutritionnelle 3

1.3. Contamination microbienne 4

1.3.1. Sources de contamination 4

1.3.2. Principaux contaminants bactériens 6

2.Entérobactéries 6

2.1. Définition 6

2.2. Classification 7

2.3. Habitat 7

2.4. Caractères bactériologiques 8

2.4.1. Caractères culturaux 8

2.4.2. Caractères biochimiques 9

.2.4.3 Caractères antigéniques 11

2.5. Facteurs de virulence 12

3. β-lactamines et usage en aviculture 13

3.1. Définition 13

3.2. Mécanisme d'action 13

.3.3 Usage en aviculture 14

3.3.1. Utilisation à des fins thérapeutiques 14

3.3.2. Utilisation en métaphylaxie 15

3.3.3. Utilisation comme promoteurs de croissance 15

3.3.4. Modes d'administration en aviculture 15

3.4. Impact de l'utilisation des antibiotiques en aviculture 16

3.4.1. Impact sur la qualité de la viande et des œufs 16

3.4.2. Impact sur la santé humaine et l'environnement 16

3.4.3. Résistance bactérienne aux antibiotiques 17

4. Résistance des entérobactéries aux β-lactamines 17

4.1. Résistance naturelle 17

4.2. Résistance acquise 18

4.2.1. Résistances non enzymatiques 18

4.2.2. Production de β-lactamases 21

Chapitre 02: Matériel et méthodes

1. Cadre d'étude 24

2. Objectifs 24

3. Matériel 24

3.1. Matériel biologique 24

3.2. Matériel non biologique 24

4. Méthodes 25

4.1. Echantillonnage 27

4.2. Pré-enrichissement 27

4.3. Isolement sélectif 28

4.4. Coloration de Gram 32

4.5. Purification 32
4.6. Conservation des isolats 33
4.7. Identification biochimique des isolats 34
4.8. Caractérisation phénotypique des mécanismes de résistance aux β-lactamines 38
4.8.1. Recherche des BLSE 38
4.8.2. Screening des souches pour la détection des céphalosporinases et des carbapénèmases 44
4.8.3. Test AmpC pour la détection d'une céphalosporinase 45
4.8.4. Recherche des carbapénèmases 47

Chapitre 03: Résultats et discussion

1. Isolement sélectif ..... Error! Bookmark not defined.
1.1. Examen macroscopique ..... **Error! Bookmark not defined.**
1.2. Examen microscopique ..... **Error! Bookmark not defined.**
2. Identification biochimique des isolats ..... Error! Bookmark not defined.
2.1. Tests préliminaires ..... **Error! Bookmark not defined.**
2.2. Identification par API20E ..... **Error! Bookmark not defined.**
2.3. Répartition des souches selon les espèces ..... **Error! Bookmark not defined.**
3. Caractérisation phénotypique des mécanismes de résistance aux β-lactamines ..... Error! Bookmark not defined.
3.1. Recherche des BLSE ..... **Error! Bookmark not defined.**
3.1.1. Test de synergie ..... **Error! Bookmark not defined.**
3.1.2. Test du double disque ..... **Error! Bookmark not defined.**
3.1.3. Répartition des souches BLSE+ selon les espèces ..... **Error! Bookmark not defined.**
3.1.4. Souches BLSE± ..... **Error! Bookmark not defined.**
3.2. Screening des souches pour la détection des céphalosporinases et des carbapénèmases ..... **Error! Bookmark not defined.**
3.4. Recherche de céphalosporinase par test AmpC ..... **Error! Bookmark not defined.**

3.5.1. Test de Hodge modifié ..... **Error! Bookmark not defined.**

3.5.2. Test Carba NP..... **Error! Bookmark not defined.**

3.5.3. Tests mCIM et eCIM..... **Error! Bookmark not defined.**

3.6. Expression des β-lactamases dans les souches isolées ..... **Error! Bookmark not defined.**

3.6.1. Expression d'un seul type de β-lactamase..... **Error! Bookmark not defined.**

3.6.2. Co-expression des β-lactamases ..... **Error! Bookmark not defined.**

Conclusion et perspectives

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Introduction

En Algérie, la viande de volaille représente la principale source de viande consommée, dépassant largement celle du mouton et du bœuf **(Guergueb *et al.*, 2021)**. Cette préférence s'explique par sa haute valeur nutritionnelle, en particulier sa richesse en protéines facilement digestibles, en acides aminés essentiels, en vitamines, en minéraux et en acides gras insaturés, ce qui offre de nombreux bienfaits pour la santé et contribue au bien-être général **(Debbarma *et al.*, 2024).**

Cependant, au-delà de ses qualités nutritionnelles, la viande de poulet constitue également un milieu favorable à la prolifération de bactéries pathogènes et contaminantes. Ces bactéries peuvent être introduites à différentes étapes de la chaîne de production, notamment par l'air, le personnel, les instruments utilisés, l'eau ou les surfaces de travail. De plus, lors de la phase d'éviscération, une contamination croisée peut survenir à partir de la flore intestinale des volailles, qui héberge de nombreuses bactéries, notamment celles appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, telles que *Escherichia coli, Hafnia, Yersinia,* et *Salmonella* **(Rouger *et al.*, 2017 ; Marmion *et al.*, 2021)**. Ces micro-organismes peuvent se transmettre à l'homme via la consommation de viande contaminée et sont responsables d'un large éventail de maladies, allant des infections opportunistes comme les infections urinaires, intra-abdominales ou sanguines, jusqu'à des pathologies plus sévères **(Herbert & Curtis., 2021 ; Li *et al.*, 2022).**

Un autre aspect préoccupant est l'émergence de la résistance aux antibiotiques. En effet, au cours de leur élevage, les volailles reçoivent souvent des antibiotiques à des fins thérapeutiques, notamment pour le traitement d'infections intestinales telles que la colibacillose ou l'entérite nécrotique, souvent causées par *E. coli, Salmonella* ou *Clostridium* spp. Les antibiotiques peuvent également être administrés à des fins métaphylactiques ou comme promoteurs de croissance **(Roth *et al.*, 2019).** Parmi les antibiotiques les plus fréquemment utilisés dans l'aviculture figurent les β-lactamines, dont la pénicilline G et l'amoxicilline sont largement administrées, notamment via l'eau ou l'alimentation des poulets **(Landoni & Albarellos, 2015).**

L'utilisation excessive et inappropriée de ces antibiotiques, notamment dans un but métaphylactique ou comme promoteurs de croissance, favorise l'apparition des souches résistantes chez les volailles, en particulier parmi les entérobactéries. Leur dissémination à

travers la chaîne alimentaire, notamment via la viande de poulet, constitue un réel danger pour la santé publique **(Díaz-Sanchez *et al.*, 2015).**

La résistance aux β-lactamines chez les entérobactéries peut s'exprimer par des mécanismes enzymatiques (par la production de β-lactamases) ou non enzymatiques (comme l'action de pompes à efflux). Parmi les β-lactamases les plus préoccupantes, on retrouve les β-lactamases à spectre étendu (BLSE), les carbapénémases et les céphalosporinases de type AmpC. Ces enzymes peuvent être naturellement présentes ou acquises par transfert génétique **(Robin *et al.*, 2012).** Actuellement, on connait une large diffusion des entérobactéries productrices de ces β-lactamases, tant en milieu hospitalier qu'en communauté, ce qui pose un problème de santé publique.

Au vu de ce constat, il devient essentiel de surveiller la résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries d'origine alimentaire, notamment la viande de poulet. C'est dans cette optique que s'inscrit notre étude, qui vise à déterminer les phénotypes de résistance aux β-lactamines exprimés par des souches isolées de la viande de poulet.

Pour atteindre cet objectif, notre travail porte sur :

- L'isolement sélectif des entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération (ERC3G) et des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes (ERC) ;
- L'identification biochimique des isolats obtenus ;
- La détection phénotypique des β-lactamases : les BLSE, les céphalosporinases (AmpC) et les carbapénémases.

Ce mémoire est structuré en trois chapitres :

Chapitre 1 : une revue bibliographique consacrée d'abord à la viande de poulet, à sa valeur nutritionnelle, et aux principaux contaminants. Elle aborde ensuite les entérobactéries, puis les β-lactamines et leur classification, et enfin la résistance des entérobactéries aux β-lactamines.

Chapitre 2 : une partie expérimentale détaillant le matériel et les protocoles des méthodes utilisés.

Chapitre 3 : les résultats obtenus, accompagnés d'une discussion approfondie.

En conclusion, les principales observations seront présentées et quelques recommandations et perspectives d'avenir seront proposées.

Chapitre 01
Synthèse bibliographique

1. Viande de poulet

1.1. Définition

La viande de poulet est classée parmi les viandes blanches en raison de sa faible concentration en myoglobine **(Keeton & Dikeman., 2017 ; Jilo & Hasan., 2022).** Elle correspond aux muscles squelettiques et aux tissus associés issus de la carcasse éviscérée du poulet, obtenue après le processus de découpe **(ACFS., 2005 ; FAO-AGS., 2007).**

1.2. Valeur nutritionnelle

La viande de poulet est reconnue pour sa haute valeur nutritionnelle, caractérisée par une teneur élevée en protéines de haute qualité, facilement digestibles, et une faible proportion de graisses saturées **(Tableau 1).**

Tableau 1 : Valeur nutritionnelle pour 100 g de viande de poulet **(Kralik *et al.*, 2018).**

Nutriment	Poulet (100 g)
Energie (Kcal)	165
Eau (%)	65.26
Protéines (g)	31.02
Lipides totaux (g)	3.57
Acides gras saturés (g)	1.010
Acides gras monoinsaturés (g)	1.240
Acides gras polyinsaturés (g)	0.770
Cholestérol (mg)	85

La qualité technologique de cette viande dépend de plusieurs facteurs, notamment les conditions d'élevage, l'alimentation, la composition des rations, le transport et le stress pré-abattage. Par ailleurs, la modification de la composition de l'alimentation avicole, par l'ajout d'huiles spécifiques, de vitamines, de microéléments et d'acides aminés, favorise l'enrichissement en composés bioactifs tels que les acides gras polyinsaturés (oméga-3), la carnosine, le sélénium et la vitamine E **(ANNEXE 1) (Kralik *et al.*, 2018).**

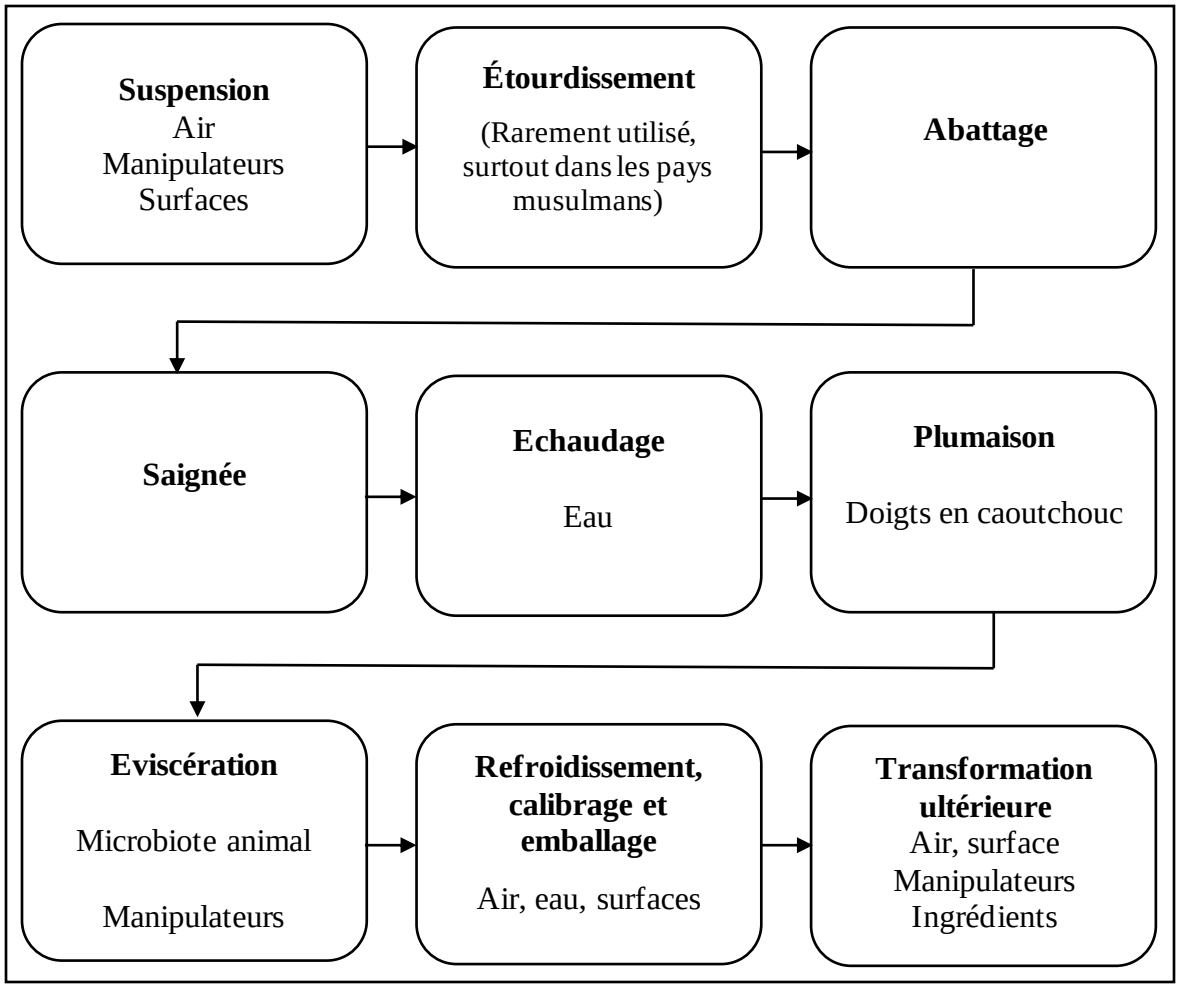
1.3. Contamination microbienne

1.3.1. Sources de contamination

Chez le poulet en bonne santé, les muscles sont naturellement stériles. Cependant, divers microbiotes colonisent le tractus digestif, les poumons, la peau et les plumes. Dans les abattoirs, les surfaces, l'air (aérosols) et les liquides constituent également des sources potentielles de contamination bactérienne. Ainsi, après l'abattage, les carcasses et les morceaux de viande peuvent être exposés à une contamination d'origine animale ainsi qu'à celle provenant de l'environnement de l'abattoir**.**

La peau des carcasses étant en contact direct avec l'air et les surfaces des équipements, elle est particulièrement exposée au risque de contamination. Dans la viande fraîche, les bactéries se localisent principalement à la surface plutôt qu'à l'intérieur du muscle. Toutefois, dans les produits transformés, ces micro-organismes peuvent pénétrer en profondeur.

Lors des étapes de transformation **(Figure 1)**, notamment le désossage, la découpe, le hachage et le mélange, la contamination bactérienne provient principalement des surfaces des équipements, de l'air ambiant et de la manipulation par le personnel. Ces procédés augmentent de manière significative la surface de contact de la viande avec l'environnement de production, favorisant ainsi l'adhésion et la prolifération des micro-organismes. Par conséquent, la charge bactérienne des produits transformés est généralement plus élevée que celle des morceaux de viande bruts **(Rouger *et al.*, 2017)**.



Après le transport, les poulets sont suspendus au convoyeur, puis abattus. Après la saignée, ils sont échaudés dans de l'eau chaude à une température comprise entre 50 et 60 °C afin d'assouplir les plumes. Ensuite, les plumes sont mécaniquement éliminées des poulets échaudés.

Dans les abattoirs à grande échelle, l'épilation des plumes se fait à l'aide de doigts en caoutchouc rotatifs, puis les carcasses subissent un lavage par pulvérisation avant l'éviscération. L'éviscération peut être réalisée par aspiration mécanique ou manuellement après l'ouverture des carcasses. À ce stade, le gésier, le cœur et le foie sont également récupérés.

Ensuite, les carcasses sont refroidies, soit par immersion dans de l'eau froide, soit par refroidissement à l'air. Les étapes de transformation ultérieures incluent la découpe, le désossage, le hachage ainsi que l'application de divers traitements pour la conservation des produits carnés, tels que la marinade ou l'ajout de différents ingrédients (sel, épices) dans les produits transformés comme les saucisses.

Figure 1 : Etapes de l'abattage du poulet et sources de contamination associées **(Rouger *et al.*, 2017).**

1.3.2. Principaux contaminants bactériens

a) Bactéries d'altération

La microflore initiale de la viande fraîche comprend principalement : *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae, Lactobacillus* spp., *Acinetobacter* spp., et *Brochothrix thermosphacta.* À ce stade, l'atmosphère de conditionnement joue un rôle déterminant dans l'évolution des microorganismes et la composition de la flore dominante dans le produit final. Dans les quatre jours suivant la production, la microflore d'altération s'établit progressivement, entraînant une détérioration perceptible lorsque la charge bactérienne atteint 10^7 cellules/cm². Toutefois, certaines espèces bactériennes peuvent provoquer des altérations sensorielles à des concentrations inférieures **(Marmion *et al.*, 2021).**

b) Bactéries pathogènes

Les viandes de poulet peuvent héberger divers agents pathogènes, parmi lesquels *Campylobacter* et *Salmonella* sont les plus fréquemment signalés. Ces bactéries, reconnues comme des pathogènes humains majeurs, colonisent couramment le tractus gastro-intestinal des poulets à des concentrations élevées. Cependant, une fois la viande contaminée, il est crucial de détecter leur présence, même à de très faibles niveaux, en raison du risque qu'elles représentent pour la santé publique.

Campylobacter jejuni et *Campylobacter coli* sont fréquemment isolés à la fois des viandes de volaille et des cas cliniques humains. Quant à *Salmonella enterica*, elle figure parmi les pathogènes les plus surveillés, avec le sérovar *Enteritidis* étant particulièrement associé aux produits de poulet et aux flambées de toxi-infections alimentaires.

Par ailleurs, la prévalence des *Listeria* spp., dans la viande de volaille est notable. *Listeria innocua* est l'espèce dominante, suivie par *Listeria monocytogenes*, une bactérie à fort potentiel pathogène, ainsi que par d'autres espèces telles que *Listeria welshimeri*, *Listeria grayi et Listeria ivanovii* **(Rouger *et al.*, 2017).**

2. Entérobactéries

2.1. Définition

La famille des *Enterobacteriaceae* représente le groupe le plus vaste et le plus hétérogène de bacilles à Gram négatif, comprenant plusieurs genres et des centaines d'espèces et sous-espèces. Les membres de cette famille sont de taille modérée (0,3 à 1 × 1 à 6 µm), non sporogènes, et peuvent croître rapidement dans des conditions aérobies et anaérobies

facultatives sur divers milieux non sélectifs (gélose au sang) et sélectifs (gélose MacConkey). La plupart sont mobiles, à l'exception de certains genres tels qu'*Arsenophonus, Biostraticola, Klebsiella, Moellerella, Obesumbacterium, Raoultella, Shimwellia, Tatumella*, ainsi que certains endosymbiontes (*Buchnera, Sodalis* et *Wigglesworthia*). Ils sont catalase-positifs et oxydase-négatifs, sauf *Plesiomonas*. Leur métabolisme repose sur la voie d'Embden-Meyerhof pour le catabolisme des sucres, entraînant une production d'acide à partir de la fermentation du glucose **(Octavia & Lan., 2014 ; Murray *et al.*, 2020).**

2.2. Classification

Les *Enterobacteriaceae* appartiennent à la classe γ des Protéobactéries et à l'ordre des *Enterobacteriales* **(Octavia & Lan., 2014)**. Historiquement, la classification de cette famille reposait principalement sur des critères phénotypiques, des analyses de relations génétiques basées sur l'ADN et l'étude des séquences du gène 16S rRNA. Toutefois, sur la base d'un ensemble substantiel de données phylogénétiques issues de la littérature, **Adeolu *et al.*, (2016)** ont proposé une révision de cette classification. Ils ont notamment suggéré de remplacer le nom *Enterobacteriales,* qui n'avait jamais été validé, par *Enterobacterales* et de redistribuer certains membres de la famille *Enterobacteriaceae* en six nouvelles familles, tout en conservant d'autres genres au sein de cette famille **(ANNEXE 2).**

Les nouvelles familles ainsi définies sont *: Erwiniaceae, Pectobacteriaceae, Yersiniaceae, Hafniaceae, Morganellaceae et Budiviciaceae*, caractérisées par une similarité génomique supérieure à 60 %. Cette proposition a été formellement acceptée et approuvée.

Malgré cette reclassification, avec ses 33 genres, la famille *Enterobacteriaceae* demeure la plus vaste au sein de l'ordre *Enterobacterales*. Toutefois, plusieurs genres historiquement associés à cette famille, tels que *Edwardsiella, Hafnia, Morganella, Proteus, Providencia, Serratia* et *Yersinia*, ont été transférés vers l'une des six nouvelles familles définies. Par ailleurs, *Plesiomonas* a été maintenu dans l'ordre *Enterobacterales,* mais il n'a pas encore été attribué à une famille spécifique **(Janda & Abbott., 2021).**

2.3. Habitat

Les *Enterobacteriaceae* sont des bactéries ubiquistes dans l'environnement. Certaines espèces ont la capacité de survivre dans divers écosystèmes **(Octavia & Lan., 2014)**, colonisant le sol, les milieux aquatiques et la végétation à travers le monde. En parallèle, elles

constituent un élément essentiel de la flore intestinale normale chez de nombreux animaux, y compris l'homme **(Murray *et al.*, 2020)**.

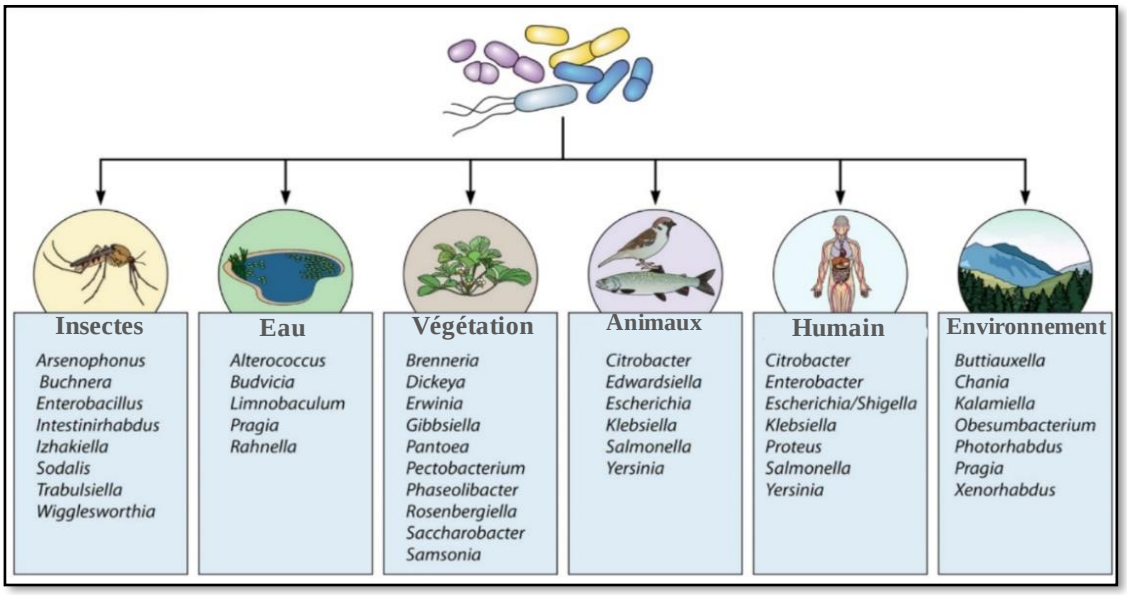


Figure 2 : Représentation catégorielle des principaux genres d'entérobactéries associés à divers écosystèmes **(Janda & Abbott., 2021).**

2.4. Caractères bactériologiques

2.4.1. Caractères culturaux

Les entérobactéries se développent généralement avec facilité sur les milieux de culture standards. La température optimale pour leur croissance est habituellement comprise entre 35 et 37 °C, bien que certaines espèces comme *Yersinia* tolèrent une plage de 30 à 37 °C, tandis que *Pantoea* et *Erwinia* préfèrent une température entre 27 et 30 °C ; certaines ne poussent pas à 37°C. Elles sont principalement aéro-anaérobies facultatives, bien que certaines souches d'*Erwinia* puissent présenter un développement plus lent en anaérobiose.

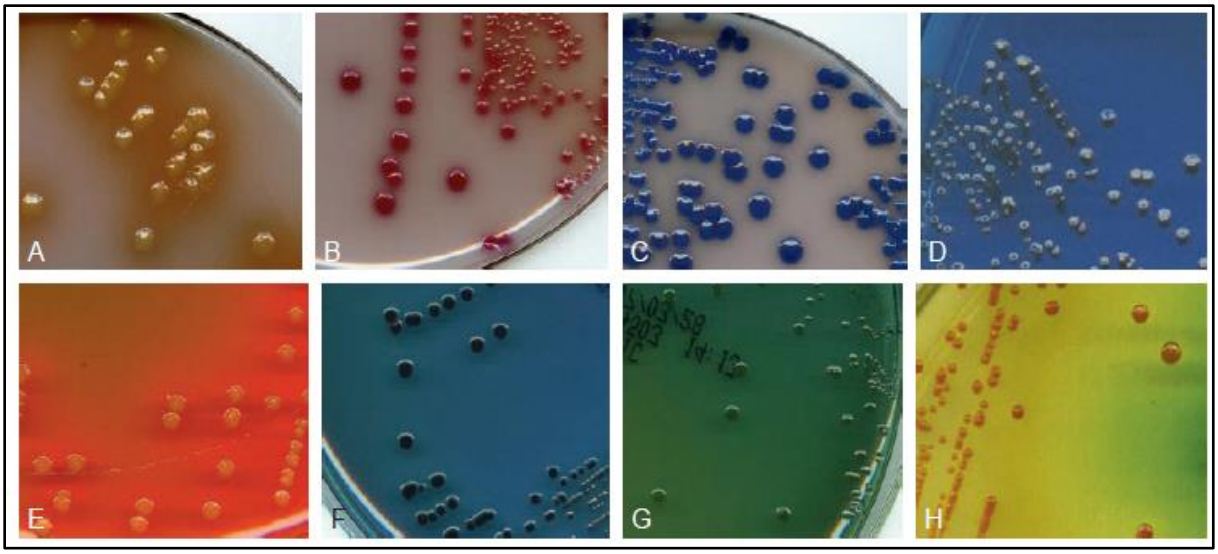
Sur gélose nutritive, les colonies apparaissent généralement florissantes : de 1 à 3 mm de diamètre, bombées, lisses et brillantes. Cependant, il existe plusieurs exceptions notables :

- les colonies de *Shigella dysenteriae*, *Salmonella Typhi*, et *Yersinia* sont souvent petites ;
- des espèces comme *Proteus mirabilis* et *Proteus vulgaris* peuvent envahir la gélose en formant des vagues successives.

Les colonies sont le plus souvent opaques avec une teinte blanchâtre mais peuvent être transparentes (*Salmonella*) ou pigmentées (*Serratia* rouge, *Erwinia* jaune) ; les colonies de

Klebsiella sont souvent muqueuses, larges et luisantes. Enfin, on observe parfois des variants muqueux (M), lisse (*smooth* S) ou rugueux (*rough* R) **(Denis *et al.*, 2016**).

La figure 03 présente l'aspect de quelques entérobactéries sur certaines géloses sélectives (Hektoen et Drigalski) ou spéciales (gélose UriSelect).



A. *Proteus mirabilis* : gélose UriSelect, colonies brunes TDA positives. **B.** *Escherichia coli*: gélose UriSelect, colonies roses β-galactosidase positives. **C.** *Klebsiella pneumoniae:* gélose UriSelect, colonies bleues β-galactosidase positives. **D.** *Citrobacter freundii*: gélose Drigalski, colonies lactose négatives. **E.** *Escherichia coli*: gélose Hektoen, colonies lactose positives. **F.** *Salmonella enteritidis* : gélose Hektoen, colonies lactose négatives H_2S positives. **G.** *Shigella flexneri* : gélose Hektoen, colonies lactose négatives. **H.** *Escherichia coli* : gélose Drigalski, colonies lactose positives.

Figure 3 : Aspect des cultures de différentes espèces d'entérobactéries sur géloses spéciales **(Denis *et al.*, 2016).**

2.4.2. Caractères biochimiques

Les entérobactéries possèdent plusieurs enzymes, leur conférant de nombreuses propriétés biochimiques, dont certaines sont communes, tandis que d'autres sont spécifiques à certaines espèces et jouent donc un rôle crucial dans leur identification **(Bentabet., 2021) :**

a) Caractères biochimiques communs

Les entérobactéries partagent plusieurs traits biochimiques fondamentaux, parmi lesquels :

- métabolisme aérobie-anaérobie facultatif ;
- fermentation du glucose avec ou sans production de gaz ;
- réduction des nitrates en nitrites ;

- oxydase négative ;
- catalase positive, à l'exception de *Shigella dysenteriae* sérotype 1.

b) Caractères biochimiques de différenciation

L'identification des différentes espèces d'entérobactéries repose sur des tests biochimiques spécifiques **(Tableau 2)** permettant d'évaluer :

- le métabolisme des protéines, notamment la présence d'uréase, la production d'indole et la dégradation du tryptophane ;
- la fermentation des sucres, tels que le lactose et le saccharose ;
- la capacité d'utilisation du citrate comme unique source de carbone ;
- la production d'enzymes spécifiques, telles que les décarboxylases et les désaminases;
- la production d'hydrogène sulfuré.

Tableau 2 : Principaux caractères biochimiques des Entérobactéries **(Denis *et al.*, 2016).**

	Escherichia coli	***Shigella***	***Salmonella***	***Citrobacter***	***Edwarsiella***	***Kluyvera* spp.**	***Moellerella***	***Leclercia***	***Leminorella***	***Yokenella***
Mobilité	+ [1]	-	+ [3]	+	+	+	-	+	-	+
Indole	+	d	-	d	+	+	d	+	-	-
H_2S Hajna	-[2]	-	+ [4]	d	+	_	-	_	+	_
Citrate Simmons	+	-	+ [4]	d	-	+	d	-	d	+
ONPG	+ [1]	d	D	+	-	+	+	+	-	+
LDC	d	-	+ [4]	-	+	+	-	-	-	+
ODC	d	d	d	d	+	+	-	-	-	+
ADH	-	-	d	-	-	-	-	-	-	
Lactose[5]	+ [1]	-	-	+	-	+	+	+	-	-
L-arabinose[5]	d	d	D	+	-	+	-	+	+	+
Sensibilité à la colistine	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-

d : différant selon les souches ; **D :** différant selon les sous-genres de *Salmonella*.
ONPG: Ortho-Nitrophenyl-β-galactoside.
LDC: Lysine decarboxylase.
ODC: Ornithine Decarboxylase.
ADH : Arginine Dihydrolase.
[1] Sauf *E. coli* biovar *alkalescens dispar.* [2] Sauf plasmide métabolique.
[3] Sauf *S.Gallinarum* et *S. Pullorum*.[4] Quelques souches négatives. [5] Fermentation.

2.4.3.Caractères antigéniques

Les Entérobactéries présentent plusieurs types d'antigènes **(Figure 4)** distincts **(Denis *et al.*, 2016)** :

- **Antigènes O :** constitués de lipopolysaccharides (LPS) thermostables, ils forment une composante structurelle de la paroi bactérienne. Chez les souches R (colonies rugueuses), ces antigènes sont absents, entraînant une auto-agglutination en eau distillée.
- **Antigènes H :** de nature flagellaire, ils sont constitués de flagelline thermolabile et caractérisent les bactéries mobiles.
- **Antigènes K :** localisés au niveau de la capsule, ils sont retrouvés chez *Klebsiella* ainsi que chez certaines souches de *E. coli, Shigella, Citrobacter* et *Salmonella* (antigène Vi). Leur structure polysaccharidique externe peut masquer l'antigène O.
- **Antigène de Kunin ou ECA (*Enterobacteriaceae* Common Antigen) :** constitué d'un glycophospholipide, il est spécifique aux Entérobactéries.
- **Antigènes d'adhésines** : comprenant les pili et les fimbriae.

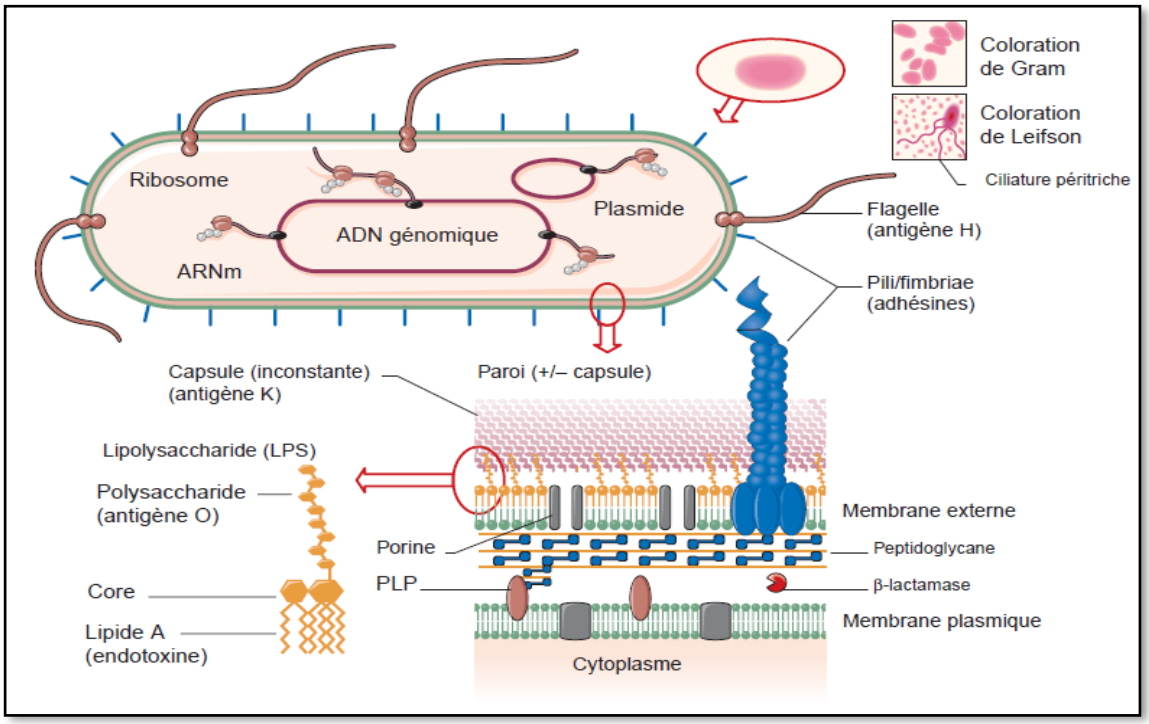


Figure 4 : Structure et aspect microscopique des *Enterobacteriaceae* **(Denis *et al.*, 2016).**

2.5. Facteurs de virulence

Les *Enterobacteriaceae* sont principalement des bactéries entériques, colonisant le tractus intestinal des humains et des animaux sans nécessairement provoquer de pathologies. Toutefois, certaines souches peuvent être impliquées dans un large éventail d'infections affectant ces organismes ainsi que les plantes.

Un certain nombre de facteurs de virulence ont été caractérisés au sein de cette famille bactérienne. Certains sont communs à tous les genres, tandis que d'autres sont spécifiques à certaines souches virulentes particulières **(Murray *et al.*, 2020) :**

a) Endotoxine :

L'endotoxine constitue un facteur de virulence commun. Son activité repose sur la partie lipidique A du LPS, qui est libérée lors de la lyse cellulaire.

b) Capsule :

Les antigènes capsulaires hydrophiles confèrent une protection contre la phagocytose et limitent l'interaction avec les cellules phagocytaires hydrophobes, améliorant ainsi la survie bactérienne dans l'hôte.

c) Variation de phase antigénique :

L'expression des antigènes somatiques (O), capsulaires (K) et flagellaires (H) est soumise à une régulation génétique qui permet une expression alternative (variation de phase). Ce mécanisme constitue une stratégie de protection pour la bactérie.

d) Systèmes de sécrétion de type III :

Certaines entérobactéries, telles que *Yersinia, Salmonella, Shigella, Escherichia* entéropathogène, disposent d'un système de sécrétion de type III. Ce système, composé d'environ 20 protéines, agit comme une seringue moléculaire facilitant l'injection directe de facteurs de virulence dans les cellules hôtes.

e) Sidérophores et hémolysines :

Dans des conditions in vitro, les bactéries bénéficient d'un apport suffisant en nutriments. Toutefois, in vivo, elles doivent développer des stratégies d'acquisition des éléments essentiels à leur croissance. Le fer, un facteur limitant, est séquestré par des protéines de l'hôte telles que l'hémoglobine, la myoglobine, la transferrine et la lactoferrine.

Pour contourner cette fixation, les bactéries produisent des sidérophores spécifiques (ex. entérobactine, aérobactine) capables de chélater le fer et de le mobiliser pour leur propre métabolisme. Par ailleurs, certaines espèces bactériennes produisent des hémolysines permettant de libérer le fer contenu dans les cellules hôtes.

f) Résistance aux antimicrobiens :

Les *Enterobacteriaceae* développent des mécanismes de résistance en réponse à l'introduction de nouveaux antimicrobiens. Ces résistances sont fréquemment portées par des plasmides transférables, facilitant leur dissémination interspécifique au sein des genres et même entre différentes familles bactériennes. Ces dernières décennies, l'acquisition de gènes de résistance a conféré à certaines souches, notamment *Klebsiella*, une multirésistance aux antibiotiques, compromettant ainsi les options thérapeutiques disponibles.

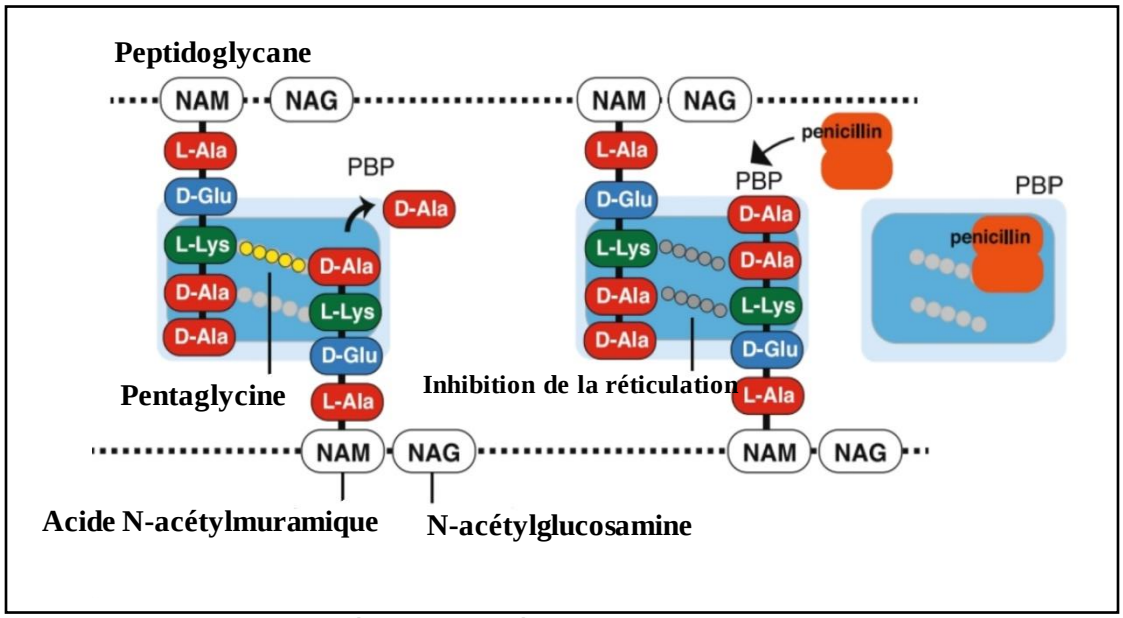
3. β-lactamines et usage en aviculture

3.1. Définition

Les β-lactamines constituent une classe d'antibiotiques antibactériens d'origine naturelle ou semi-synthétique. Sur le plan chimique, elles se caractérisent par la présence d'un noyau bêta-lactame au sein de leur structure moléculaire, élément déterminant de leur dénomination. Ce noyau, comprenant trois atomes de carbone et un atome d'azote, peut être soit isolé comme dans les monobactames, soit inclus dans une configuration bicyclique, caractéristique des autres classes de cette famille. D'un point de vue biologique, ces molécules possèdent une activité bactéricide ciblant les bactéries en phase de multiplication, tout en présentant une toxicité très faible **(Ben Youssef *et al.*, 2016 ; Singh *et al.*, 2022 ; Karunarathna *et al.*, 2025).** Cette classe comprend plusieurs sous-familles, notamment : les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes, les monobactames et les inhibiteurs de bêta-lactamases **(Pandey & Cascella., 2019)**.

3.2. Mécanisme d'action

Les β-lactamines inhibent l'enzyme transpeptidase, une protéine de liaison à la pénicilline (PBP) essentielle à la réticulation des chaînes peptidiques dans la couche de peptidoglycane **(Figure 5)**. Cette interaction entraîne : l'inhibition de l'étape finale de la transpeptidation, l'affaiblissement de la structure de la paroi cellulaire, la rendant vulnérable à la lyse osmotique et l'activation des enzymes autolytiques bactériennes, accélérant ainsi la mort cellulaire (**Karunarathna *et al.*, 2025**).



Le peptidoglycane possède une unité structurale de base dans laquelle deux sucres aminés, N-acétylglucosamine (NAG) et N-acétylmuramique (NAM), s'alternent. Une chaîne peptidique longitudinale liée au NAM forme un pilier structurel. Cette chaîne peptidique est un pentapeptide composé d'une alternance de formes D et L d'acides aminés, notamment L-alanine, γ-D-acide glutamique, L-lysine, D-alanine et D-alanine.

Cet arrangement forme une enzyme bactérienne connue sous le nom de protéine de liaison à la pénicilline (PBP, Penicillin-Binding Protein). La PBP reconnaît l'alanyl-alanine, un dimère d'alanine formé par D-alanine-D-alanine, présent à l'extrémité du pentapeptide, et exerce une action enzymatique de liaison croisée (cross-linking).

Étant donné que la pénicilline est structurellement similaire à l'alanyl-alanine au niveau de la région terminale de la structure en pilier, la PBP capture la pénicilline, ce qui inhibe la réaction de liaison croisée et perturbe la synthèse du peptidoglycane, entraînant ainsi la lyse bactérienne.

Figure 5 : Mode d'action des β-lactamines **(Sawa *et al.*, 2020).**

3.3. Usage en aviculture

3.3.1. Utilisation à des fins thérapeutiques

Les β-lactamines sont employées pour traiter diverses infections bactériennes chez les poules **(Landoni & Albarellos., 2015)**.

- **Pénicilline G :** efficace contre *Clostridium perfringens*, responsable de l'entérite nécrotique, ainsi que contre *Pasteurella multocida*, agent du choléra aviaire.
- **Amoxicilline et Ampicilline :** indiquées dans le traitement des infections à *Escherichia coli, Pasteurella multocida, Salmonella* spp et *Clostridium perfringens,* notamment dans les maladies respiratoires chroniques.

- **Ceftiofur :** c'est la seule céphalosporine approuvée pour l'utilisation dans la production avicole en tant que céphalosporine de troisième génération, il est très efficase contre les bactéries à Gram négatif.

3.3.2. Utilisation en métaphylaxie

La métaphylaxie consiste à administrer un antibiotique à un groupe de poules après la détection de cas cliniques afin de traiter les individus malades et de limiter la propagation de l'infection aux autres animaux exposés. Cette pratique est courante dans les élevages intensifs où les poules sont élevées en groupes homogènes, soumis à des facteurs de stress favorisant l'apparition de maladies. Les β-lactamines sont utilisées dans cette approche pour lutter contre les infections bactériennes. Toutefois, leur usage métaphylactique contribue au développement de résistances aux antimicrobiens, notamment chez *E. coli* **(Jerab *et al.*, 2022)**.

3.3.3. Utilisation comme promoteurs de croissance

L'utilisation des antibiotiques promoteurs de croissance (APC) consiste à administrer des antibiotiques à des poules saines à des concentrations inférieures à 200 g par tonne d'aliment pendant plus de 14 jours. Cette concentration sub-thérapeutique favorise la croissance en stabilisant la population bactérienne intestinale, ce qui améliore l'absorption des nutriments de l'alimentation. Cependant, les préoccupations concernant le développement de résistances aux antibiotiques chez les agents pathogènes d'origine alimentaire ont conduit à une intensification des recherches sur des alternatives aux APC **(Diaz-Sanchez *et al.*, 2015)**.

3.3.4. Modes d'administration en aviculture

Les méthodes d'utilisation des β-lactamines chez les poulets varient entre une administration individuelle et une administration collective. L'administration individuelle permet de traiter uniquement les animaux malades avec la dose correcte, mais elle est chronophage et exige un effort considérable, notamment lorsque de nombreux sujets nécessitent un traitement, ce qui peut être stressant pour les poulets et le personnel. En revanche, le traitement collectif est plus simple et rapide, bien qu'il puisse entraîner une distribution inégale des doses parmi les poules.

L'administration orale est privilégiée à l'échelle du troupeau, soit par l'eau de boisson, soit par l'aliment médicamenteux. L'eau de boisson est le mode préféré, car les poulets malades cessent souvent de s'alimenter mais continuent à boire, garantissant ainsi l'efficacité

du traitement. Cette méthode est économique, facile à mettre en œuvre et permet une prise en charge rapide, mais elle est influencée par des facteurs tels que l'âge, le sexe et la température ambiante.

L'incorporation dans l'alimentation représente une alternative, mais elle est soumise à l'influence de la hiérarchie alimentaire des poulets, ce qui entraîne une consommation inégale de l'antibiotique. Cela peut provoquer un sous-dosage, menant à l'échec du traitement et à l'émergence de résistances bactériennes, ou un surdosage, entraînant une toxicité et des résidus d'antibiotiques dans la viande.

Enfin, l'injection sous-cutanée est exclusivement réservée au traitement des poussins d'un jour **(Landoni & Albarellos., 2015)**.

3.4. Impact de l'utilisation des antibiotiques en aviculture

L'utilisation des β-lactamines dans l'élevage de poulets a des implications importantes, à la fois bénéfiques et nocives. Bien que ces antibiotiques soient essentiels pour traiter les infections bactériennes et améliorer la santé des animaux **(John *et al.*, 2024)**, leur surutilisation a également des effets néfastes sur la santé animale, humaine et sur l'environnement **(Islam *et al.*, 2024)**.

3.4.1. Impact sur la qualité de la viande et des œufs

La contamination des produits avicoles par des bactéries pathogènes constitue un risque sanitaire majeur en cas d'utilisation non contrôlée des antibiotiques. Ces bactéries peuvent être impliquées dans la transmission de maladies d'origine alimentaire. Des études ont montré qu'un usage intensif des antibiotiques peut favoriser l'apparition de bactéries résistantes, augmentant ainsi le risque de transmission aux consommateurs par la chaîne alimentaire **(Mehdi *et al.*, 2018)**.

3.4.2. Impact sur la santé humaine et l'environnement

L'utilisation excessive des antibiotiques dans l'élevage des volailles peut entraîner une accumulation de résidus médicamenteux dans les produits d'origine animale, ce qui représente un danger pour la santé des consommateurs. Parmi les effets indésirables figurent des réactions allergiques, des troubles digestifs et des altérations potentielles du fonctionnement des organes vitaux en cas d'exposition prolongée.

En outre, les déchets animaux contenant des antibiotiques contribuent à la pollution environnementale. Ces substances, libérées par les excréments, peuvent contaminer les sols et les eaux souterraines, perturbant ainsi l'équilibre microbien des écosystèmes et facilitant la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques, avec des conséquences potentielles pour la santé humaine et animale **(Mehdi *et al.*, 2018)**.

3.4.3. Résistance bactérienne aux antibiotiques

Le développement de la résistance bactérienne constitue l'un des défis majeurs liés à l'usage excessif des antibiotiques. Les bactéries peuvent acquérir des mécanismes de résistance, réduisant ainsi l'efficacité des traitements, compliquant la lutte contre les infections et limitant les options thérapeutiques disponibles.

La transmission des bactéries résistantes via la chaîne alimentaire favorise la propagation d'infections résistantes aux médicaments chez l'homme, constituant ainsi une menace pour la santé publique **(Mehdi *et al.*, 2018)**.

4. Résistance des entérobactéries aux β-lactamines

Les β-lactamines représentent la classe d'antibiotiques la plus couramment employée dans le traitement des infections causées par les entérobactéries. Leur large utilisation s'explique principalement par leur faible toxicité et leur efficacité bactéricide. Toutefois, les entérobactéries possèdent intrinsèquement et peuvent acquérir des mécanismes de résistance, limitant ainsi l'efficacité de ces antibiotiques **(Robin *et al.*, 2012).**

4.1. Résistance naturelle

Le principal mécanisme de résistance des entérobactéries aux β-lactamines repose sur la production de β-lactamases, un phénomène naturellement présent dans la majorité des espèces **(Robin *et al.*, 2012).** Les β-lactamases sont des enzymes capables d'hydrolyser le noyau β-lactame des antibiotiques de cette classe, les rendant ainsi inefficaces **(Morrison & Zembower., 2020)**. Elles présentent des spectres hydrolytiques variables en fonction de l'espèce bactérienne, et leur expression peut être régulée par différents systèmes de contrôle. De plus, certaines espèces sont capables de produire plusieurs β-lactamases de manière constitutive. L'ensemble de ces facteurs contribue à la diversité des phénotypes de résistance naturelle observés au sein des entérobactéries **(Robin *et al.*, 2012)**. Toutes les entérobactéries sont naturellement résistantes à la pénicilline G et à l'oxacilline. Selon les espèces ; d'autres résistances naturelles aux β-lactamines peuvent être exprimées **(ANNEXE 03)**.

4.2. Résistance acquise

La résistance acquise chez les entérobactéries est principalement due à l'acquisition de gènes de résistance par transfert horizontal des gènes, un mécanisme qui permet l'échange rapide de matériel génétique entre bactéries via la transformation, la transduction ou, plus fréquemment, la conjugaison. Ce processus facilite l'émergence de bactéries multirésistantes, appelées « superbugs », capables d'échapper aux traitements antibiotiques classiques **(Gauba & Rahman., 2023).**

Les principaux mécanismes de résistance acquise incluent des mécanismes enzymatiques et non enzymatiques **(Robin *et al.*, 2012).**

4.2.1. Résistances non enzymatiques

a) Modification de la cible

La modification des PLP chez les entérobactéries pour résister aux β-lactamines repose sur des altérations structurales de ces protéines, affectant leur affinité pour les antibiotiques. Ces modifications impliquent principalement des insertions ou mutations au niveau du site actif, entraînant des changements conformationnels qui entravent la fixation des β-lactamines tout en préservant la fonction transpeptidase essentielle à la synthèse de la paroi bactérienne. Certaines conditions environnementales peuvent également induire l'expression de PLP alternatives, renforçant la résistance aux antibiotiques ciblant ces protéines. Ce mécanisme représente une stratégie supplémentaire de réduction de la sensibilité aux β-lactamines **(Sethuvel *et al.*, 2023**).

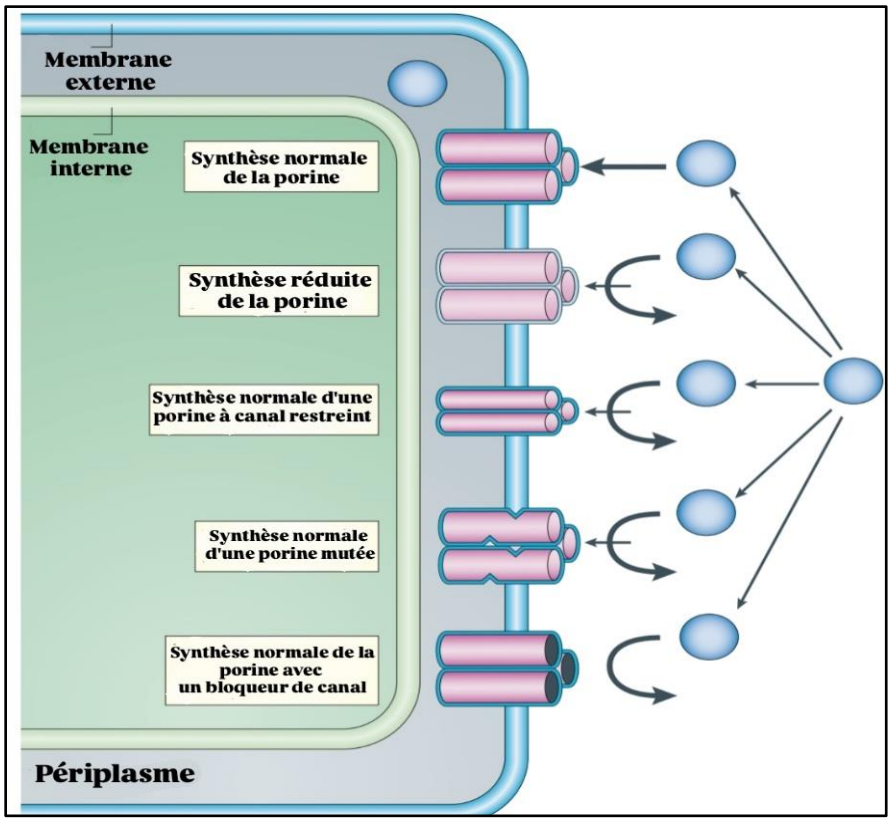
b) Diminution de la perméabilité

Les β-lactamines ciblent généralement des structures bactériennes intracellulaires ou membranaires, nécessitant ainsi leur pénétration à travers l'enveloppe bactérienne. Chez les entérobactéries, la réduction de la perméabilité constitue un mécanisme de résistance clé contre ces antibiotiques, limitant leur accès aux cibles intracellulaires. Ce mécanisme repose principalement sur la modification des porines, qui sont des canaux de diffusion hydrophiles permettant le passage des β-lactamines à travers la membrane externe **(Munita & Arias., 2016)**.

Les altérations des porines peuvent être réalisées par quatre processus **(Figure 6)** principaux **(Pagès *et al.*, 2008)** :

- une diminution du niveau d'expression des porines ;
- un remplacement du type de porine exprimé ;
- une mutation ou modification altérant les propriétés fonctionnelles d'un canal porinique ;
- l'effet des molécules bloquant les pores.

Ces altérations réduisent significativement l'entrée des β-lactamines et entraînent une baisse de leur efficacité **(Munita & Arias., 2016).**



Les molécules de β-lactamines et les trimères de porines sont représentés respectivement par des cercles bleus et des cylindres roses. L'épaisseur des flèches droites indique le niveau de pénétration des β-lactamines à travers les canaux des porines. Les flèches courbées illustrent l'échec de l'absorption qui peut résulter de : une diminution de l'expression des porines, un changement dans le type de porine exprimée (porine à canal restreint), une mutation ou une modification altérant les propriétés fonctionnelles du canal porinique (porine mutée). L'effet des molécules bloquant les pores (représentées par des cercles noirs) est montré dans la partie inférieure de la figure.

Figure 6 : Mécanismes de résistance aux antibiotiques associés à la modification des porines **(Pagès *et al.*, 2008).**

c) Pompes à efflux

Les pompes d'efflux constituent un mécanisme clé de résistance aux β-lactamines, en réduisant leur concentration intracellulaire et en diminuant ainsi leur efficacité antimicrobienne. Ces protéines de transport complexes sont localisées dans les membranes interne et externe des entérobactéries, où elles jouent un rôle crucial dans l'extrusion des substances toxiques, y compris les antibiotiques.

Les pompes d'efflux sont classées en deux groupes selon leur source d'énergie : les pompes primaires, qui utilisent l'ATP, et les pompes secondaires, qui exploitent la force motrice des protons (PMF). La majorité des pompes d'efflux des entérobactéries appartiennent à la famille résistance-nodulation-division (RND) **(Figure 7)**, caractérisée par une structure tripartite comprenant une protéine de la membrane externe (OMP : Outer membrane protein), une protéine de fusion membranaire (MFP : Membrane fusion protein) et une protéine de la membrane interne (IMP : Inner membrane protein). Ces pompes traversent l'enveloppe cellulaire, permettant l'expulsion active des antibiotiques du cytoplasme grâce au PMF **(Gauba & Rahman., 2023).**

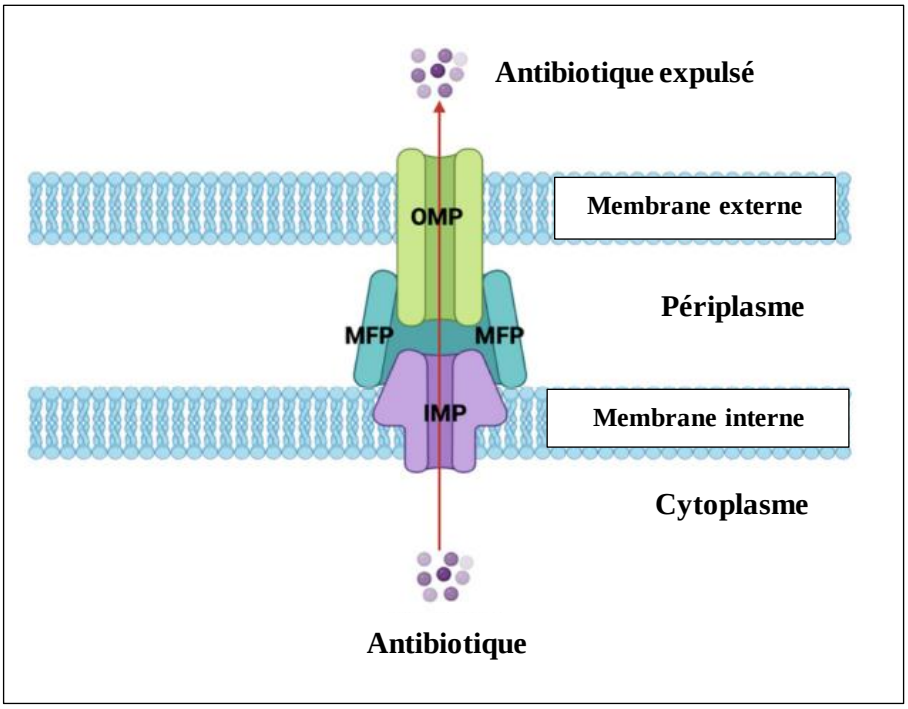


Figure 7 : Structure générale et fonction des pompes d'efflux RND **(Gauba & Rahman., 2023).**

4.2.2. Production de β-lactamases

- **Mode d'action :**

La β-lactamase exerce son mécanisme d'action en neutralisant l'activité antibactérienne des β-lactames par hydrolyse de la liaison amide (–CO–NH) du noyau β-lactame **(Figure 8)**, constituant fondamental de leur structure chimique **(Sawa *et al.*, 2020).**

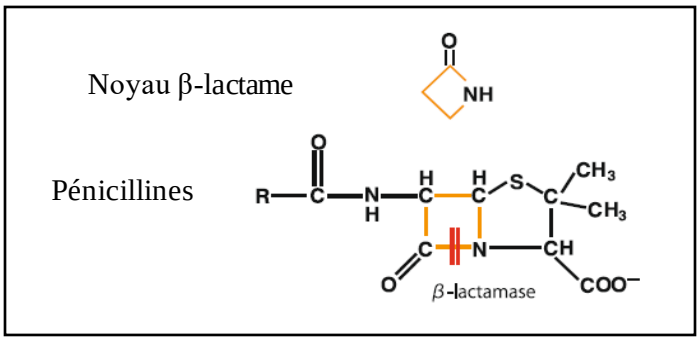


Figure 8 : L'action enzymatique d'une β-lactamase sur les pénicillines **(Sawa *et al.*, 2020).**

- **Classification des β-lactamases :**

Les β-lactamases sont actuellement classées selon deux approches : la classification moléculaire d'Ambler et la classification fonctionnelle de Bush-Jacobi-Medeiros **(Figure 9)**.

La classification d'Ambler regroupe ces enzymes en quatre classes (A, B, C et D) en fonction des motifs constitués par les séquences primaires de leurs protéines. Les β-lactamases des classes A, C et D possèdent un résidu de sérine en tant que site catalytique, tandis que celles de la classe B requièrent des ions zinc pour leur activité enzymatique.

En parallèle, la classification fonctionnelle de Bush-Jacobi-Medeiros divise ces enzymes en trois groupes (1 à 3) selon leur spectre d'hydrolyse des β-lactamines et leur sensibilité aux inhibiteurs. Le groupe 1 comprend les céphalosporinases, correspondant aux β-lactamases de classe C dans la classification moléculaire et dont l'origine génétique est chromosomique. Le groupe 2 regroupe les β-lactamases non incluses dans le groupe 1 et présentant une sérine au centre catalytique, correspondant aux classes A et D dans la classification moléculaire. Enfin, le groupe 3 inclut les métallo-β-lactamases (MBLs), qui relèvent de la classe B selon la classification d'Ambler **(Sawa *et al.*, 2020).**

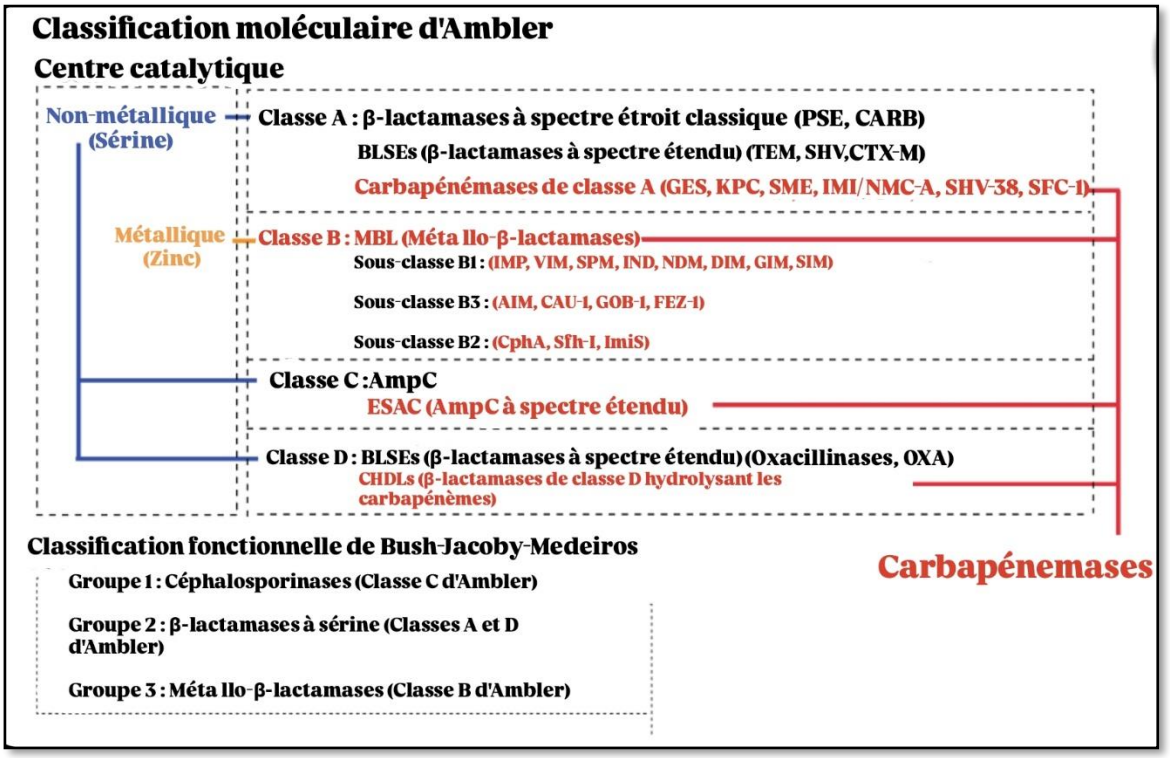


Figure 9 : Classification des β-lactamases selon les méthodes d'Ambler et de Bush-Jacoby-Medeiros **(Sawa *et al.*, 2020).**

a) Bêta-lactamases à spectre étendu

Les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) sont des enzymes hydrolytiques qui confèrent une résistance aux oxyimino-céphalosporines de large spectre (de troisième et quatrième générations) ainsi qu'aux monobactames (aztréonam), tout en restant inefficaces contre les céphamycines (céfoxitine) et les carbapénèmes (méropénème, imipénème, ertapénème et doripénème) **(Husna *et al.*, 2023).**

Classification des bêta lactamases à spectre étendu

Les bêta lactamases à spectre étendu (BLSE) représentent des variants mutés des bêta lactamases, tant sur le plan structural que fonctionnel. Ces enzymes sont classées selon deux systèmes distincts : la classification d'Ambler, qui repose sur la structure moléculaire, et celle de Bush-Jacoby-Medeiros, basée sur leur fonction enzymatique.

D'après la classification d'Ambler, les BLSE appartiennent aux classes A et D, caractérisées par l'utilisation de la sérine comme centre actif enzymatique. Dans le système de Bush-Jacoby-Medeiros, elles sont intégrées au groupe 2 **(Husna *et al.*, 2023).**

Les classifications les plus récentes subdivisent les BLSE en trois catégories principales **(Husna *et al.*, 2023)** :

- BLSE de classe A selon Ambler (ESBLA).
- BLSE diverses (ESBLM).
- BLSE capables d'hydrolyser les carbapénèmes (ESBLCARBA).

b) Carbapénémases

Les entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC) sont souvent appelées "superbactéries" en raison de leur capacité à résister aux carbapénèmes, une classe d'antibiotiques considérée comme un dernier recours pour traiter les infections dues aux bactéries multirésistantes. Cette résistance est due à la production d'enzymes carbapénémases, qui hydrolysent les molécules d'antibiotiques. Parmi les principales EPC, on trouve *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, Enterobacter aerogenes* et le complexe *Enterobacter cloacae*. Les gènes de résistance sont souvent portés par des plasmides, facilitant leur transfert entre bactéries et favorisant la propagation de cette résistance **(Hughes *et al.*, 2019).**

c) Céphalosporinases (AmpC)

Les β-lactamases de type AmpC, produites par les *Enterobacteriaceae*, appartiennent à la classe C selon la classification structurelle d'Ambler et au groupe 1 dans la classification fonctionnelle de Bush et al. Ces enzymes hydrolysent préférentiellement les céphalosporines par rapport à la benzylpénicilline et résistent à l'inhibition par l'acide clavulanique. De plus, elles présentent une forte affinité pour l'aztréonam **(Singh *et al.*, 2022).**

Chapitre 02

Matériel et méthodes

1. Cadre d'étude

Cette étude a été menée sur une période de 02 mois et 14 jours, du 16 février au 30 avril, au laboratoire N° 02 de microbiologie du Département de biologie appliquée, relevant de la Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie de l'Université Echahid Cheikh Larbi Tebessi-Tébessa.

2. Objectifs

Notre recherche porte sur la résistance des entérobactéries dans la viande de poulet, avec les objectifs sont les suivants :

- isolement sélectif des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes et aux céphalosporines de troisième génération ;
- identification biochimique des entérobactéries isolées ;
- détection phénotypique de trois types de β-lactamases impliqués dans la résistance des entérobactéries aux β-lactamines : BLSE, céphalosporinases et carbapénèmases ;
- évaluation de la prévalence des phénotypes de résistance détectés chez les souches isolées.

3. Matériel

3.1. Matériel biologique

- 14 échantillons de blanc de poulet.
- Souche d'*E.coli* ATCC 25922.

3.2. Matériel non biologique

a) Verreries, instruments, consommables, appareils, réactifs et colorants (ANNEXE 04).

b) Milieux de culture (ANNEXE 05) :

- Bouillon tryptone-sel.
- Bouillon trypticase soja (TSB).
- Gélose Mac Conkey (MC).
- Gélose Nutritive (GN).
- Gélose Mueller-Hinton (MH).

c) Produits :

- Antibiotiques en poudre : Céfotaxime (Ayataxim ®) et Imipénème (Samipenem ®).
- Galeries API 20E BioMérieux, France.
- Disques d'antibiotiques BioMaxima :

  Amoxicilline/acide clavulanique : AMC (20-10µg).

  Ceftazidime : CAZ (30 µg).

  Céfotaxime : CTX (30µg).

  Céfépime : FEP (30µg).

  Céfoxitine : FOX (30µg).

  Imipénème : IMP (10µg).

  Méropénème : MRP (10µg).
- Rouge de phénol.
- Sulfate de zinc (ZnSO4).
- NaOH.
- Tris HCl.
- Solution d'EDTA 0,5 M.

4. Méthodes

Notre travail pratique s'est déroulé en deux parties principales :

- isolement sélectif des ERC3G et des ERC ;
- tests phénotypiques pour la recherche des β-lactamases (BLSE, AmpC et carbapénemases).

La première partie est réalisée selon la méthode référencée par l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) dans la version ANSES/LMV/18/01-Version 02, qui détaille la procédure pour l'isolement *d'Escherichia coli* producteurs de BLSE, AmpC ou carbapénémase dans les viandes fraîches **(ANSES, 2021).**

Le protocole comporte les étapes suivantes :

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

Remarque : ce protocole a été adapté en fonction des moyens et des conditions disponibles ; toute modification apportée sera signalée au fur et à mesure dans la section correspondante.

Un schéma récapitulatif de la procédure suivie dès l'échantillonnage jusqu'aux tests phénotypiques de détection des β-lactamases est présenté dans **la figure 10.**

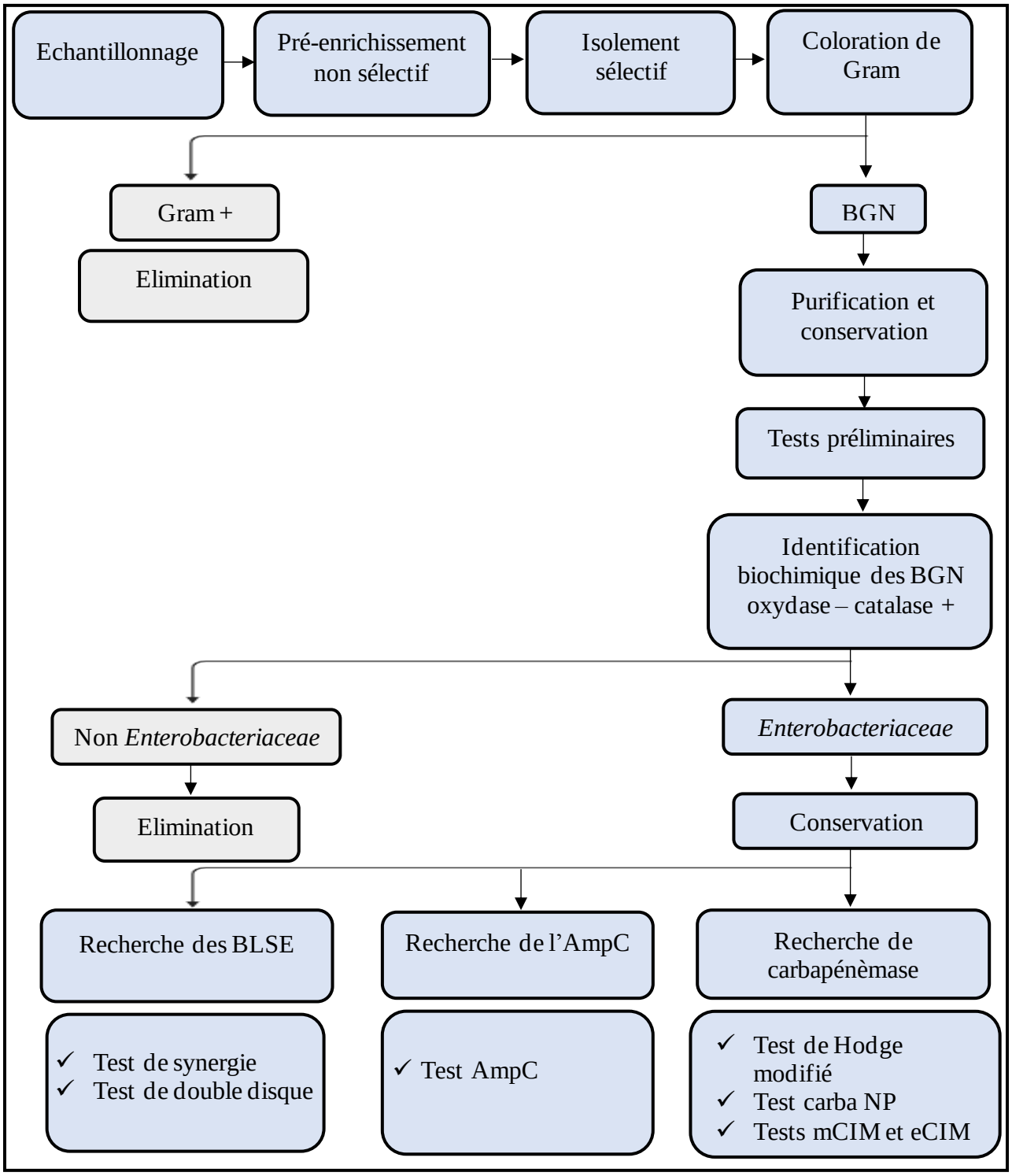


Figure 10 : Schéma récapitulatif du protocole de travail **(Schéma personnel., 2025).**

4.1. Echantillonnage

L'échantillonnage s'est déroulé du 15 février 2025 jusqu'à 16 mars 2025, et a concerné plusieurs communes de la wilaya de Tébessa, à savoir : Aïn Zerga, Bir Mokkadem et Chéria **(ANNEXE 06).**

a) Prélèvement et conservation des échantillons :

Les échantillons ont été prélevés auprès de différents points de vente, en se présentant comme de simples consommateurs. Le choix s'est porté spécifiquement sur la partie pectorale (poitrine de poulet). Le prélèvement a été effectué le jour même de l'analyse ou la veille. Chaque échantillon a été placé dans un sachet stérile de type Ziploc, hermétiquement fermé. Les informations relatives à l'échantillon (N° de l'échantillon, point de vente, date et lieu de prélèvement) ont été notées sur le sachet. Les échantillons ont été conservés entre + 2 °C et + 8 °C jusqu'à l'analyse bactériologique.

b) Transport au laboratoire :

Le transport des échantillons a été effectué dans une glacière **(Figure 11)**, assurant une température de conservation ne dépassant pas +8 °C. Les échantillons doivent être transportés au laboratoire et analysés dans les 36 heures après l'échantillonnage.

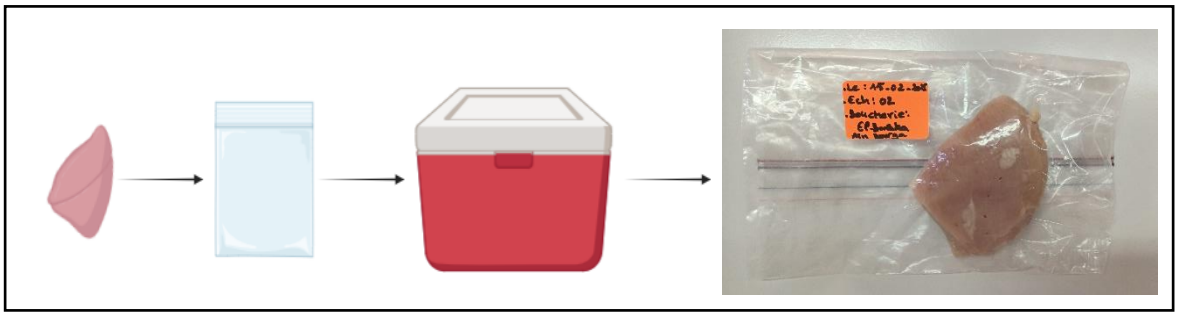


Figure 11 : Transport des échantillons dans une glacière **(Photo personnelle., 2025).**

4.2. Pré-enrichissement

Cette étape constitue une phase essentielle permettant la réanimation de la flore bactérienne présente dans la viande de poulet, notamment les entérobactéries **(Rasamsetti *et al.*, 2021).** Le pré-enrichissement est réalisé selon les étapes suivantes **(Figure 12)** :

- peser dans une boite de Pétri, 10 g (au lieu de 25 g) de viande de poulet, en réalisant des prises d'essai homogènes au cœur de la viande à l'aide d'un scalpel stérile ;

- transférer la quantité pesée dans un bocal en verre stérile ;
- ajouter 90 mL de bouillon tryptone-sel (au lieu de 225ml de l'eau peptonée tamponnée) à l'aide d'une seringue stérile de 10 ml ;
- refermer hermétiquement le bocal ;
- incuber à 37 °C pendant 18 à 22 heures.

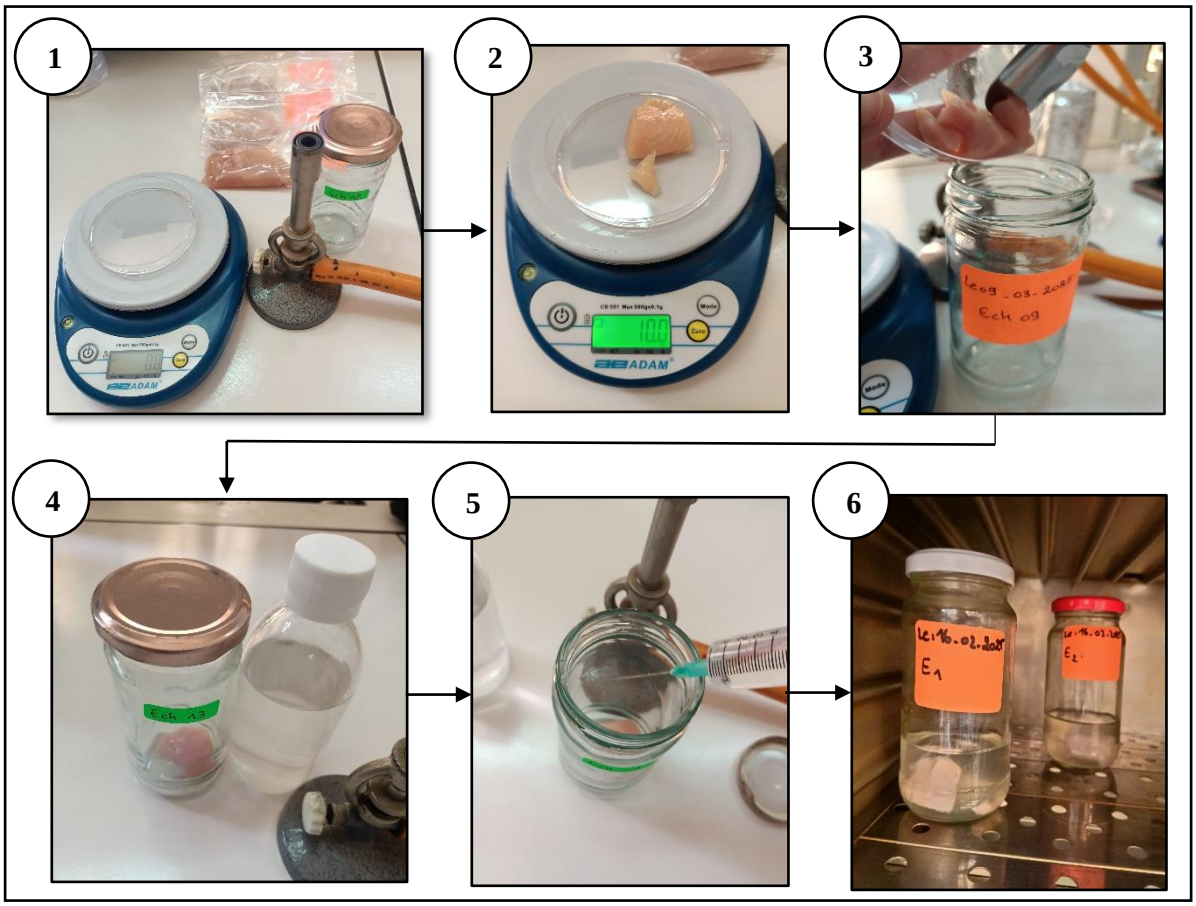


Figure 12: Protocole du pré-enrichissement **(Photo personnelle.,2025).**

4.3. Isolement sélectif

Conformément au protocole établi par l'ANSES, cette étape repose sur l'utilisation d'un milieu de culture sélectif supplémenté en antibiotiques, permettant le dépistage ciblé et l'isolement sélectif des entérobactéries productrices de BLSE, d'AmpC ou de carbapénémases (CP).

On a utilisé la gélose MacConkey, un milieu à la fois sélectif et différentiel, couramment utilisé pour l'isolement des entérobactéries, à partir de différents produits **(Condalab., 2022).**

4.3.1. Préparation de milieu MacConkey additionné d'antibiotiques

La gélose MC est préparée selon les recommandations du fabricant **(ANNEXE 06),** puis supplémentée avec l'antibiotique approprié immédiatement avant son utilisation. Elle est additionnée de :

- céfotaxime (CTX) à une concentration finale de 1mg/L pour l'isolement des ERC3G;
- l'imipénème (IMP) à une concentration finale de 2mg/L pour l'isolement des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes (ERC) (au lieu du milieu chromogénique recommandé dans la méthode de référence).

a) Préparation des solutions d'antibiotiques (Figure 13)

- Peser séparément 10 mg de chacun des antibiotiques : céfotaxime (Ayataxim®) et imipénème (Samipenem®) dans un petit morceau de papier aluminium.
- Transférer chaque quantité d'antibiotique dans un tube stérile, préalablement étiqueté CTX (pour le céfotaxime) et IMP (pour l'imipénème) respectivement.
- Ajouter 10 mL d'eau distillée stérile dans chaque tube.
- Bien mélanger chaque solution afin d'assurer une dissolution complète des antibiotiques.
- Conserver les solutions d'antibiotiques au réfrigérateur, jusqu'à leur utilisation.

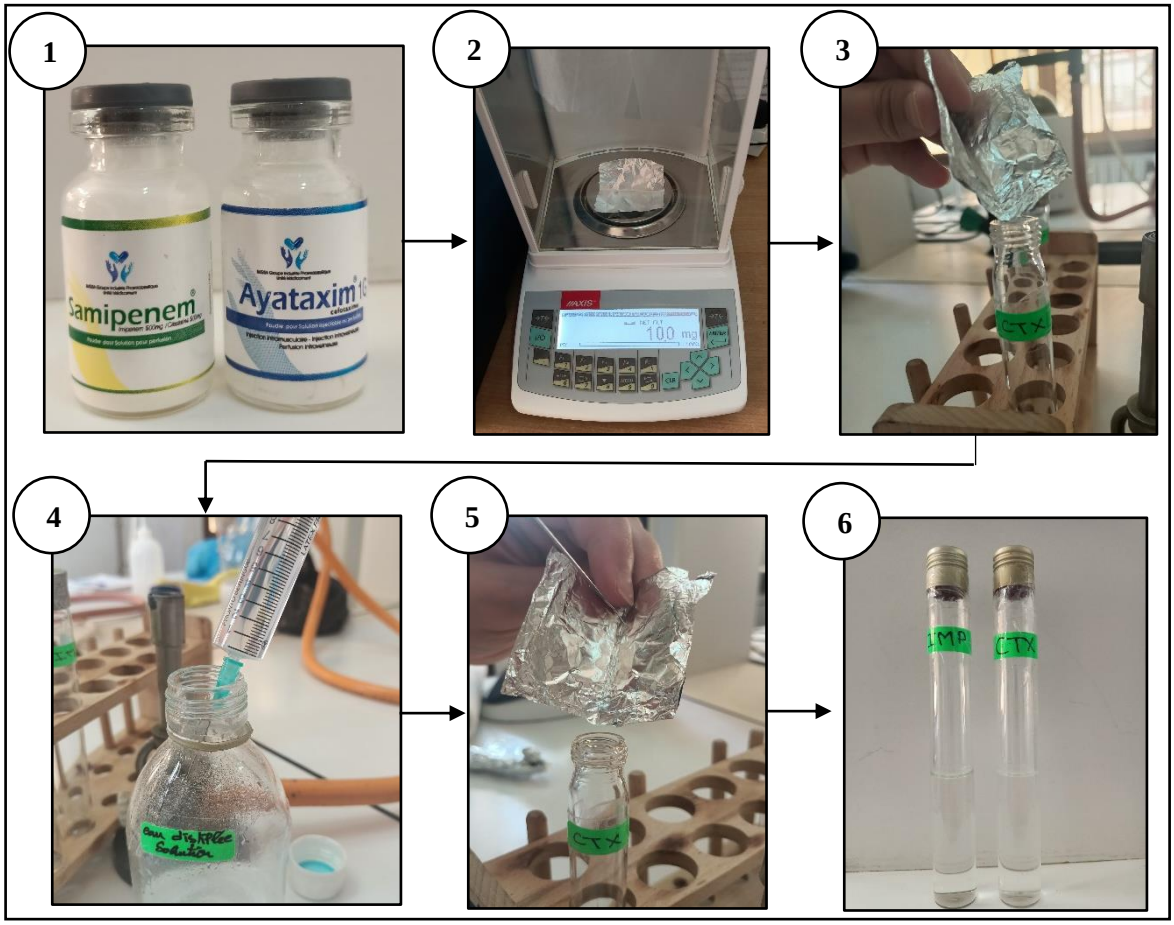


Figure 13 : Préparation des solutions d'antibiotiques **(Photo personnelle., 2025).**

b) Addition des antibiotiques à la gélose (Figure 14)

Les solutions d'antibiotiques préparées sont ajoutées à la gélose MC à des volumes bien déterminés, pour obtenir les concentrations finales souhaitées :

- Ajouter 100 µL de la solution CTX à 100 mL de gélose MC préalablement fondue, afin d'obtenir une concentration finale de 1 mg/L.
- Ajouter 200 µL de la solution IMP à 100 mL de gélose MC, pour obtenir une concentration finale de 2 mg/L.
- Mélanger lentement les milieux après addition des antibiotiques afin d'éviter la formation de mousse.
- Couler les milieux dans des boîtes de Pétri, en étiquetant clairement chaque boîte selon l'antibiotique ajouté (CTX ou IMP), puis laisser solidifier à température ambiante.

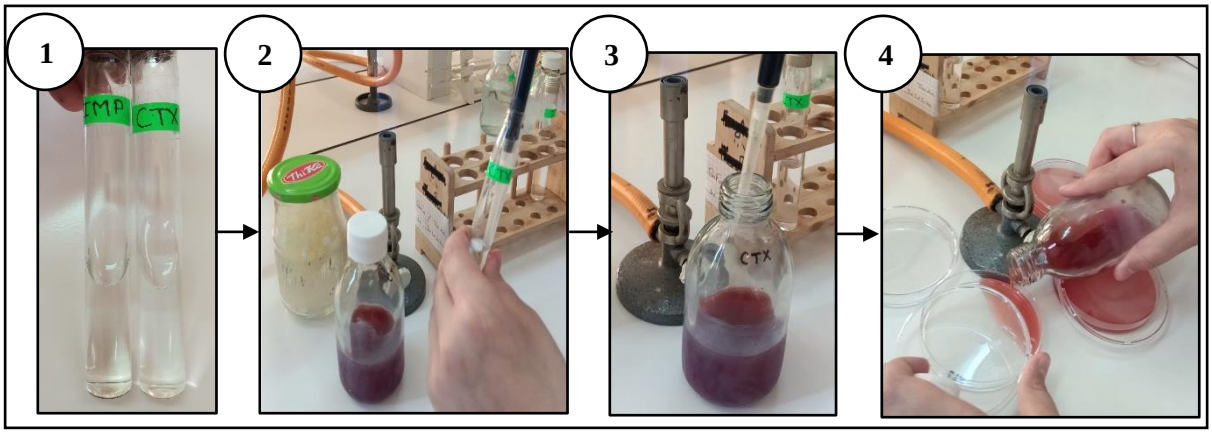


Figure 14 : Addition des antibiotiques à la gélose MacConkey **(Photo personnelle., 2025).**

4.3.2. Isolement

L'isolement sélectif des ERC3G et ERC est réalisé sur les milieux MC+ CTX et MC+ IMP respectivement, à partir de la culture pré-enrichie la veille, de chaque échantillon, selon les étapes suivantes **(Figure 15)** :

- Mélanger doucement la culture du pré-enrichissement ;
- Prélever à l'aide d'une öse stérile, puis ensemencer sur un quadrant d'une boîte contenant la gélose MC+ CTX ;
- Réaliser deux étalements successifs à partir du premier, en utilisant la même öse, afin d'obtenir des colonies isolées ;
- Procéder de la même manière sur une autre boîte contenant MC+ IMP ;
- Incuber les boîtes à 37 °C pendant 24 à 48 heures.

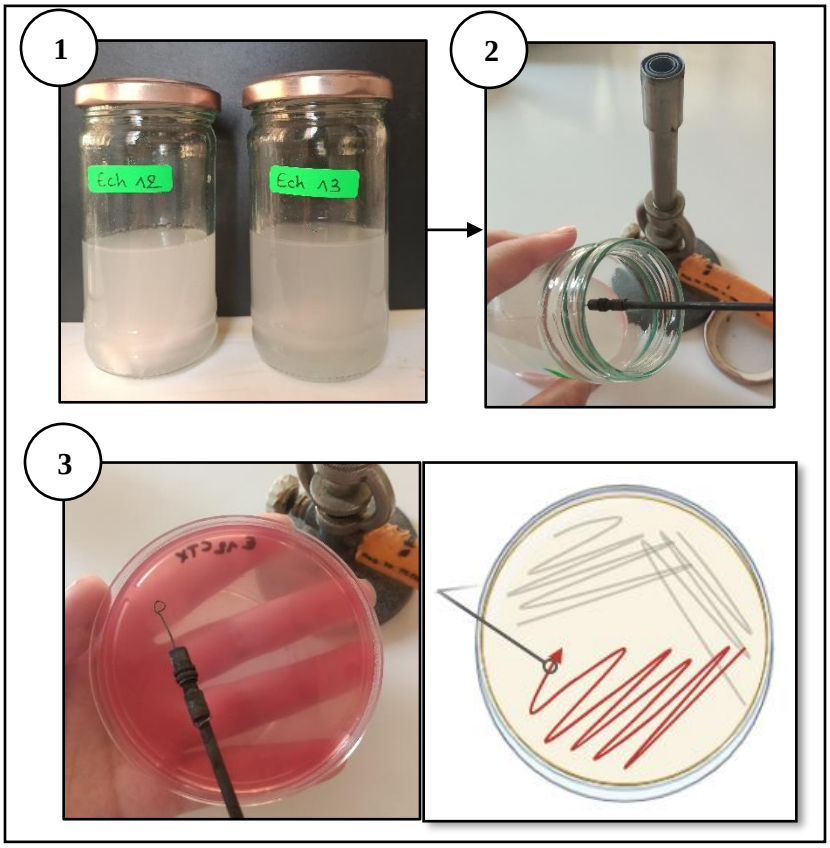


Figure 15 : Etape de l'isolement sélectif **(Photo personnelle., 2025).**

4.4. Coloration de Gram

Après incubation, les colonies présentant une morphologie typique des entérobactéries ont été soumises à une observation microscopique après une coloration de Gram, afin de confirmer leur nature de bacilles à Gram négatif **(ANNEXE 7).**

4.5. Purification

Le but de cette étape est d'isoler une culture pure présentant les mêmes caractéristiques morphologiques que celle obtenue après l'isolement initial. Elle est réalisée comme suit **(Figure 16)** :

- sélectionner une colonie pour chaque morphologie et couleur distinctes observées sur MC supplémentés de CTX et IMP, ayant donné des BGN par coloration de Gram ;
- prélever à partir de chaque colonie à l'aide d'une anse stérile et ensemencer par des stries sur une nouvelle boîte de gélose MC pour avoir une culture pure et bien isolée ;
- incuber les boîtes à 37 °C pendant 24 heures.

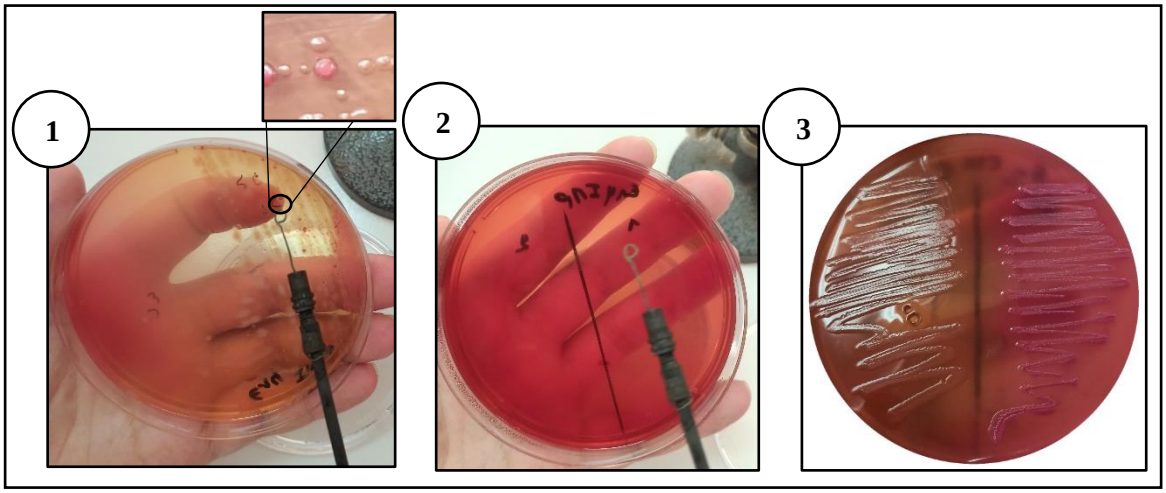


Figure 16 : Etape de purification **(Photo personnelle., 2025).**

4.6. Conservation des isolats

Les isolats bactériens sont conservés sur des tubes de gélose nutritive (GN) inclinée pour une utilisation ultérieure. Cette conservation de courte durée consiste à **(Figure 17)** :

- prélever à partir de la culture pure et ensemencer en stries sur GN inclinée à l'aide d'une anse stérile ;
- noter sur le tube, la date de conservation et le code de l'isolat ;
- incuber les tubes à 37 °C pendant 24 heures ;
- conserver les tubes en position verticale, soit au réfrigérateur (4 °C) ou à température ambiante.

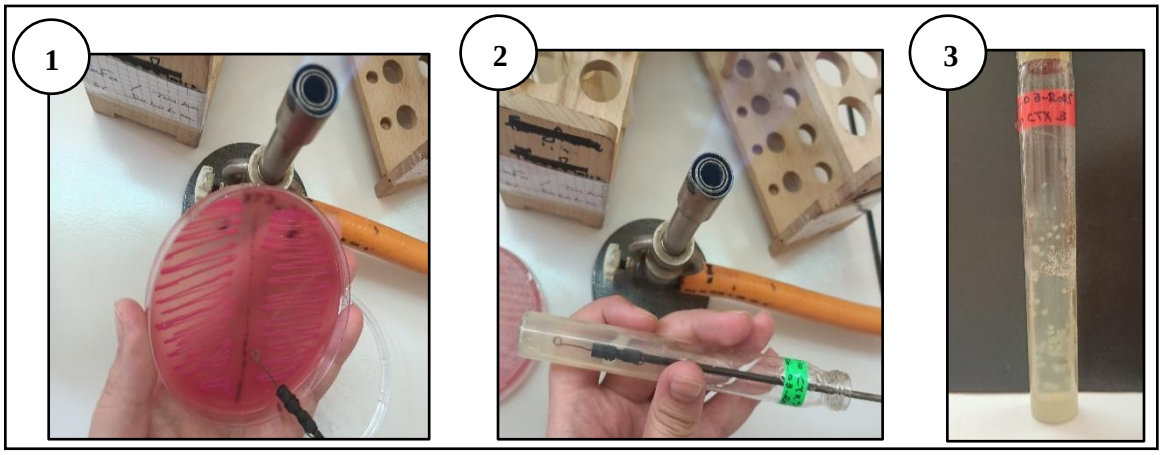


Figure 17 : Etape de conservation des isolats **(Photo personnelle., 2025).**

4.7. Identification biochimique des isolats

L'identification a été réalisée par le système API 20E (bioMérieux, France) standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif non fastidieux.

a) Description de la galerie et principe :

La galerie API 20^{E} est constituée d'une bandelette en plastique comportant 20 microtubes, renfermant des substrats biochimiques déshydratés. Ces microtubes sont ensemencés à l'aide d'une suspension bactérienne standardisée, permettant ainsi la reconstitution des tests. Au cours de l'incubation, des réactions biochimiques spécifiques se produisent, se traduisant par des changements de couleur spontanés ou révélés par l'ajout de réactifs appropriés. La lecture des résultats se fait à l'aide d'un tableau et l'identification finale de la souche est obtenue via le catalogue analytique API ou un logiciel d'identification dédié.

b) Technique :

- **Repiquage des isolats :**

Afin d'assurer une identification précise et fiable, les tests biochimiques doivent être réalisés à partir d'une culture jeune et pure. Les isolats conservés sont repiqués sur GN et incubés à 37 °C pendant 18 à 24 heures **(Figure 18)**.

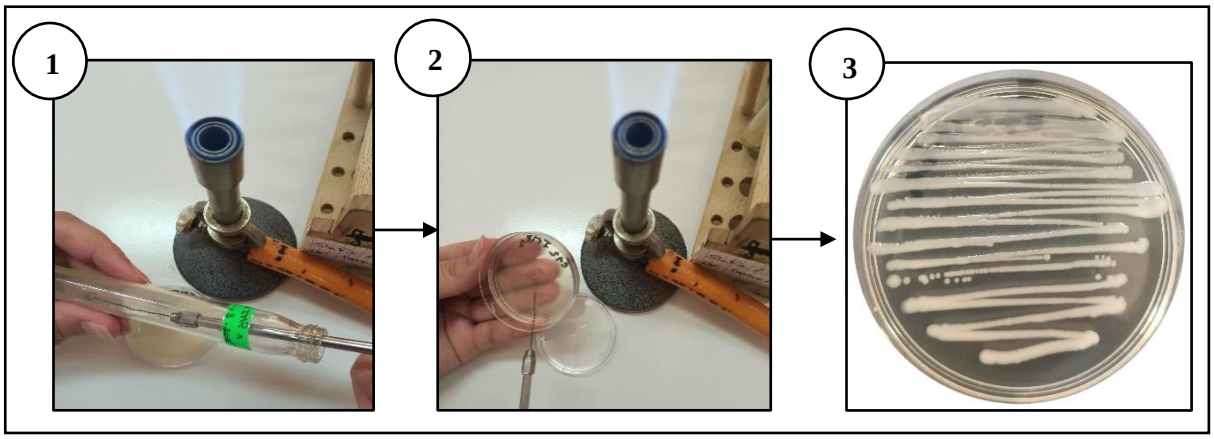


Figure 18 : Repiquage des isolats conservés **(Photo personnelle., 2025).**

- **Tests préliminaires :**

Avant de procéder à l'identification, il est recommandé d'effectuer les tests enzymatiques préliminaires suivants :

Le test catalase : qui permet de vérifier la capacité de la souche à décomposer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et oxygène. Une réaction positive se manifeste par une effervescence immédiate.

Le test oxydase : qui détecte la présence de la cytochrome c oxydase.

Seulement, les isolats catalase (+) et oxydase (-) sont retenus pour l'identification.

- **Préparation de l'inoculum :**

On prélève 2 à 3 colonies à l'aide d'une anse stérile et on les re suspend dans 5 ml d'eau physiologique stérile jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène **(Figure 19)**.

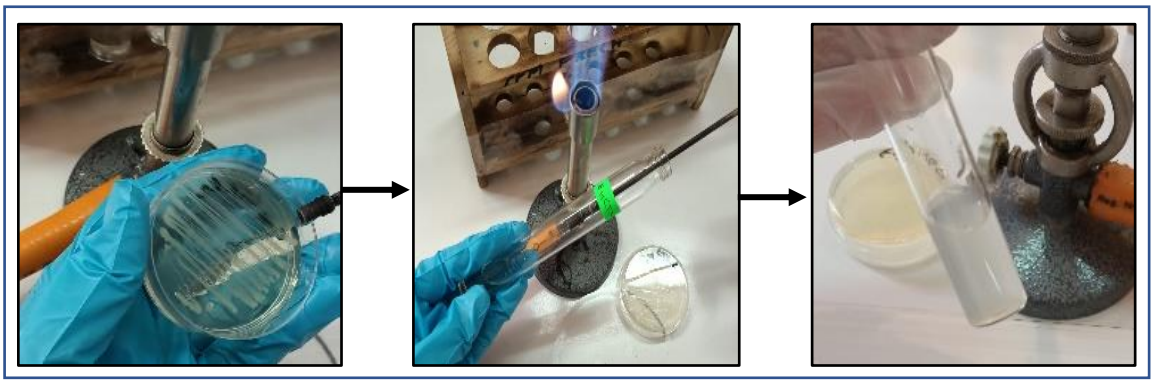


Figure 19 : Préparation de l'inoculum **(Photo personnelle., 2025).**

- **Préparation de la galerie (Figure 20) :**

- Inscrire le code de l'isolat sur la languette latérale de la galerie (éviter d'écrire sur le couvercle).
- Prélever environ 5 ml d'eau distillée stérile à l'aide d'une micropipette ou d'une seringue stérile.
- Répartir l'eau distillée dans les alvéoles du fond de la boîte d'incubation, afin d'assurer une atmosphère humide.
- Retirer délicatement la galerie API 20E de son emballage et placer dans la boîte d'incubation, en prenant soin de ne pas contaminer les microtubes.

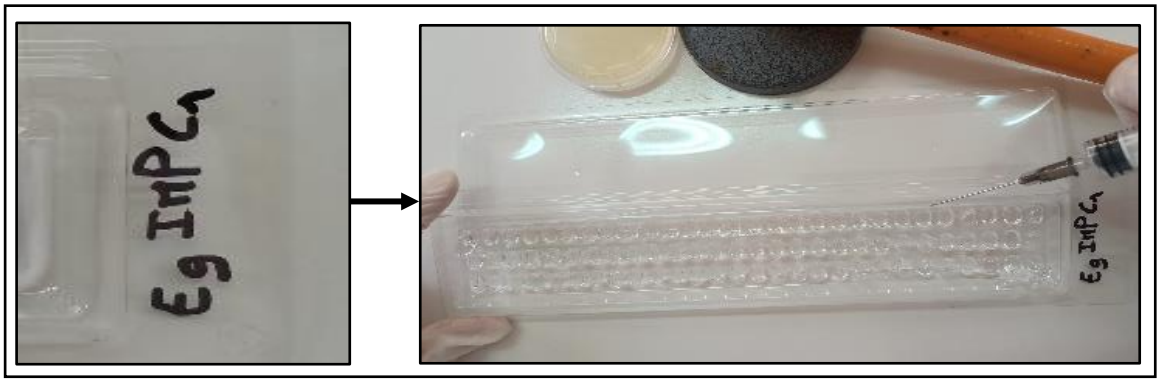


Figure 20 : Préparation de la galerie Api 20^{E} **(Photo personnelle., 2025).**

Inoculation de la galerie (Figure 21) :

- À l'aide d'une seringue stérile, introduire délicatement la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie.
- Maintenir la pointe de la seringue appuyée sur le bord de la cupule, tout en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant, afin d'éviter la formation de bulles d'air au fond des microtubes :
  - Tests encadrés (CIT, VP, GEL) : remplir à la fois le tube et la cupule.
  - Tests soulignés (ADH, LDC, ODC, H_2S, URE) : remplir uniquement le tube, puis ajouter une goutte d'huile de vaseline ou de paraffine stérile dans la cupule pour créer une anaérobiose.
  - Autres tests (ni encadrés ni soulignés) : remplir uniquement le tubule.
- Fermer hermétiquement la boîte d'incubation.
- Incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures.

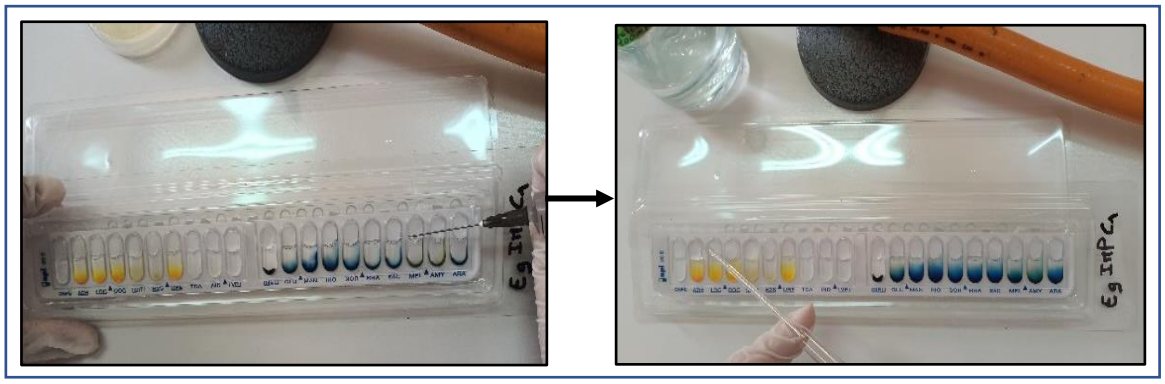


Figure 21 : Inoculation de la galerie Api 20^{E} **(Photo personnelle., 2025).**

c) Lecture :

Après incubation, la lecture de la galerie s'effectue en se référant au tableau de lecture **(ANNEXE 08).**

- si moins de trois tests (y compris le test GLU) sont positifs avant l'ajout de réactifs, il est nécessaire de réincuber la galerie pendant 24 heures supplémentaires (± 2 heures), sans ajouter de réactifs.
- si trois tests ou plus sont positifs (GLU + ou -), il faut :
  - Noter toutes les réactions spontanées sur la fiche de résultats.
  - Procéder ensuite à l'addition des réactifs spécifiques pour révéler les tests correspondants.

Remarque importante : le test de détection de la production d'indole (test IND) doit être réalisé en dernier, car il libère des gaz pouvant interférer avec la lecture d'autres tests. Après l'ajout du réactif, ne pas remettre le couvercle d'incubation.

Test TDA : Ajouter une goutte du réactif TDA dans le tube correspondant. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive.

Test VP : Ajouter une goutte de chacun des réactifs VP1 et VP2. Après 10 minutes, l'apparition d'une couleur rose ou rouge confirme une réaction positive. Une coloration faible ou retardée est considérée négative.

Test NO_2 : Ajouter deux gouttes de réactifs NIT1 et NIT2 dans le tube GLU. Après 2 à 3 minutes, une coloration rouge indique un résultat positif. Si le tube reste jaune, ajouter 2 à 3 mg de poudre de zinc :

- un tube toujours jaune après 5 minutes indique une réduction complète en azote (résultat positif).
- une coloration rose-rouge indique que les nitrates n'ont pas été réduits (résultat négatif).

Test IND : Ajouter une goutte de réactif de Kovacs. Une couleur rose diffuse dans la cupule révèle une réaction positive.

d) Interprétation :

L'identification des isolats est réalisée à l'aide d'un logiciel spécialisé, une feuille Excel pour l'identification microbienne version 4.1.

4.8. Caractérisation phénotypique des mécanismes de résistance aux β-lactamines

La caractérisation des mécanismes de résistance aux β-lactamines a été réalisée en recherchant spécifiquement trois types d'enzymes associés à cette résistance, à savoir :

- les β-lactamases à spectre étendu (BLSE) ;
- les céphalosporinases (AmpC) ;
- les carbapénèmases.

4.8.1. Recherche des BLSE

La détection des BLSE repose sur la réalisation de deux tests : le test de synergie et le test du double disque en suivant la démarche illustrée dans le schéma ci-dessous **(Figure 22)**.

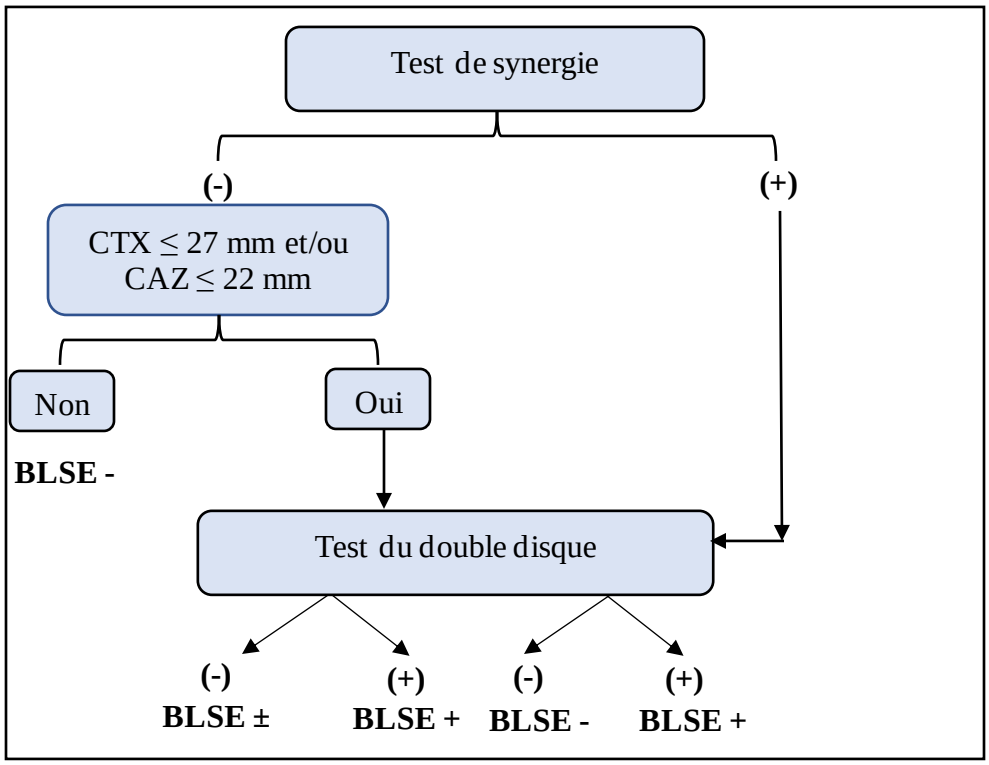


Figure 22 : Démarche de recherche des BLSE **(Photo personnelle., 2025).**

4.8.1.1. Test de synergie

a) Principe

Cette méthode qualitative, décrite initialement par **Jarlier *et al.*, (1988)**, est basée sur la recherche d'une image de synergie dite "en bouchon de champagne" entre deux disques sur un antibiogramme standard : un disque de céfotaxime, ceftazidime, céfépime et un disque contenant de l'acide clavulanique (amoxicilline-acide clavulanique) **(CA-SFM., 2024).** Cette synergie est due à l'inhibition des BLSE par l'acide clavulanique.

b) Protocole

- **Préparation de la gélose Mueller-Hinton (MH) :**

Elle est préparée et coulée dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre, à une épaisseur standard de 4 ± 0,5 mm, ce qui correspond à environ 25 ml de gélose par boîte.

- **Préparation et standardisation de l'inoculum :**
  - Prélever au moins 3 colonies bien isolées à partir d'une culture jeune de 18 à 24 h sur GN.
  - Emulsionner les colonies dans 5 ml d'eau physiologique stérile.
  - Homogénéiser soigneusement la suspension pour obtenir une turbidité uniforme : l'opacité de la suspension doit correspondre à une densité optique (DO) de 0,08 à 0,1 à 625 nm, équivalente à 0,5 de l'échelle McFarland, soit environ 10^6 à 10^8 UFC/ml**.**
  - Comparer visuellement la turbidité de la suspension à celle de l'étalon McFarland 0,5 préparé **(ANNEXE 09)** : placer les tubes devant un fond blanc avec des lignes noires **(Figure 23)**.
  - Avant chaque utilisation, agiter vigoureusement l'étalon.

L'inoculum bactérien doit idéalement être employé dans les 15 min et au plus tard dans les 60 min qui suivent sa préparation.

- **Ensemencement de la gélose MH (Figure 23) :**
  - Plonger un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne standardisée.
  - Égoutter soigneusement l'écouvillon sur les parois internes du tube pour éliminer l'excès de liquide.
  - Ensemencer uniformément la surface de la gélose MH par stries serrées dans trois directions différentes, en tournant la boîte de 60° à chaque passage pour assurer une répartition homogène de l'inoculum.
  - Laisser les boîtes à température ambiante pendant quelques minutes pour séchage.

- **Dépôt des disques et incubation des boîtes (Figure 23) :**
  - Déposer délicatement les disques antibiotiques à l'aide d'une pince stérile, à plat et sans les déplacer, afin d'éviter toute perturbation de la diffusion.

- Placer un disque d'amoxicilline-acide clavulanique (AMC 20/10 µg) à une distance de 2,5 cm des disques de céfotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ) et céfépime (FEP).
- Appuyer légèrement sur chaque disque pour assurer un bon contact avec le milieu.
- Les boîtes doivent être incubées idéalement dans les 15 minutes suivant le dépôt des disques (sans dépasser 60 minutes).
- Incuber à 37 °C pendant 18 à 24 heures, couvercle vers le haut.

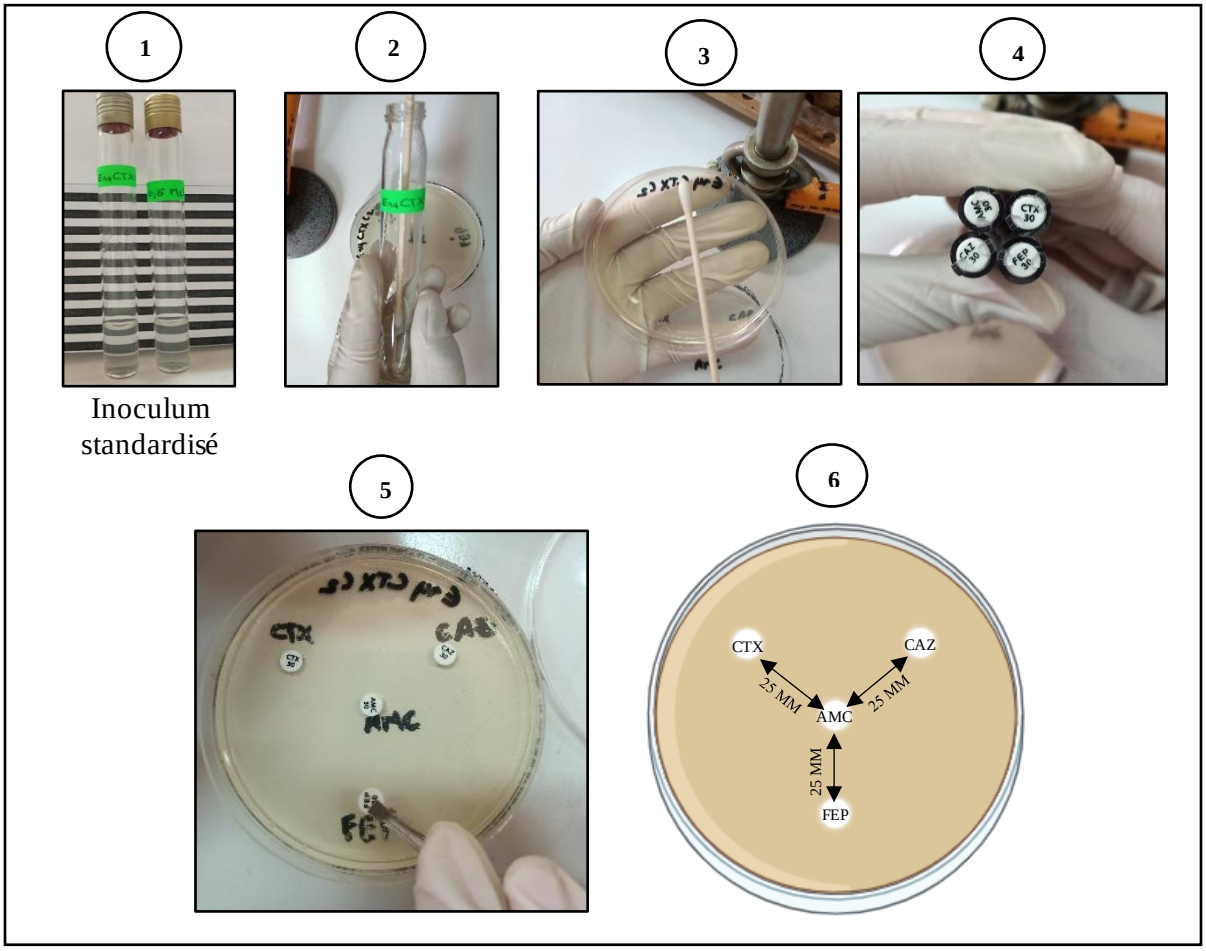


Figure 23 : Protocole de test de synergie **(Photos personnelles., 2025).**

c) Lecture :

La présence d'une BLSE est mise en évidence par l'apparition de synergie en forme caractéristique de "bouchon de champagne" **(CA-SFM., 2024).** En parallèle, on mesure les diamètres des zones d'inhibition autour des disques antibiotiques à l'aide d'une règle millimétrée, pour la catégorisation clinique des souches (résistante, intermédiaire, sensible) **(Tableau 03)** et suspecter la production des BLSE pour les souches n'ayant pas donné une image de synergie mais présentant des diamètres ≤ 27 mm pour CTX et ≤ 22 mm pour CAZ.

L'interprétation de la catégorie des souches vis-à-vis les différents antibiotiques testés au fur et à mesure dans notre travail est effectuée en se référant au **tableau 03** où sont indiqués les diamètres critiques (d : diamètre critique inferieur, D : diamètre critique supérieur) après comparaison entre les diamètres mesurés et ceux recommandés.

Pour les antibiotiques : AMC, FEP, FOX et IMP, l'interprétation est faite selon **CASFM (2024) :**

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

Pour les antibiotiques CTX et CAZ, l'interprétation est faite selon **CLSI (2024):**

- Si le diamètre de la zone d'inhibition est ≥ D : la souche est dite sensible (S).
- Si le diamètre de la zone d'inhibition est ≤ d : la souche est dite résistante (R).
- Si d < diamètre de la zone d'inhibition > D (compris entre d et D): la souche est dite intermédiaire (I)

Tableau 3 : Diamètres critiques correspondants aux antibiotiques utilisés **(CASFM, 2024 ; CLSI, 2024).**

Classe	Antibiotique	Sigle	Charge du disque	Diamètres Critiques			Interprétation
				S	I	R	
Clavams	Amoxicilline/acide clavulanique	AMC	20-10µg	≥ 19	-	< 19	CASFM
C2G	Céfoxitine	FOX	30 µg	≥ 18	-	< 18	CASFM
C3G	Ceftazidime	CAZ	30 µg	≥ 21	18 – 20	≤ 17	CLSI
	Céfotaxime	CTX	30µg	≥ 26	23 – 25	≤ 22	CLSI
C4G	Céfépime	FEP	30µg	≥ 27	24 – 26	< 24	CASFM
Carbapénèmes	Imipénème	IMP	10µg	≥ 22	19 – 21	< 19	CASFM

C2G : céphalosporines de deuxième génération.
C3G : céphalosporines de troisième génération.
C4G : céphalosporines de quatrième génération.

4.8.1.2. Test du double disque

a) Principe :

Cette méthode quantitative repose sur la comparaison des zones d'inhibition autour des disques de céfotaxime, ceftazidime et de céfépime avec et sans acide clavulanique. En cas de production de BLSE, le diamètre de la zone d'inhibition autour du disque testé avec l'acide clavulanique doit être supérieur de plus de 5 mm à celui du disque testé seul (sans inhibiteur). Elle est réalisée selon le protocole décrit par (**Rahal *et al.*, 2005).**

b) Protocole (Figure 24) :

- Procéder à la préparation de l'inoculum et à l'ensemencement comme décrit dans le test de synergie.
- Placer un disque d'AMC et un disque de CTX (respectivement en positions 1 et 2), espacés de 2,5 cm de centre à centre.
- Laisser diffuser les antibiotiques à température ambiante.
- Après une heure de diffusion, retirer le disque d'AMC et le remplacer par un deuxième disque de CTX.
- Incuber les boîtes pendant 18 heures à 37 °C.

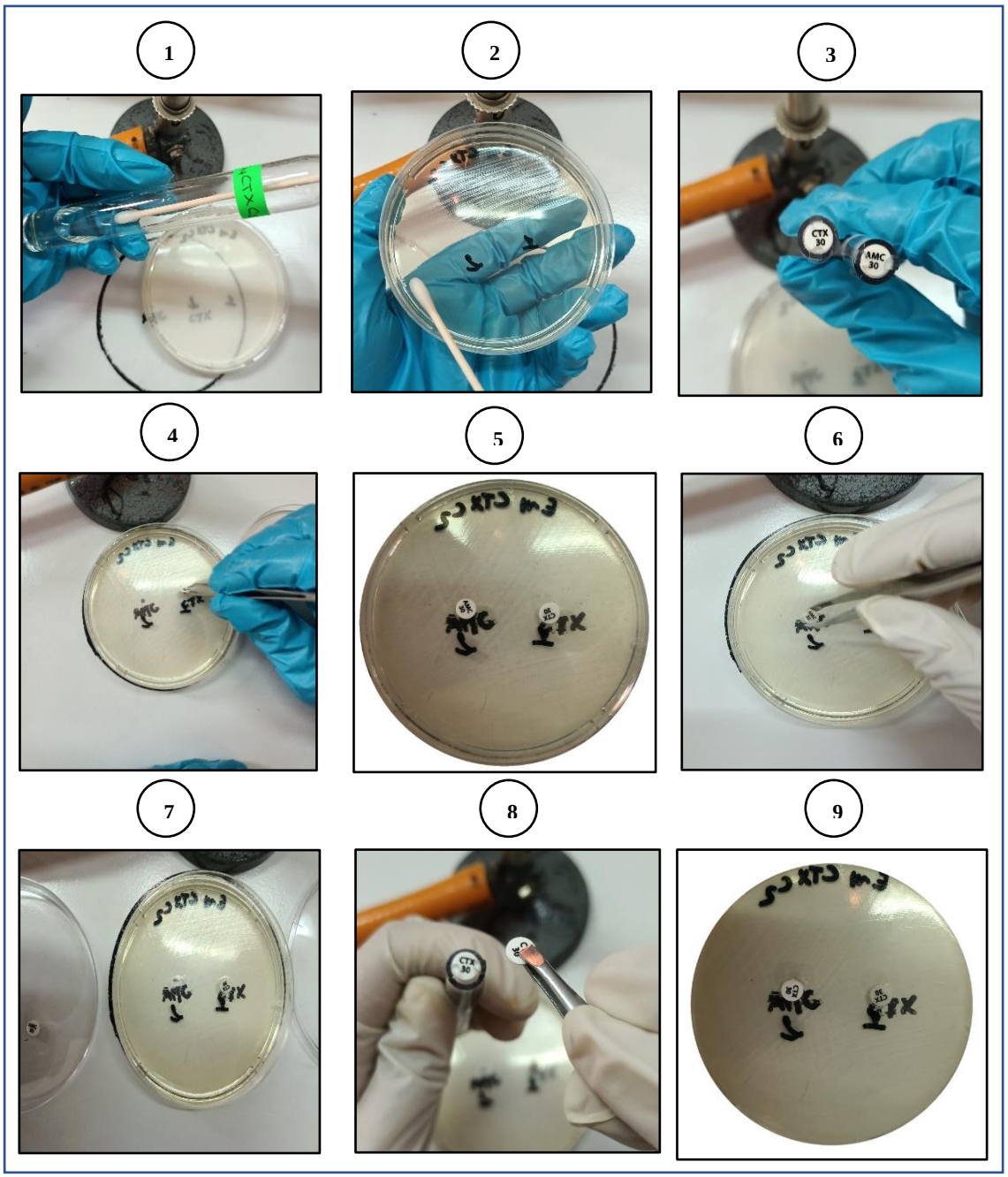
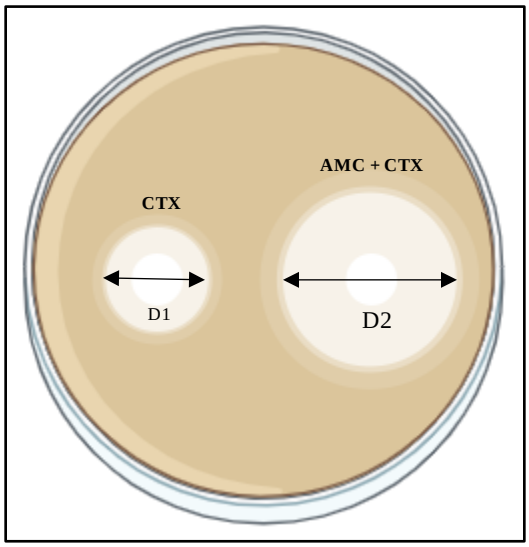


Figure 24 : Etapes de test du double disque **(Photos personnelles., 2025).**

c) Lecture :

Le test du double disque est considéré comme positif lorsque le diamètre de la zone d'inhibition autour du disque CTX appliqué après la diffusion du disque d'AMC est supérieur ou égal à 5 mm par rapport au diamètre de la zone d'inhibition autour du disque CTX seul **(Figure 25)**. Cela indique la présence d'une BLSE **(CASFM., 2024).**



Test positif : D2 ≥ D1+ 5 mm

Figure 25 : Interprétation de test du double disque.

4.8.2. Screening des souches pour la détection des céphalosporinases et des carbapénèmases

a) Protocole :

- Procéder de la même manière précédemment décrite pour la préparation de l'inoculum et l'ensemencement.
- Placer un disque de céfoxitine (FOX) et un disque d'imipénème (IMP) sur la gélose, en respectant la distance entre les disques **(Figure 26)**.
- Incuber les boîtes à 37°C pendant 18 à 24 heures.

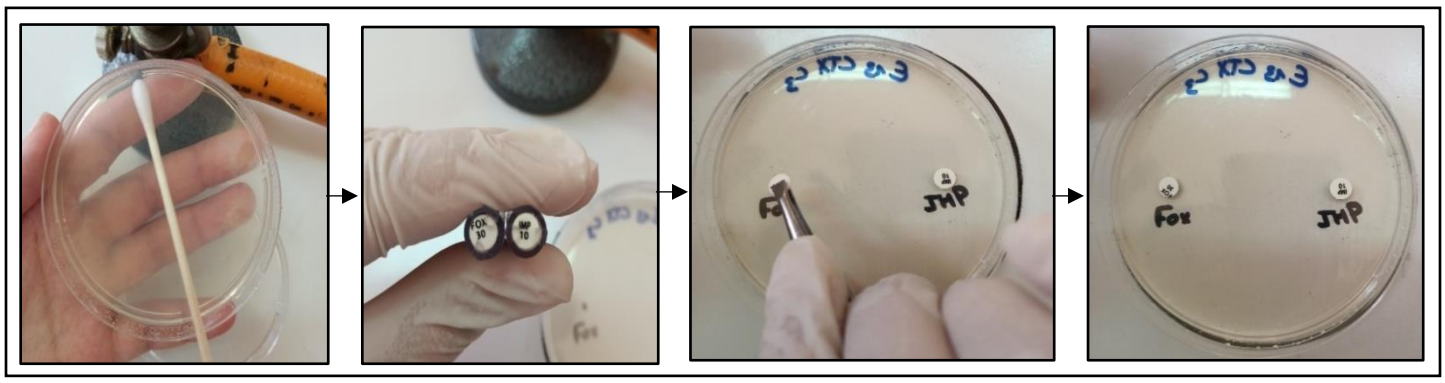


Figure 26 : Screening des souches **(Photo personnelle., 2025).**

a) Lecture :

Les souches dont le diamètre d'inhibition autour du disque FOX est inférieur à 18 mm c.-à-d. résistantes, sont présumées productrices de bêta-lactamases de type AmpC, et doivent être soumises au test du disque AmpC pour confirmation **(Black *et al.*, 2005).**

Les souches présentant une sensibilité réduite au carbapénème testé : un diamètre inférieur à 22 mm autour du disque IMP c.-à-d. résistantes ou intermédiaires, sont orientées vers des tests de détection des carbapénèmases : le test Carba NP, le test mCIM et le test eCIM **(CLSI.,2024).**

4.8.3. Test AmpC pour la détection d'une céphalosporinase

a) Principe

Ce test a été décrit par **Black *et al.*, (2005)**, il repose sur la capacité des bêta-lactamases de type AmpC à hydrolyser les céphamycines, notamment la céfoxitine. Lorsqu'elles sont produites par une souche bactérienne, ces enzymes peuvent inactiver l'antibiotique, entraînant une réduction ou une distorsion de la zone d'inhibition observée sur une souche indicatrice sensible.

b) Protocole (Figure 27) :

- Préparer une suspension standardisée de la souche *E. coli* ATCC 25922 à 0,5 McFarland.
- Ensemencer par écouvillonnage sur gélose MH.
- Placer un disque de céfoxitine (FOX : 30 µg) au centre de la boîte.
- Déposer un disque stérile (6 mm) juste à côté du disque de céfoxitine, en veillant à ce qu'il le touche presque.
- Prélever plusieurs colonies d'une culture fraîche de la souche testée, puis les étaler directement sur le disque stérile déjà placé sur la gélose.
- Incuber la boîte à 37°C pendant 24 heures.

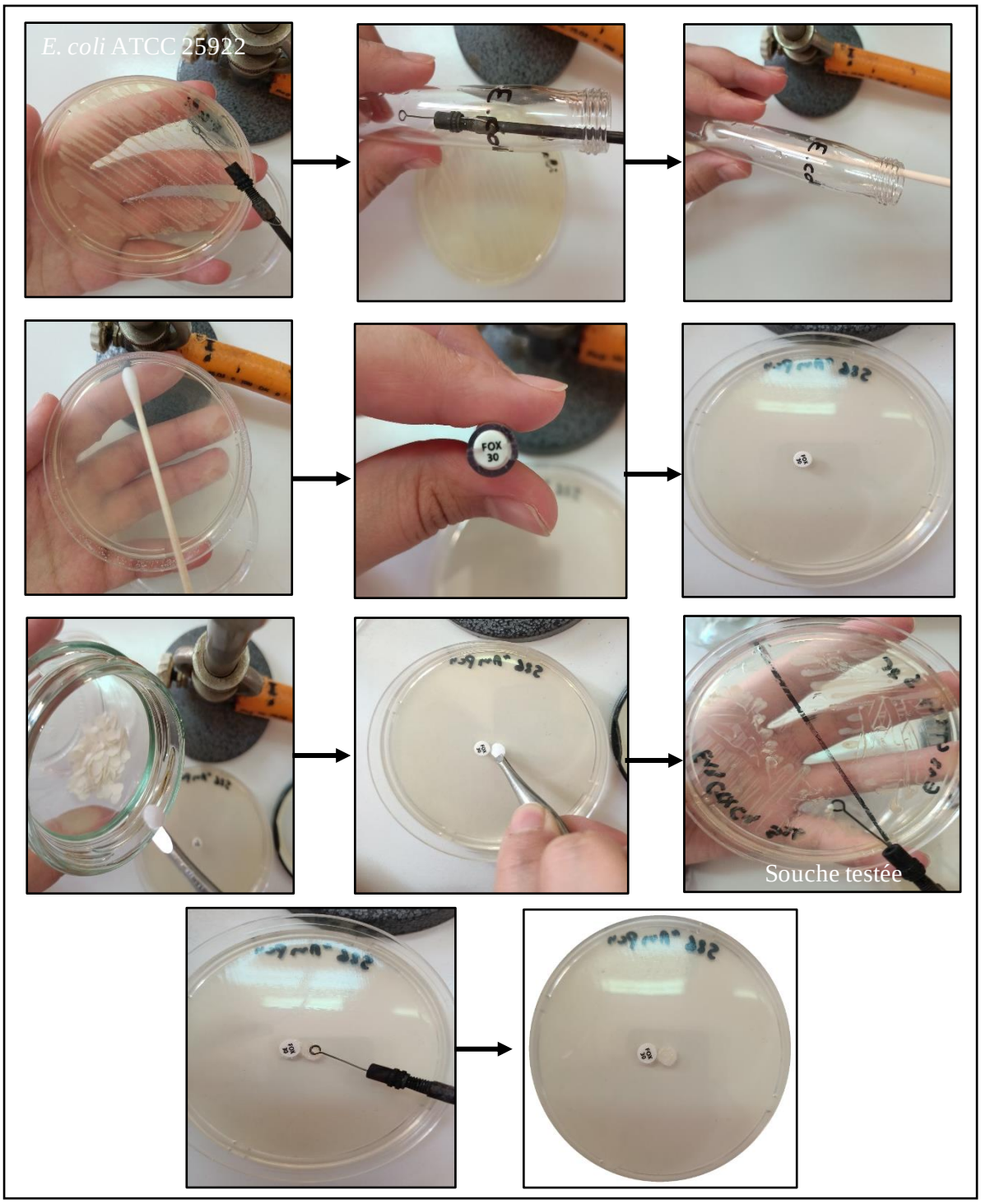


Figure 27 : Protocole du test AmpC **(Photo personnelle., 2025).**

c) Interprétation :

L'observation d'une indentation ou d'un aplatissement de la zone d'inhibition du côté du disque contenant la souche testée traduit une inactivation enzymatique de la céfoxitine, indiquant un résultat positif. En revanche, l'absence de déformation visible suggère une absence d'inactivation significative, ce qui correspond à un résultat négatif.

4.8.4. Recherche des carbapénèmases

La recherche des carbapénèmases est réalisée à l'aide des trois tests :

- Test de Hodge modifié.
- Test Carba NP (Carba Nordmann-Poirel).
- Tests mCIM (modified carbapenem inactivation method) et eCIM (EDTA carbapenem inactivation method).

4.8.4.1. Test de Hodge modifié

a) Principe :

Ce test repose sur l'inactivation d'un carbapénème par des souches productrices de carbapénèmase, ce qui permet à une souche indicatrice sensible de croître en direction du disque contenant cet antibiotique, le long de la strie d'inoculum de la souche testée **(Pasteran *et al.*, 2016).**

b) Protocole (Figure 28) :

- Ensemencer par écouvillonnage une suspension de la souche indicatrice *E. coli* ATCC 25922 en culture confluente sur gélose MH.
- Placer un disque de carbapénème : imipénème (IMP) au centre de la boîte de Pétri.
- Ensemencer la ou les souches à tester en traçant une strie fine avec un écouvillon, partant du disque IMP jusqu'au bord de la boîte (jusqu'à 4 souches peuvent être testées par boîte).
- Incuber la boîte à 37°C pendant 24 heures.

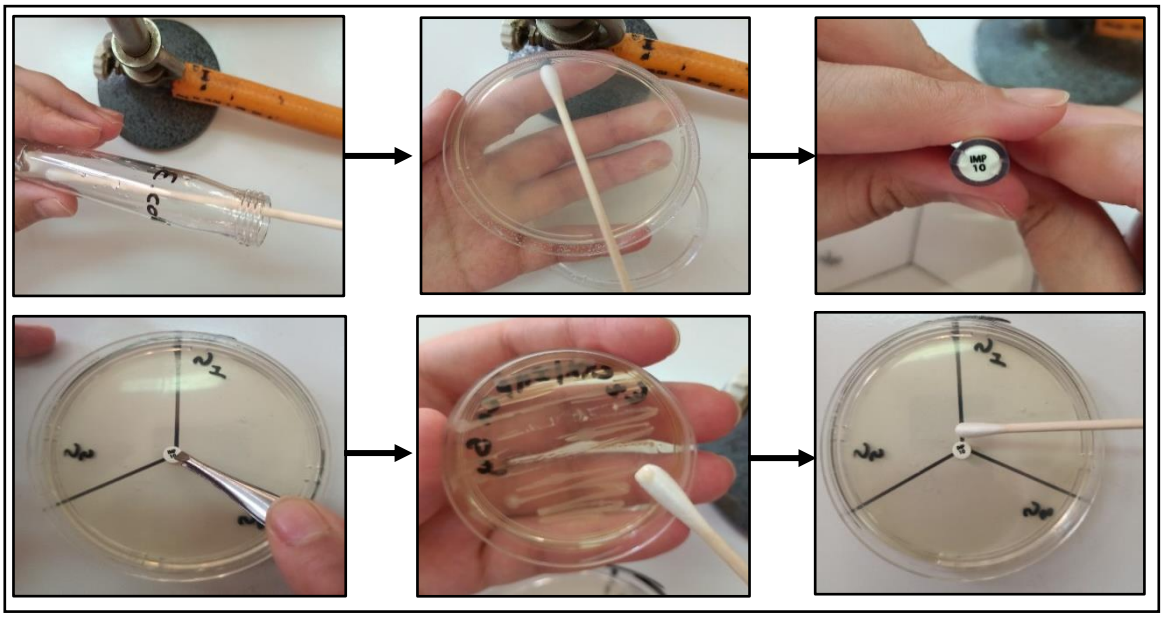


Figure 28 : Protocole du test de Hodge modifié **(Photo personnelle., 2025).**

c. Interprétation :

La présence d'une carbapénèmase est mise en évidence par une distorsion ou une déformation de la zone d'inhibition autour du disque de carbapénème, au niveau du point de contact avec la strie de la souche testée.

4.8.4.2. Test Carba NP

a) Principe :

Le test Carba NP recommandé par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), est un test biochimique permettant la détection rapide (en moins de 2 heures) de la production de carbapénémases chez les bacilles à Gram négatif. Il repose sur l'hydrolyse in vitro de l'imipénème par un lysat bactérien, détectée par un changement de pH à l'aide de l'indicateur rouge de phénol (passage du rouge à l'orange/jaune) **(Pasteran *et al.*, 2016).**

b) Protocole :

- **Préparation de la solution A :**
  - Préparer une solution concentrée de rouge de phénol à 0,5 % (p/v) **(ANNEXE 10)**.
  - Dans un bécher de 50 ml, ajouter 2 ml de cette solution à 16,6 ml d'eau distillée.
  - Ajuster le pH de la solution obtenue à 7,8 en ajoutant goutte à goutte une solution de NaOH 0,1 N **(ANNEXE 10)**.

- Ajouter ensuite 180 µl d'une solution de $ZnSO_4$ à 10 mM **(ANNEXE 10)** pour obtenir une concentration finale de $ZnSO_4$ de 0,1 mM**.**

- **Préparation de la solution B (solution A avec l'imipénème) :**

- Peser 30 mg d'imipénème.
- Ajouter cette quantité à 5 ml de la solution A.
- Mélanger jusqu'à dissolution complète de l'antibiotique, afin d'obtenir une concentration finale de 6 mg/ml en imipénème.

- **Technique du test Carba NP :**

- Ajouter 200 µl de tampon de lyse Tris-HCl 20 mM dans un tube Eppendorf de 1,5 ml.
- Prélever un ose de 10 µl de colonies bactériennes (issues de préférence de la zone autour du disque de carbapénème sur un antibiogramme) et les resuspendre dans le tube contenant le tampon de lyse.
- Vérifier que la suspension est homogène. Si nécessaire, homogénéiser par pipetage (mouvement haut-bas) ou par vortex pendant 5 secondes afin de bien dissocier les colonies.
- Répartir 100 µl du lysat bactérien dans deux tubes Eppendorf distincts, étiquetés respectivement « A » et « B » (en indiquant également le code de la souche testée).
- Ajouter au tube A : 100 µl de solution A (sans imipénème) et au tube B : 100 µl de solution B (solution A + imipénème à 6 mg/ml).
- Vortexer légèrement les deux tubes.
- Incuber à 37 °C pendant un maximum de 2 heures.

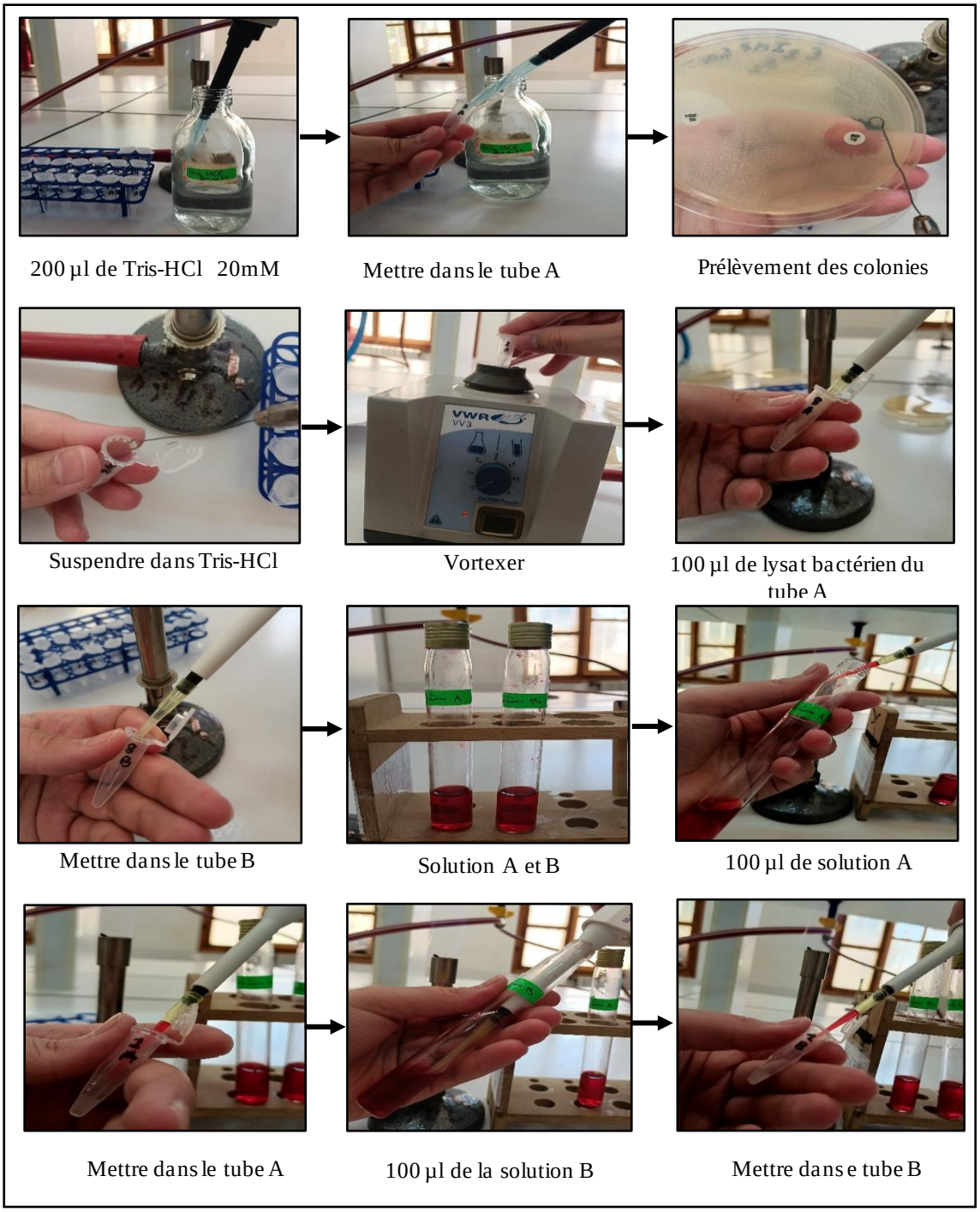


Figure 29 : Protocole du test Carba NP **(Photo personnelle., 2025).**

c) Lecture et interprétation :

La lecture se fait en observant les couleurs des tubes A et B et l'interprétation se fait selon **le tableau 04.**

Tableau 4 : Interprétation des résultats du test Carba NP **(CLSI., 2024).**

Tube A (Sans imipénème)	Tube B (Plus imipénème)	Interprétation
Rouge ou rouge orange	Rouge ou rouge orange	Négative, pas de Carbapénèmase détectée
Rouge ou rouge orange	Orange claire, jaune foncé, ou jaune	Positive, production de carbapénèmase
Rouge ou rouge orange	Orange	Invalide
Orange, orange claire, jaune foncé, ou jaune	N'importe quelle couleur	Invalide

4.8.4.3. Tests mCIM et eCIM:

Ces tests sont recommandés par le CLSI pour la détection des carbapénémases.

- **Principe de test mCIM (modified carbapenem inactivation method):**

Le test mCIM repose sur l'incubation d'un disque de méropénème avec la souche à tester; si cette dernière produit une carbapénèmase, l'antibiotique est hydrolysé, indiquant ainsi la présence de l'enzyme **(Pierce *et al.*, 2017).**

- **Principe de test eCIM (EDTA carbapenem inactivation method):**

Lorsque le test mCIM donne un résultat positif, le test eCIM est réalisé en complément afin de différencier les carbapénèmases de type métallo-bêta-lactamases (MBL) de celles de type sérine-bêta-lactamases. Le test eCIM repose sur la capacité de l'EDTA à inhiber spécifiquement l'activité des MBL **(Verma *et al.*, 2024).**

a) Protocole

- À l'aide d'une anse stérile, prélever 1 µl de la souche à tester à partir d'une culture jeune.
- Suspendre la souche dans deux tubes de 2 mL de bouillon trypticase de soja (TSB) :
  - Un tube pour le test mCIM (sans EDTA).
  - Un second tube pour le test eCIM : ajouter 20 µL d'EDTA 0,5 M pour obtenir une concentration finale de 5 mM.
- Vortexer vigoureusement chaque suspension pendant 10 à 15 secondes.
- Ajouter de manière aseptique un disque de méropénème (MRP 10 µg) dans chaque tube, à l'aide d'une pince stérile.

- Incuber les deux tubes à 37°C pendant 4 h 15 min **(Figure 30).**

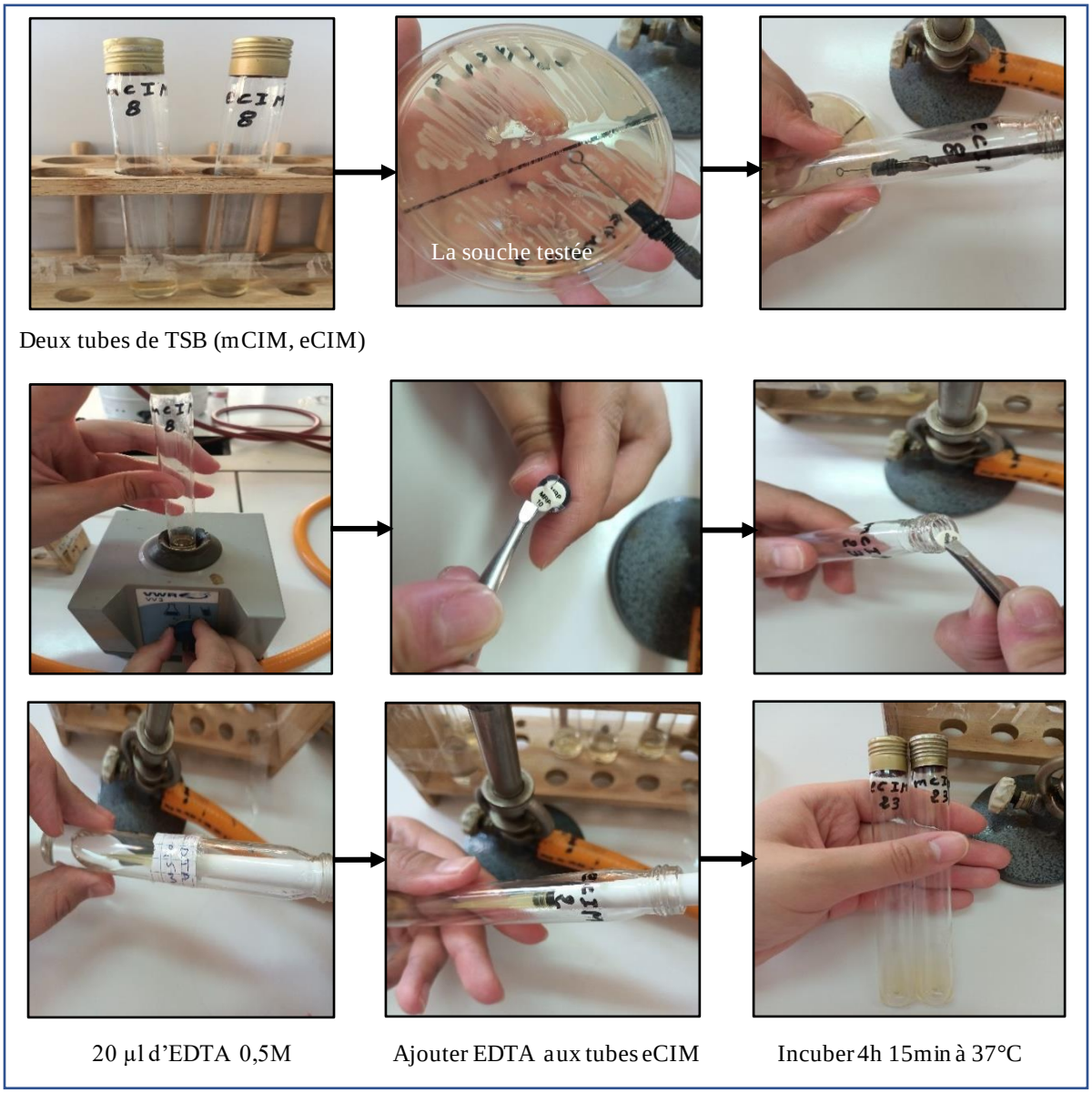


Figure 30 : Protocole mCIM et eCIM **(Photo personnelle., 2025)**.

Juste avant la fin de l'incubation :

- Préparer une suspension d'*E. coli* ATCC 25922 à une turbidité de 0,5 McFarland.
- Ensemencer par écouvillonnage sur gélose MH.
- Laisser sécher la surface de la gélose pendant 3 à 10 minutes.
- Retirez le disque de MRP de chaque suspension à l'aide d'une anse de platine en plaçant le côté plat de la boucle contre le bord plat du disque. Faites glisser et appuyez délicatement sur l'anse de platine le long du bord intérieur du tube pour éliminer l'excès de liquide du disque. Retirer le disque du tube, puis placez-le sur la boite MH préalablement inoculée avec la souche indicatrice d'*E. coli.*

- Retourner les boîtes et incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures.

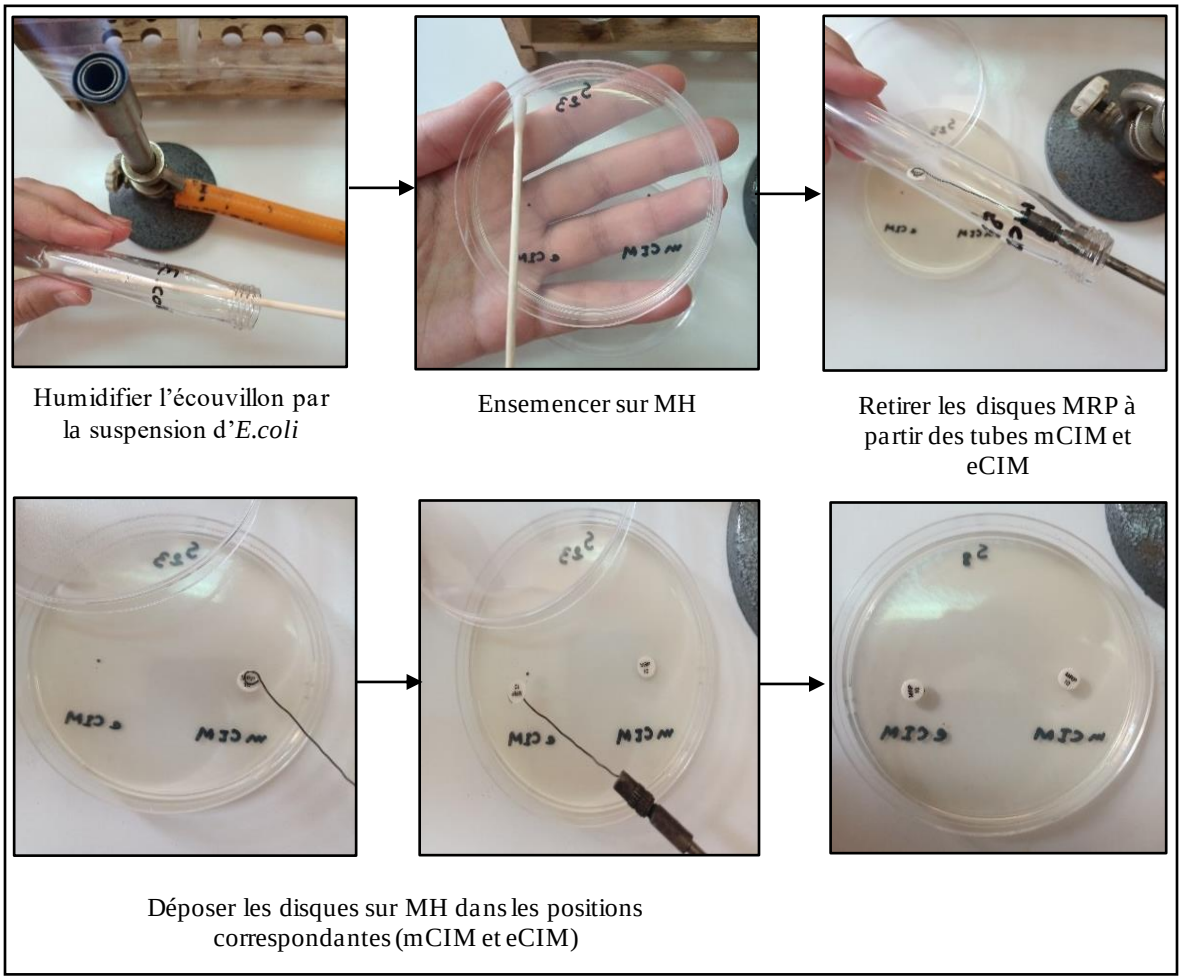


Figure 31 : Protocole de mCIM / eCIM **(la suite) (Photo personnelle., 2025).**

b) Interprétation :

- **Test mCIM**

Mesurer le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque de MRP.

Carbapénèmase positive :

- Diamètre de la zone de 6 à 15 mm.
- Présence de colonies ponctuelles dans une zone de 16 à 18 mm.

Si l'isolat produit de carbapénèmase, le MRP sera hydrolysé et il n'y aura aucune zone d'inhibition ou inhibition limitée de la croissance d'*E. coli.*

Carbapénèmase négative :

- Diamètre de zone ≥ 19 mm (zone claire).

Si l'isolat ne produit pas de carbapénémase, le MRP ne sera pas hydrolysé et inhibera croissance de l'*E. coli* sensible au MRP.

Carbapénèmase indéterminée :

- Diamètre de zone de 16 à 18 mm
- Diamètre de la zone ≥ 19 mm et présence de colonies ponctuelles dans la zone.

La présence ou l'absence d'une carbapénèmase ne peut être confirmée dans ce cas.

- **Test eCIM**

Interpréter eCIM uniquement lorsque le test mCIM est positif.

Métallo-β-lactamase positive :

- Une augmentation ≥ 5 mm du diamètre de la zone pour l'eCIM par rapport au diamètre de la zone pour le mCIM.

Si l'isolat produit une MBL, l'activité de la carbapénèmase sera inhibée en présence d'EDTA de telle sorte que le MRP ne sera pas hydrolysé aussi efficacement que dans le tube sans EDTA. Le résultat est une inhibition d'*E. coli* sensible au MRP et une augmentation du diamètre de la zone eCIM par rapport au diamètre de la zone mCIM.

Métallo-β-lactamase négative :

- Une augmentation ≤ 4 mm du diamètre de zone pour eCIM par rapport au diamètre de zone du mCIM.

Si l'isolat produit une sérine carbapénèmase, l'activité de la carbapénèmase ne sera pas affectée par la présence d'EDTA et il n'y aura pas ou peu (≤ 4 mm) d'augmentation du diamètre de la zone en présence d'EDTA par rapport au diamètre de la zone mCIM.

Tableau 5 : Interprétation des résultats des tests mCIM et eCIM combinés **(CLSI., 2024).**

Résultat mCIM	**Résultat eCIM**	**Interprétation**
Négatif	Ne pas interpréter	Carbapénèmase non détectée
Positif	Négatif	Carbapénèmase à sérine détectée
Positif	Positif	Métallo-β-lactamase détectée
Non concluant	Ne pas interpréter	Test non concluant pour la présence de carbapénèmase

Chapitre 03

Résultats et discussion

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Dans un contexte mondial marqué par l'émergence croissante des bactéries multirésistantes, l'étude de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries d'origine alimentaire devient une priorité absolue en matière de santé publique. La viande de volaille, largement consommée et souvent produite dans des conditions favorisant l'usage abusif des antimicrobiens, constitue un vecteur potentiel de dissémination de souches résistantes à l'homme. C'est dans cette optique que notre étude a été réalisée dans le but d'isoler des ERC3G et des ERC de la viande de poulet, afin de déterminer leurs phénotypes de résistance aux β-lactamines et d'évaluer la prévalence des β-lactamases détectées.

Les résultats de l'identification biochimique ont mis en évidence, malgré un nombre limité d'isolats, une diversité d'espèces dont *Escherichia coli* est la plus fréquente, suivie de *Klebsiella* spp., et *Hafnia alvei*, ainsi que la présence de *Salmonella choleraesuis ssp. arizonae,* un pathogène alimentaire.

Les souches isolées ont été soumises à des tests phénotypiques pour la recherche de trois types de β-lactamases : le test de synergie et le test du double disque pour la détection des BLSE, le test AmpC pour les céphalosporinases, ainsi que les tests de Hodge modifié, Carba NP, mCIM et eCIM pour les carbapénémases.

Les résultats obtenus révèlent une présence avérée des trois types de β-lactamases. La prévalence des souches productrices de BLSE était non négligeable, avec prédominance d'*E. coli*, ce qui souligne leur implication probable dans la dissémination de cette résistance. Plusieurs souches ont également été considérées comme BLSE ±, nécessitant des tests complémentaires pour la confirmation. De plus, les céphalosporinases AmpC étaient détectées dans la moitié des souches, ce qui présente un taux alarmant qui soulève de sérieuses inquiétudes quant à la propagation de ce mécanisme de résistance. La détection de carbapénémases de type MBL et de type sérine chez certaines souches, même en faibles proportions, est particulièrement préoccupante. Ainsi, la présence des entérobactéries productrices de telles β-lactamases dans la viande de poulet constitue un véritable signal d'alarme, en raison des impasses thérapeutiques posées par ces bactéries, les carbapénèmes étant les antibiotiques du dernier recours. En parallèle, l'étude de la sensibilité aux six β-lactamines testées (AMC, CTX, CAZ, FEP, FOX et IMP) a montré des taux résistance relativement élevés en particulier à l AMC et non négligeable l'IMP.

Par ailleurs, la répartition des souches isolées selon les β-lactamases détectées a montré que la plupart des souches exprimaient au moins un type de β-lactamases (AmpC ou BLSE), un quart des souches co-exprimant simultanément deux types de β-lactamases. Il convient de noter que toutes les souches productrices de carbapénémases exprimaient également BLSE ou AmpC, renforçant ainsi leur potentiel de résistance multiple. Parmi celles-ci, une souche de *Salmonella choleraesuis ssp. arizonae*, bactérie pathogène, produisait à la fois BLSE et MBL, soulignant la gravité du phénomène.

Au vu des résultats obtenus, il apparaît indispensable de renforcer les dispositifs de surveillance microbiologique dans la filière avicole, notamment en ce qui concerne la résistance aux β-lactamines. La sensibilisation des éleveurs et des professionnels du secteur, à l'utilisation des antibiotiques en élevage, est une mesure prioritaire. Il est également essentiel d'encourager la recherche appliquée visant à développer des alternatives thérapeutiques plus sûres, dans le but de limiter la propagation des souches multirésistantes et de préserver l'efficacité des antibiotiques disponibles.

Enfin, plusieurs pistes peuvent être envisagées pour approfondir cette étude :

- confirmation de la présence ou l'absence des BLSE par le test à la cloxacilline, pour les souches BLSE ±;
- caractérisation moléculaire par PCR et séquençage des gènes codant les β-lactamases afin de confirmer les résultats phénotypiques;
- étude comparative des entérobactéries isolées de la viande de poulet et de celles d'autres produits alimentaires d'origine animale (tels que la viande rouge, les œufs ou les produits laitiers crus) pour évaluer la diversité des profils de résistance et la circulation des souches multirésistantes dans la chaîne alimentaire.
- recherche des alternatives aux antibiotiques utilisés dans l'élevage avicole, afin d'améliorer la santé animale sans contribuer au développement de la résistance aux antibiotiques.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Adeolu M., Alnajar S., Naushad S., Gupta R. S. (2016). Genome-based phylogeny and taxonomy of the '*Enterobacteriales*': proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 66:5575–5599. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001485.

Alabi, O. J., O. John. Makinde, S.S.A. Egena, Mbajiorgu, F., & Adewara, O. (2023). Antibiotics in broilers chicken production: a review of impacts, challenges and potential alternatives: https://doi.org/10.12982/VIS.2024.039. Veterinary Integrative Sciences, 22(2), 559–578. retrieved from https://he02.tci-thaijo.org/index.php/vis/article/view/263812.

Al-chalaby A. Y., Al-Abedi S., Al-Aalim A. (2024). Isolation and identification of Klebsiella pneumoniae from respiratory disease in chicken. Iraq J Vet Sci. 38(2):583–588. https://doi.org/10.33899/ijvs.2024.144877.3335.

Althaus, D., Zweifel, C., & Stephan, R. (2017). Analysis of a poultry slaughter process: Influence of process stages on the microbiological contamination of broiler carcasses. Italian Journal of Food Safety, 6(4), 6864.

Angelini, F. A., Pegels, E. R., & Quiroga, M. I. (2021). Evaluation of phenotypic methods for the detection of carbapenemases applicable to low complexity laboratories. Revista de Ciencia y Tecnología (RECyT), 36(1), 14–23. https://doi.org/10.36995/j.recyt.2021.36.002.

Arefinejad, A., Khodadadi, M., Zeinali, T., & Yousefi, M. (2023). Phenotypic and genotypic evaluation of ESBL- and AmpC-producing *Escherichia coli* isolated from chicken distributed in Birjand, East of Iran. Acta Alimentaria, 52(1), 52–60. https://doi.org/10.1556/066.2022.00164.

B

Bajracharya, A. M., Kharel, P., Thapa, S., & Shrestha, S. (2024). Metallo-β-Lactamase Producing Gram-Negative Bacteria Isolated from Chicken Meat in Bharatpur, Chitwan. Medical Sciences Forum, 24(1), 1. https://doi.org/10.3390/ECA2023-16386.

Barka, M. S., Cherif-Anntar, A., & Benamar, I. (2021). Antimicrobial resistance patterns and transferable traits in *Enterobacteriaceae* isolates from poultry in Tlemcen, Algeria. African Journal of Clinical and Experimental Microbiology, 22(2), 196-203.

Ben Youssef S., Belguith J., Hadiji R. (2016). Les bêta-lactamines en médecine vétérinaire. École Nationale de Médecine Vétérinaire, Sidi Thabet. 53 p. https://pharmatox.files.wordpress.com/2016/01/bc3aatalactamines-2015-20161.pdf .

Benameur, Q., Tali-Maamar, H., Assaous, F., Guettou, B., Benklaouz, M. B., Rahal, K., & 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. https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.469-473.

Bentabet J. (2021). Profil épidémiologique des entérobactéries productrices de β-lactamases à spectre élargi à l'hôpital Ibn Tofail. Thèse de doctorat. Université Cadi Ayyad, Faculté de Médecine et de Pharmacie – Marrakech. 102 p. http://wd.fmpm.uca.ma/biblio/theses/annee-htm/FT/2021/these72-21.pdf

BioMérieux. Galeries d'identification API. https://www.biomerieux.fr/fr/diagnostic-clinique/galeries-didentification-api.

Black, J. A., Moland, E. S., & Thomson, K. S. (2005). AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking chromosomal AmpC beta-lactamases. Journal of clinical microbiology, 43(7), 3110–3113. https://doi.org/10.1128/JCM.43.7.3110-3113.2005.

Brătfelan, D. O., Tabaran, A., Colobatiu, L., Mihaiu, R., & Mihaiu, M. (2023). Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Isolates from Chicken Meat in Romania. Animals: an open access journal from MDPI, 13(22), 3488. https://doi.org/10.3390/ani13223488.

Bushen, A., Tekalign, E., & Abayneh, M. (2021). Drug- and Multidrug-Resistance Pattern of *Enterobacteriaceae* Isolated from Droppings of Healthy Chickens on a Poultry Farm in Southwest Ethiopia. Infection and drug resistance, 14, 2051–2058. https://doi.org/10.2147/IDR.S312185.

C

Chaibi, N., Cherrad, A., & Nouioua, F. (2023). Recherche et antibiogramme des souches d'*Escherichia coli* dans les abats de volailles dans un abattoir à Bordj Bou Arreridj (Mémoire de Master, Université de Bordj Bou Arreridj, Algérie, 62 p.).

Cheemala, S. S., Vara, A., Lakshmi, M. S., Pradhan, S., & Kalyani, K. (2023). Phenotypic Detection of Carbapenemase Production in Gram Negative Bacilli from Clinical Isolates in a Tertiary Care Hospital in Telangana. Journal of Pure and Applied Microbiology, 17(4). https://doi.org/10.22207/JPAM.17.4.07.

Clemente, L., Leão, C., Moura, L., Albuquerque, T., & Amaro, A. (2021). Prevalence and characterization of ESBL/AmpC producing *Escherichia coli* from fresh meat in Portugal. Antibiotics, 10(11), 1333. https://doi.org/10.3390/antibiotics10111333.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2024). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (33rd ed., CLSI supplement M100). Clinical and Laboratory Standards Institute. https://www.darvashco.com/wp-content/uploads/2024/07/CLSI-2024_compressed-1.pdf .

Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM). (2023). Société Française de Microbiologie. https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2024/06/CASFM2024_V1.0.pdf .

Condalab. (2022). MacConkey Agar EP/USP/ISO – Fiche technique (Réf. 1052). Condalab. https://www.biovendor.sk/d-doc/2/14633/638624275660000000/LC1052.pdf.

D

Debbarma, S., Baruah, M. S., Debbarma, A., & Sneha, E. N. P. (2024). Chicken meat: A nutritious choice for a healthier future. Vet Farm Frontier e-magazine, Special Issue WNW 2024(3), 10–13. https://www.researchgate.net/publication/383863144.

Denis F., Le Hello S., Barraud O. (2016). Bacilles à Gram négatif aérobie et aéro-anaérobies. In : Denis F., Ploy M.-C., Martin C., Cattoir V. (éds). Bactériologie médicale. 3e éd. Elsevier Masson, chap. 30, pp : 301-387.

Díaz-Sánchez S., Moscoso S., Solis S., Andino A., Hanning I. (2015). Antibiotic use in poultry: A driving force for organic poultry production. Food Prot Trends. 35(6):440–447. https://www.researchgate.net/publication/282332674_Antibiotic_use_in_poultry_A_driving_force_for_organic_poultry_production.

E

Elmanama, A., Al-Reefi, M., Shamali, M., & Hemaid, H. (2019). Carbapenems resistance among Gram negative bacteria isolated from poultry samples in Gaza - Palestine. The International Arabic Journal of Antimicrobial Agents, 8. https://doi.org/10.3823/826.

F

Faife, S.L., Zimba, T., Sekyere, J.O., Govinden, U., Chenia, H.Y., Simonsen, G.S., Sundsfjord, A. and Essack, S.Y. (2020). β-lactam and fluoroquinolone resistance in *Enterobacteriaceae* from imported and locallyproduced chicken in Mozambique. J. Infect. Dev. Ctries., 14(5): 471–478.

Food and Agriculture Organization of the United Nations – AGS. (2007). Poultry: Information on post-harvest operations. Instructional Manual, 23 p. http://www.fao.org/3/a-au131e.pdf.

G

Gadou V. (2019). Epidémiologie moléculaire des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi résistantes aux aminosides et aux fluoroquinolones dans le district d‟Abidjan, Côte d‟ivoire. Thèse de doctorat. Université Félix HOUPHOUET BOIGNY.

Gauba A., Rahman K. M. (2023). Evaluation of antibiotic resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. Antibiotics. 12(11), 1590. https://doi.org/10.3390/antibiotics12111590.

Gazal, L. E. S., Medeiros, L. P., Dibo, M., Nishio, E. K., Koga, V. L., Gonçalves, B. C., Grassotti, T. T., de Camargo, T. C. L., Pinheiro, J. J., Vespero, E. C., de Brito, K. C. T., de Brito, B. G., Nakazato, G., & Kobayashi, R. K. T. (2021). Detection of ESBL/AmpC-producing and fosfomycin-resistant *Escherichia coli* from different sources in poultry production in Southern Brazil. Frontiers in Microbiology, 11, 604544. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.604544.

Ghaderpour, A., Ho, W. S., Chew, L. L., Bong, C. W., Chong, V. C., Thong, K. L., & Chai, L. C. (2015). Diverse and abundant multi-drug resistant E. coli in Matang mangrove estuaries, Malaysia. Frontiers in Microbiology, 6, 977.

Ghasemnejad, A., Doudi, M., & Amirmozafari, N. (2018). Evaluation of Modified Hodge Test as a Non-molecular Assay for Accurate Detection of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. Polish Journal of Microbiology, 67(3), 291–295. https://doi.org/10.21307/pjm-2018-034.

Guergueb, N., Alloui, N., Ammar, A., Aoun, L., & Chachoua, I. (2021). Factors associated with bacterial contamination of poultry meat at butcher shops in Biskra, Algeria = Faktori povezani s bakterijskom kontaminacijom mesa peradi u mesnicama u Biskri, Alžir. Veterinarska stanica, 52(4), 321–328. https://doi.org/10.46419/vs.52.4.3.

H

Herbert, R., & Curtis, C. (2021). Commonly encountered central nervous system infections in the neurointensive care unit. Anaesthesia & Intensive Care Medicine, 22(3), 132–138. https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2020.12.002.

Hughes, L. D., Aljawadi, A., & Pillai, A. (2019). An overview of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) in trauma and orthopaedics. Journal of Orthopaedics, 16(6), 455–458. https://doi.org/10.1016/j.jor.2019.06.026.

Husna, A., Rahman, M. M., Badruzzaman, A. T. M., Sikder, M. H., Islam, M. R., Rahman, M. T., Alam, J., & Ashour, H. M. (2023). Extended-Spectrum β-Lactamases (ESBL): Challenges and Opportunities. Biomedicines, 11(11), 2937. https://doi.org/10.3390/biomedicines11112937.

I

Inamdar D. P., Anuradha B. (2020). Phenotypic methods for detection of Amp C β-lactamases in Gram negative clinical isolates of a tertiary care hospital. Indian J Microbiol Res, 7(2):125–129. https://www.ijmronline.org/article-details/11734.

Islam, M. A., Bose, P., Rahman, M. Z., Muktaruzzaman, M., Sultana, P., Ahamed, T., & Khatun, M. M. (2024). A review of antimicrobial usage practice in livestock and poultry production and its consequences on human and animal health. Journal of Advanced Veterinary and Animal Research, 11(3), 675–685. https://doi.org/10.5455/javar.2024.k817.

Islam, M. A., Bose, P., Rahman, M. Z., Muktaruzzaman, M., Sultana, P., Ahamed, T., & Khatun, M. M. (2024). A review of antimicrobial usage practice in livestock and poultry production and its consequences on human and animal health. Journal of advanced veterinary and animal research, 11(3), 675–685. https://doi.org/10.5455/javar.2024.k817.

J

Janda J. M., Abbott S. L. (2021). The changing face of the family *Enterobacteriaceae* (Order: *Enterobacterales*): New members, taxonomic issues, geographic expansion, and new diseases and disease syndromes. Clin Microbiol Rev. 34(2): e00174-20. https://doi.org/10.1128/CMR.00174-20.

Jarlier, V., Nicolas, M. H., Fournier, G., & Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. Reviews of infectious diseases, 10(4), 867–878. https://doi.org/10.1093/clinids/10.4.867.

Jerab J., Jansen W., Blackwell J., van Hout J., Palzer A., Lister S., Chantziaras I., Dewulf J., De Briyne N. (2022). Real-World Data on Antibiotic Group Treatment in European Livestock: Drivers, Conditions, and Alternatives. Antibiotics (Basel). 11(8):1046. https://doi.org/10.3390/antibiotics11081046.

Jilo, S. A., & Hasan, L. A. (2022). The importance of poultry meat in medicine: A review. Journal of World's Poultry Research, 12(4), 258-262. https://doi.org/10.36380/jwpr.2022.28.

K

Kamboh, A.A., Shoaib, M., Abro, S.H., Khan, M.A., Malhi, K.K. and, Yu, S. (2018). Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* isolated from liver of commercial broilers and backyard chickens. J. Appl. Poult. Res., 27(4): 627–634.

Kamel K., Merghad A., Barour D, Gherissi D.E., and Khenenou T. (2024). High antimicrobial resistance rates and multidrug resistance in *Enterobacteriaceae* isolates from poultry in Souk Ahras region, Algeria, Veterinary World, 17(12): 2709–2718.

Kanaan, M. H. G., Khalil, Z. K., Khashan, H. T., & Alshammari, A. A. (2022). Occurrence of virulence factors and carbapenemase genes in *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* isolated from chicken meat and egg samples in Iraq. BMC Microbiology, 22, 279. https://doi.org/10.1186/s12866-022-02696-7.

Kang, H., Kim, H., Kim, H., Jeon, J. H., Kim, S., Park, Y., & Kim, S. H. (2024). Genetic Characteristics of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Salmonella* Isolated from Retail Meats in South Korea. Journal of microbiology and biotechnology, 34(5), 1101–1108. https://doi.org/10.4014/jmb.2312.12018.

Karunarathna I., Gunawardana K., Warnakulasooriya A., Athulgama P., Dius S., Ranwala R., Bandara S., Godage S., Rodrigo P. N., Jayawardana A., Vidanagama U., Fernando C., Ekanayake U., Hapuarachchi T., Gunasena P., Aluthge P., Gunathilake S., Rathnayak B. (2025). Beta-Lactam Antibiotics: Mechanism of Action and Clinical Relevance. Uva Clinical Pharmacology / Antimicrobial. https://www.researchgate.net/publication/388218378_BetaLactam_Antibiotics_Mechanism_of_Action_and_Clinical_Relevance.

Kebaili, A., & Azmani, I. (2019). Antibiorésistance des entérobactéries d'origine aviaire (Mémoire de Master, Université Belhadj Bouchaib d'Aïn Témouchent, Algérie, 75 p.). https://dspace.univtemouchent.edu.dz/bitstream/123456789/1477/1/Anitibior%C3%A9sistance%20des%20ent%C3%A9robact%C3%A9ries%20d'origine%20aviaire.pdf .

Keeton, J. T., & Dikeman, M. E. (2017). 'Red' and 'white' meats—Terms that lead to confusion. Animal Frontiers, 7(4), 29–33. https://doi.org/10.2527/af.2017.0440.

Kouara S., Branya J., Lebbar Z., Mahmoud M. (2023). Prevalence of enterobacteria producing carbapenemases and BLSE in the adult resuscitation environment at Hassan II hospital in Fes. International Journal of Life Science Research Archive, 5(2): 72–78. https://doi.org/10.53771/ijlsra.2023.5.2.0101.

Kralik G., Kralik Z., Grčević M., Hanžek D. (2018). Quality of chicken meat. In Animal Husbandry and Nutrition: 63-94. https://doi.org/10.5772/intechopen.72865.

Kumari, N., Khutade, K., & Shah, H. (2024). Extended Spectrum Beta-Lactamase and AmpC Producing *Enterobacteriaceae* in Broiler Chicken and Goat in Palghar district, Maharashtra. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 84(8), 125–132. https://doi.org/10.47583/ijpsrr.2024.v84i08.019.

L

Lagha N. (2015). Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries productrices de ß-lactamses à spectre étendu (BLSE) isolées de l‟hôpital de Laghouat.Thèse de doctorat, Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l‟Univers 37-38.

Laghawe, A., Jaitly, N., & Thombare, V. (2012). The simultaneous detection of the ESBL and the AmpC β-lactamases in gram negative bacilli. Journal of Clinical and Diagnostic Research, 6(4), 660–663.

Lakhdari B., Nebbache D., Ouahdi I. (2023). Isolement et antibiogramme d'entérobactéries productrices de β-lactamases à spectre étendu (BLSE) de plusieurs origines à BBA. Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi – Bordj Bou Arreridj. Mémoire de Master en Sciences biologiques, spécialité : Microbiologie appliquée. 84 p.

Landoni M. F., Albarellos G. (2015). The use of antimicrobial agents in broiler chickens. Vet J. 205(1):21–27. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.04.016.

Leinyuy, J. F., Ali, I. M., Karimo, O., & Tume, C. B. (2022). Patterns of Antibiotic Resistance in *Enterobacteriaceae* Isolates from Broiler Chicken in the West Region of Cameroon: A Cross-Sectional Study. The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale, 2022, 4180336. https://doi.org/10.1155/2022/4180336.

Li, P., Jiang, H., Xiong, J., Fu, M., Huang, X., Huang, B., & Gu, Q. (2022). Foodborne pathogens of *Enterobacteriaceae*, their detection and control. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.102086.

M

M.J, Jenkins S.G, Westblade L.F. (2019). EDTA-modified carbapenem inactivation method: a phenotypic method for detecting metallo-β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. J ClinMicrobiol 57: e01757-18. https://doi.org/10.1128/JCM.01757-18.

Marmion, M., Ferone, M. T., Whyte, P., & Scannell, A. G. M. (2021). The changing microbiome of poultry meat; from farm to fridge. Food Microbiology, 99, 103823. https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103823.

Maurer, F. P., Castelberg, C., Quiblier, C., Bloemberg, G. V., & Hombach, M. (2015). Evaluation of carbapenemase screening and confirmation tests with *Enterobacteriaceae* and development of a practical diagnostic algorithm. Journal of Clinical Microbiology, 53(1), 95–104. https://doi.org/10.1128/JCM.01692-14.

Mehdi, Y., Létourneau-Montminy, M. P., Gaucher, M. L., Chorfi, Y., Suresh, G., Rouissi, T., Brar, S. K., Côté, C., Ramirez, A. A., & Godbout, S. (2018). Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. Animal Nutrition, 4(2), 170–178. https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.03.002.

Meletis G. (2016). Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. Therapeutic advances in infectious disease, 3(1), 15–21. https://doi.org/10.1177/2049936115621709.

Mezalira T., Gonçalves D., Dias E., Silva F., Carvalho I., Santos I., Geronimo E., Dias J., Otutumi L. (2019). Extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-producing enterobacteria isolated from broiler breeder chickens. Biotemas. 32(4):1–10. https://doi.org/10.5007/2175-7925.2019v32n4p1 .

Morrison, L., & Zembower, T. R. (2020). Antimicrobial resistance. Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America, 30(4), 619–635. https://doi.org/10.1016/j.giec.2020.06.004.

Moussa N., Moussaoui F. Z. (2016). Recherche des entérobactéries productrices de β-lactamases à spectre élargi dans les viandes de volaille. Université de Tébessa. Mémoire de Master en sciences biologiques, microbiologie appliquée. 75 p.

Müller, M., Wiencierz, A., Gehringer, C., Muigg, V., Bassetti, S., Siegemund, M., Hinic, V., Tschudin-Sutter, S., & Egli, A. (2024). Factors associated with non-carbapenemase mediated carbapenem resistance of Gram-negative bacteria: A retrospective case-control study. International Microbiology, 27(4), 597–606. https://doi.org/10.1007/s10123-023-00405-6.

Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. Microbiology Spectrum, 4(2), 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.

Murray P. R., Rosenthal K. S., & Pfaller M. A. (2020). *Enterobacteriaceae*. In Medical Microbiology (9e éd.), chap. 25, pp. 257-562. Elsevier. https://dokumen.pub/medical-microbiology-9nbsped-9780323673228-9780323674508.html.

N

National Bureau of Agricultural Commodity and Food Standards. (2005). Chicken meat. Thai Agric Stand. ;6700-2005(122-60 D) :17. https://faolex.fao.org/docs/pdf/tha166268.pdf.

Nossair, M.A., Abd El Baqy,F.A., Rizk, M.S.Y., Elaadli, H.;Mansour, A.M., El-Aziz, A.H.A., Alkhedaide, A., Soliman, M.M.;Ramadan, H., & Shukry, M. (2022). Prevalence and Molecular Characterization of Extended-Spectrum β-Lactamases and AmpC β-lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* among Human,Cattle, and Poultry. Pathogens,11, 852. https://doi.org/10.3390/pathogens11080852.

O

Octavia S., Lan R. (2014). The Family *Enterobacteriaceae*. In Rosenberg E., DeLong E. F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds). The Prokaryotes. Springer, Berlin, Heidelberg. 225–286. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38922-1_167.

P

Pagès, J. M., James, C. E., & Winterhalter, M. (2008). The porin and the permeating antibiotic: A selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. Nature Reviews Microbiology, 6(12), 893–903. https://doi.org/10.1038/nrmicro1994.

Pandey N., Cascella M. (2019). Beta-lactam antibiotics. In : StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls https://www.researchgate.net/publication/335681179_Beta_Lactam_Antibiotics.

Paray, A. A., Singh, M., Mir, M. A., & Kaur, A. (2023). Gram staining: A brief review. International Journal of Research and Review, 10(9), 336–341. https://doi.org/10.52403/ijrr.20230934.

Parveen, M.R., Harish, B. N., & Parija, S. C. (2010). AmpC beta-lactamases among gram negative clinical isolates from a tertiary hospital, South India. Brazilian Journal of Microbiology, 41(3), 596–602. https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000300009.

Pasteran, F., Gonzalez, L. J., Albornoz, E., Bahr, G., Vila, A. J., & Corso, A. (2016). Triton Hodge Test: Improved Protocol for Modified Hodge Test for Enhanced Detection of NDM and Other Carbapenemase Producers. Journal of clinical microbiology, 54(3), 640–649. https://doi.org/10.1128/JCM.01298-15.

Pierce, V. M., Simner, P. J., Lonsway, D. R., Roe-Carpenter, D. E., Johnson, J. K., Brasso, W. B., Bobenchik, A. M., Lockett, Z. C., Charnot-Katsikas, A., Ferraro, M. J., Thomson, R. B., Jenkins, S. G., Limbago, B. M., & Das, S. (2017). Modified Carbapenem Inactivation Method for phenotypic detection of carbapenemase production among *Enterobacteriaceae*. Journal of Clinical Microbiology, 55(8), 2321–2333. https://doi.org/10.1128/JCM.00193-17.

Praseptiangga D., Supyani ., Sudibya ., Raharjo D., Shirakawa T. (2017). Prevalence of antibiotic-resistance Enterobacteriaceae strains isolated from chicken meat at traditional markets in Surabaya, Indonesia. IOP Conf Ser Mater Sci Eng. 193:012007. https://doi.org/10.1088/1757-899X/193/1/012007.

Projahn, M., Daehre, K., Roesler, U., & Friese, A. (2018). ESBL-/AmpC-producing Enterobacteriaceae in broiler farms—transmission dynamics at farm level. Microbial Drug Resistance, 24(4), 511-518.

R

Rahal K., Belouni R., Benslimani A. (2005). Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale. Rec de L'OMS. 4éme édition. Algérie.46-52.

Rasamsetti, S., Berrang, M., Cox, N. A., & Shariat, N. W. (2021). Selective pre-enrichment method to lessen time needed to recover *Salmonella* from commercial poultry processing samples. Food Microbiology, 99, 103818. https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103818.

Reich, F., Atanassova, V., & Klein, G. (2013). Extended-spectrum β-lactamase- and AmpC-producing enterobacteria in healthy broiler chickens, Germany. Emerging Infectious Diseases, 19(8), 1253–1259. https://doi.org/10.3201/eid1908.120879.

Robin, F., Gibold, L., & Bonnet, R. (2012). Résistances naturelles et acquises aux β-lactamines chez les entérobactéries : Comment les identifier en pratique quotidienne Revue Francophone des Laboratoires, 2012(447), 47–58. https://doi.org/10.1016/S1773-035X(12)71676-3.

Rodríguez-Guerrero, E., Callejas-Rodelas, J. C., Navarro-Marí, J. M., & Gutiérrez-Fernández, J. (2022). Systematic Review of Plasmid AmpC Type Resistances in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and Preliminary Proposal of a Simplified Screening Method for ampC. Microorganisms, 10(3), 611. https://doi.org/10.3390/microorganisms10030611.

Roth, N., Käsbohrer, A., Mayrhofer, S., Zitz, U., Hofacre, C., & Domig, K. J. (2019). The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. Poultry science, 98(4), 1791–1804. https://doi.org/10.3382/ps/pey539.

Roth, N., Käsbohrer, A., Mayrhofer, S., Zitz, U., Hofacre, C., & Domig, K. J. (2019). The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. Poultry Science, 98(4), 1791–1804. https://doi.org/10.3382/ps/pey539.

Rouger A., Tresse O., Zagorec M. (2017). Bacterial contaminants of poultry meat: Sources, species, and dynamics. Microorganisms. 5(3):50. https://doi.org/10.3390/microorganisms5030050.

S

Salvia, T., Dolma, K. G., Dhakal, O. P., Khandelwal, B., & Singh, L. S. (2022). Phenotypic detection of ESBL, AmpC, MBL, and their co-occurrence among MDR *Enterobacteriaceae* isolates. Journal of Laboratory Physicians, 14(03), 329-335.

Sawa T., Kooguchi K., Moriyama K. (2020). Molecular diversity of extended-spectrum β-lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. J Intensive Care. 8:13. https://doi.org/10.1186/s40560-020-0429-6.

Senthamilselvan, B., Marimuthu Ragavan, R., Rameshkumar, K., Madani, Z., Aridass, D., Sarva, K., Sivakumar, S., Arunagirinathan, N., Alodaini, H., Hatamleh, A., & Narasingam, A. (2024). Molecular analysis of ESBL- and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* in fecal samples from broiler and backyard chickens. Journal of King Saud University - Science, 36, 103191. https://doi.org/10.1016/j.jksus.2024.103191.

Sethuvel, D. P. M., Bakthavatchalam, Y. D., Karthik, M., Irulappan, M., Shrivastava, R., Periasamy, H., & Veeraraghavan, B. (2023). β-Lactam resistance in ESKAPE pathogens mediated through modifications in penicillin-binding proteins: An overview. Infectious Diseases and Therapy, 12(3), 829–841. https://doi.org/10.1007/s40121-023-00771-8.

Sfeir M.M, Hayden J.A, Fauntleroy K.A, Mazur C, Johnson J.K, Simner P.J, Das S, Satlin Shrestha, D., Arjyal, C., Parajuli, H., & Pantha, S. (2024). Phenotypic characterization of ESBL-producing urinary isolates of *E. coli* and *Klebsiella* spp. in a tertiary care children's hospital in Nepal. Tropical Medicine and Health, 52, Article 7. https://doi.org/10.1186/s41182-024-00587-3.

Singh A.,Shahid M., Sami H. (éds). (2022). Beta-Lactam Resistance in Gram-Negative Bacteria. Threats and Challenges. 1re éd. Springer Singapore. 324 p. https://doi.org/10.1007/978-981-16-9097-6 .

V

Verma, G., Singh, N., Smriti, S., Panda, S. S., Pattnaik, D., Tripathy, S., Praharaj, A. K., & Patro, A. R. K. (2024). Modified Carbapenem Inactivation Method and Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)-Carbapenem Inactivation Method for Detection of Carbapenemase-Producing *Enterobacterales* and Pseudomonas aeruginosa. Cureus, 16(6), e63340. https://doi.org/10.7759/cureus.63340 .

Von Tippelskirch, P., Gölz, G., Projahn, M., Daehre, K., Friese, A., Roesler, U., Alter, T., & Orquera, S. (2018). Prevalence and quantitative analysis of ESBL and AmpC beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* in broiler chicken during slaughter in Germany. International Journal of Food Microbiology, 281, 82–89. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.022.

W

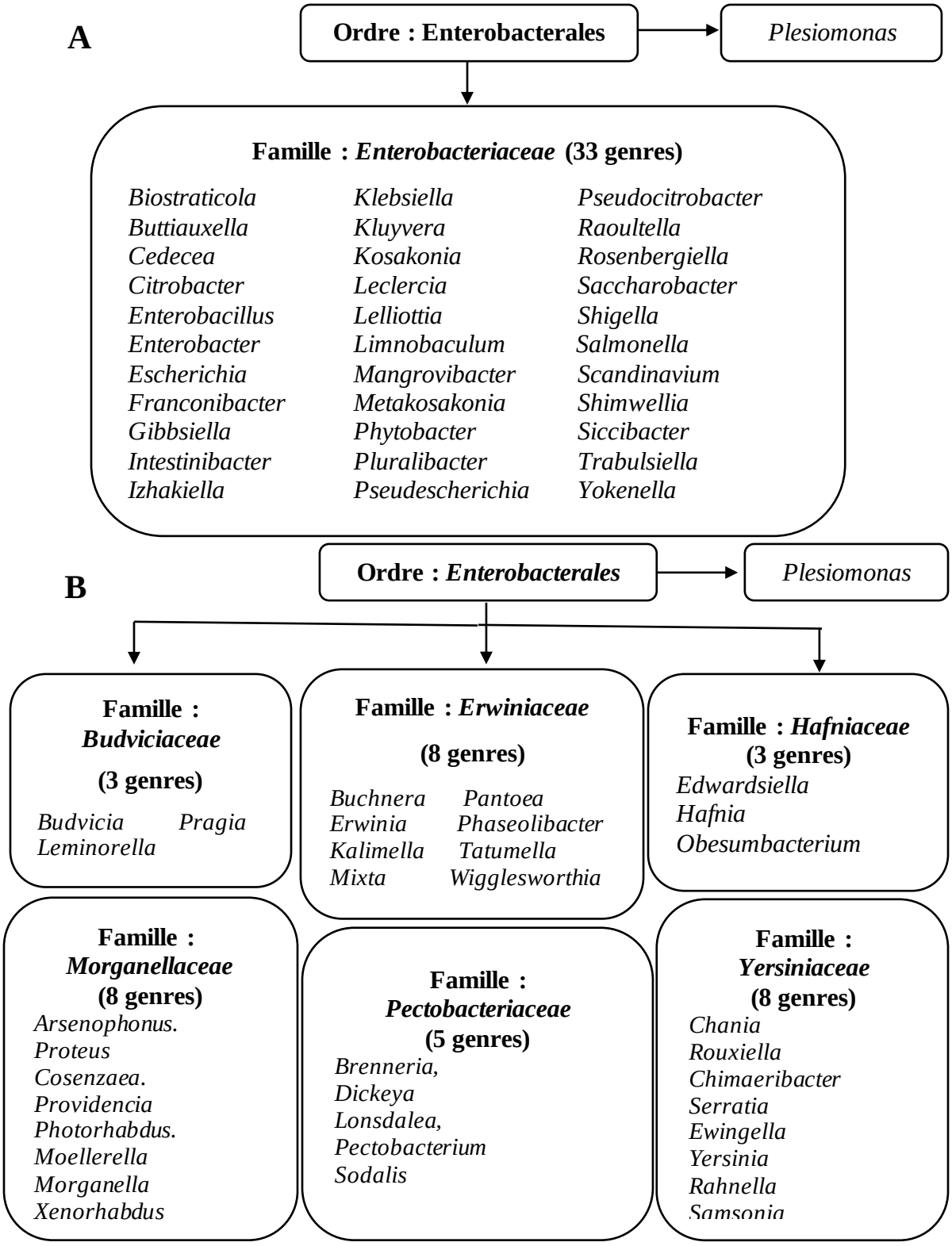
Widodo, A., Khairullah, A. R., Effendi, M. H., Moses, I. B., & Agustin, A. L. D. (2024). Extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* from poultry: A review. Veterinary world, 17(9), 2017–2027. https://doi.org/10.14202/vetworld.2024.2017-2027.

Annexes

Annexes

Annexe 01 : Teneur en minéraux et vitamines dans 100 g de viande de poulet **(Kralik *et al.*, 2018).**

Minéraux (*mg*)	
Calcium	15
Fer	1.04
Magnésium	29
Phosphore	228
Potassium	256
Sodium	74
Zinc	1.00
Vitamines	
Vitamine C (mg)	0.0
Thiamine (mg)	0.070
Riboflavine (mg)	0.114
Niacine (mg)	13.712
Vitamine B6 (mg)	0.600
Folate (µg)	4
Vitamine B12 (µg)	0.34
Vitamine A (µg)	6
Vitamine E (mg)	0.27
Vitamine D (D2+D3) (µg)	0.1
Vitamine K (*µg*)	0.3



(A) Famille *Enterobacteriaceae* révisée ; **(B)** Six nouvelles familles proposées pour inclusion dans l'ordre *Enterobacterales*.

Annexe 02 : Classification proposée des membres actuels de la famille *Enterobacteriaceae* selon **Adeolu *et al.*, (2016).**

Annexe 03 : Résistances naturelles aux β-lactamines des genres/ espèces d'entérobactéries **(CA-SFM, 2024).**

Espèces	Aminopénicillines	Amoxicilline – acide clavulanique	Ticarcilline, pipéracilline	Céphalosporines 1ère génération	Céfoxitine	Céfuroxime	Imipénème
Groupe Citrobacter amalonaticus [1]	R		R	R		R	
***Citrobacter freundii* complex** [2]	R	R		R	R		
Citrobacter koseri	R		R				
Enterobacter amnigenus (Lelliottia amnigena)	R	R		R	R		
***Enterobacter cloacae* complex** [3]	R	R		R	R		
Escherichia (Atlantibacter) hermanni	R		R				
Hafnia alvei et paraalvei	R	R		R			
Klebsiella aerogenes	R	R		R	R		
***Klebsiella* spp.**	R		R				
Leclercia adecarboxylata							
Morganella morganii	R	R		R	R	R	R[4]
Pantoea agglomerans	R	R		R	R		
Plesiomonas shigelloides	R	R	R				
Proteus mirabilis							R [4]
Proteus vulgaris, penneri et hauseri	R			R		R	R [4]
Providencia rettgri	R	R		R			R [4]
Providencia stuartii	R	R		R	R		R [4]
***Raoultella* spp.**	R		R				
***Salmonella* spp.**							
Serratia marcescens	R	R		R	R	R	
Yersinia enterocolitica	R	R	R	R	R		

[1] Le groupe *Citrobacter amalonaticus* inclut les principales espèces suivantes : *C. amalonaticus, C. farmeri, C. rodentium et C. sedlakii.*

[2] *Citrobacter freundii* complex inclut les principales espèces suivantes : *C. braakii, C. cronae, C. europaeus, C. freundii, C. gillenii, C. murlinae, C. pasteurii, C. portucalensis, C. tructae, C. youngae et C. werkmanii.*

[3] *Enterobacter cloacae* complex inclut les principales espèces suivantes : *E. asburiae, E. bugandensis, E. chuandaensis, E. cloacae* (différentes sous-espèces), *E. hormaechei* (différentes sous-espèces), *E. kobei, E. ludwigii, E. roggenkampii et E. sichuanensis.*

[4] Résistance naturelle de bas niveau à l'imipénème : les souches sauvages sont catégorisées « sensibles à forte posologie ».

Annexe 04 : Liste de matériel utilisé (Verrerie, instruments et consommable, appareillage, réactifs et colorants).

Verreries	Instruments et consommables	Appareillage	Réactifs et colorants
○ **Tubes à essai** ○ **Flacons** ○ **Bocaux en verre** ○ **Béchers** ○ **Pipettes Pasteur** ○ **Pipettes graduées** ○ **Entonnoir** ○ **Erlenmeyer**	○ Boites de Pétri ○ Sac Ziploc ○ Couteaux ○ Spatules ○ Anse de platine ○ Barreaux magnétiques ○ Micropipette ○ Embouts ○ Portoirs en bois ○ Ecouvillons ○ Pince ○ Lames ○ Papier aluminium ○ Tubes Eppendorf ○ Papier absorbant ○ Marqueur permanent	○ Stérilisateur ○ Etuve bactériologique ○ Balance de précision ○ Plaque chauffante ○ Autoclave ○ Microscope optique ○ Réfrigérateur ○ Bec Bunsen ○ Vortex ○ Spectrophotomètre ○ pH mètre	○ Violet de Gentiane ○ Lugol ○ Fuchsine ○ Ethanol ○ Réactif TDA ○ Réactifs VP 1 et VP 2 ○ Réactifs NIT 1 et NIT 2 ○ Poudre de Zinc ○ Réactif de Kovacs

Annexe 05 : Composition et préparation des milieux de culture utilisés pour 1 litre de milieu.

1. **Bouillon Tryptone-sel**

Composition

- Tryptone ..... 1 g
- NaCl ..... 8,5 g

Préparation

- Dissoudre 8,5 g de NaCl et 1 g de tryptone dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Remuer doucement jusqu'à dissolution complète.
- Distribuer la solution dans des flacons, à raison de 90 ml par flacon.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 à 20 minutes.
- Laisser refroidir le milieu à température ambiante.

2. **Gélose Mac Conkey**

Composition

- Peptone ..... 20.000 g
- Sels biliaires ..... 1,5 g
- Cristal violet..... 0,001g
- Rouge neutre..... 0,050g
- Chloride de sodium..... 5 g
- Lactose monohydraté..... 10 g
- Agar ..... 15 g

pH final à 25°C : 7,2 ± 0,2

Préparation

- Mettre en suspension 51.55 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution complète.
- Répartir en flacons, à raison de 100 ml par flacon.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
- Refroidir et maintenir à 44-47 °C.

3. **Gélose nutritive inclinée**

Composition

- Peptone ..... 5,0 g
- Extrait de viande..... 3,0 g
- Agar- agar 12,0g

pH du milieu à 25 °C : 7,0 ± 0,2.

Préparation

- Dissoudre 20 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée.
- Chauffer progressivement sous agitation continue jusqu'à dissolution complète.
- Répartir la solution dans des tubes, à raison de 7 ml par tube.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
- Laisser solidifier en position inclinée sur une surface froide afin de former une pente.

4. Gélose Mueller Hinton

Composition

- Extrait de bœuf ..... 2,0 g
- Hydrolysat acide de caséine 17,5g
- Amidon ..... 1,5 g
- Agar 17g

pH=7,3 ± 0,1 à 25°C

Préparation

- Dissoudre 21 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée.
- Chauffer progressivement sous agitation continue jusqu'à dissolution complète.
- Distribuer la solution dans des flacons.
- Stériliser à 121 °C pendant 10 minutes.
- Laisser refroidir le milieu à température ambiante.

5. Bouillon de CASO = Trypticase soja

Composition

- Peptone de caséine ..... 17 g
- Peptone de soja ..... 3 g
- D (+) Glucose ..... 2,5 g
- Chlorure de sodium ..... 5 g
- Phosphate hydrogéné dipotassique ..... 2,5 g

pH final : 7,3 ± 0,2 à 37° C .

Préparation

- Dissoudre 30 g de poudre déshydraté dans 1 litre d'eau distillée.
- Agiter jusqu'à la dissolution complète de poudre.
- Distribuer le bouillon dans des flacons ou bien dans des tubes.
- Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes.
- Laisser refroidir le milieu à température ambiante.

Annexe 06 : Dates et lieux de prélèvement des échantillons de viande de poulet.

Date de prélèvement	Numéro de l'échantillon	Lieu de prélèvement
15 février 2025	E 01	Boucherie Oudie : centre-ville Bir Mokkadem.
	E 02	Boucherie "El baraka" centre-ville Aïn Zerga.
22 Février 2025	E 03	Boucherie Nour Eddine : centre-ville Bir Mokkadem.
	E 04	Boucherie Essalam : Quartier Cheikh Larbi Tebessi Chéria.
	E 05	Boucherie "El rahma" centre-ville Aïn Zerga.
	E 06	Boucherie "Nahel" centre-ville Aïn Zerga.
01 Mars 2025	E 07	Boucherie Triki : Route de Tébessa Chéria.
	E 08	Boucherie "Mechri" centre-ville Aïn Zerga.
09 Mars 2025	E 09	Boucherie "Stamboli" centre-ville Aïn Zerga.
	E 10	Boucherie Ammara : Quartier du village socialiste Chéria.
	E 11	Boucherie "Riadh" centre-ville Aïn Zerga.
16 Mars 2025	E 12	Boucherie "Trente" centre-ville Aïn Zerga.
	E 13	Boucherie Errafeq 2 : Complexe Manass Ibrahim Chéria.
	E 14	Boucherie la gazella : Centre-ville de Chéria.

E : Echantillon.

Annexe 07 : Protocole Standard de la coloration de Gram **(Paray *et al.*, 2023).**

Préparation du frottis

- Déposer une goutte de solution saline physiologique ou d'eau distillée sur une lame propre dans la zone marquée, puis prélever une colonie et l'émulsifier.
- Fixer ensuite le frottis par la chaleur en passant la lame 3 à 4 fois au-dessus de la flamme, face du frottis vers le haut.

Procédure de coloration

- Placer la lame avec le frottis préparé sur un support de coloration au-dessus de l'évier, puis ajouter le colorant primaire, c'est-à-dire le violet de gentiane (cristal violet), pendant 1 minute.
- Après 1 minute, rincer doucement le frottis à l'eau du robinet, puis ajouter le lugol pendant 1 minute.
- Après 1 minute, rincer à nouveau doucement à l'eau.
- Ajouter le décolorant, c'est-à-dire l'alcool éthylique à 95 %, pendant moins de 10 secondes.
- Rincer encore doucement à l'eau, puis ajouter le colorant de contraste, c'est-à-dire la safranine ou la fuchsine carbonylée diluée (1:10), pendant moins d'une minute.
- Après 1 minute, rincer à l'eau douce et laisser sécher à l'air libre.
- Nettoyer l'arrière de la lame avec un papier absorbant, déposer une goutte d'huile de cèdre, et observer au microscope avec l'objectif à immersion dans l'huile (100x).

Annexe 08 : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20^{E}.

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	**Positif**
ONPG	Ortho-nitro-phenyl-Galactosidase	Beta- galactosidase	Incolore	Jaune
ADH	L-arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/orangé
LDC	L-lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Rouge/orangé
ODC	L-ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orangé
CIT	Citrate de sodium	Utilisation du citrate	Vert pâle/jaune	Bleu-vert/bleu
H_2S	Thiosulfate de sodium	Production d'H_2S	Incolore/grisâtre	Dépôt noir/fin liseré
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orangé
TDA	L-tryptophane	Tryptophane désaminase	**TDA / immédiat**	
			Jaune	Marron-rougeâtre
IND	L-tryptophane	Production d'indole	**Kovacs/ immédiat**	
			Incolore-vert pale-jaune	Rose
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoine	**VP 1 + VP 2/ 10mn**	
			Incolore/ rose pale	Rose/rouge
GEL	Gélatine de kohn	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune/jaune gris
MAN	D-mannitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SOR	D-sorbitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
RHA	L-rhamnose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SAC	D-saccharose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MEL	D-melibiose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
ARA	L-arabinose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
Nitrate réductase Tube GLU	Potassium nitrate	Production de NO_2 Réduction au stade N_2	**NIT1 + NIT2 / 2-3 mn**	
			Jaune	Rouge
			Zinc / 5mn	
			Rouge/orangé	Jaune

Annexe 09 : Protocole de préparation de l'étalon de turbidité McFarland 0,5

(CA-SFM, 2024).

McFarland 0,5	
01	Ajouter 0,5mL d'une solution à 0,048mol/L de $BaCl_2$, (1,175% p/v $BaCl_2$, $2H_2O$) à 99,5 mL d'une solution 0,18 mol/L (0,36 N) de H2SO4 (1% v/v) et agiter vigoureusement.
02	Vérifier la densité de la suspension à l'aide d'un spectrophotomètre avec un faisceau de 1 cm et des cuvettes assorties. L'absorbance à 625 nm doit être comprise entre 0,08 et 0,13.
03	Distribuer la suspension dans des tubes de même taille que ceux utilisés pour ajuster l'inoculum. Sceller les tubes.
04	Une fois scellés, conserver ces tubes à température ambiante et à l'abri de la lumière.
05	Renouveler l'étalon ou vérifier son absorbance après 6 mois de conservation.
06	Avant usage, mélanger vigoureusement le tube à l'aide d'un Vortex
07	Il convient de vérifier les étalons achetés dans le commerce en s'assurant que l'absorbance se situe dans les limites fixées.

Annexe 10 : Protocole de préparation des solutions du test Carba NP **(CLSI, 2024).**

Solution de sulfate de zinc heptahydraté à 10mM	
01	Peser 1,4 g de sulfate de zinc heptahydraté ($ZnSO_4.7H_2O$).
02	Ajouter la poudre à 500 ml d'eau distillée.
03	Mélanger la solution.
04	Conserver la solution à température ambiante.

Solution de rouge de phénol à 0,5 %	
01	Peser 1,25 g de poudre de rouge de phénol.
02	Ajouter la poudre à 250 ml d'eau distillée.
03	Mélanger la solution.
04	Conserver la solution à température ambiante.

Hydroxyde de sodium (NaOH) à 0,1 N	
01	Ajouter 20 ml de NaOH 1N à 180 ml d'eau distillée.
02	Conserver à température ambiante

Annexe 12 : Diamètres des zones d'inhibition pour CTX et CAZ des souches BLSE±.

Espèce	Souche	Diamètre (mm)	
		CTX	CAZ
Proteus vulgaris	**3**	13	30
Proteus mirabilis	**4**	15	22
Proteus mirabilis	**5**	15	19
Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	**6**	25	15
Klebsiella pneumoniae ssp pneumonia	**7**	23	14
Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	**8**	24	15
Klebsiella oxytoca	**12**	20	0
Klebsiella oxytoca	**14**	23	10
Klebsiella oxytoca	**15**	25	14
Raoultella ornithinolytica	**17**	28	13