République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de 1'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique Université Dr. Yahia Farès de Médéa
Faculté des Sciences

Mémoire de Master

Département : Sciences de la Nature et de la Vie

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Réalisé par :

HAYOULA Ayat - MAMI Riham - RABAHI Ikram

Exploration de l'efficacité des désinfectants sur la formation de biofilm bactériens sur les surfaces abiotiques

Soutenue publiquement le : 21-06-2023

Devant le jury composé de :

Dr. HOCEINI Amina	MCB, Université de Médéa.	Présidente
Dr. BOUBEKRI Kamel	MCB, Université de Médéa.	Examinateur
Dr. NABI Ibrahim	MCB, Université de Médéa.	Promoteur
Dr. ACHEK Rachid	MCA, Université Khemis Meliana	Invite de honeur

Médéa, 2022/2023

Remerciement

Tout d’abord, nous tenons remercier « dieu » le tout puissant de nous avoir donné le courage, la patience et la force de vouloir et pouvoir continuer surtout dans les moments les plus difficiles, pour la réalisation de ce modeste travail.

En premier lieu, Nous tenons tout d’abord à exprimer nos remerciements les plus sincères à Notre encadreur **Mr NABI Ibrahim** et nous exprimons par ces quelques mots notre profond respect et notre reconnaissance pour avoir accepté de nous encadrer et nous guider durant tout la période de travail, pour la confiance et les conseils qu’il nous a donné et sur tout pour son professionnalisme.

Nous souhaitons exprimer notre vif remerciement aux membres du jury, en commençant par **Mme Amina HOCEINI**, qui nous a fait l'honneur d'accepter d'examiner ce modeste travail.Nous sommes reconnaissants envers **Mr Kamel BOUBEKRI** qui a accepté d'analyser notre travail, en espérant recevoir ses critiques et ses orientations.

Nous tenons aussi à exprimer notre profonde gratitude et notre sincère reconnaissance a **MR ACHEK Rachid** en tant qu'invité d'honneur. Votre participation a véritablement donné une dimension exceptionnelle à cette occasion mémorable, et nous tenons à vous adresser nos plus chaleureux remerciements

On tient tout particulièrement à exprimer nos remerciements à l’équipe de laboratoire et plus spécialement **Mme Tifoura** pour sa patience et son effort lors de la conception de ce travail.

On remercie chaleureusement le personnel de service de bactériologie du laboratoire de l'établissement public de santé de proximité **(EPSP)** de Médéa pour toute l’aide qu’ils nous ont apportés lors de la réalisation de ce travail.

Nos remerciements et nos reconnaissances vont également à toutes les personnes proches ou lointaines qui ont contribué avec nous, même si avec un mot de motivation.

Dédicace

Ma adorable mère Saliha❤

A la femme qui a été toujours à mes côtés pour me soutenir et m'encourager pour affronter les différents obstacles, Ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force.

Mon cher père Sidali❤

A l'homme, qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour m'encourager et me rendre heureuse.

À mes frères Fares, Zahredin et Rafik❤

Que j'adore énormément, pour qu'ils soient fiers de leur grande sœur.

À mes sœur Nour et Wissem❤

Pour tous ces bons moments passés ensemble et ceux à venir, Pour tous ces fous rires, Pour toutes ces discussions interminables, je vous souhaite la réussite dans votre vie, et d'être combler de bonheur. Merci d'être toujours présents à mes côtés et de m'avoir continuellement encouragé.

À mes partenaires, et mes amies Ayat et Ikram❤

Avec lesquelles j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler. Sans qui rien n'aurait été pareil, nous avons formé une belle équipe avec des beaux moments, je vous remercie donc pour tout ce que vous m'as apporté au cours de cette année.

À mes grands-parents et à tous les membres de la famille Mami et Halilali

Pour leur soutien indéfectible et leurs conseils et encouragements.

À ammou MAMI Mohamed El Kamel

Qu'Allah ait son âme

À tous mes collègues et à toute ma promotion de microbiologie 2022-2023.

À mes amis et à toutes les personnes que j'aime, à tous ceux qui m'ont apporté de l'aide de près ou de loin.

Riham

Dédicace

En ce Moment particulier de ma vie

Je tiens à dédier ce modeste travail

***À Ma chère Maman**, la maman la plus extraordinaire au monde, qui a fait de moi ce que je suis aujourd'hui merci pour tous tes sacrifices et ton amour éternel de m'avoir encouragée et d'avoir toujours cru en moi*

Je t'aime Mama❤

À Mon père d'amour❤ *tu me manques tellement, te rendre fier c'est l'un de mes objectifs, je n'oublierai jamais tes conseils précieux et l'amour que tu m'as donnée, et je demande à tous ceux qui liront ces mots de prier pour qu'on se réunira au paradis*

À Mes frères Mohamed et Nabil❤ *qui ont été toujours là pour moi, ma réussite est votre réussite aussi*

Je vous aime

À mes deux grandes familles ***Hayoula*** *et* ***Khelil cherfi***

À mes cousins, cousines et mes chères copines « Amira, Meriem, Maroua, Manel, Camélia »❤ *je ne vous remercierai jamais assez pour votre soutien et de m'encourager surtout dans les moments difficiles*

Je vous aime

À mes amies et partenaires « Ikram et Riham »❤

ça me fait tellement plaisir de travailler ensemble, merci pour votre gentillesse, confiance et surtout pour votre compréhension tout au long de ce travail, vous êtes les meilleures.

Ayat

Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers.

A ma meilleure mère au monde ❤

Qu'Allah ait son âme. J'écris ces mots en souhaitant que tu sois présente avec moi pour partager ma joie et être fière de moi, mais je sais que tu es dans un lieu bien meilleur.
J'implore tous ceux qui liront ce message de prier pour elle, afin qu'elle repose en paix.
Les mots sont insuffisants pour exprimer tout mon amour et ma considération pour les sacrifices qu'avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Malgré ton départ, ton esprit demeure avec moi, et ton héritage de force et de douceur ne s'éteindra jamais. Tu me manques à chaque instant.
Je t'aime profondément et tu resteras à jamais dans mon cœur.

A mon cher père ❤

L'homme qui a tout fait pour mon succès et mon confort, Je vous remercie beaucoup pour ta confiance et pour tout ce que tu as fait pour moi.
Je t'aime papa.

A me sœur Hanane ❤

Ma meilleure, ma force merci d'être toujours là pour moi et merci pour votre soutien, Je suis fière d'être ta sœur.
Je t'aime très fort ma chérie.

A ma sœur Hadjer et mes nièces d'amour Assil et Mirel ❤

Merci pour l'amour et le bonheur que vous apportez dans ma vie
Je vous aime mes chéries.

A mes frères Adel, Lotfi, Mahfoud ❤

Je vous remercie Pour votre soutien et votre encouragement
Je vous aime

A mon frère Hamza ❤

Aucun langage ne saurait exprimer mon respect et mon amour pour toi. Tu as assumé le rôle de second père depuis que je suis petite.
Et sa femme Nesrine, et mes amours Djoud et Amir et Ouass la source de la joie et bonheur
Je vous aime.

A mes partenaires et mes amies Ayat et Riham ❤

Votre présence a été une source de force pour moi, Merci pour tous les souvenirs et les moments merveilleux que nous avons partagés ensemble, Chaque jour, je me rends compte que je suis avec les partenaires les plus exceptionnelles au monde. Je suis tellement fière de ce que nous avons accompli. Je vous souhaite plein d'autres réussites et beaucoup de bonheur.

A ma cousine Chahinaz ❤

La personne qui me fait rire du fond du cœur et avec elle je me sens à l'aise.
Je t'aime chouchou

À toutes les personnes bienveillantes qui ont laissé de beaux souvenirs dans ma vie.

Ikram

Résumé

Les biofilms sont des communautés microbiennes complexes qui produisent une matrice protectrice, cette forme de survie représente un problème majeur pour les différentes industries alimentaires.

Cette étude porte sur la formation de biofilm par des entérobactéries responsables de mammites cliniques et de colibacillose en Algérie.

L'objectif de l'étude est de tester la capacité de formation de biofilm par la méthode de de Plaque de Culture en Tissu (TCP) de ces entérobactéries et d'évaluer l'efficacité de différents désinfectants sur les isolats choisies le biofilm formé.

Les désinfectants utilisés sont : Chlorhexidine, acide per acétique, ammonium quaternaire et par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) des désinfectants et ensuite établir leur profil de résistance aux antibiotiques, les EBLSE ont été détecté par le test de synergie et Le test PCR est utilisé pour la détection des gènes : fimH et PapC sur huit souches de chaque espèce.

Les résultats ont montré que toutes les souches étaient formatrices de biofilm, mais à des degrés variables. La chlorhexidine s'est révélée être le désinfectant le plus efficace, tandis que l'ammonium quaternaire avait un effet faible sur les souches testées. De plus, toutes les souches étaient résistantes à au moins un antibiotique testé.

La détection des gènes fimH et PapC a confirmé la présence de fimH dans quelques isolats choisis. Ces résultats soulignent l'importance de prendre des mesures de prévention et de contrôle efficaces pour lutter contre la formation de biofilm et l'antibiorésistance chez les entérobactéries responsables de mammites cliniques et de colibacillose.

Mots clés : Désinfectants, Chlorhexidine, ammonium quaternaire, Acide peracétique, Biofilm, Entérobactéries, MIC, MBC, antibiorésistance, fimH, PapC

ملخص:

البيو أغشية هي مجتمعات ميكروبية معقدة تنتج مصفوفة واقية، وتشكل تكوينها مشكلة كبيرة لصناعات الأغذية المختلفة. تركز هذه الدراسة على تكوين البيوأغشية بواسطة الإنتروباكتيريا المسؤولة عن التهاب الضروع الحادة والكوليباسيلوز في الجزائر.

تهدف الدراسة إلى اختبار قدرة الإنتروباكتيريا على تكوين البيو أغشية باستخدام طريقة لوحة زراعة الأنسجة (TCP) وتقييم فعالية مطهرات مختلفة على البيو أغشية المتكون. تشمل المطهرات المستخدمة الكلورهيكسيدين، حمض بيراسيتيك، أمونيوم رباعي، ويتم تحديد التركيز المثبط الحد الأدنى (MIC) والتركيز المكثف الحيوي الحد الأدنى (MBC) لهذه المطهرات. بالإضافة إلى ذلك، يتم تحديد ملف مقاومة المضادات الحيوية للعزلات المختارة، ويتم اكتشاف إنزيمات البيتا لاكتاماز ذات الطيف الموسع باستخدام اختبار التآزر، ويتم استخدام تقنية البلمرة المتسلسلة (PCR) لاكتشاف جينات fimH و PapCفي ثماني سلالات من كل نوع.

أظهرت النتائج أن جميع السلالات قادرة على تكوين البيو أغشية، ولكن بدرجات متفاوتة. تبين أن الكلورهيكسيدين هو أكثر مطهر فعالية، في حين أن أمونيوم رباعي كان له تأثير ضعيف على السلالات المختبرة. علاوة على ذلك، كانت جميع السلالات مقاومة لمضاد حيوي واحد على الأقل تم اختباره.

تم اكتشاف وجود جينات fimH وPapC، وهذه النتائج تسلط الضوء على أهمية تنفيذ تدابير فعالة للوقاية والسيطرة لمكافحة تكوين البيو أغشية ومقاومة المضادات الحيوية في الإنتروباكتيريا المسؤولة عن التهاب الضروع الحادة والكوليباسيلوز.

الكلمات المفتاحية: مطهرات، كلورهيكسيدين، أمونيوم رباعي، حمض بيراسيتيك، البيو أغشية، إنتروباكتيريا، MIC، MBC، مقاومة المضادات الحيوية، fimH، PapC.

Abstract

Biofilms are intricate communities of microorganisms that generate a protective matrix, posing significant challenges for various food industries.

This study focuses on the formation of biofilms by enterobacteria, which are responsible for clinical mastitis and colibacillosis in Algeria. The primary objective of this study is to assess the biofilm-forming capacity of these enterobacteria using the Tissue Culture Plate (TCP) method, as well as to evaluate the efficacy of different disinfectants on the established biofilm.

The disinfectants utilized in this study include Chlorhexidine, peracetic acid, and quaternary ammonium. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of these disinfectants are determined. Additionally, the antibiotic resistance profile of the selected isolates is established, and the presence of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) is detected through the synergy test. Furthermore, the fimH and PapC genes are detected using PCR in eight strains of each species.

The results of the study reveal that all strains of enterobacteria possess the ability to form biofilms, albeit to varying extents. Among the tested disinfectants, Chlorhexidine proves to be the most effective, while quaternary ammonium exhibits a weak impact on the tested strains. Moreover, all strains demonstrate resistance to at least one of the antibiotics tested.

The identification of fimH and PapC genes confirms the presence of fimH in certain selected isolates. These findings emphasize the importance of implementing robust preventive and control measures to combat the formation of biofilms and antibiotic resistance in enterobacteria responsible for clinical mastitis and colibacillosis.

Keywords: Disinfectants, Chlorhexidine, quaternary ammonium, Peracetic acid, Biofilm, Enterobacteria, MIC, MBC, antibiotic resistance, fimH, PapC.

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFNOR : Association Française de Normalisation

AI : Auto inducteur

AIPS : Peptides d'auto-induction"

AM : Ampicilline

AMC : Amoxicilline + acide clavulanique

AML : Amoxicilline

AP : Acide peracétique

ARN : Acide ribonucléique

ATB : Antibiotique

BET : Bromure d'éthidium

BGN : Bacilles Gram négatif

BLSE : Bêta-lactamase à spectre élargi

BMR : Bactéries multi-résistantes

C : Chloramphénicol

CAQ : Composés d'ammonium quaternaire

CCLIN : Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales

CHX : Chlorhexidine

CIP : Ciprofloxacine

CLOH : Acide hypochloreux

CMB : Concentration Minimum Inhibitrice

CMI : Concentration minimale inhibitrice

Liste des abréviations

CN **:** Gentamicine

CTX **:** Céfotaxime

CV **:** Cristal Viole

DO **:** Densité Optique

E. COLI **:** *Escherichia coli*

ED **:** Eau Distillée Stérile

ELISA **:** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EPS **:** Exo-poly-Saccharides

EPSP **:** L'établissement public de santé de proximité

GNRI **:** Gram négatif à résistance intrinsèque

H2O2 **:** Peroxyde d'hydrogène

ICE **:** Eléments D'intégration et de Conjugaison

K **:** Kanamycine

KF **:** Céfalotine

LPS **:** Lipopolysaccharides

MH **:** Mueller Hinton

PBS **:** Solution saline tamponnée au phosphate

PCR **:** Polymerase chain reaction

PH **:** Potentiel Hydrogène

QQ **:** Quorum Quenching

QQE **:** Quorum quenching enzymes

QS **:** Quorum Sensing

QSI **:** Quorum Sensing inhibiteurs

Liste des abréviations

R **:** Résistante

SI **:** Séquence d'insertion

TBE **:** Tris-Borate-EDTA

TCP **:** Plaque de Culture de Tissu

TE **:** Tétracycline

TN **:** Transposons composites

TSB **:** Bouillon de soja tryptique

UFC **:** Unité Formatrices des Colonies

UV **:** Ultra-Violet

VIH **:** Virus de l'Immunodéficience Humaine

Liste des Figures

Figure 1	: Développement d'un biofilm clinique bactérien **(Lebeaux et Ghigo, 2012)**.	**06**
Figure 2	: Mécanismes du quorum sensing bactérien et des différentes stratégies de quorum quenching. (Mion *et al.*, 2019)	**11**
Figure 3	: Désinfectants et antiseptiques : leur localisation et leurs composants cibles**. (Basiry et *al*., 2022).**	**16**
Figure 4	: Différents mécanismes de résistance aux agents antimicrobiens. (Ruddaraju *et al.*, 2020)	**17**
Figure 5	*:* Ensemencement sur le milieu MacConkey après l'enrichissement dans le TSB.	**25**
Figure 6	*:* Les étapes de la méthode de formation de biofilm TCP.	**27**
Figure 7	: Principe des techniques de quantification des biofilms en microplaques. **(Laurent, 2011).**	**28**
Figure 8	: les désinfectants utilisés.	**29**
Figure 9	: Essai de l'efficacité des désinfectants.	**31**
Figure 10	: photo représente l'interprétation des CMI.	**31**
Figure 11	: Préparation l'étalon de 0.5 Mac Farland.	**33**
Figure 12	: Application des disques d'antibiotiques.	**34**
Figure 13	: le pied à coulisse utilisée dans l'antibiogramme.	**34**
Figure 14	*:* Le protocole et les étapes suivis dans l'extraction de l'ADN.	**37**
Figure 15	: Les étapes de la PCR.	**39**
Figure 16	: chargement de l'échantillon d'ADN amplifier dans les puits de gel d'agarose.	**40**
Figure 17	*:* Mettre le gel d'agarose au transluminateur.	**40**
Figure 18	: observation de la turbidité dans le milieu TSB avec le contrôle négative	**42**
Figure 19	: observation de la pureté des souches vivantes d'entérobactéries non/fermentatrice de lactose.	**42**

Liste des Figures

Figure 20	: Variabilité des aspects macroscopiques des souches d'entérobactéries selon leur espèce sur le milieu mac conkey.	**44**
Figure 21	: Microplaque de différentes catégories de formation de biofilm.	**46**
Figure 22	: profile de potentiel de formation de biofilm chez les entérobactéries responsables de mammites cliniques chez les bovins et colibacilloses chez les volailles.	**51**
Figure 23	: Photographie personnelle présentant les résultats de MIC (96-puits) et MBC par acide péracetique (souches volailles).	**55**
Figure 24	: Photographie personnelle présentant les résultats exemplaires de MIC (96-puits) et MBC par chlorhexidine (souches lait).	**55**
Figure 25	*:* Photographie personnelle présentant les résultats exemplaires de MIC (96-puits) et MBC par Ammonium quaternaire (souches lait).	**55**
Figure 26	: La susceptibilité aux désinfectants (A.Q - CHX - AP) sur les isolats des volailles en terme du potentiel de production de biofilm.	**59**
Figure 27	: La susceptibilité aux désinfectants (A.Q - CHX - AP) sur les isolats des mammites en terme du potentiel de production de biofilm.	**60**
Figure 28	*:* Circle représente le pourcentage de résistance des souches volailles (e.coli).	**62**
Figure 29	: Circle représente le pourcentage de sensibilité des souches lait (e.coli).	**63**
Figure 30	*:* Circle représente le pourcentage de sensibilité des souches lait (k. pneumonie).	**65**
Figure 31	*:* Résultats de l'antibiogramme des souches volailles (e.coli).	**66**
Figure 32	*:* Résultats de l'antibiogramme des souches lait (e.coli).	**66**
Figure 33	: *R*ésultats de l'antibiogramme des souches lait (k. pneumonie).	**66**
Figure 34	: Visualisation des résultats des tests de synergie pour la recherche des BLSE : Comprendre les mécanismes d'inactivation des bêtalactamines"	**68**
Figure 35	: Profil électrophorétique d'ADN obtenu âpres l'extraction des souches présente dans le **tableau 19**, électrophorèse sur un gel d'agarose à (2%) après coloration au BET suivie d'une visualisation sous UV.	**72**
Figure 36	: Profil électrophorétique d'ADN obtenu âpres l'extraction des souches présente dans le **tableau 20**, électrophorèse sur un gel d'agarose à (2%) après coloration au BET suivie d'une visualisation sous UV.	**74**

Liste des tableaux

Tableau 1	: Spectre d'activité des principales familles d'antiseptiques et désinfectants. **(Faure, 2010).**	**15**
Tableau 2	: Mécanisme de *résistance* aux désinfectants.	**19**
Tableau 3	: Le nombre et les origines des souches utilisée (25 souche/lait).	**23**
Tableau 4	: Le nombre et les origines des souches utilisée (23 souche/volaille).	**24**
Tableau 5	: Classification de la formation de biofilm selon **(Stepanović et al., 2007)**.	**28**
Tableau 6	: Les souches utilisées pour tester l'efficacité de désinfectants sur la formation du biofilm.	**29**
Tableau 7	: Les antibiotiques utiliser dans l'antibiogramme	**35**
Tableau 8	: Caractères culturaux des souches isolées.	**43**
Tableau 9	: Répartition des souches d'entérobactéries isolées et identifiées.	**44**
Tableau 10	: Méthode d'évaluation de la formation de biofilm.	**47**
Tableau 11	: Caractéristiques du Potentiel de production de biofilm (TCP) des entérobactéries responsables de colibacilloses chez les volailles.	**48**
Tableau 12	: Caractéristiques du Potentiel de production de biofilm (TCP) des entérobactéries responsables de mammites cliniques chez les bovins.	**49**
Tableau 13	: La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des différents désinfectants.	**53**
Tableau 14	: La Concentration Minimale bactéricide (CMB) des différents désinfectants.	**54**
Tableau 15	: Interprétation des zones d'inhibition des différents antibiotiques sur les souches volailles (E.coli).	**61**
Tableau 16	: Interprétation des zones d'inhibition des différents antibiotiques sur les souches lait (E.coli).	**63**
Tableau 17	: Tableau : Interprétation des zones d'inhibition des différents antibiotiques sur les souches lait (K. Pneumonie).	**64**
Tableau 18	: Interaction entre capacité de formation de biofilm et l'antibiorésistance.	**69**

Sommaire

Introduction générale.....01

Chapitre I : généralité sur le biofilm.

I.1. Préambule 03

I.2. Définition. 03

I.3. Matrice exopolysaccharidique 03

I.4. Les étapes de formation de biofilm.....04

I.4.1. Adhésion. 04

I.5. Biofilm entérobactérien.....06

I.5.1. Escherichia coli 06

I.5.2. Klebsiella pneumoniae 07

I.5.3. Salmonella.....07

1.5.4. Caractères culturaux… 07

I.6. Les facteurs influençant la formation du biofilm..... 08

I.6.1. La surface 08

I.6.2. Les caractéristiques du milieu… 09

I.6.3. Propriété des cellules.....10

I.7. Mécanisme régulateur de la formation de biofilm 10

I.7.1. Le quorum sensing… 10

I.7.2. Le quorum quenching 11

Chapitre II : relation entre désinfectants et biofilms.

II.1. Définition.....12

II.1.1. La désinfection. 12

II.1.2. Désinfectant.....12

II.2. Les différentes classes de désinfectants.....12

II.3. Le mécanisme d'action des désinfectants 14

II.4. Mécanismes d'action des antiseptiques et désinfectants (CAPP, 2007). 15

Sommaire

II.5. Mécanismes de résistance bactérienne 16

II.6. Les liaisons biofilm et tolérance aux désinfectants..... 20

II.6.1. La limitation de la diffusion/réaction des désinfectants dans matrice de biofilm..... 20

II.6.2. L'adaptation phénotypique 21

Chapitre III : Matériels et Méthode.

III.1. MATERIELS ET METHODE 22

III.1.1. Type et cadre de l'étude..... 22

III.1.2. Les objectifs 22

III.2. Matériel utilisé..... 22

III.2.1. Matériel non biologique 22

III.2.2. Matériel biologique 23

III.3. Origine et identification des souches..... 23

III.4. Méthodologie de travail..... 24

III.4.1. Revivification et vérification de la pureté des souches 24

III.5. La Technique d'évaluation de la formation de biofilm in vitro… 25

III.5.1. Méthode de culture sur microplaque (TCP) 25

III.5.2. Détection de la formation de biofilm..... 26

III.5.2.1. Protocole..... 26

III.5.2.2. Lecture de la microplaque 28

III.5.3. Evaluation in vitro de l'efficacité de quelques désinfectants sur la formation du biofilm 28

III.5.3.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)…..... 30

III.5.3.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)… 31

III.6. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques..... 32

III.6.1. Mueller Hinton (MH)… 32

III.6.2. Méthode de lecture 34

III.6.3. Les Antibiotiques utilisés 35

III.6.4. Détection de la résistance des entérobactéries aux β-lactamines par production de BLSE 35

Sommaire

III.7. Partie biologie moléculaire..... 36

III.7.1. Extraction de l'ADN génomique..... 36

III.7.2. Technique de PCR…..... 38

III.7.3. Électrophorèse sur gel d'agarose 39

III.7.4. Préparation du gel à 2 %.....40

III.7.5. Evaluation de la qualité et la quantité d'ADN extrait 40

Chapitre IV : Résultats et discussions.

IV.1. Isolement et revivification des souches utilisées 42

IV.2. Identification des isolats 42

IV.2.1. Aspet macroscopique 42

IV.2.2. L'identification.....44

IV.3. Evaluation de la formation de biofilm..... 46

IV.3.1. Quantification de biofilm par TCP 46

IV.4. Détermination de la susceptibilité au désinfectants (CMI/CMB) ….....53

IV.5. Susceptibilité aux désinfectants et potentiel de production de biofilm /espèces 56

IV.6. Résultats de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques.....61

IV.6.1. Profil de résistance des souches d'Escherichia coli isolées des volailles 62

IV.6.2. Profil de sensibilité des souches d'Escherichia coli isolées des bovines.....63

IV.6.3. Profil de sensibilité des souches Klebsiella pneumoniae isolées des bovines 65

IV.6.4. Recherche de la production des β-lactamases à spectre étendu (BLSE) chez les entérobactéries.....……...67

IV.6.5. Relation entre potentiel de production de biofilm et profil de l'antibiorésistance 68

IV.7. Evaluation de la qualité et la quantité d'ADN extrait.....70

IV.8. Technique de PCR 70

Conclusions 76

Références bibliographiques.

Introduction

Les micro-organismes ont une capacité extraordinaire à vivre dans presque tous les environnements et à se protéger des agents externes grâce à des mécanismes de survie sophistiqués. Les bactéries peuvent être trouvées sous forme planctonique ou dans des conditions spécifiques, sous forme d'agrégats sessiles sur des surfaces biotiques et abiotiques, formant des structures complexes connues sous le nom de biofilm. Les biofilms sont un ensemble de cellules microbiennes associées de manière irréversible à une surface et enveloppées dans une matrice essentiellement auto-produite. La matrice du biofilm se compose de polysaccharides, de protéines et d'ADN, constituant une source tenace qui protège les bactéries contre une variété de contraintes physiques, chimiques et biologiques. (Di Somma et *al*., 2020).

Les Enterobacteriaceae sont des bactéries ubiquitaires c'est une famille de bactéries que l'on retrouve dans différents habitats.

Ce sont des hôtes normaux ou pathologiques du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux à sang chaud relativement peu rencontrée dans d'autres sites du corps, ces bactéries représentent plus de 10% de la flore totale (Guiraud, 2012).

Parmi les bactéries impliquées dans la formation de biofilms, les entérobactéries sont couramment présentes dans les environnements (sol, eau, plantes).

Certaines entérobactéries, telles *qu'Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*, sont des bactéries pathogènes pour les animaux et peuvent également être des bactéries zoonotiques, ce qui pose un problème majeur en matière de santé animale et publique. Plusieurs maladies causées par ces bactéries sont liées à leur capacité de former des biofilms (Wenz et *al*., 2011 ; Smith et *al*., 2001).

Ce mode d'organisation rend les bactéries plus résistantes, puisque la matrice extracellulaire agit comme une barrière contre les biocides et les antibiotiques, et permet de concentrer les nutriments nécessaires à la vie des bactéries (Allison, 2003 ; Costerton et *al*., 1995).

Face à cette problématique, l'objectif principal de cette thèse est d'évaluer l'efficacité des désinfectants sur les biofilms d'entérobactéries en surface abiotique, tout en prenant en compte le défi constant de l'antibiorésistance. Cette résistance bactérienne est un phénomène dynamique en constante évolution. Cette résistance résulte d'interactions complexes entre les

Bactéries d'une part et leur environnement d'autre part, et est principalement liée à une utilisation excessive des agents anti -microbiennes (Cohen et *al*., 2011 ; Basmaci et Cohen, 2018).

Les bactéries, afin de faire face à la pression de sélection exercée par les antibiotiques, développent des mécanismes leur permettant de s'adapter aux conditions hostiles de leur environnement (Ben redjeb et *al*., 2000 ; Faure, 2009)

Pour atteindre cet objectif, cette thèse se concentrera sur l'évaluation de divers désinfectants et agents antimicrobiens pour déterminer leur efficacité contre les biofilms d'entérobactéries.

L'objectif de notre étude consiste à étudier :

- Identifier les espèces d'entérobactéries responsables de mammites cliniques et colibacillose par MALDI-TOF, sur 25 échantillons de lait et 23 des volailles.
- Déterminer le potentiel de production de Biofilm par la méthode de la plaque en tissu (TCP).
- Déterminer le niveau de la tolérance aux trois désinfectants (Ammonium quaternaire, Chlorhexidine et Acide peracétique). En termes de concentration minimum inhibitrice (MIC) et concentration minimum bactéricide (MBC).
- Déterminer la résistance aux différentes classes d'antibiotiques.
- La détection des gènes fimH et papC dans quelques souches choisies.

Chapitre I
Généralités sur le biofilm

I.1. Préambule :

L'histoire de biofilm a commencé avec la découverte du microscope par Antonie Van Leeuwenhoek en 1683 lorsqu'il décrivait la présence communautés des microorganismes appelé « Animalcule » sur ses propres dents (Donlan, 2002).

En 1978, Costerton et ses collaborateurs ont développé la première théorie complète des biofilms, démontrant que de nombreuses espèces bactériennes ont la capacité de coloniser différents substrats. Les cellules adhérentes se fixent, se développent et se multiplient, formant ainsi des micro-colonies. La croissance de ces micro-colonies conduit à la formation de biofilms (Costerton et *al*., 1995 ; Watnick et Kolter, 2000). Par conséquent, l'adhérence aux surfaces et la formation de biofilms représentent l'une des stratégies de survie les plus couramment utilisées par les bactéries, où elles sont encastrées dans une matrice riche en eau, en sucres et en protéines. (Lasa, 2006).

I.2. Définition :

Le mot "biofilm" ("Bio" qui signifie « vie » et "film" qui signifie « fine couche »), ils sont définis comme des communautés de cellules microbiennes fixées de manière irréversible à des surfaces biologiques ou inertes (Blaschek et *al*., 2006). Ces cellules sont agrégées et protégées par leur propre matrice polymérique extracellulaire sécrétée, ce qui entraîne des altérations de leur croissance et de leur transcription génétique par rapport aux cellules non attachées (Costerton *et al.,* 2008). La matrice extracellulaire des biofilms est composée d'exopolysaccharides (EPS), de protéines et d'acides nucléiques, qui confèrent aux cellules de nombreux avantages par rapport aux cellules planctoniques (Costerton *et al.*, 2008). En effet, les micro-organismes présents dans les biofilms sont plus résistants à la plupart des agents antimicrobiens ainsi qu'aux défenses immunitaires de leur hôte (Bjarnsholt et *al*., 2011).

I.3. Matrice exopolysaccharidique :

L'eau est le composant principal des matrices de biofilms, (jusqu'à 97 %), ce qui explique leur nature hydrophile. La matrice présente de canaux et de pores qui permettent la circulation de l'eau, des ions et des nutriments (Clutterbuck, 2007). Bien que les propriétés physico-chimiques du substrat varient selon la nature, les espèces et les conditions de croissance du biofilm (Karatan et Watnick, 2009 ; Fleming et Wingender, 2010).

Ce dernier consiste toujours initialement en :

- Exopolysaccharides (EPS) : éléments structuraux majeurs des membranes biologiques.

- Protéines, dont les enzymes : <1-2%.
- Acides nucléiques (ADN et ARN) : <1-2%.
- Lipides, glycolipides et cations.
- Agent Tensioactifs.
- Débris issus des matières en contact avec les surfaces.

La matrice joue un rôle structural et fonctionnel important en agissant comme une barrière protectrice contre les facteurs environnementaux comme la dessiccation, ainsi que vis-à-vis des substances bactéricides et bactériophages (Donlan, 2002).

I.4. Les étapes de formation de biofilm :

La formation des biofilms est processus initié par les bactéries en réponse à diverses pressions environnementales. Lorsque les bactéries sont confrontées à ces conditions stressantes (manque d'oxygène, de nutriments, présence de bactéricide …), elles ont la capacité de former des biofilms sur une variété de surfaces, qu'il s'agisse de tissus vivants, des surfaces abiotiques, des dispositifs médicaux ou d'autres supports présents dans le sol ou les milieux aquatiques.

La formation d'un biofilm se déroule en quelques étapes communes : contact initial/attachement à la surface, suivi de la formation de micro-colonies, maturation et formation de l'architecture du biofilm, et enfin détachement/dispersion du biofilm.

I.4.1Adhésion : Le processus d'adhésion microbienne aux surfaces est conditionné par un certain nombre de facteurs, y compris les espèces de bactéries, la composition de la surface des cellules, la nature des surfaces, la disponibilité des éléments nutritifs, les conditions hydrodynamiques, la communication. Il y a plusieurs hypothèses proposées pour décrire le mécanisme d'adhésion et qui ont le même axe d'interprétation :

L'adhésion est composée de deux étapes alternatives : l'adhésion réversible et l'adhésion irréversible :

1. **L'adhésion réversible :** Au départ, les cellules microbiennes planctoniques se déplacent dans le milieu liquide par des forces physiques ou par les flagelles. Lorsque les bactéries sont au voisinage d'une surface des forces attractives ou répulsives qui varient en fonction des niveaux de nutriments, du pH, de la force ionique et de la température interviennent et conduisent à une interaction réversible avec la surface (Roux and Ghigo, 2006 ; Garret et *al*., 2008 ; Banerjee et *al*., 2015).
2. **L'adhésion irréversible :** La phase irréversible est caractérisée par des interactions de courte distance telles que les interactions hydrophobes, acides-base de Lewis, et la

formation de dipôle. La formation des micro-colonies est le résultat de l'accumulation et de la croissance des microorganismes et est associée à la production d'EPS (Chmielewski et Frank, 2003), ce qui contribue à renforcer le lien entre les microorganismes et le substrat (Donlan, 2002).

Le passage entre la phase d'adhésion réversible et la phase d'adhésion irréversible serait très rapide (de la seconde à la minute) (Garret et *al*., 2008 ; Brauge, 2015).

3. **Accumulation des micro-colonies :** lorsque les bactéries adhèrent à la surface et que cette liaison devient stable, ce qui entraîne la formation d'une micro-colonie. La multiplication des bactéries dans le biofilm commence sous l'effet de signaux chimiques. Le mécanisme génétique de production d'exopolysaccharides est activé lorsque l'intensité du signal dépasse un certain seuil (Costerton *et al.,* 1999). Ainsi, grâce à ce signal chimique, les divisions cellulaires bactériennes ont lieu dans la matrice d'exopolysaccharide intégrée, ce qui aboutit à la formation d'une micro-colonie (Mckenney D, *et al.,* 1999). (Jacobsen *et al.,* 2008).

   Les bactéries se multiplient lentement et continuent de produire des exopolysaccharides. Elles s'agrègent entre elles et forment des micro-colonies, qui sont protégées par la matrice exopolysaccharidique (Jacobsen et *al*., 2008)

4. **La maturation :** Une fois que les bactéries ont adhéré solidement au support, elles vont accélérer leur division pour développer le biofilm et lui donner son architecture. Les microorganismes sont séparés par des canaux aqueux qui forment un réseau de circulation permettant d'une part d'acheminer l'oxygène et les nutriments dans les régions enfuies du biofilm et d'autre part d'évacuer les déchets (Filloux et Vallet, 2003). Le stade de maturation correspond au développement des micro-colonies et à la structuration du biofilm : les micro-colonies se développent en piliers d'épaisseur variable au sein desquels les cellules sont englobées dans la matrice extracellulaire. (SCHEMBRI, KJAERGAARD et KLEMM, 2003 ; BELOIN *et al.,* 2004 ; REN *et al.,* 2004).

5. **Le détachement de bactérie :** La densité bactérienne sur une surface peut atteindre 10^7 cellules/cm3 (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Le détachement des cellules associées aux biofilms intervient lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables (le retour à l'état planctonique). Traditionnellement, le détachement de bactéries est considéré comme un phénomène passif, dépendant notamment des forces du flux du milieu dans lequel le biofilm se trouve. Cependant, le détachement de bactéries peut aussi être une stratégie active, initiée par les bactéries elles-mêmes, leur permettant de coloniser de nouvelles surfaces et de survivre lorsque l'espace et les nutriments deviennent limités. Les bactéries peuvent se détacher seules ou par petits ou gros amas selon les mécanismes impliqués (Kaplan, 2010). Le détachement de bactéries est un processus complexe qui implique des signaux environnementaux et une communication entre les bactéries. Ainsi un biofilm établi constitue un réservoir de bactéries viables, capables d'aller coloniser d'autres surfaces.

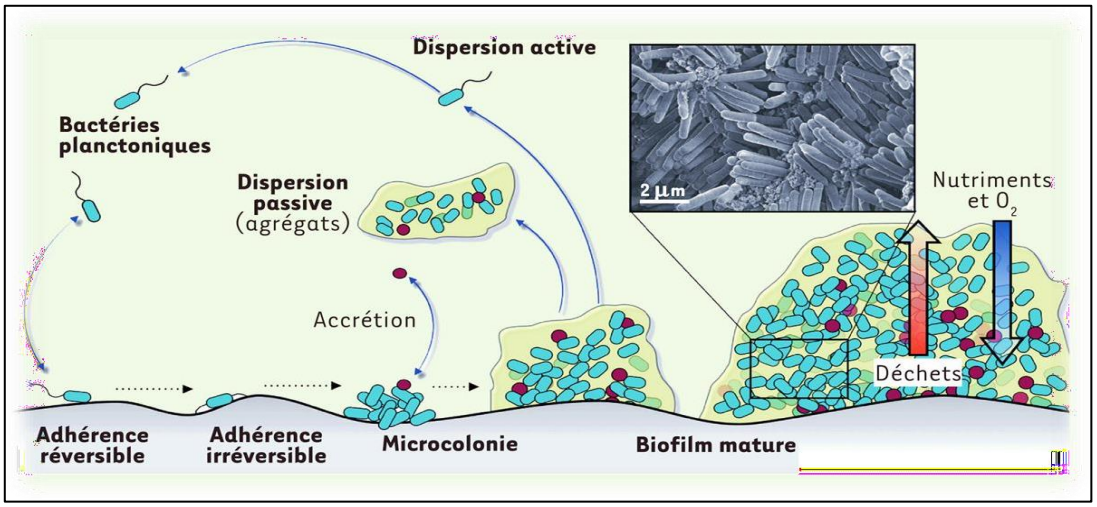


Figure 1 : Développement d'un biofilm clinique bactérien **(Lebeaux et Ghigo, 2012)**.

I.5. Biofilm entérobactérien :

Le biofilm pose un grave problème de santé publique en raison de sa nature résistante aux antibiotiques et des maladies associées aux dispositifs médicaux à demeure (Costerton *et al.*, 2009, Khan *et al*., 2014). La capacité de formation de biofilms a été signalée chez un grand nombre d'espèces bactériennes telles que *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *S. aureus*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae.* (Parsek and Singh 2003, Miller and Bassler 2001, Fux *et al* 2005 *;* 2009).

I.5.1. Escherichia coli :

E. coli est une bactérie Gram négative en forme de bâtonnet qui est à l'origine d'un grand nombre d'infections telles que les infections dans l'industrie avicole, les mammites et les infections urinaires...ect. Elle est capable de sécréter des toxines, des polysaccharides et de former un biofilm.

Il peut également former un biofilm in vitro (Naves *et al.,* 2010). Les capsules *d'E. coli* sont des molécules de poids moléculaire élevé et sont attachées à la surface de la cellule. Les capsules *d'E. coli* jouent un rôle indirect dans le biofilm en protégeant l'adhésion de la surface bactérienne. Différentes conditions environnementales affectent la capacité *d'E. coli* à former un biofilm (Larson EL, *et al.,* 2003). L'épaisseur du biofilm *d'E. coli* peut atteindre des centaines de microns, ce qui complique le traitement par antibiotiques en raison de la présence d'exopolymères (Larson *et al.,* 2003).

I.5.2. Klebsiella pneumoniae :

Klebsiella pneumoniae est une entérobactérie responsable de plusieurs affections nosocomiales. Sur différentes souches de *K. pneumoniae* provenant de divers échantillons humains tels que l'urine, les expectorations sanguines et les écouvillons de plaies a révélé qu'environ 40 % des souches avaient la capacité de former des biofilms. De plus, il a été observé que l'augmentation de la température de 35°C à 40°C favorisait une croissance plus importante des biofilms sur les surfaces non biologiques. Par ailleurs, la capacité de *Klebsiella pneumoniae* à former des biofilms est plus efficace lorsqu'elle est en présence d'un mélange de souches plutôt que lorsqu'elle est une souche individuelle (Miller AA et Miller PF, 2011 ; Podschun R et Ullmann U, 1998).

I.5.3. Salmonella :

Les espèces de Salmonella sont le premier agent causal des zoonoses d'étiologie bactérienne et des épidémies d'intoxication alimentaire. Des études scientifiques ont montré que *Salmonella* peut adhérer sous forme de biofilm aux surfaces abiotique. Les espèces de *Salmonella* possèdent des structures de surface avec des propriétés adhérentes. De plus, il produit de la cellulose en tant que substance extracellulaire, qui est le composant principal de la matrice polymère. (Vestby, *et al.,* 2009).

1.5.4. Caractères culturaux :

Les entérobactéries poussent facilement sur les milieux ordinaires en 24 heures à 37°C en aérobiose et en anaérobiose. Leurs exigences nutritionnelles sont, en général, réduites et la plupart se multiplient en milieu synthétique avec une source de carbone simple comme le glucose. Ce sont des germes mésophiles et neutrophiles (pH optimum voisin de 5,5 - 8) et ils sont assez tolérants aux variations de la pression osmotique. Ainsi on distingue 5 types de colonies :

- **Colonies S (smooth) :** arrondies, lisses, humides, blanches ou translucides.

- **Colonies R (rugueuses) :** sèches à contours irréguliers et mates (bactéries vieillies ou anormales).

- **Colonies M (muqueuses) :** grosses colonies ± confluentes (Klebsiella spp).

- **Colonies envahissantes ou nappantes :** formation d'un tapis uniforme (Proteus).

- **Colonies naines :** Elles s'observent avec des souches déficientes dans certaines de leurs chaînes métaboliques (Akel, 2014).

I.6. Les facteurs influençant la formation du biofilm :

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe, sous l'influence de nombreux facteurs, Les bactéries initient la formation de biofilm en réponse au stress environnemental, comme le manque d'oxygène ou de nutriments, et face aux changements de température.

I.6.1. La surface : En général, tout matériau en contact avec un fluide contenant des bactéries constitue un support potentiel pour la formation d'un biofilm.

- **Rugosité de surface :** Plus la surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des micro-colonies est importante (Characklis, 1990). Les surfaces rugueuses sont préférentiellement colonisées en raison de forces répulsives plus faibles et de surfaces d'attache accrues grâce à la présence de rugosité. Cependant, certaines souches de bactéries sauvages se développent également sur des surfaces lisses (Donlan et Costerton, 2002).

- **Propriétés physicochimiques de la surface :** Les propriétés physico-chimiques de la surface affectent le taux d'adhérence et son étendue. Les micro-organismes se fixent plus facilement aux surfaces hydrophobes et non polaires telles que le téflon ou d'autres plastiques qu'aux matériaux hydrophiles tels que le verre ou le métal (Bendinger, 2003).

- **Présence de films protéiques sur la surface :** La présence de polymères protéiques sur la surface d'un matériau modifie ses propriétés physico-chimiques et exerce une influence directe sur l'attachement des bactéries à cette surface. En effet, la présence préalable d'un film protéique tel que le sang, les larmes, l'urine, la salive, le liquide interstitiel et les sécrétions respiratoires sur un biomatériau affecte l'adhésion des bactéries à sa surface et favorise la formation de biofilms (Nobbs, 2009).

I.6.2. Les caractéristiques du milieu :

La formation et la dispersion d'un biofilm nécessitent des équipements enzymatiques précis et des entités structurales particulières, dont l'activation dépend de facteurs environnementaux clefs (Donlan, 2002).

- **La température :** La température est importante non seulement parce qu'elle affecte le métabolisme bactérien et l'activité enzymatique, mais aussi parce qu'elle affecte certains paramètres physico-chimiques (pH, activité ionique, agitation thermique et solubilité des gaz) ainsi que les propriétés de surface des bactéries. La température de croissance peut avoir un effet dramatique sur la mobilité électrophorétique des cellules et la production de flagelles, affectant ainsi l'adhésion (bellifa Samia, 2014).

- **PH :** Le pH du milieu environnant modifie la charge de surface des microbes ainsi que celle du support solide, car la balance d'ionisation (protonation/déprotonation) des groupes fonctionnels exposés se déplace en fonction de leur pKa (bellifa Samia, 2014). Les interactions électrostatiques répulsives préjudiciables à l'adhésion sont ainsi réduites ou augmentées (Boutaleb, 2007).

- **Sources de carbone disponibles :** Elles ont une influence sur la formation d'un biofilm et sur sa maturation (Martinez, 2007).

- Concentration en concentration en fer, osmolarité, présence d'ions spécifiques.

- **Sources de carbone disponibles :** elles ont une influence sur la formation d'un biofilm et sur sa maturation (Martinez, 2007).

- **Concentrations en nutriments :** dans un milieu statique, la concentration en nutriments doit être élevée pour qu'il puisse y avoir formation d'un biofilm ; ce n'est pas le cas pour un milieu hydrodynamique (Spormann, 2008).

- Concentrations en certains cations L'augmentation de la concentration de plusieurs cations (sodium Na+, Calcium Ca2+, ion ferrique Fe3+) influence l'attachement de Pseudomonas fluorescens sur des surfaces en verre, en réduisant les forces répulsives s'exerçant entre les bactéries chargées négativement et la surface de verre (Fletcher, 1988).

- Hydrodynamique du fluide Selon la position du matériau dans un fluide, il sera plus ou moins exposé à des turbulences. La zone de moindres turbulences, à l'écart des flux laminaires, est appelée zone de fixation. C'est précisément dans cette zone qu'il est plus facile pour les micro-organismes de se fixer sur une surface, puisqu'ils sont moins soumis aux forces exercées par le fluide (Donlan, 2002).

I.6.3. Propriété des cellules :

L'hydrophobicité de la surface cellulaire, la présence de fimbriae et de flagelles, ainsi que la production d'exopolysaccharides sont des facteurs qui influencent l'adhérence des bactéries à une surface. L'hydrophobicité de la surface joue un rôle essentiel dans l'attachement des micro-organismes, où les liaisons hydrophobes deviennent plus importantes lorsque les matériaux sont moins polarisés. La plupart des bactéries ont une charge négative et présentent des zones hydrophobes à leur surface. Plusieurs structures bactériennes, telles que les flagelles, les fimbriae et les polysaccharides, participent à leur attachement à une surface. Des compétitions ou des coopérations peuvent survenir entre les cellules lorsque plusieurs espèces bactériennes sont impliquées. Les polymères apolaires présents à la surface des cellules, tels que les fimbriae, certaines protéines et les acides mycoliques (présents dans certaines bactéries Gram positives), semblent se fixer préférentiellement sur des surfaces hydrophobes. Les exopolysaccharides et les lipopolysaccharides jouent un rôle plus important dans les mécanismes d'attachement aux surfaces hydrophiles. (Donlan, 2002).

I.7. Mécanisme régulateur de la formation de biofilm :

I.7.1. Le quorum sensing :

La formation d'un biofilm est contrôlée par des mécanismes de régulation tels que le Quorum-Sensing (QS). Il s'agit de mécanismes de contrôle au sein des cellules, matérialisés par des signaux de cellules à cellules, via des médiateurs chimiques, et dépendant de la quantité de cellules présentes : on parle de mécanismes de perception de densité cellulaire. Ces mécanismes sont basés sur le principe de masse critique. Une fois que les concentrations en molécules signaux atteignent une valeur seuil, des régulateurs transcriptionnels sont activés et exercent un contrôle sur des gènes spécifiques (Costerton et *al*., 1999 ; Tomlin et *al*., 2005 ; Irie and Parsek, 2008). Le QS régule la physiologie du biofilm en modulant la taille de la population du biofilm, et en prenant en compte les conditions environnementales. Il initie les phénomènes de dispersion et d'essaimage de bactéries planctoniques à partir du biofilm (Irie and Parsek, 2008).

I.7.2. Le quorum quenching :

La perturbation des mécanismes de la communication quorum sensing (QS) peut entraîner d'importantes modifications phénotypiques chez les micro-organismes du biofilm, telles qu'une sensibilité accrue aux antibiotiques ou aux antiseptiques, ainsi que des anomalies dans le cycle de développement du biofilm, en particulier lors des étapes de formation et de dispersion (Irie, 2008). Différentes stratégies ont été développées pour inhiber ces comportements régulés par le QS en bloquant la communication entre les bactéries. Cette méthode d'inhibition du QS est connue sous le nom de "quorum quenching" (QQ). Puisque la production et la détection de molécules de signalisation sont les principaux composants du QS, le QQ peut interférer de différentes manières avec ce système, que ce soit au niveau intracellulaire ou extracellulaire. L'utilisation de molécules inhibitrices, appelées inhibiteurs du QS (IQS), permet ainsi d'intervenir au niveau des cellules bactériennes pour inhiber la production ou la perception des molécules de signalisation. D'autres stratégies ciblent directement les molécules de communication sécrétées dans l'environnement avant qu'elles n'atteignent leur cible. Le QQ présente l'avantage de ne pas affecter la croissance des bactéries, contrairement aux antibiotiques, ce qui réduit considérablement la pression de sélection et devrait limiter l'émergence de résistance (Mion, 2019). Le QQ représente donc une approche idéale pour la prévention et le traitement des infections bactériennes et pourrait constituer une alternative aux antibiotiques (Mion, 2019).

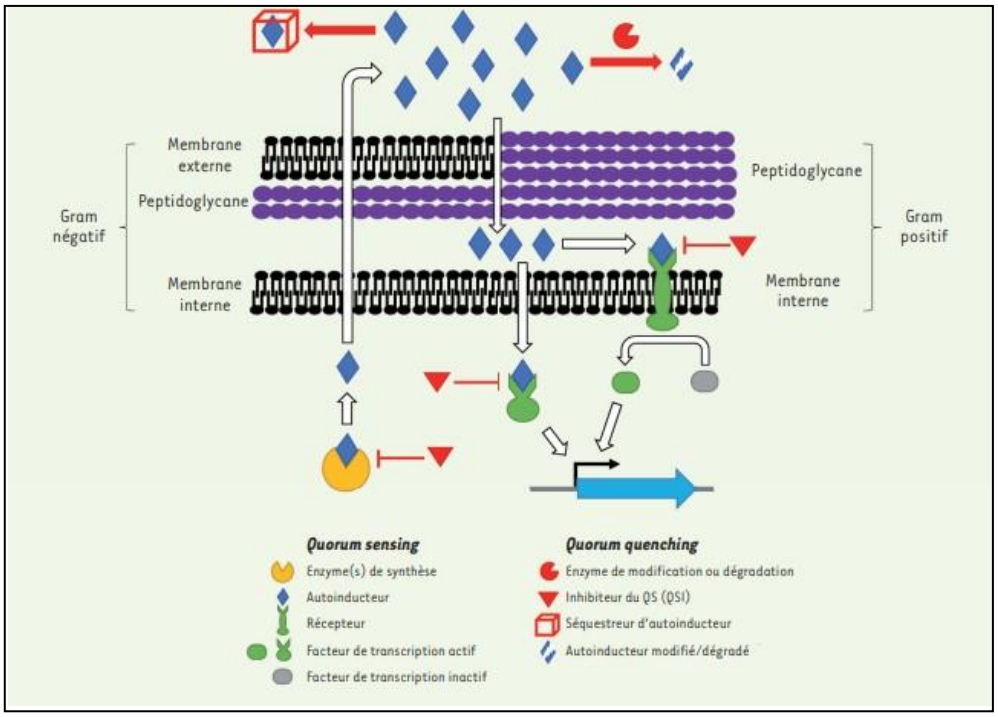


Figure 2 : Mécanismes du quorum sensing bactérien et des différentes stratégies de quorum quenching.(Mion *et al.*, 2019)

Chapitre II
Désinfectants et biofilms bactériens

II.1. Définition :

II.1.1. La désinfection : est un processus qui élimine de nombreux ou tous les micro-organismes pathogènes sur les objets inanimés, à l'exception des spores bactériennes. Cela est généralement réalisé par l'utilisation de produits chimiques ou liquides, (Rutala, 1990).

II.1.2. Désinfectant : Il s'agit d'un produit ou procédé utilisé dans des conditions spécifiées pour réaliser la désinfection ou la décontamination. (AFNOR, 1981 NF T 72-101)

Il existe deux principales catégories de désinfectants :

1) Les antiseptiques : qui sont utilisés pour la désinfection niveau des tissus vivants, dans la limite de leur tolérance, d'éliminer ou de tuer les micro-organismes et/ou d'inactiver les virus, en fonction des objectifs fixés.

2) Les désinfectants : qui sont employés pour la désinfection des surfaces inanimées telles que les sols, les lits, les bureaux, etc. (CCLIN, 2000).

3) Caractéristiques du désinfectant idéal :

- Avoir un large spectre d'efficacité.
- Être utilisé à faible concentration.
- Avoir une action durable.
- Être sans danger, même à forte concentration, pour l'homme.
- Ne laisse aucun résidu de souillure.
- Être sans action corrosive sur les matériaux.
- Être peu coûteux. (Quittet et Nelis, 1999).

II.2. Les différentes classes de désinfectants :

Parmi les produits les plus couramment utilisés, nous pouvons citer :

1. **Les alcools :** tels que l'éthanol et l'isopropanol, sont parmi les plus utilisés. Ils sont actifs sur les bactéries à Gram+ et à Gram- et agissent rapidement (environ 30 secondes). Cependant, ils sont inefficaces contre les spores, peu efficaces sur les virus et s'évaporent rapidement. De plus, ils sont inactivés par les matières organiques et ont tendance à faire coller les débris organiques (Massicotte, 2009).
2. **Les aldéhydes :** tels que le formaldéhyde et le glutaraldéhyde, font également partie des principaux désinfectants de cette catégorie. Ils sont bactéricides à des concentrations élevées sur les bactéries à Gram-. On leur attribue également des qualités de fongicide, de

Virucide, de mycobactéricide et de sporicide (Massicotte, 2009). De plus, ils ont un large spectre d'action et restent actifs sur une large plage de pH (Quittet et Nelis, 1999).

3. **Le biguanide :** est un désinfectant et antiseptique largement utilisé. Il présente une structure chimique contenant deux groupes guanidine reliés par une chaîne carbonée. Les biguanides ont une activité antimicrobienne étendue contre les bactéries, les champignons et les virus. Parmi les biguanides, la chlorhexidine est particulièrement appréciée pour ses propriétés exceptionnelles telles que son efficacité, sa persistance et son activité résiduelle prolongée. Elle trouve de nombreuses applications, notamment dans l'hygiène buccale, la désinfection des plaies et la préparation de la peau avant une intervention chirurgicale (Massicotte, 2009).
4. **Les composés halogénés :** tels que le chlore et ses dérivés, ainsi que l'iode et ses dérivés, sont largement utilisés en raison de leur efficacité, même à de faibles concentrations en chlore actif. Par exemple, le mélange d'iode avec un agent tensio-actif présente une forte action bactéricide à faibles concentrations (Bimbenet et Duequenoy, 2002). De plus, ils possèdent une puissante activité désodorisante et un large spectre d'activité sur les microorganismes (Trueman, 1971).
5. **Les composés d'ammonium quaternaire (CAQ)** : Les ammoniums quaternaires sont des composés tensioactifs ayant une action détergente. En les combinant avec des agents non ioniques, on obtient des produits nettoyants et désinfectants. Ils sont généralement peu toxiques et leur structure permet la création de produits neutres. Ils agissent de manière résiduelle sur les surfaces, offrant un effet bactériostatique à faible concentration et bactéricide à forte concentration. Leur stabilité dans l'eau chaude les rend efficaces pendant plusieurs heures (Massicotte, 2009).
6. **Les composés d'ammonium quaternaire (CAQ)** : Les ammoniums quaternaires sont des composés tensioactifs ayant une action détergente. En les combinant avec des agents non ioniques, on obtient des produits nettoyants et désinfectants. Ils sont généralement peu toxiques et leur structure permet la création de produits neutres. Ils agissent de manière résiduelle sur les surfaces, offrant un effet bactériostatique à faible concentration et bactéricide à forte concentration. Leur stabilité dans l'eau chaude les rend efficaces pendant plusieurs heures (Massicotte, 2009).
7. **Les composés phénoliques** : présentent une action bactéricide et fongicide. À faible concentration (0,2%), ils ont un effet bactériostatique, tandis qu'à partir de 1%, ils deviennent bactéricides. Les dérivés phénoliques dissous dans l'eau démontrent une

excellente activité contre les mycobactéries et les virus. Sur le marché, on trouve des nouvelles formules combinant plusieurs phénols capables de détruire les virus hydrophiles. Ces composés sont principalement utilisés pour le nettoyage des surfaces contaminées par des matières organiques. (Massicotte, 2009).

8. **Les oxydants :** sont des produits à base d'oxygène qui contiennent généralement des atomes travaillant par paires. On peut citer le peroxyde, l'acide peracétique, le peroxyphtalate, le perglutarate et le peroxymonosulfate. L'acide peracétique : L'acide peracétique est un désinfectant hautement efficace obtenu par le mélange d'acide acétique et de peroxyde d'hydrogène. Il présente un large spectre d'action, même à faible concentration, en altérant la perméabilité de la membrane cellulaire des micro-organismes. (Bimbenet et Duequenoy, 2002).

II.3. Le mécanisme d'action des désinfectants :

Les désinfectants sont des produits largement utilisés dans divers contextes tels que les hôpitaux, l'industrie et les foyers domestiques. Ils appartiennent à différentes classes chimiques et ont des spectres d'action variés. Certains désinfectants ont la capacité d'inhiber la croissance des microorganismes (bactériostase, fongistase, virustase), tandis que d'autres ont une action létale (bactéricide, fongicide, etc.). Certains antiseptiques et désinfectants peuvent présenter ces deux modes d'action en fonction de la concentration utilisée. D'autres désinfectants ont toujours une action létale ou toujours une action bactériostatique ou fongistatique, indépendamment de la concentration utilisée.(Faure, 2010).

Divers paramètres peuvent influencer l'efficacité des produits désinfectants : (Russel et *al*., 2004).

- Le temps de contact (une augmentation du temps de contact entraîne une augmentation de l'activité désinfectante).
- La température (une augmentation de la température favorise l'activité désinfectante).
- Le pH (l'activité peut varier selon les familles de désinfectants, avec une augmentation ou une diminution d'activité).
- La liposolubilité (capacité de pénétration des désinfectants).
- La présence de fluides ou d'autres matières biologiques tels que le sang ou le pus (l'activité est présente pour toutes les familles de désinfectants, à l'exception des phénols.
- La présence de savon (l'activité peut varier pour les ammoniums quaternaires, la chlorhexidine et les produits chlorés).

La plupart des désinfectants présentent une activité satisfaisante contre les bactéries et les virus enveloppés tels que le VIH, les hépatites B et C, l'herpès et la grippe. Cependant, leur efficacité peut varier d'un produit à l'autre lorsqu'il s'agit de virus non enveloppés tels que le poliovirus, les hépatites A et E, les papillomavirus, ainsi que contre les mycobactéries responsables de la tuberculose, les moisissures ou les spores. Le choix du désinfectant dépendra du type de désinfection envisagée, des types de microorganismes impliqués (voir Tableau 4).

Tableau 1: Spectre d'activité des principales familles d'antiseptiques et désinfectants. (Faure, 2010).

	Spectre d'action							
Familles	Gram +	Gram -	Mycobactéries	Levures	Moisissures	Virus nus	Virus enveloppés	Spores
HALOGENES	+	+	+	+	+	+	+	+
BIGUANIDES	+	+	+/-	+	+/-	+/-	+	-
ALCOOLS	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+	-
AMMONIUMS QUATERNAIRES	+	+/-	-	+	+	+/-	+	-
ALDEHYDES	+	+	+	+	+	+	+	+
OXYDANTS (DESINFECTION)	+	+	+	+	+	+	+	+
OXYDANTS (ANTISEPSIE)	+	+	-	+	+	+/-	+	-

+ : produits actifs ; +/ - : produits inconstamment actifs ; - : produits inactifs.

II.4. Mécanismes d'action des antiseptiques et désinfectants (CAPP, 2007) :

- **Les alcools :** tels que l'éthanol et l'isopropanol, sont des agents désinfectants qui agissent en dénaturant les protéines cytoplasmiques et membranaires des micro-organismes ciblés. En altérant la structure et la fonction des protéines, ils perturbent les processus cellulaires essentiels. De plus, les alcools exercent une action inhibitrice sur la synthèse des acides nucléiques et des protéines.
- **Les aldéhydes :** tels que le formaldéhyde, le glutaraldéhyde et l'aldéhyde succinique, agissent en altérant la paroi cellulaire des micro-organismes. Leur action se caractérise

également par l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines, ce qui perturbe les processus essentiels à la survie des micro-organismes.

- **Les ammoniums quaternaires :** sont des composés désinfectants qui agissent en se liant aux acides gras et aux groupes phosphates présents dans la membrane cellulaire des micro-organismes ciblés. Cette liaison entraîne une perturbation de l'intégrité de la membrane, conduisant à une fuite de constituants cellulaires essentiels et finalement à la lyse de la cellule.
- **Les biguanides :** agissent en se liant aux acides gras et aux groupes phosphates présents dans la membrane cellulaire des micro-organismes, provoquant ainsi une perturbation de la membrane. Cette altération conduit à une fuite de constituants cellulaires et à la coagulation du cytosol.
- **Les halogènes :** tels que le chlore et l'iode, agissent en détruisant les protéines membranaires et chromosomiques par un processus appelé halogénation. Ce mécanisme implique la modification chimique des protéines par les halogènes, ce qui entraîne leur destruction.
- **Les oxydants :** agissent en produisant des radicaux libres qui interagissent avec les lipides, les protéines et l'ADN. Ces radicaux libres sont des espèces chimiques hautement réactives qui réagissent avec les composants cellulaires, provoquant ainsi des dommages oxydatifs. Les lipides, les protéines et l'ADN sont particulièrement sensibles à ces réactions, ce qui peut entraîner des altérations structurelles et fonctionnelles des cellules.

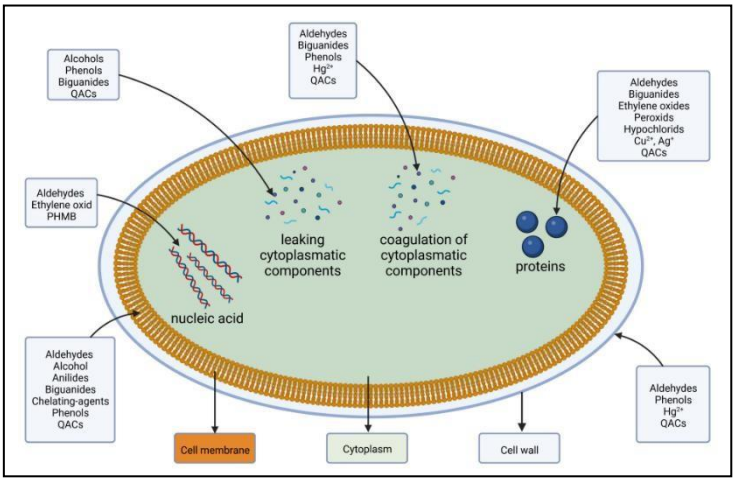


Figure 3 : Désinfectants et antiseptiques : leur localisation et leurs composants cibles**. (Basiry et *al*., 2022).**

II.5. Mécanismes de résistance bactérienne :

La notion de « tolérance » doit être précisée car elle varie en fonction qu'il s'agisse de cellules planctoniques ou adhérées en biofilms. Dans le premier cas, une souche bactérienne est

Considérée comme tolérante à un agent biocide si elle n'est pas désactivée par une concentration ou une durée d'exposition spécifique qui désactiverait généralement la majorité des autres souches (Langsrud et *al*., 2003)

La résistance bactérienne aux antiseptiques est un problème majeur, Certaines souches bactériennes peuvent développer une résistance en altérant les mécanismes de passage des molécules à travers la membrane cellulaire. Il est essentiel de respecter strictement les règles d'utilisation des antiseptiques pour éviter l'émergence de souches résistantes. (Faure, 2010)

Il existe deux catégories de résistance bactérienne aux antiseptiques : la résistance intrinsèque, qui est naturellement présente chez certaines souches bactériennes, et la résistance acquise, qui est développée par les bactéries suite à des altérations génétiques ou à l'acquisition de gènes de résistance. (Tong *et al.*, 2021)

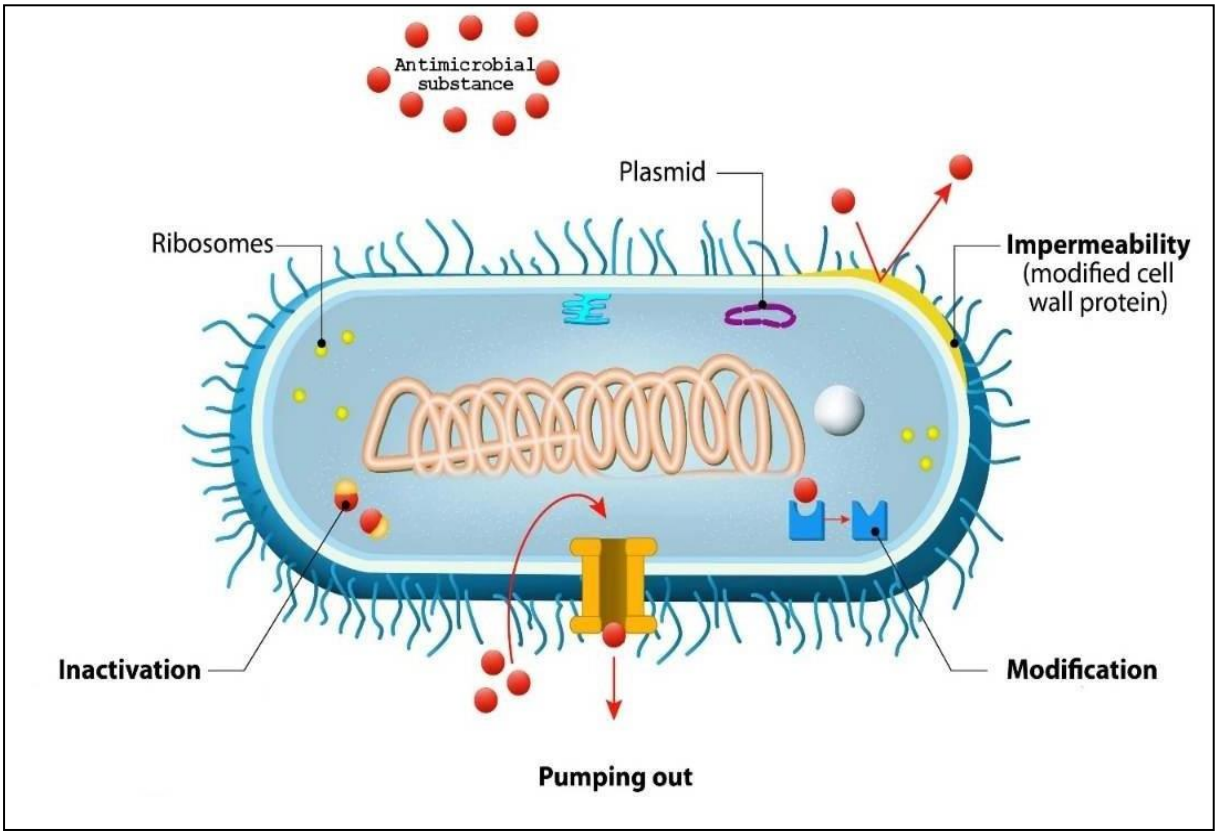


Figure 4 : Différents mécanismes de résistance aux agents antimicrobiens.(Ruddaraju *et al.*, 2020)

Tableau 2 : Mécanisme de résistance aux désinfectants.

	Mécanisme	Activité	Référence
Résistance naturelle (ou intrinsèque)	Limitation de la diffusion par formation de biofilms	Les biofilms bactériens présentent une résistance bien plus élevée à la désinfection par rapport aux bactéries libres. Cette résistance est attribuée au mécanisme de la matrice extracellulaire, qui forme une structure complexe et dense, rendant difficile la pénétration des agents antibactériens. De plus, la production de glycocalyx, une substance collante sécrétée par les bactéries, recouvre la surface bactérienne et agit comme un tampon protecteur.	(Tong et *al*., 2021).
	Diminution de la perméabilité de la membrane cellulaire	La présence de porines dans les couches externes des GNRI peut réduire ou empêcher la pénétration du désinfectant dans les bactéries.	(Carlie et *al*., 2019)
	Les pompes efflux	Ce mécanisme de résistance bactérienne peut diminue la concentration d'antimicrobiens en réduisant leur diffusion à travers la paroi bactérienne. Cela peut être dû à des modifications des composants de la paroi, comme les porines, qui limitent la diffusion des antimicrobiens, ou à l'expulsion active des antimicrobiens vers le milieu extracellulaire par ces pompes.	Li & Nikaido, 2004 et Li & Nikaido, 2009).
	Inactivation des enzymes	La libération des enzymes face aux divers agents antibactériens a été observée. Des recherches ont démontré que les bactéries étaient capables de désactiver les désinfectants tels que l'acide hypochloreux (HOCl), le H2O2, les composés d'ammonium quaternaire (CAQ) et le formaldéhyde grâce à une catalyse enzymatique.	(Tong et *al*., 2021)

Résistance acquise	Les transposons composites (Tn), séquences d'insertion (IS) et transposons unitaires	Les transposons et les séquences d'insertion sont des fragments d'ADN mobiles associés à des gènes de résistance. Ils peuvent se déplacer aléatoirement vers de nouvelles positions sur le même brin d'ADN ou sur d'autres brins d'ADN, transférant ainsi les gènes de résistance. Les transposons unitaires sont généralement plus grands que les séquences d'insertion et peuvent inclure à la fois des gènes passagers et des gènes de transposase. Ils forment une structure plus étendue qui abrite plusieurs gènes de résistance.	(Partridge et *al* ., 2018).
	Les intégrons et les cassettes de gènes	Les cassettes de gènes sont de courts fragments d'ADN composés d'un ou deux gènes, généralement dépourvus d'un site de recombinaison (attC) et d'un promoteur. Elles peuvent être insérées dans un intégron ou exister sous forme circulaire libre. Les intégrons facilitent le déplacement des gènes de résistance entre des sites spécifiques et subissent une recombinaison spécifique au site. Lorsque plusieurs cassettes de gènes sont insérées dans le même intégron, elles forment des cassettes-puces. Ce mécanisme peut conférer une résistance aux antibiotiques et aux désinfectants, ainsi qu'une Co-résistance entre les désinfectants et les antibiotiques.	(Delihas, 2011) (Zhou et *al*., 2017 ; Kim et *al*., 2018)
	Les ilots génomique ICE	Un îlot génomique désigne une portion du chromosome bactérien qui n'est pas d'origine génétique intrinsèque, mais qui a été introduite par transfert horizontal de gènes et intégrée dans le chromosome hôte via une conjugaison médiée par un phage. Lors de l'induction de l'expression du gène ICE, ces éléments sont excisés du chromosome et sont capables de se transmettre automatiquement par conjugaison.	(Delavat et *al*., 2017) (Johnson & Grossman, 2015)
	Les mutations régulatrices	La résistance aux désinfectants peut résulter de l'acquisition d'éléments génétiques mobiles provenant de sources externes. Cependant, elle peut également être due à des processus d'adaptation génétique intrinsèque, tels que l'expression différentielle des gènes induits par le stress antimicrobien ou par des mutations génétiques.	(Kim et *al*., 2018)

II.6. Les liaisons biofilm et tolérance aux désinfectants :

La question de l'insensibilité aux désinfectants dans le biofilm est complexe et souvent abordée sous l'angle de la tolérance plutôt que de la résistance véritable. Cette distinction est importante car l'insensibilité observée est principalement due à une adaptation physiologique résultant du mode de vie particulier du biofilm. En effet, les biofilms sont des communautés de microorganismes organisés en structures multicellulaires, protégées par une matrice extracellulaire. Cette matrice joue un rôle essentiel en offrant une barrière physique qui limite l'accès des désinfectants aux cellules du biofilm.

II.6.1. La limitation de la diffusion/réaction des désinfectants dans matrice de biofilm :

La matrice extracellulaire présente dans le biofilm constitue une structure dense et complexe qui pose des difficultés de pénétration aux biocides. Les biofilms composés de Pseudomonas aeruginosa et de Klebsiella pneumoniae ont révélé des concentrations de chlore mesurés à l'aide d'une microélectrode à l'intérieur des biofilms étaient généralement limitées à seulement 20 %, voire moins. La capacité du chlore à pénétrer dans le biofilm et sa vitesse de pénétration varient en fonction de l'emplacement où les mesures étaient effectuées, mettant en évidence la présence d'une distribution hétérogène de la biomasse et des conditions hydrodynamiques locales. (De Beer et al. 1994). De plus, la présence de matières organiques telles que les protéines, les acides nucléiques et les glucides peut profondément altérer l'efficacité des biocides (Lambert et Johnston, 2001). Dans le cas d'un biofilm mixte de P. aeruginosa et K. pneumoniae, le temps de pénétration était huit fois plus long pour l'hypochlorite alcalin (48 minutes) que pour le chlorosulfamate (6 minutes), bien que ce dernier présente un poids moléculaire plus élevé (Stewart et *al*., 2001). La réduction de la pénétration du biocide alcalin dans le biofilm est principalement attribuée à sa capacité accrue à réagir avec les constituants de la matrice, plutôt qu'à sa taille moléculaire. Par ailleurs, l'hydrophobicité de la paroi cellulaire bactérienne pourrait modifier la diffusion des nanoparticules à travers le biofilm, ce qui suggère que les éléments interfaciaux de la paroi cellulaire tels que le peptidoglycane, les fimbriae et les capsules pourraient également influencer la diffusion des composés au sein du biofilm. Ces interactions complexes soulignent l'importance des composants de la matrice et de la paroi cellulaire dans la résistance du biofilm aux désinfectants, et mettent en évidence la nécessité de prendre en compte ces facteurs lors du développement de stratégies efficaces de lutte contre les biofilms. (Habimana et *al*. 2011).

II.6.2. L'adaptation phénotypique :

La pénétration limitée des désinfectants dans un biofilm peut entraîner des concentrations plus faibles dans les régions plus profondes du biofilm. En réponse à ces concentrations sublétals, les bactéries développent des mécanismes d'adaptation. Par exemple, des études ont montré une survie accrue de Pseudomonas aeruginosa après un choc avec des composés quaternaires d'ammonium (QAC) lorsqu'elles sont préalablement exposées à des doses sublétals. Cette survie accrue est associée à des modifications de la composition de la membrane cellulaire (Bribier et al., 2011). Les bactéries adaptées au biofilm présentent une surexpression de protéines spécifiques impliquées dans le métabolisme énergétique, la biosynthèse des protéines, l'adaptation (CspA) et la détoxification (Mangalappalli-Illathu & Korber, 2006). De plus, des changements dans la composition des acides gras ont été observés lors de l'adaptation spécifique au biofilm (Mangalappalli-Illathu et *al*., 2008).

Les comparaisons des profils d'expression des gènes et les analyses protéomiques entre les états planctoniques et les biofilms de différentes espèces corroborent ces adaptations phénotypiques. Les gènes impliqués dans la production de protéines flagellaires sont réprimés, tandis que ceux liés à la production de la matrice extracellulaire et aux protéines d'adhésion telles que les curli sont surexprimés (Bribier et *al*., 2011). Ces résultats soutiennent l'idée que les bactéries adaptées au biofilm modifient leur expression génique et leur protéomique pour favoriser l'adhésion et la formation de la matrice, tout en réduisant leur mobilité.

Chapitre III
Matériels et méthodes

III.1. MATERIELS ET METHODE

III.1.1. Type et cadre de l'étude :

Ce travail a été réalisé dans le cadre de la préparation d'un mémoire de Master en Microbiologie appliquée à l'Université de Yahia Farès Médéa.

L'étude pratique a été effectuée au sein du laboratoire de Microbiologie, Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Dr Yahia Farès, Médéa, ainsi qu'au niveau du service de bactériologie du laboratoire de l'établissement public de santé de proximité (EPSP) de Médéa, durant une période s'étendant de février à mai 2023.

Dans le but de développer une nouvelle méthode reproductible pour tester l'efficacité des désinfectants sur les biofilms bactériens et d'évaluer l'efficacité de différents désinfectants contre les biofilms.

III.1.2. Les objectifs :

- Isoler et revivifier les entérobactéries chez les volailles et les bovins.
- Étudier la capacité de formation de biofilm des entérobactéries isolées chez les volailles et les bovins.
- Évaluer l'efficacité de différents désinfectants sur le biofilm formé par les entérobactéries.
- Évaluer l'effet des désinfectants sur la formation de biofilm en induisant un stress cellulaire.
- Analyser la sensibilité des souches isolées aux antibiotiques couramment utilisés chez les volailles et les bovins.
- Réaliser la technique PCR sur un sous-ensemble des souches bovines et aviaires, en particulier celles ayant démontré une forte capacité de formation de biofilm.

Ces différentes étapes de recherche contribuent à une meilleure compréhension de la formation de biofilm chez les entérobactéries isolées chez les volailles et les bovins, ainsi qu'à l'évaluation de l'efficacité des désinfectants et de la sensibilité aux antibiotiques de ces souches.

III.2. Matériel utilisé :

Nous avons utilisé deux types de matériel

III.2.1. Matériel non biologique : L'ensemble du matériel utilisé dans les différentes manipulations est cité en Annexe.

III.2.2. Matériel biologique : Dans notre étude, nous avons utilisé des souches isolées, identifiées et analysées précédemment.

III.3. Origine et identification des souches :

Les souches étudiées comprennent deux types de souches d'origine animale. Les premières souches ont été isolées à partir du lait de mammite clinique chez les bovins dans diverses régions de l'Algérie (tableau 1 et 2), tandis que les autres ont été isolées à partir du foie de volaille. L'identification de ces souches a été réalisée en utilisant la technique **MALDI/TOF-MS** (Spectrométrie de Masse par Ionisation Désorption Laser Assistée par Matrice et Temps de Vol), considérée comme la méthode la plus précise dans ce domaine.

Tableau 3 : Le nombre et les origines des souches utilisée (25 souche/lait).

Les échantillons (ID)	*MALDI-TOF MS*	Région
M_01	*Escherichia coli*	Sidi-Bel-Abbès
M_02	*Escherichia coli*	Sidi-Bel-Abbès
M_09	*Enterobacter cloacae*	Sidi-Bel-Abbès
M_10	*Escherichia coli*	Sidi-Bel-Abbès
M_11	*Klebsiella pneumoniae*	Sidi-Bel-Abbès
M_12	*Klebsiella pneumoniae*	Sidi-Bel-Abbès
M_15	*Escherichia coli*	Sidi-Bel-Abbès
M_18	*Klebsiella pneumoniae*	Sidi-Bel-Abbès
M_20	*Enterobacter cloacae*	Sidi-Bel-Abbès
M_27	*Raoultella orntholytica*	Guelma
M_28	*Raoultella orntholytica*	Guelma
M_31	*Raoultella orntholytica*	Guelma
M_34	*Escherichia coli*	Guelma
M_37	*Escherichia coli*	Médéa
M_38	*Escherichia coli*	Ain-Defla
M_46	*Escherichia coli*	Ain-Defla
M_48	*Escherichia coli*	Ain-Defla
M_52	*Escherichia coli*	Ain-Defla
M_55	*Escherichia coli*	Boumerdes
M_62	*Escherichia coli*	Boumerdes
M_69	*Escherichia coli*	Ain-Defla
M_70	*Escherichia coli*	Ain-Defla
M_73	*Serratia macescens*	Guelma
M_74	*Serratia macescens*	Guelma
M_77	*Escherichia coli*	Guelma

Tableau 4 : Le nombre et les origines des souches utilisée (23 souche/volaille).

Les échantillons (ID)	MALDI-TOF	Région
A1	*Escherichia coli*	Médéa
A2	*Escherichia coli*	Médéa
A3	*Escherichia coli*	Médéa
A4	*Escherichia coli*	Médéa
A5	*Escherichia coli*	Médéa
A6	*Escherichia coli*	Médéa
A7	*Escherichia coli*	Médéa
A8	*Escherichia coli*	Médéa
A9	*Escherichia coli*	Médéa
A10	*Escherichia coli*	Médéa
A11	*Escherichia coli*	Médéa
A12	*Escherichia coli*	Djelfa
A14	*Escherichia coli*	Djelfa
A15	*Escherichia coli*	Djelfa
A16	*Escherichia coli*	Djelfa
A18	*Escherichia coli*	Djelfa
A19	*Escherichia coli*	Djelfa
A20	*Escherichia coli*	Djelfa
A21	*Escherichia coli*	Djelfa
A22	*Escherichia coli*	Djelfa
A23	*Escherichia coli*	Chlef
A24	*Escherichia coli*	Chlef
A25	*Escherichia coli*	Djelfa

III.4. Méthodologie de travail :

III.4.1. Revivification et vérification de la pureté des souches :

Tout d'abord, les souches qui avaient été préalablement conservées dans le glycérol ont été revivifiées. Après homogénéisation par vortex, la revivification des souches a été réalisée dans un bouillon de TSB (bouillon tryptone soja). L'incubation a été effectuée à 37°C pendant 24 heures.

La vérification de la pureté des souches a été réalisée sur le milieu Mac Conkey, un milieu de culture sélectif couramment utilisé pour isoler et identifier les bactéries entériques Gram-négatives (comme Escherichia coli, Salmonella et Shigella).

La purification a été réalisée en réalisant des stries sur une gélose, avec une incubation à 37°C pendant 24 heures, jusqu'à l'apparition de colonies identiques en termes de taille, de forme et de couleur, ce qui témoigne de la pureté des souches.

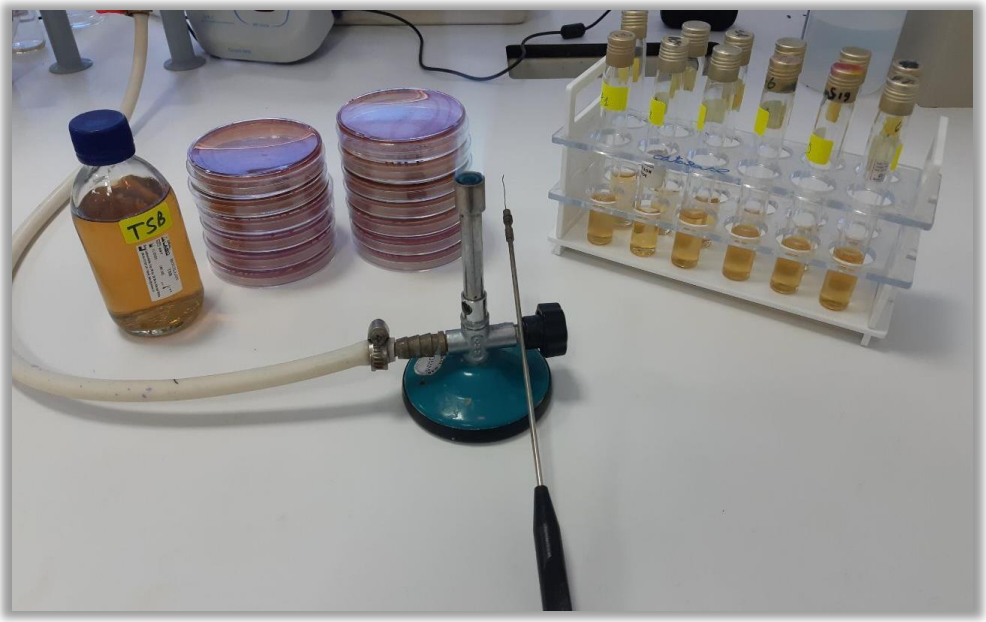


Figure 5 : Ensemencement sur le milieu MacConkey après l'enrichissement dans le TSB.

III.5. La Technique d'évaluation de la formation de biofilm in vitro :

III.5.1. Méthode de culture sur microplaque (TCP) :

Cette méthode a été décrite en **1985** par le groupe de recherche de **Christensen**, pour l'étude in vitro de la formation de biofilms et de la résistance à la corrosion.

Dans la plupart de ces systèmes modèles, la quantification de la biomasse du biofilm se fait par ensemencement conventionnel, ce qui demande beaucoup de travail et de temps. **(Donlan et Costerton, 2004).**

Cette méthode permet une détermination quantitative du biofilm formé en mesurant la densité optique relier au colorant présent dans le biofilm. **(Musk et *al*., 2005).**

Le test en micro-titration est une méthode simple et économique pour étudier la formation de biofilms. Il est largement utilisé en recherche et en clinique pour évaluer l'efficacité des agents antimicrobiens et développer des stratégies de prévention et de contrôle des infections associées aux biofilms.

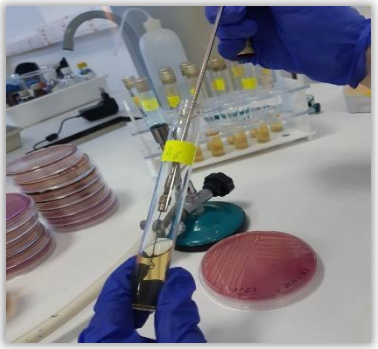
III.5.2. Détection de la formation de biofilm :

III.5.2.1. Protocole :

À partir de quelques colonies prélevées sur le milieu MacConkey, les souches ont été cultivées individuellement pendant 18 à 24 heures dans 5 ml de TSB à 37°C. Chaque culture a été ajustée pour atteindre une densité de 0,5 unité de McFarland (dilution dans le TSB) à une longueur d'onde de 600 nm. Un volume de 200 µl de la suspension bactérienne a été déposé dans les puits stériles en polystyrène d'une microplaque de 96 puits en forme de "U". Chaque culture bactérienne a été utilisée 3 fois pour garantir l'exactitude des résultats. Les 3 puits de la première colonne ont été remplis avec un même volume de 200 µl de TSB non ensemencé, servant de contrôle négatif. La microplaque recouverte a ensuite été incubée à 37°C pendant 24 heures, puis à nouveau pendant 48 heures sans agitation.

Après la durée d'incubation, le contenu des puits de la microplaque a été vidé. Trois lavages consécutifs ont été réalisés avec 200 µl de solution saline tamponnée au phosphate (PBS, pH=7,4) pour éliminer les bactéries libres planctoniques. Ensuite, les cellules adhérentes ont été fixés dans une étuve pendant 60 minutes à 60°C. Les cellules bactériennes adhérentes à la paroi interne des puits, formant un biofilm, ont été colorées avec du cristal violet à 0,1% (m/v). Après 10 à 15 minutes, la solution de cristal violet a été éliminée et les puits ont été rincés 3 fois avec de l'eau distillée stérile pour éliminer toute trace de colorant non fixé. Ensuite, les microplaques ont été laissées sécher à température ambiante.

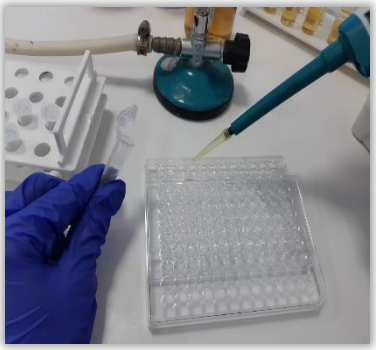
Enfin, les puits ont été remplis à nouveau avec 150 µl d'une solution d'éthanol à 95% pendant au moins 30 minutes à température ambiante pour solubiliser le colorant contenu dans les cellules emprisonnées dans le biofilm ainsi formé. La densité optique a été mesurée à 600 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (ELISA) (modèle MP96 de Safas Monaco) connecté à un ordinateur.



Ensemencement dans le milieu TSB.



Dilution dans le milieu TSB.



Remplissage de la microplaque.



Incubation.



Vidange de microplaque.



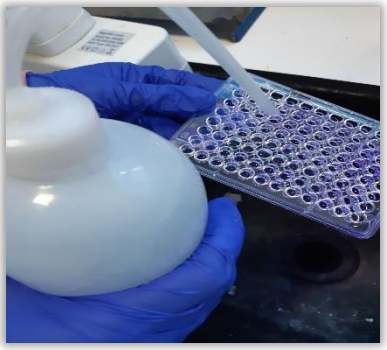
Rinçage par PBS.



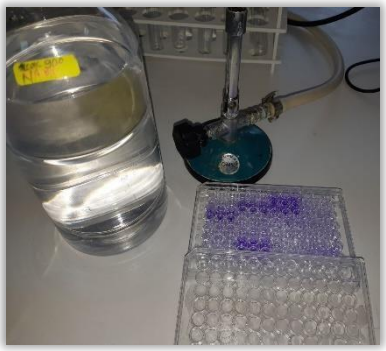
Fixation.



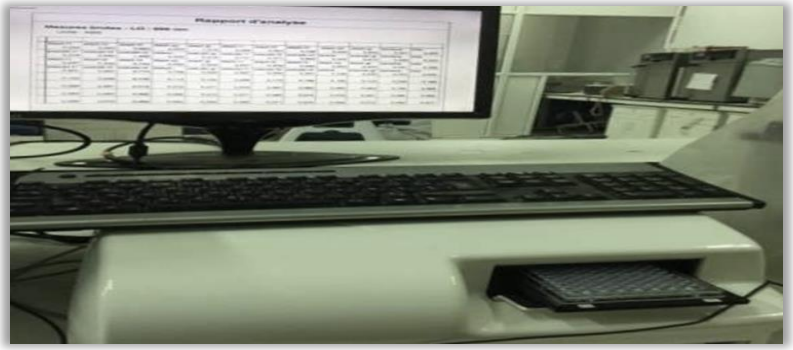
Coloration par cristal violet.



Lavage 3 fois par l'eau distillée.



Resolubilisassions par l'éthanol.



Lecture par le lecteur MP96.

Figure 6 : Les étapes de la méthode de formation de biofilm TCP.

III.5.2.2. Lecture de la microplaque :

La lecture visuelle du biofilm dans la microplaque après coloration permet d'obtenir une estimation approximative de sa densité dans chaque puits (figure 7). Toutefois, il est recommandé d'utiliser des méthodes de quantification plus précises, telles que la mesure de l'absorbance ou de la biomasse, afin d'évaluer de manière plus fiable la formation du biofilm.

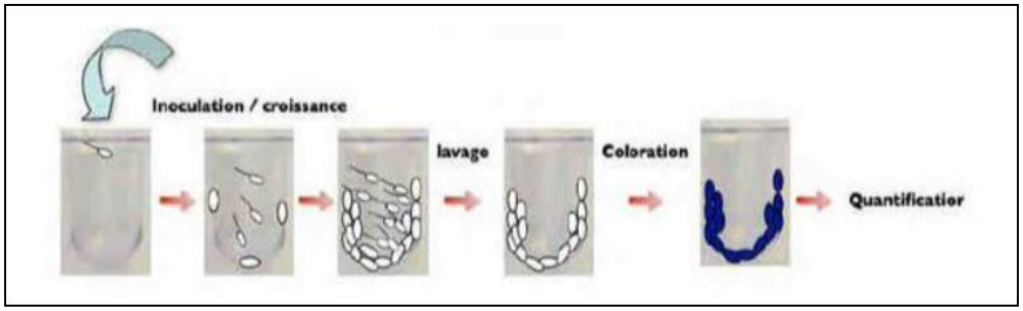


Figure 7 : Principe des techniques de quantification des biofilms en microplaques. **(Laurent, 2011).**

Afin de faciliter l'interprétation des résultats, les souches peuvent être classées selon les catégories suivantes établies par Stepanovic et al. (2000) : les souches ne produisant pas de biofilm (catégorie 7), celles produisant faiblement un biofilm (catégorie 8), celles produisant modérément un biofilm (catégorie 9) et celles produisant fortement un biofilm (catégorie 10).

Tableau 5 : Classification de la formation de biofilm selon **(Stepanoviç et *al*., 2007).**

Moyennes des valeurs de DO	Formation de Biofilm	Interprétation
DO lue ≤ DOnc (7)	/_	Absence
DOnc< DO lue ≤ 2XDOnc (8)	±	Faible
2XDOnc < DO lue ≤ 4XDOnc (9)	+	Modéré
DO lus> 4XDOnc (10)	++	Fort

Notes : **DOnc :** la moyenne des DO des Contrôles négatifs.

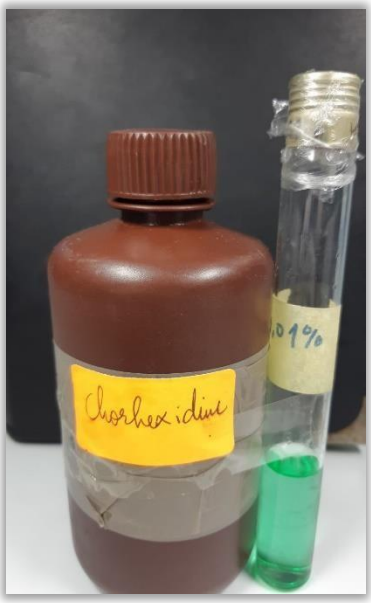
III.5.3. Evaluation in vitro de l'efficacité de quelques désinfectants sur la formation du biofilm :

Pendant cette étape de l'étude expérimentale, l'efficacité de trois désinfectants a été évaluée sur des souches déjà caractérisées pour leur capacité à former des biofilms (CMI/CMB). Parmi celles-ci, huit souches ont été sélectionnées pour étudier l'efficacité de différents désinfectants sur la formation de biofilm. Le choix de ces souches a été fondé sur leur fort potentiel de

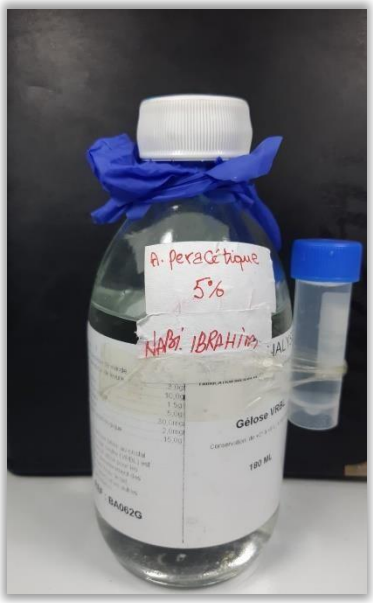
formation de biofilm, ainsi que sur la disponibilité des microplaques, des milieux et des réactifs nécessaires. Il est également important de noter que la durée limitée allouée à l'étude a influencé le nombre de souches sélectionnées.

Tableau 6 : Les souches utilisées pour tester l'efficacité de désinfectants sur la formation du biofilm.

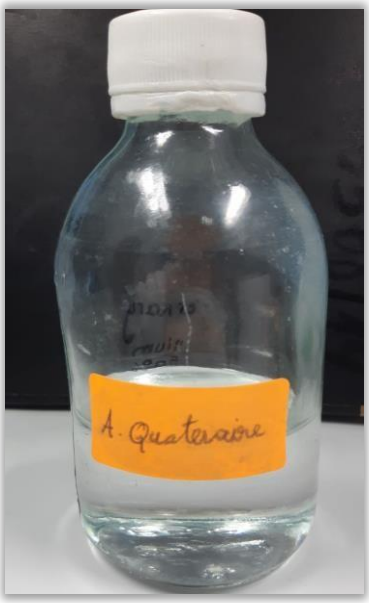
Les souches		Moyennes de DO
Les souches aviaires	A7	0,13
	A9	0,48
	A10	0,18
	A25	0,14
Les souches laits	M2	2,05
	M11	2,00
	M18	1,81
	M69	1,59



Chlorhexidine.



Acide peracétique.



Ammonium quaternaire.

Figure 8 : les désinfectants utilisés.

III.5.3.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :

La méthode de micro-dilution en milieu liquide. Cette technique est vivement recommandée pour les agents antimicrobiens hydrosolubles tels que les désinfectants. Elle agit comme une méthode de référence pour définir la dilution cible des désinfectants pour chaque espèce, utilisées pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) des agents antimicrobiens, qui tuent (activité bactéricide) ou inhibent la croissance (activité bactériostatique) des bactéries. (Ramzi *et al.*, 2020)

- **Protocole :**

Pour commencer, des colonies bactériennes sont prélevées et inoculées dans 5 ml de bouillon TSB, puis incubées à une température de 37°C pendant une période de 18 à 24 heures. Ensuite, tous les puits de la plaque sont remplis avec 100 µl de bouillon TSB, à l'exception des puits de la colonne n° 01 et n° 12. Par la suite, une dilution du désinfectant est préparée à la concentration la plus élevée, et la colonne n°1 est remplie avec 200 µl de cette concentration préparée.

Ensuite, 100 µl des puits n°01 sont transférés au puits suivant (n°02) et bien mélangés. Cette opération est répétée successivement pour les puits suivants jusqu'au puits n°11 Les 100 µl supplémentaires du puits n°10 sont jetés. Chaque deux rangées correspond à une souche bactérienne sélectionnée, et les puits n°1 à n°11 servent pour les dilutions décroissantes du désinfectant testé. Le puit n°12 est réservé respectivement comme un contrôle positif.

L'opération est ensuite répétée pour les autres rangées Un inoculum est préparé pour chaque isolat, en diluant les suspensions bactériennes dans le bouillon TSB pour obtenir une concentration bactérienne de 0,5 McF. Cette concentration est ensuite diluée dans le TSB à un rapport de 1 :150 pour obtenir une concentration finale d'environ 10^6 CFU/ml.

Puis, 100 µl d'inoculum sont ajoutés à chaque puits de n°01 à n°11. Enfin, la colonne n°12 est remplie avec 200 µl d'inoculum (contrôle positive). La microplaque est recouverte et incubée à 37°C pendant 24 heures.

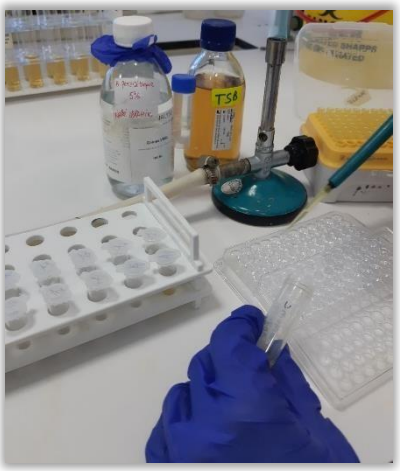
Enfin, il est possible d'observer à l'œil nu le taux de croissance dans les puits contenant l'agent antimicrobien.



Essai avec chlorhexidine diluée 10 fois.



Essai avec 5% d'ammonium quaternaire.



Essai avec 0.1% acide peracétique.

Figure 9 : Essai de l'efficacité des désinfectants.

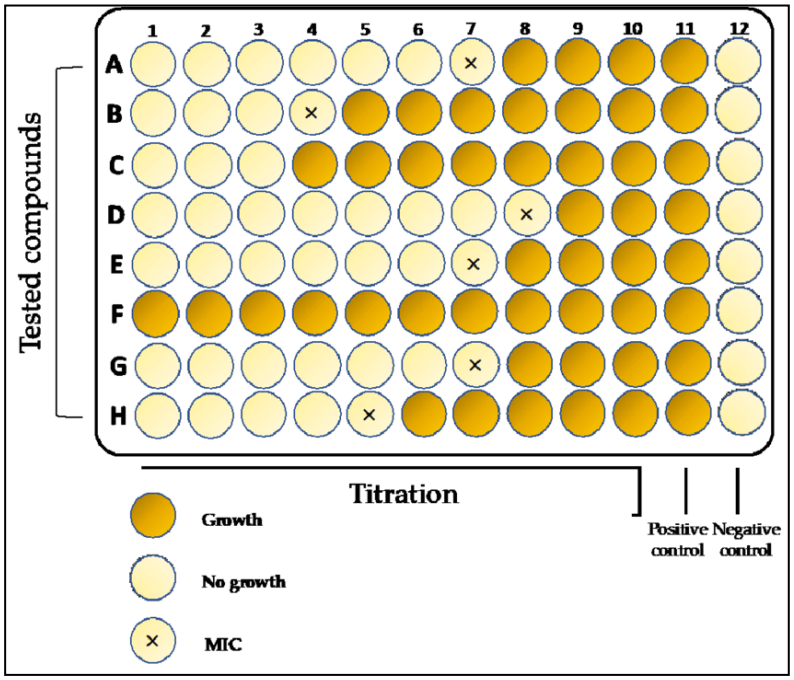


Figure 10 : photo représente l'interprétation des CMI.

III.5.3.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) :

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) est une mesure utilisée en microbiologie pour déterminer la concentration la plus faible d'un agent antimicrobien qui est nécessaire pour

tuer complètement une population bactérienne spécifique. Elle est souvent utilisée pour évaluer l'efficacité d'un agent antimicrobien ou d'un médicament contre les bactéries.

Il est important de noter que la détermination de la CMB peut varier en fonction de différents facteurs, tels que la souche bactérienne testée, les conditions d'incubation et les critères utilisés pour évaluer la croissance bactérienne.

La CBM est un paramètre accepté pour l'évaluation des nouveaux antimicrobiens, et il est fréquemment utilisé comme un outil de recherche pour fournir une prédiction de l'éradication bactérienne. (Nathally Claudiane de Souza Santos et *al*, 2020).

Protocole :

- Préparez des boîtes de Petri contenant du milieu de culture Muller-Hinton avec une épaisseur de gélose de 4 mm, Assurez-vous que les boîtes sont correctement séchées.
- Déposez précisément une goutte de 10 µl de suspension bactérienne dans des puits distincts, comprenant un puits correspondant à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et d'autres puits avec des concentrations supérieures à la CMI du désinfectant testé, où aucune croissance bactérienne ne devrait être détectée.
- Incubez les boîtes à une température de 37 °C pendant une durée de 18 à 24 heures.
- Procédez à l'évaluation de la présence de croissance bactérienne. L'absence de croissance bactérienne dans le puits présentant la concentration la plus faible indique la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) du désinfectant testé. Il est possible que la CMB soit équivalente à la CMI ou qu'elle soit supérieure à celle-ci.

Note : N'oubliez pas d'identifier les boîtes selon les identifiants des souches.

III.6. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques :

Les profils de résistance aux antibiotiques des 23 souches des volailles et 26 souches des bovines ont été déterminés par la méthode de diffusion de disques sur gélose Mueller Hinton (annexe) en tenant compte des recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (EUCAST/CA-SFM, 2013).

III.6.1. Mueller Hinton (MH) : C'est la gélose la plus communément utilisée pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques (l'antibiogramme) (Denis et *al*., 2011).

Protocole

- Préparer un inoculum à partir d'une ou deux colonies isolées sur le milieu (Mac Conkey) et les émulsionner dans l'eau physiologique stérile 0.9 % Cette dernière a été homogénéisée à l'aide d'un vortex et la suspension a été ajustée à l'échelle 0,5 Mcfarland.
- Après 15 min de la préparation de l'inoculum, A l'aide d'un écouvillon stérile, introduit dans la suspension bactérienne et éliminer l'excès de liquide en tournant l'écouvillon sur les parois du tube.
- Écouvillonner sur la totalité de la surface de la gélose dans trois directions en stries serrées et tournant l'écouvillon sur lui-même ou en utilisant un ensemencer rotatif.
- Déposer les disques d'antibiotiques à tester (maximum 6 sur la boîte de 90 mm) à l'aide d'une pince stérile (Le nombre de disques déposés par boîte est limité pour éviter les interférences entre les zones d'inhibition).
- Incuber les boîtes idéalement à 35±2°C en aérobiose 16h à 24 h.



Figure 11 : Préparation l'étalon de 0.5 Mac Farland.

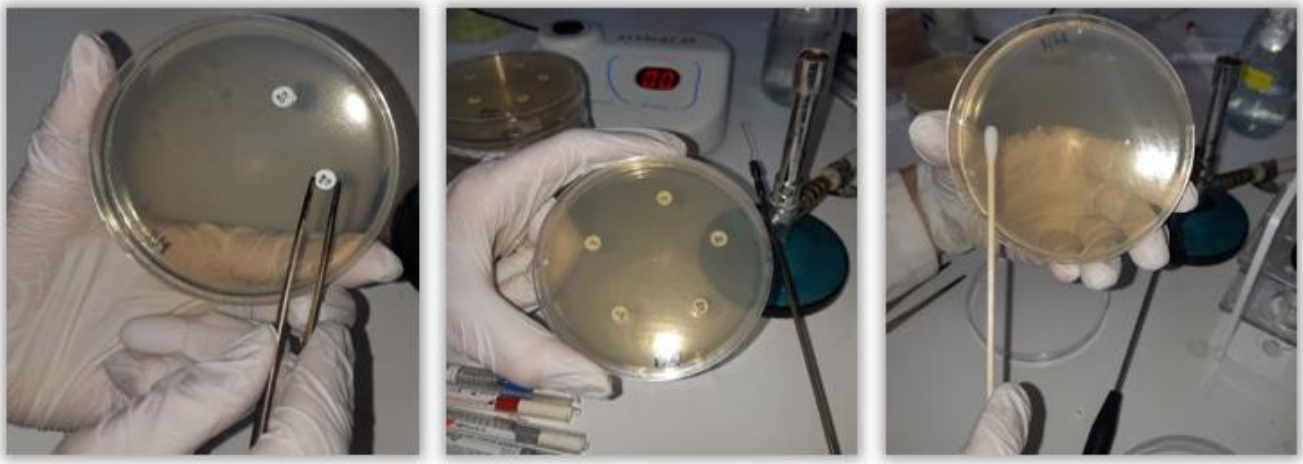


Figure 12 : Application des disques d'antibiotiques.

III.6.2. Méthode de lecture :

- La bordure de la zone d'inhibition doit être évaluée visuellement.
- Mesurez les diamètres des zones d'inhibition au millimètre le plus proche à l'aide d'un pied à coulisse ou d'un système de lecture automatisé.
- Interprétez les diamètres des zones d'inhibition.

Les résultats obtenus sont comparés aux valeurs critiques indiquées dans le tableau de lecture. En fonction de ces comparaisons, la bactérie est classée dans l'une des catégories suivantes : sensible, résistante ou intermédiaire. Les valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) pour les entérobactéries en médecine vétérinaire sont répertoriées dans le tableau intitulé "Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale" (STANDARDISATION DE L'ANTIBIOGRAMMEA L'ECHELLE NATIONALE).

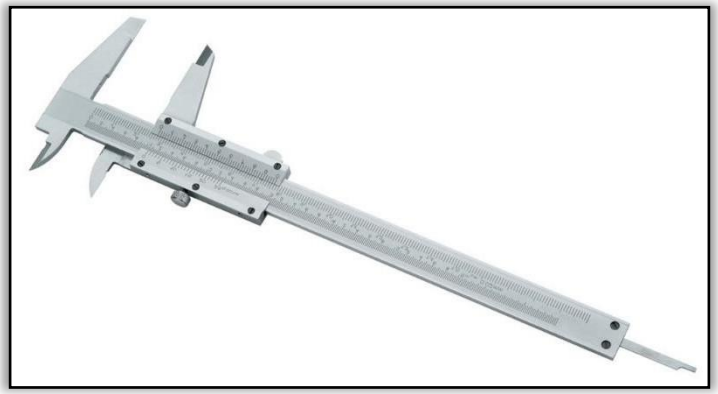


Figure 13 : le pied à coulisse utilisée dans l'antibiogramme.

III.6.3. Les Antibiotiques utilisés :

Tableau 7 : Les antibiotiques utiliser dans l'antibiogramme.

La Famille	Antibiotiques	Charge des disques (µg)	Diamètres critiques (mm)			Symbole
			S	I	R	
Pénicillines	Amoxicilline	10µg	≥17	14-16	≤13	AMX
	Céfalotine	30 µg	≥18	15-17	≤14	KF
	Ampicilline	10µg	≥17	14-16	≤13	AM
Quinolones	Ciprofloxacine	5 µg	≥21	17-20	≤16	CIP
	Acide nalidixique	30 µg	≥19	14-18	≤13	NA
Tétracyclines	Tétracycline	30 µg	≥19	15-18	≤14	TE
Aminosides	Gentamicine	10 µg	≥15	13-14	≤12	CN
	Kanamycine	30 µg	≥18	14-17	≤13	KA
Phénicols	Chloramphénicol	30 µg	≥18	13-17	≤12	C
Sulfamides	Triméthoprime-sulfaméthoxazole	1,25/23,75µg	≥16	11-15	<10	SXT
Polymyxines	Colistine	10 µg	≥11	-	≤10	CT
Céphalosporins	Céfotaxime	30 µg	26	-	23	CTX

III.6.4. Détection de la résistance des entérobactéries aux β-lactamines par production de BLSE :

Les β-lactamases à spectre étendu (BLSE) sont des enzymes produites par certaines bactéries qui sont capables de dégrader les antibiotiques de la classe des β-lactamines, tels que les pénicillines et les céphalosporinesde troisième génération (C3G) (Céfotaxime, ceftriaxone, ceftazidime) et des monobactames (aztréonam). (Qachaou et *al*., 2011).

Protocole :

Un inoculum est préparé en utilisant une culture bactérienne jeune de 18 à 24 heures, La gélose Muller-Hinton est ensemencée par la méthode d'écouvillonnage. Ensuite, un disque contenant l'association amoxicilline/acide clavulanique est placé au centre de la boîte de Pétri, à une distance de 3 cm des disques de Céfotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ) et aztréonam (ATM).

La confirmation phénotypique des souches productrices de β-lactamases à spectre élargi (BLSE) a été effectuée en recherchant les images en bouchon de champagne ou en entonnoir qui peuvent apparaître entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de β-lactamase (Amoxicilline-acide-clavulanique) et les disques de céphalosporines de troisième génération (Céfotaxime, ceftazidime et céfepime) et l'aztréonamdisposés sur la gélose Mueller-Hinton pré-ensemencée (Bakour et *al*., 2014).

III.7. Partie biologie moléculaire :

III.7.1. Extraction de l'ADN génomique :

Principe L'extraction de l'acide désoxyribonucléique est une technique permettant d'isoler ce dernier de cellules ou de tissus, cet isolement est la première étape dans la plupart des études de biologie moléculaire. Dont l'objectif de cette technique dans le cas présent est d'obtenir un ADN purifié, isolé de sources diverses, afin de pouvoir mener une analyse spécifique (Raoudha et *al*., 2012). Il existe différents protocoles pour extraire l'ADN mais le principe est à peu près toujours le même (Surzycki, 2000) :

- La lyse de membrane cellulaire et nucléaire
- Élimination des protéines, des acides nucléiques (ARNs) et des autres contaminants comme les métabolites secondaires
- Un traitement à l'aide d'une solution de précipitation, d'habitude l'éthanol ou l'isopropanol.

- **Protocole :**

Aperçu expérimental :

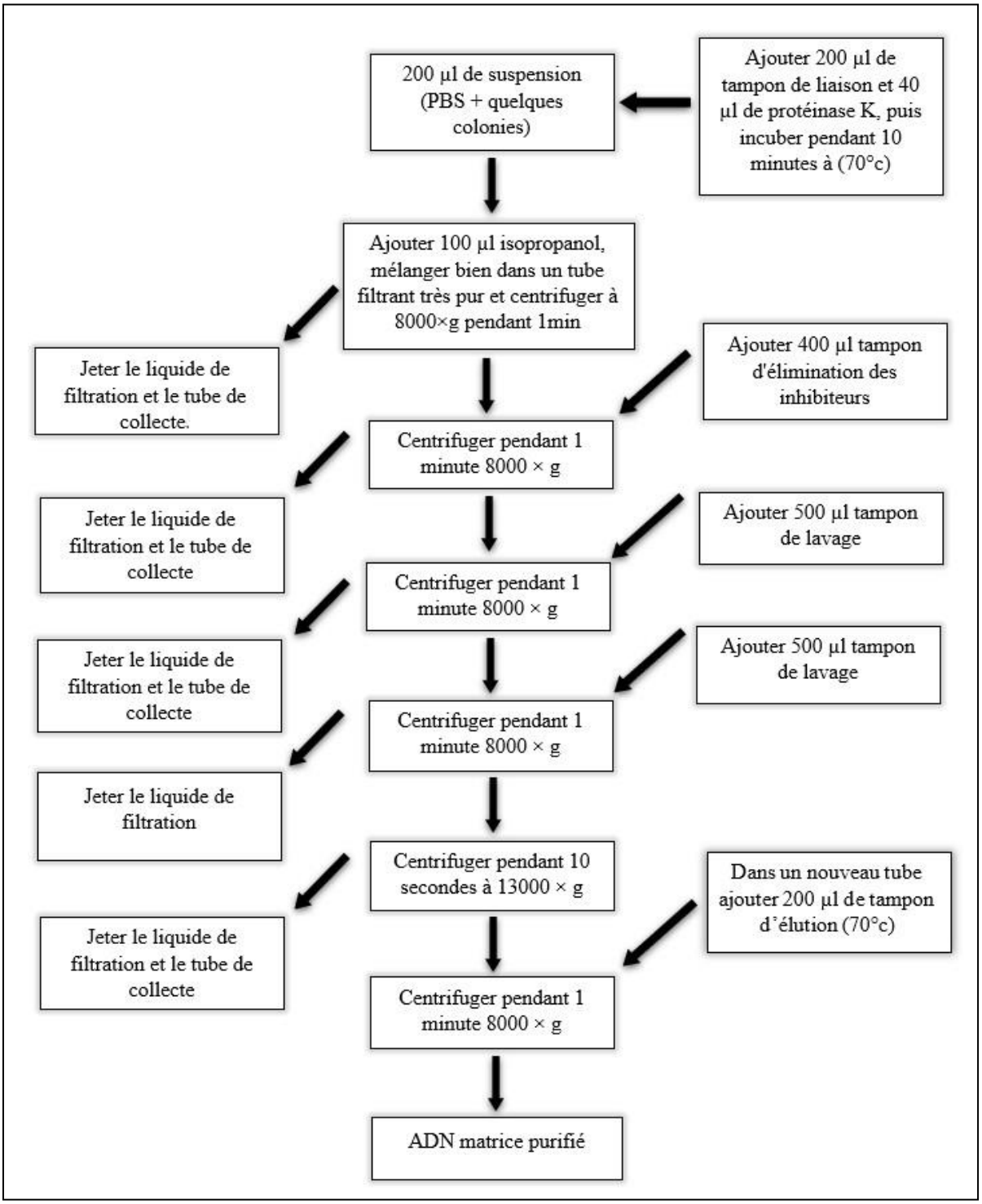


Figure 14 : Le protocole et les étapes suivis dans l'extraction de l'ADN.

III.7.2. Technique de PCR :

La PCR, un procédé enzymatique permettant l'amplification in vitro de l'ADN spécifique, y compris à partir de faibles quantités, génère des millions de copies qui sont ensuite adéquates pour une analyse ultérieure (Garibyan et Avashia, 2013). La PCR s'est imposée comme la méthode prédominante pour la détection de l'ADN et de l'ARN (Poitras et Houde, 2002).

- **Protocole :**

Le protocole PCR a été effectué selon le numéro de protocole 2023_Ecoli_Biofilm_01/pap-C le 24.05.2023, en utilisant le kit Solis BioDyne Monoplex MasterMix PCR (15 µl). Un total de 20 échantillons a été traités. Le programme PCR utilisé était "Facteurs de biofilm".

La région ciblée est :

- Le gène pap-C avec une taille attendue de 501 pb - associée à l'adhésion du biofilm.
- Le gène fim-H avec une taille attendue de 508pb – est lié à la formation de fimbriae.

Préparation d'un volume total de 15 µl de Solis BioDyne Monoplex Master Mix PCR. Les composants de la réaction de PCR comprenaient : de l'eau (13 µl), du **Solis FAST® Master Mix Ready To Load**, (4 µl), l'amorce avant (0,5 µl,), l'amorce arrière (0,5 µl,) et de l'ADN matrice (2 µl). Pour préparer le cocktail réactionnel, nous avons multiplié tous les composants par 22 (le nombre d'échantillons), multiplié par 20 pour atteindre un volume final de 20 µl par réaction, et ajouté une marge d'erreur de 2 µl. Ensuite, nous avons ajouté 2 µl d'ADN extrait à chaque réaction. Le thermocycleur a été lancé avec le programme suivant :

- Une dénaturation initiale à 98 °C pendant 2 minutes
- Une dénaturation à 98 °C pendant 10 secondes
- Une hybridation à 58 °C pendant 30 secondes
- Une extension à 72 °C pendant 30 secondes « Le cycle a été répété 30 fois. »
- La dernière étape d'extension a été réalisée à 72 °C pendant 2 minutes.

Le produit de la PCR a été analysé en utilisant l'électrophorèse sur gel d'agarose à 2 %. Après coloration au bromure d'éthidium, les bandes ont été visualisées sous UV et leurs tailles ont été estimées en comparaison avec un marqueur de poids moléculaire, en appliquant une tension de 100V pendant 30 minutes.

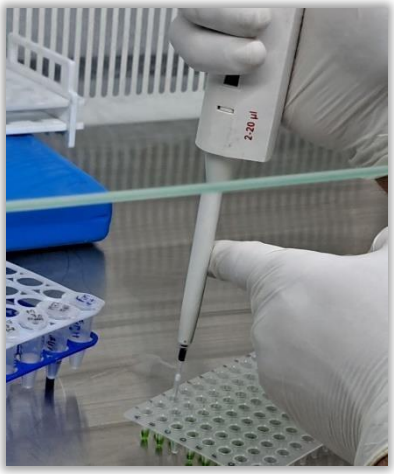
Remarque : Le BET s'intercale entre les bases azotées de la double hélice d'ADN et devient fluorescent après excitation par les ultraviolets. Plus le fragment d'ADN est long, plus la coloration émise est intense.



Préparation de cocktail PCR papC - fimH



Remplir les puits de la plaque d'amplification par le cocktail préparé.



Ajouter l'ADN extrait.



Recouvrir la plaque d'amplification.



Vérification de la plaque d'amplification.



Mettre la plaque au thermocycleur.

Figure 15 : Les étapes de la PCR.

III.7.3. Électrophorèse sur gel d'agarose :

La technique d'électrophorèse sur gel d'agarose est utilisé quotidiennement dans les laboratoires de biologie moléculaire, il s'agit d'un moyen de séparation efficace et parfait des biomolécules chargées tel que l'ADN, en fonction de leur charge, leur taille et leur forme (Magdeldin, 2012).

III.7.3.1. Préparation du gel à 2 % :

Protocole :

- Peser 2 g d'agarose dans un Erlenmeyer de 100 ml.
- Ajouter 100 ml de tampon TBE 1X (1 fois concentré) (voir annexe).
- Faire fondre ce mélange au four à micro-ondes, en arrêtant le four toutes les 10 secondes pour agiter. Le mélange doit devenir parfaitement transparent, sans présence de particules d'agarose.
- Ajouter 5 µl de la solution de bromure d'éthidium. Homogénéiser le mélange.
- Placer le peigne, et couler le gel dans l'appareil d'électrophorèse en veillant à éviter la formation de bulles, Laisser le gel refroidir.

III.7.3.2. Evaluation de la qualité et la quantité d'ADN extrait :

III.7.3.2.1. Vérification de l'intégrité d'ADN

L'intégrité d'ADN extrait ainsi que sa présence ont été vérifié par l'électrophorèse sur un gel d'agarose à 1.5%, 2%,2,5%.

III.7.3.2.2. Préparation et dépôt des échantillons :

- Placer le gel dans la cuve et s'assurer qu'il est recouvert de tampon TBE 1X.
- Déposer, 5 µl d'ADN extrait dans les puis de gel d'agarose et noter son ordre.
- Brancher les fils et mettre le générateur de puissance sous tension à 100V pendant 30 minutes.
- À la fin de la migration, l'ADN a été visualisé sous U.V après coloration au BET.

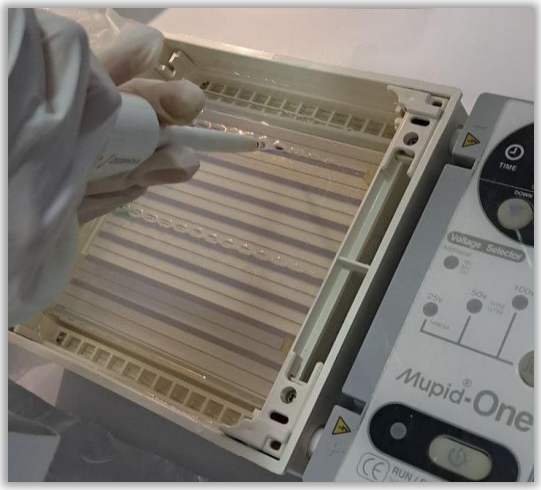


Figure 11 : chargement de l'échantillon d'ADN amplifier dans les puits de gel d'agarose.

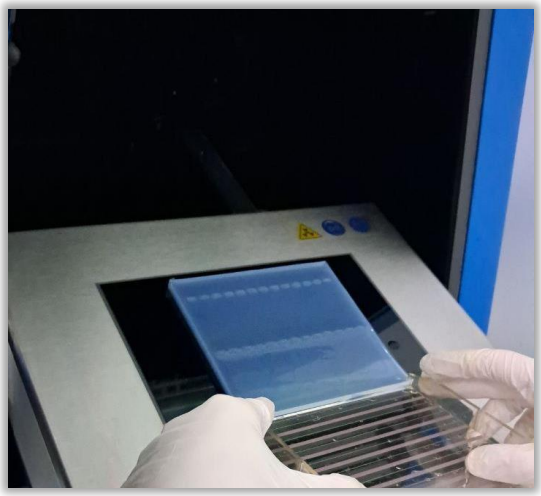


Figure 17 : Mettre le gel d'agarose au transluminateur.

III.7.3.2.3. Visualisation des fragments d'ADN :

L'incorporation de bromure d'éthidium dans le gel d'agarose permet de visualiser les fragments d'ADN sur le gel, Le bromure d'éthidium a la capacité de s'insérer entre les paires de bases empilées de l'ADN, lors de l'illumination sous lumière UV du gel d'agarose l'apparition de l'ADN sur le gel comme une bande de fluorescence orange.

Chapitre IV
Résultats et discussion

IV.1. Isolement et revivification des souches utilisées :

Sur un total de 51 souches d'entérobactéries, comprenant 26 souches responsables de mammites cliniques et 25 souches responsables de colibacilloses, qui ont été isolées et identifiées à partir de différentes wilayas en Algérie. Après un processus d'enrichissement des échantillons dans un bouillon TSB pendant 24 heures, il a été constaté que 48 échantillons présentaient une apparence trouble. Par la suite, ces échantillons ont été ensemencés sur gélose MacConkey et incubés pendant 18 à 24 heures à une température de 37 °C, afin de confirmer la vitalité des souches.



Figure 18 : observation de la turbidité dans le milieu TSB avec le contrôle négative.

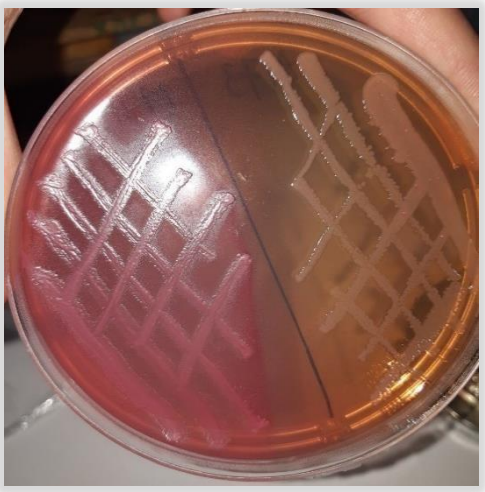


Figure 19 : observation de la pureté des souches vivantes d'entérobactéries non/fermentatrice de lactose.

IV.2. Identification des isolats :

IV.2.1. Aspet macroscopique :

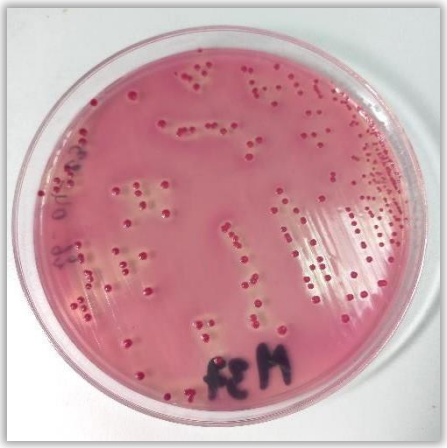
Après l'observation des (48) boîtes incubées pendant 24 heures sur le milieu MacConkey, différentes caractéristiques de colonies ont été observées, telles que la taille des colonies (grande/petite), le changement de couleur, la consistance (sèche/muqueuse), etc. Ces observations indiquent une diversité dans les espèces d'entérobactéries.

Les bactéries présentes sur le milieu MacConkey se différencient par leur capacité à fermenter le lactose. Les bactéries lactose-fermentantes entraînent une acidification du milieu, ce qui se traduit par un changement de couleur vers le jaune. En revanche, les bactéries non-fermentantes conservent la couleur initiale du milieu **(Fauchère et Avril, 2002)**. Cette distinction

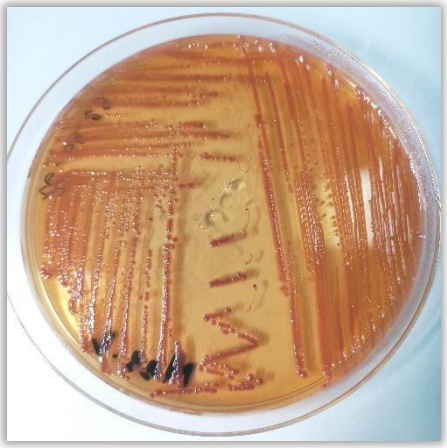
visuelle permet d'identifier facilement les différentes espèces d'entérobactéries présentes. Le tableau suivant récapitule les principales caractéristiques observées pour ces colonies.

Tableau 8 : Caractères culturaux des souches isolées.

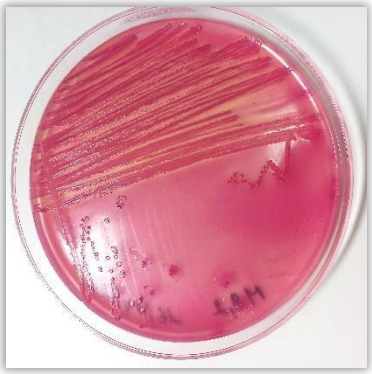
Bactérie	Caractères macroscopiques
Escherichia coli	Colonies rondes, lisses, à bords réguliers de 2 à 3mm de diamètre et non pigmentées.
Klebsiella	Colonies de type mucoïdes, volumineuses de 4 mm de diamètre, bombées, brillantes, opaques et souvent confluentes.
Enterobacter cloacae	Colonies opaques, brillantes, souvent d'aspect gras.
Serratia macescens	Colonies rondes, légèrement convexes, opaques ou translucides à contours réguliers d'un diamètre de 2 à 4 mm et peuvent avoir un aspect rugueux ou muqueux.
Raoultella orntholytica	Petite à moyenne taille, lisses et convexes, peuvent présenter une couleur rose à rouge en raison de la fermentation du lactose Odeur désagréable.



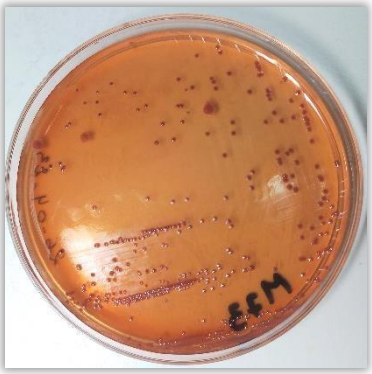
Aspect *d'Escherichia coli* sur milieu Mac Conkey.



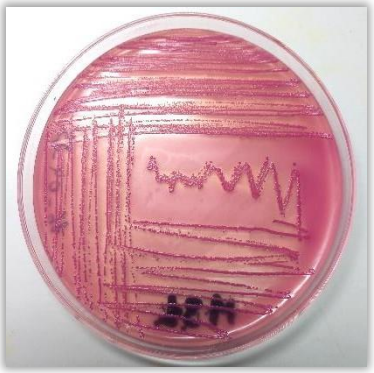
Aspect *Klebsiella pneumonie* sur milieu Mac Conkey.



Aspect *d'Enterobacter cloaceae* sur milieu Mac Conkey.



Aspect de *Serratia macescens* sur mac Conkey.



Aspect *de Raoultella orntholytica* sur mac conkey.

Figure 20 : Variabilité des aspects macroscopiques des souches d'entérobactéries selon leur espèce sur le milieu mac conkey.

IV.2.2. L'identification : L'identification des souches d'entérobactéries a été réalisée par la technique MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time-Of-Flight).

Tableau 9 : Répartition des souches d'entérobactéries isolées et identifiées.

Région	Espèce	Mammites cliniques	Colibacilloses
Sidi-Bel-Abbès	*Escherichia coli*	4	0
	Enterobacter cloacae	2	0
	Klebsiella pneumoniae	3	0
Guelma	*Raoultella orntholytica*	3	0
	Escherichia coli	2	0
	Serratia macescens	2	0
Médéa	*Escherichia coli*	1	11
Ain-Defla	*Escherichia coli*	6	0
Boumerdes	*Escherichia coli*	2	0
Djelfa	*Escherichia coli*	0	10
Chlef	*Escherichia coli*	0	2

Le tableau (9) fournit une analyse des espèces bactériennes impliquées dans les cas de mammite clinique chez les vaches dans différentes régions. Les espèces identifiées comprennent

Escherichia coli, Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae, Raoultella orntholytica et *Serratia macescens*. De plus, le tableau présente le nombre de cas de colibacillose signalés chez les volailles, associés spécifiquement à l'espèce *Escherichia coli*, dans différentes régions.

L'analyse du tableau confirme qu'*Escherichia coli* est l'espèce bactérienne la plus fréquemment identifiée dans les cas de mammite clinique, présente dans plusieurs régions telles que Sidi-Bel-Abbès, Guelma, Médéa, Ain-Defla, Boumerdes, Djelfa et Chlef. Cette constatation est cohérente avec les études antérieures qui ont également souligné le rôle prédominant d'*E. coli* en tant que bactérie Gram-négative associée à la mammite bovine **(Gianneechini et *al*., 2002)**. La présence d'*E. coli* dans les glandes mammaires des vaches peut provoquer une inflammation et des symptômes cliniques localisés et systémiques, en particulier lors de la parturition et en début de lactation.

Par ailleurs, les espèces bactériennes *Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae, Raoultella ornitholytica* et *Serratia marcescens* sont également impliquées dans les cas de mammite clinique chez les bovins. Toutes ces espèces sont des bacilles à Gram négatif et peuvent causer des infections graves de la glande mammaire chez les vaches laitières.

Il est important de noter que ces différentes espèces bactériennes peuvent présenter des variations en termes de prévalence et de répartition géographique. Par exemple, *Enterobacter cloacae et Klebsiella pneumoniae* ont été principalement signalées dans les régions de *Médéa et Djelfa,* tandis que *Raoultella ornitholytica* et *Serratia marcescens* ont été mentionnées dans les régions de Guelma et Djelfa. Cependant, il est possible que ces espèces soient également présentes dans d'autres régions, mais peut-être à des niveaux moins élevés ou moins fréquents.

Selon les données du tableau, il est possible d'observer une prévalence de la colibacillose aviaire causée par *Escherichia coli* dans les régions mentionnées. Cela confirme également les études antérieures qui ont identifié *Escherichia coli* comme l'agent bactérien le plus fréquent associé aux problèmes de santé généraux et de production chez les volailles **(Barnes et *al*., 2008 ; Kabir, 2010 ; Zhuang et *al*., 2014 ; Landman et van Eck, 2015)**. Ces études ont souligné l'importance de mettre en place des mesures de prévention et de contrôle pour limiter la propagation de cette bactérie et réduire son impact sur les élevages avicoles.

Dans les régions de Médéa et Djelfa, le nombre de cas de colibacillose signalés s'élève respectivement à 11 et 10. Tous les cas ont été attribués à l'espèce bactérienne *Escherichia coli*. Ces données suggèrent que *Escherichia coli* est le principal agent responsable de l'infection dans

ces régions, En revanche, dans la région de Chlef, seulement 2 cas de colibacillose ont été rapportés.

Ces résultats mettent en évidence la présence de la colibacillose dans différentes régions, avec des variations en termes de prévalence. Les régions de Médéa et Djelfa semblent être davantage touchées par cette infection, tandis que Chlef enregistre un nombre relativement faible de cas.

IV.3. Evaluation de la formation de biofilm :

IV.3.1. Quantification de biofilm par TCP :

Le test TCP, tel que décrit par Christensen et al., est largement utilisé et considéré comme la norme pour la détection de la formation de biofilms (Stepanovic et *al*., 2007). Dans cette étude, nous avons évalué la capacité de production de biofilms in vitro de 48 isolats en utilisant la méthode quantitative de coloration au cristal violet sur une microplaque de 96 puits, comme décrit précédemment pour la méthode TCP.

La méthode de la plaque de culture tissulaire permet une évaluation semi-qualitative et quantitative de la formation du biofilm. Tout d'abord, une évaluation semi-qualitative est réalisée en observant visuellement la coloration au cristal violet dans la plupart des puits où un biofilm s'est formé, classifiant ainsi sa densité en tant que forte, modérée ou faible.

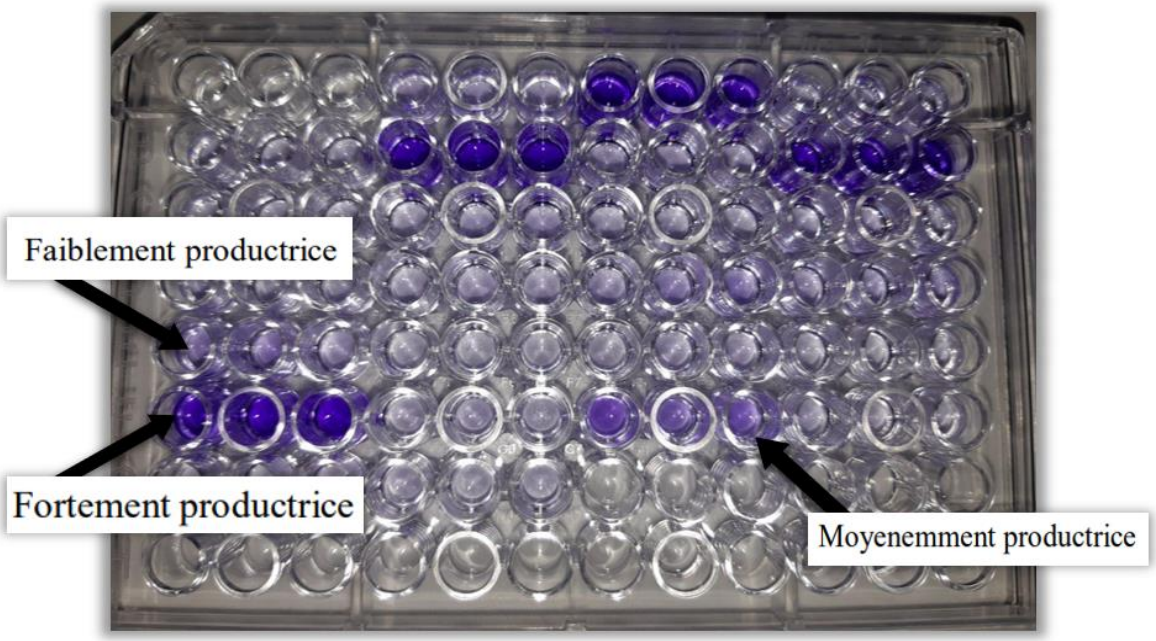


Figure 21 : Microplaque de différentes catégories de formation de biofilm.

Pour l'analyse quantitative, la densité optique du biofilm formé dans chaque puits est mesurée à une longueur d'onde de 600 nm. Différentes catégories de biofilms sont déterminées en fonction de la capacité des bactéries à adhérer à la surface de la plaque en polystyrène, en utilisant la valeur de densité optique comme témoin négatif (TSB non ensemencé) qui est égal à 0.1.

Tableau 10 : Méthode d'évaluation de la formation de biofilm.

Valeure de DO	Estimation de biofilm
DO < 0.1	Absence de biofilm
0.1 < DO < 0.2	Faible
0.2 < DO ≤ 0.4	Moyenne
DO > 0.4	Fort

Pour étudier la relation entre la durée d'incubation et le potentiel de biofilm, nous avons utilisé 25 souches d'entérobactéries responsables de mammites et 23 souches d'entérobactéries responsables de colibacillose. Ces souches ont été analysées selon la méthode TCP, conformément aux recommandations de Stepanoviç et *al*, avec une modification de la durée d'incubation. Plus précisément, les échantillons ont été incubés pendant 24 heures et 48 heures.

Cette modification de la durée d'incubation nous permet d'évaluer l'impact de la prolongation de la période d'incubation sur le potentiel de formation de biofilm des entérobactéries étudiées. En comparant les résultats obtenus après 24 heures et 48 heures d'incubation, nous pourrons déterminer si une durée plus longue favorise une plus grande formation de biofilm.

Les souches sont classées en : 1) forte productrice (**SBP**), 2). Modérée (**MBP**), 3). Faible (**WBP**) et non productrice (**NBP**).

Tableau 11 : Caractéristiques du Potentiel de production de biofilm (TCP) des entérobactéries responsables de colibacilloses chez les volailles

Les échantillons (ID)	Espèce	Moyenne 24h	Interprétation	Moyenne 48h	Interprétation
T (-)	-	0.1	-	0.1	-
A1	*E. coli*	0.12	WBF	0.23	MBF
A2	*E. coli*	0.12	WBF	-	SBF
A3	*E. coli*	0.13	WBF	0.15	WBF
A4	*E. coli*	0.12	WBF	0.29	MBF
A5	*E. coli*	0.12	WBF	0.26	MBF
A6	*E. coli*	0.12	WBF	0.19	WBF
A7	*E. coli*	0.13	WBF	0.22	MBF
A8	*E. coli*	0.12	WBF	0.26	MBF
A9	*E. coli*	0.48	SBF	0.95	SBF
A10	*E. coli*	0.20	MBF	0.15	WBF
A11	*E. coli*	0.12	WBF	0.18	WBF
A12	*E. coli*	0.12	WBF	0.24	MBF
A14	*E. coli*	0.11	WBF	0.13	WBF
A15	*E. coli*	0.16	WBF	0.24	MBF
A16	*E. coli*	0.13	WBF	0.19	WBF
A18	*E. coli*	0.12	WBF	0.24	MBF
A19	*E. coli*	0.13	WBF	0.46	MBF
A20	*E. coli*	0.12	WBF	0.19	WBF
A21	*E. coli*	0.12	WBF	0.20	MBF
A22	*E. coli*	0.12	WBF	0.20	MBF
A23	*E. coli*	0.13	WBF	0.25	MBF
A24	*E. coli*	0.12	WBF	0.26	MBF
A25	*E. coli*	0.14	WBF	0.37	MBF

Tableau 12 : Caractéristiques du Potentiel de production de biofilm (TCP) des entérobactéries responsables de mammites cliniques chez les bovins.

Les échantillons (ID)	Espèce	Moyenne 24h	Interprétation	Moyenne 48h	Interprétation
T (-)	-	0.1	-	0.1	-
M01	*E. coli*	0.06	NBF	0.12	WBF
M02	*E. coli*	1.04	SBF	2.05	SBF
M09	*E. cloacae*	0.03	NBF	0.09	NBF
M10	*E. coli*	0.01	NBF	0.09	NBF
M11	*K. pneumoniae*	1.23	SBF	2.00	SBF
M12	*K. pneumoniae*	1.29	SBF	0.13	WBF
M15	*E. coli*	0.02	NBF	0.08	NBF
M18	*K. pneumoniae*	1.29	SBF	1.81	SBF
M20	*E. cloacae*	0.01	NBF	0.59	SBF
M27	*R. orntholytica*	0.06	NBF	0.08	NBF
M28	*R. orntholytica*	0.06	NBF	0.07	NBF
M31	*R. orntholytica*	0.05	NBF	0.09	NBF
M34	*E. coli*	0.04	NBF	0.08	NBF
M37	*E. coli*	0.08	NBF	0.08	NBF
M38	*E. coli*	0.04	NBF	0.15	WBF
M46	*E. coli*	0.01	NBF	0.14	WBF
M48	*E. coli*	0.06	NBF	0.17	WBF
M52	*E. coli*	0.09	NBF	0.05	NBF
M55	*E. coli*	0.01	NBF	0.06	NBF
M62	*E. coli*	0.05	NBF	0.06	NBF
M69	*E. coli*	1.50	SBF	1.59	SBF
M70	*E. coli*	0.06	NBF	0.08	NBF
M73	*S. macescens*	0.22	WBF	0.34	MBF
M74	*S. macescens*	0.02	NBF	0.08	NBF
M77	*E. coli*	0.05	NBF	0.09	NBF

Le Tableau 11 présente les caractéristiques du potentiel de production de biofilm (TCP) des entérobactéries responsables de colibacilloses, évaluées à la fois après 24 heures et 48 heures d'incubation. Les échantillons ont été identifiés par leur ID et appartiennent tous à l'espèce E. coli.

En analysant les résultats, nous pouvons observer que la moyenne du potentiel de biofilm après 24 heures d'incubation varie de 0.1 à 0.48. L'interprétation des résultats montre que la plupart des échantillons présentent une formation de biofilm faible (WBF) à ce stade.

Après 48 heures d'incubation, la moyenne du potentiel de biofilm varie de 0.1 à 0.95. L'interprétation des résultats révèle une augmentation de la formation de biofilm, avec une combinaison de formations de biofilm faibles (WBF), modérées (MBF) et fortes (SBF).

Comparant les moyennes de biofilm entre 24 heures et 48 heures, nous constatons une tendance générale à une augmentation du potentiel de biofilm avec une durée d'incubation plus longue. Cependant, certains échantillons montrent des variations intéressantes, passant de formations de biofilm faibles à modérées ou fortes, et vice versa.

Ces observations soulignent l'importance de la durée d'incubation dans la formation du biofilm chez les entérobactéries responsables de colibacilloses. Une prolongation de la durée d'incubation peut favoriser une plus grande formation de biofilm dans certains échantillons, ce qui peut avoir des implications importantes pour la virulence et la résistance des souches bactériennes.

Le tableau 12 présente les caractéristiques du Potentiel de production de biofilm (TCP) des entérobactéries responsables de mammites cliniques, avec des mesures de moyenne à 24 heures et à 48 heures :

Pour l'espèce E. coli, la moyenne à 24 heures montre principalement une interprétation de "NBF" (Pas de biofilm formé), avec quelques cas interprétés comme "WBF" (Faible formation de biofilm). À 48 heures, la moyenne présente une interprétation majoritaire de "WBF" (Faible formation de biofilm), mais il y a également des cas interprétés comme "MBF" (Formation de biofilm modérée) et "SBF" (Formation de biofilm forte). Cela suggère une augmentation du potentiel de formation de biofilm d'E. coli entre 24 heures et 48 heures.

Pour l'espèce E. cloacae et R. orntholytica la moyenne à 24 heures indique principalement une interprétation de "NBF" (Pas de biofilm formé). À 48 heures, la moyenne montre également une interprétation de "NBF" (Pas de biofilm formé). Ces résultats suggèrent que E. cloacae et R. orntholytica présente un potentiel limité de formation de biofilm, qui ne semble pas évoluer et reste stable significativement entre 24 heures et 48 heures.

Pour l'espèce K. pneumoniae, la moyenne à 24 heures présente une interprétation majoritaire de "SBF" (Formation de biofilm forte). À 48 heures, la moyenne continue d'afficher principalement une interprétation de "SBF" (Formation de biofilm forte), bien qu'il y ait un cas interprété comme "WBF" (Faible formation de biofilm). Ces résultats indiquent que K. pneumoniae présente un potentiel élevé de formation de biofilm qui persiste entre 24 heures et 48 heures.

Pour l'espèce S. macescens, la moyenne à 24 heures est interprétée comme "WBF" (Faible formation de biofilm), tandis qu'à 48 heures, la moyenne affiche une interprétation de "MBF" (Formation de biofilm modérée). Cela suggère une augmentation du potentiel de formation de biofilm de S. macescens entre 24 heures et 48 heures.

En résumé, les résultats des tableaux 3 et 4 montrent que E. coli présente un potentiel de formation de biofilm variable, avec une augmentation entre 24 heures et 48 heures. K. pneumoniae présente un potentiel élevé de formation de biofilm, tandis que E. cloacae, R. orntholytica et S. macescens ont généralement un potentiel limité de formation de biofilm.

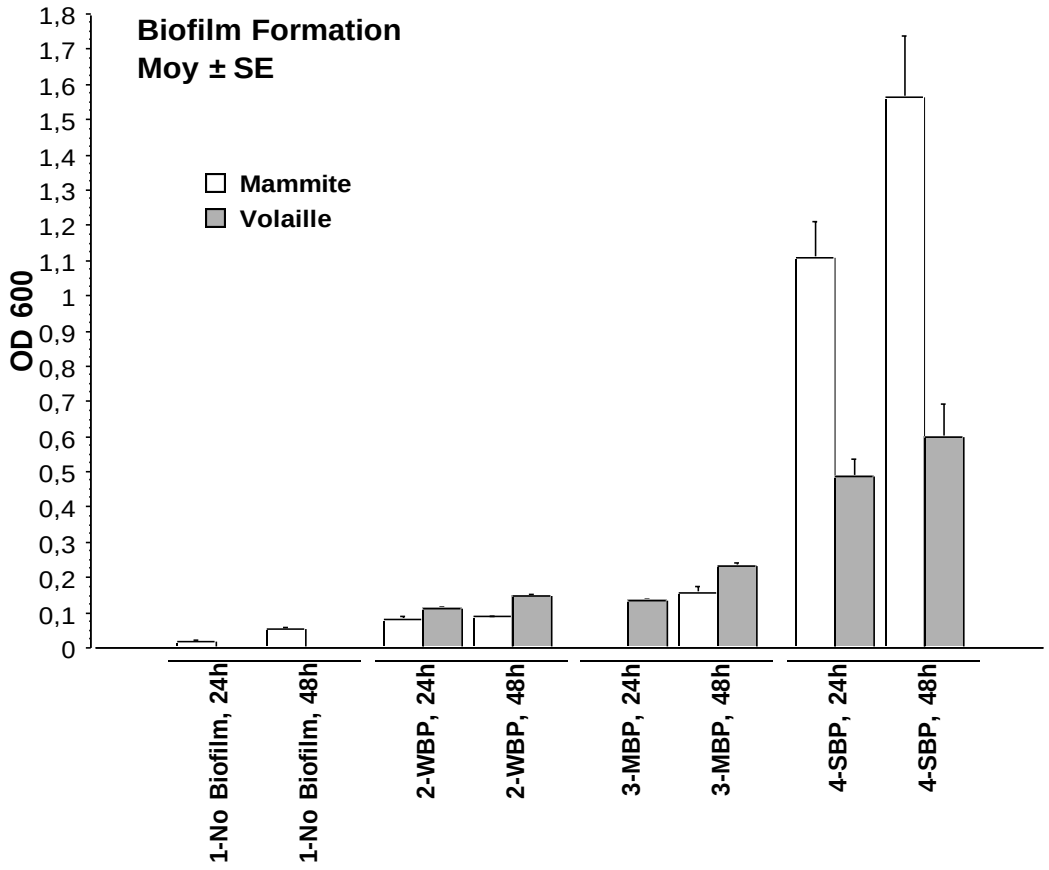


Figure 22 : profile de potentiel de formation de biofilm chez les entérobactéries responsables de mammites cliniques chez les bovins et colibacilloses chez les volailles.

La figure présente les profils de potentiel de formation de biofilm chez les entérobactéries responsables de mammites cliniques chez les bovins et de colibacilloses chez les volailles à 24 heures puis à 48 heures.

Nos résultats démontrent que les isolats responsables de mammites cliniques présentent un potentiel de formation de biofilm nettement supérieur à celui des isolats responsables de colibacillose (SBF). Au contraire dans le cas de (WBF) et (MBF) les différences entre les deux types d'isolats sont moins marquées.

Ces observations indiquent que les entérobactéries responsables de mammites cliniques chez les bovins ont une plus grande capacité à former un biofilm par rapport aux entérobactéries responsables de colibacillose chez les volailles. Cela suggère une adaptation spécifique de ces isolats aux conditions environnementales des mammites bovines, favorisant ainsi leur survie et leur persistance.

IV.4. Détermination de la susceptibilité au désinfectants (CMI/CMB) :

Parmi les 48 souches étudiées, nous avons soigneusement sélectionné huit isolats présentant une forte capacité de formation de biofilm, dont six isolats d'*E. coli* et deux isolats de *Klebsiella pneumonia*e, pour évaluer la sensibilité de ces isolats à trois agents désinfectants, à savoir l'acide peracétique, la chlorhexidine et le quaternaire d'ammonium. Pour cela, nous avons utilisé la méthode de la concentration minimale inhibitrice (CMI) sur des plaques de micro-titration, en suivant les recommandations standard de l'EUCAST de 2022. Sert a connu la plus faible concentration de chaque désinfectant capable d'inhiber la croissance des isolats de manière significative.

Tableau 13 : La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des différents désinfectants.

	Désinfectants					
	Acide-peracétique		Chlorhexidine		Ammonium quaternaire	
Isolâtes	**MIC Intervalle**	**MIC 90**	**MIC Intervalle**	**MIC 90**	**MIC Intervalle**	**MIC 90**
Totale (n=8)	0.207-0.773	0.773	0.208-0.364	0.364	3.505-3.689	3.689
E. coli volaille (n=4)	0.207-0.773	0.773	0.208-0.307	0.307	/	/
K. pneumoniae (n=2)	0.315-0.573	0.573	0.242-0.320	0.320	3.505-3.689	3.689
E. coli bovine (n=2)	0.229-0.457	0.457	0.287-0.364	0.364	3.445-3.618	3.618

MIC= Minimum inhibitory concentration ; MIC90= MIC qui inhibe 90% des isolats.

- **Interprétation :**

Le tableau présenté résume les résultats des tests d'efficacité des désinfectants sur différents isolats bactériens. Il contient les valeurs de la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour chaque désinfectant et isolat bactérien, ainsi que les intervalles de CMI et les valeurs de CMI 90. Les valeurs de CMI indiquent la plus faible concentration de désinfectant requise pour inhiber la croissance bactérienne. Les intervalles de CMI fournissent une plage de valeurs dans laquelle se situe la CMI, tandis que la CMI 90 représente la concentration à laquelle 90 % des isolats sont inhibés. En analysant les données du tableau, on peut observer que l'acide peracétique et la

Chlorhexidine ont montré des profils d'activité similaires contre la plupart des isolats, avec des valeurs de CMI se situant dans des plages comparables. Cependant, l'acide peracétique a montré une activité inhibitrice légèrement plus élevée que la chlorhexidine, comme en témoignent les valeurs de CMI 90. Les résultats pour l'ammonium quaternaire étaient disponibles pour tous les isolats, à l'exception de l'isolat d'E. coli aviaire qui a été complètement inhibé par l'ammonium quaternaire. Les valeurs de CMI pour l'ammonium quaternaire étaient plus élevées que celles des autres désinfectants, indiquant une concentration plus élevée nécessaire pour inhiber la croissance bactérienne.

Tableau 14 : La Concentration Minimale bactéricide (CMB) des différents désinfectants.

	Désinfectants					
	Acide-peracétique		Chlorhexidine		Ammonium quaternaire	
Isolâtes	**MBC Intervalle**	**MBC 90**	**MBC Intervalle**	**MBC 90**	**MBC Intervalle**	**MBC 90**
Totale (n=8)	0.176-0.702	0.702	0.192-1.183	1.183	3.579-4.00	4.00
E. coli volaille (n=4)	0.176-0.773	0.773	0.192-1.183	1.183	/	/
K. pneumoniae (n=2)	0.45-0.575	0.575	0 .570-1.117	1.117	3.579-4.00	4.00
E. coli bovine (n=2)	0.229-0.702	0.702	O.290-1.08	1.08	3.654-3.657	3.657

MBC= Minimum bactericid concentration ; MBC90= MBC qui inhibe 90% des isolats.

- **Interprétation :**

L'analyse des données révèle des variations significatives dans la concentration minimale bactéricide (MBC) nécessaire pour inhiber la croissance des bactéries. L'acide peracétique et la chlorhexidine ont montré des profils d'activité similaires, avec des valeurs MBC se situant dans des plages comparables pour la plupart des isolats. Cependant, l'acide peracétique a démontré une activité bactéricide légèrement supérieure, avec des valeurs MBC 90 plus élevées par rapport à la chlorhexidine. En revanche, l'ammonium quaternaire a nécessité des concentrations plus élevées pour obtenir une activité bactéricide efficace. Cette différence d'efficacité peut être liée aux

mécanismes d'action spécifiques de chaque désinfectant et aux caractéristiques propres des isolats bactériens.

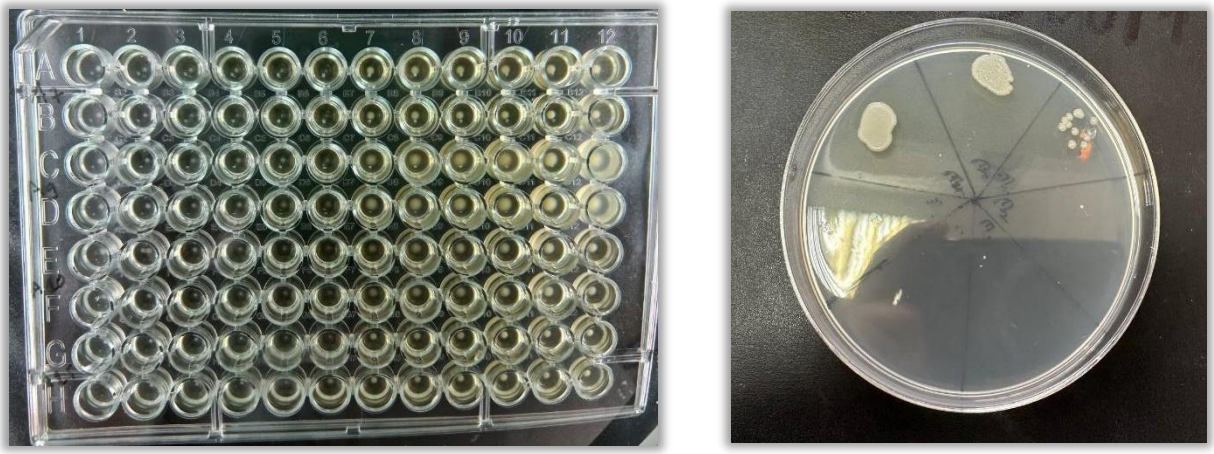


Figure 23 : les résultats de MIC (96-puits) et MBC paracide peracétique (souches volailles).

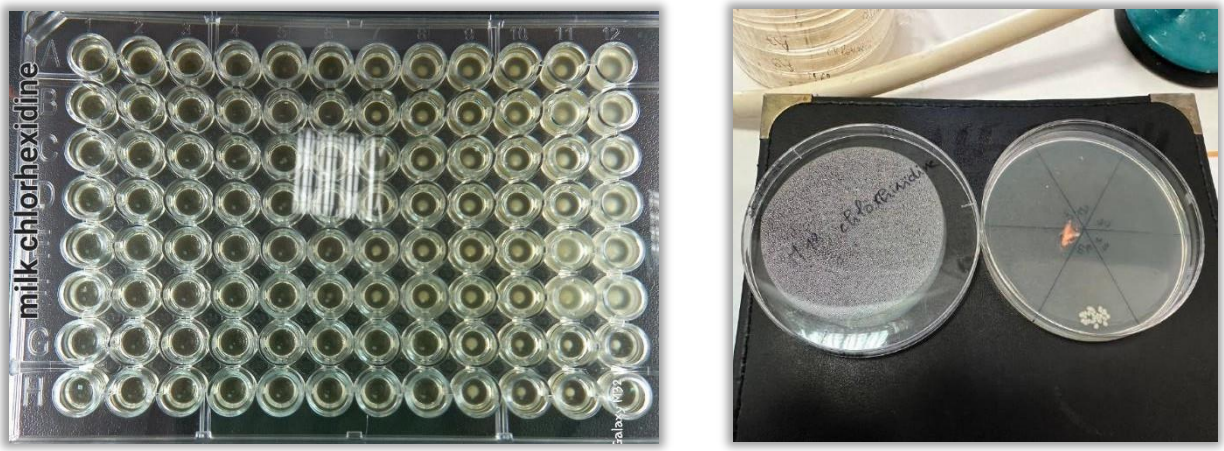


Figure 24 : les résultats exemplaires de MIC (96-puits) etMBC par chlorhexidine (souches lait).

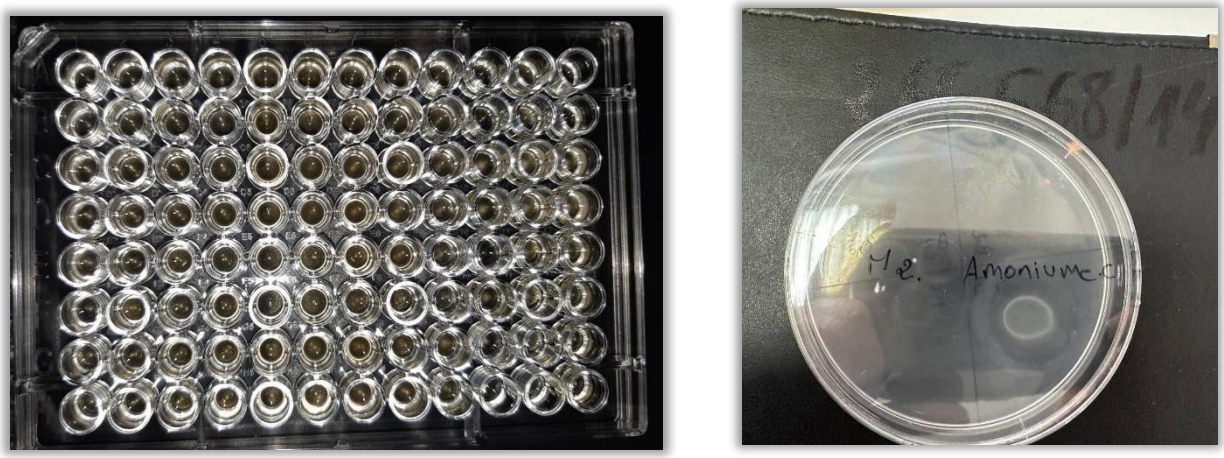


Figure 25 : les résultats exemplaires de MIC (96-puits) etMBC par Ammonium quaternaire (souches lait).

IV.5. Susceptibilité aux désinfectants et potentiel de production de biofilm /espèces :

La figure 26 présente la susceptibilité des différents isolats d'entérobactéries responsable de colibacilloses choisis, les concentrations de différents désinfectant et les valeurs de densité optique à 600 nm (DO_600nm) ainsi que les contrôles positif et négatif, en termes de leur potentiel de production de biofilm.

Pour l'ammonium quaternaire et d'après les résultats présentés, en comparaison, les cultures en puits avec des concentrations non inhibitrices (faibles concentrations de désinfectant) de 0,005 %, 0,01 % et 0,02 % ont montré des valeurs de densité optique (DO) légèrement supérieures à celle du contrôle positif. Cela suggère que les concentrations faibles sont les meilleures concentrations car elles ont la capacité d'inhiber la croissance bactérienne et de réduire le potentiel de production de biofilm après 48 heures d'incubation.
Cependant, à partir de la concentration 0,04 % jusqu'à 5 %, les valeurs de DO ont dépassé celle du contrôle positif, indiquant une formation de biofilm sous l'effet du stress induit par les désinfectants.

Les résultats d'acide peracétique démontrent que les dilutions de 0,0001% et 0,0002% ont montré une réduction du potentiel de production de biofilm, tandis que les dilutions de 0,0008% à 0,0031% ont montré une augmentation du potentiel de production de biofilm. Les autres dilutions ont montré des effets similaires au contrôle positif. Ces résultats suggèrent que l'efficacité du désinfectant acide peracétique peut varier en fonction de sa concentration, avec des concentrations trop faibles ou trop élevées ayant un impact sur la formation de biofilm par les bactéries

Les dilutions de chlorhexidine de 0,05%, 0,1% et 0,2% montrent une forte turbidité, ce qui indique une augmentation du potentiel de production de biofilm. Cela suggère que les isolats d'E. coli étudiés ont une capacité accrue à former un biofilm en présence de concentrations plus élevées de chlorhexidine. En revanche, les dilutions de chlorhexidine allant de 0,0008 à 0,025 ont une turbidité plus faible que celle du contrôle positif. Cette observation suggère que ces dilutions ont un potentiel réduit de production de biofilm par rapport au contrôle positif. En résumé, les résultats indiquent que des concentrations plus élevées de chlorhexidine favorisent la formation de biofilm chez les isolats d'E. coli étudiés,

L'ammonium quaternaire, l'acide peracétique et la chlorhexidine. Ces tests évaluent le potentiel de production de biofilm en fonction des concentrations de chaque désinfectant. Les résultats ont révélé des effets distincts des trois désinfectants sur la formation de biofilm. Les

concentrations faibles d'ammonium quaternaire ont été les plus efficaces pour inhiber la croissance bactérienne et réduire le potentiel de biofilm, tandis que des concentrations élevées de cet agent ont favorisé la formation de biofilm. Ce comportement pourrait être dû à la capacité des bactéries productrices de biofilm et d'en fabriquer une matrice extracellulaire pour y s'est adhérer. Pour l'acide peracétique, les dilutions extrêmement faibles et élevées ont augmenté le potentiel de biofilm, tandis que des concentrations intermédiaires ont montré une réduction. Quant à la chlorhexidine, des concentrations plus élevées ont favorisé la formation de biofilm, tandis que des dilutions plus faibles ont entraîné une réduction du potentiel de biofilm.

La figure 27 présente la susceptibilité des différents isolats d'entérobactéries responsable de mammites clinique choisis, les concentrations de différents désinfectant et les valeurs de densité optique à 600 nm (DO_600nm) ainsi que les contrôles positif et négatif, en termes de leur potentiel de production de biofilm.

Les résultats suggèrent que les concentrations de désinfectant ammonium quaternaire de 0.005% et 0.01% sont efficaces pour inhiber la croissance bactérienne et réduire le potentiel de formation de biofilm, tandis que des concentrations plus élevées peuvent favoriser la croissance bactérienne avec le temps.

L'acide peracétiques démontrent que les concentrations de désinfectant à faible dose (0.0001% et 0.0002%) montrent des valeurs de DO similaires à celles du contrôle positif. Cependant, à mesure que la concentration de désinfectant augmente, les valeurs de DO diminuent progressivement, suggérant une réduction du potentiel de production de biofilm. Les concentrations plus élevées montrent une diminution plus marquée des valeurs de DO, indiquant une inhibition plus prononcée de la formation de biofilm. Ces résultats confirment l'efficacité du désinfectant contre les souches responsables de mammites cliniques.

La dilution de chlorhexidine de 0,1 présente une légère augmentation de la turbidité par rapport au contrôle positif, ce qui suggère une forte formation de biofilm. Cependant, les concentrations plus faibles de désinfectants montrent une réduction de la formation de biofilm. En d'autres termes, cela signifie que la dilution de 0,1 favorise la croissance du biofilm, tandis que des concentrations plus faibles de désinfectants sont efficaces pour réduire la formation de biofilm.

Les isolats d'E. coli et k pneumoniae provenant de bovins respectivement terme du potentiel de production de biofilm. Les résultats indiquent que les concentrations de 0,005 % et 0,01 %

D’ammonium quaternaire sont efficaces pour inhiber la croissance bactérienne et réduire le potentiel de formation de biofilm. Pour l’acide peracétique les résultats montrent que des

Concentrations de désinfectant à faible dose, telles que 0,0001 % et 0,0002 %, conduisent à des valeurs de densité optique (DO) similaires à celles du contrôle positif. Les valeurs de DO diminuent progressivement, ce qui suggère une réduction du potentiel de formation de biofilm. Les concentrations plus élevées montrent une diminution plus marquée des valeurs de DO, indiquant une inhibition plus forte de la formation de biofilm. Indiquant une inhibition plus prononcée de la formation de biofilm. Ces résultats confirment l'efficacité du désinfectant contre les souches responsables de mammites cliniques. Quant à la chlorhexidine, bien qu'une dilution de 0,1 favorise la croissance du biofilm, des concentrations plus faibles de désinfectant se révèlent efficaces pour réduire sa formation. En conclusion, les désinfectants ammonium quaternaire et acide peracétique semblent plus performants que la chlorhexidine dans la prévention de la formation de biofilm.

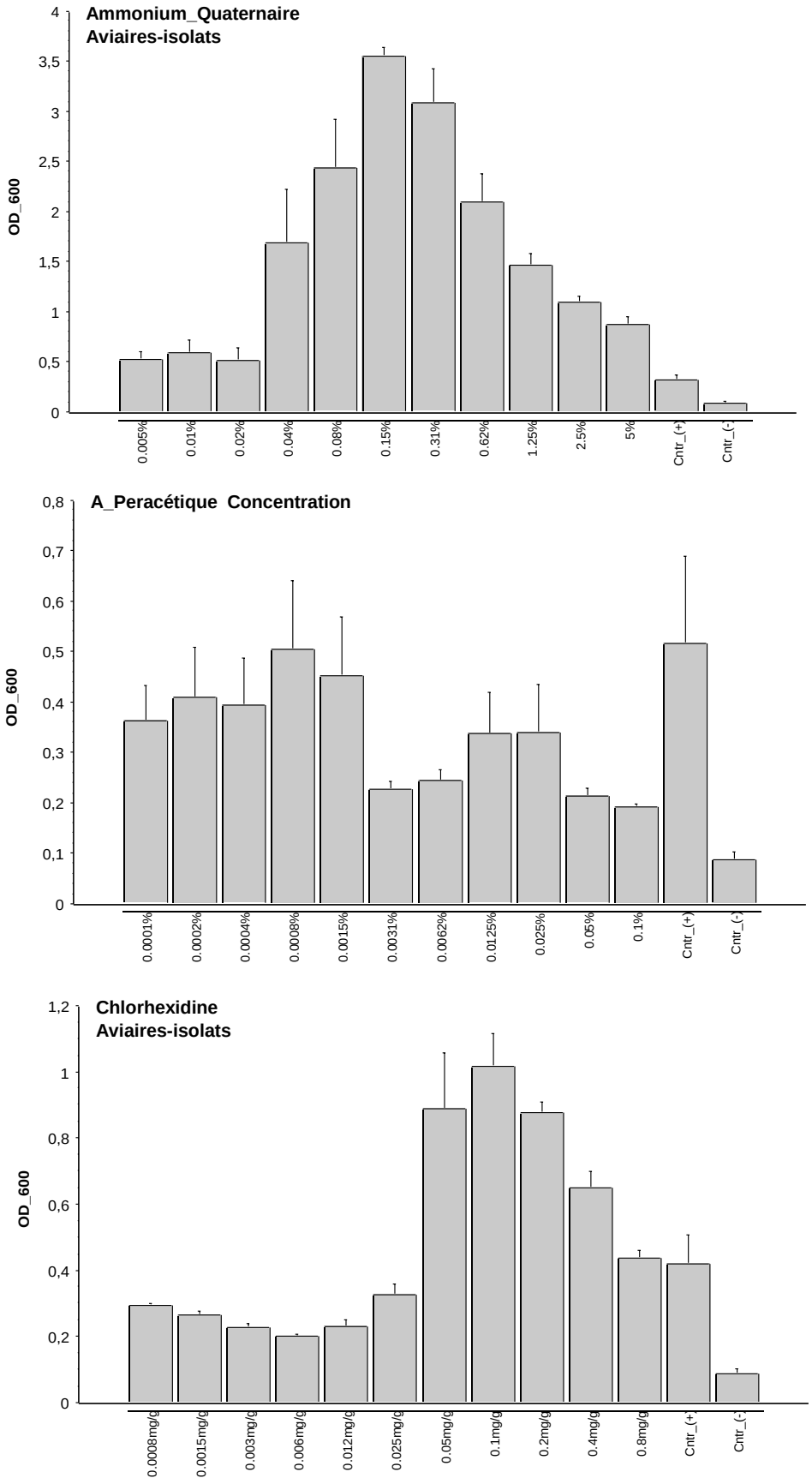


Figure 26 : La susceptibilité aux désinfectants (A.Q - CHX - AP) sur les isolats des volailles en terme du potentiel de production de biofilm.

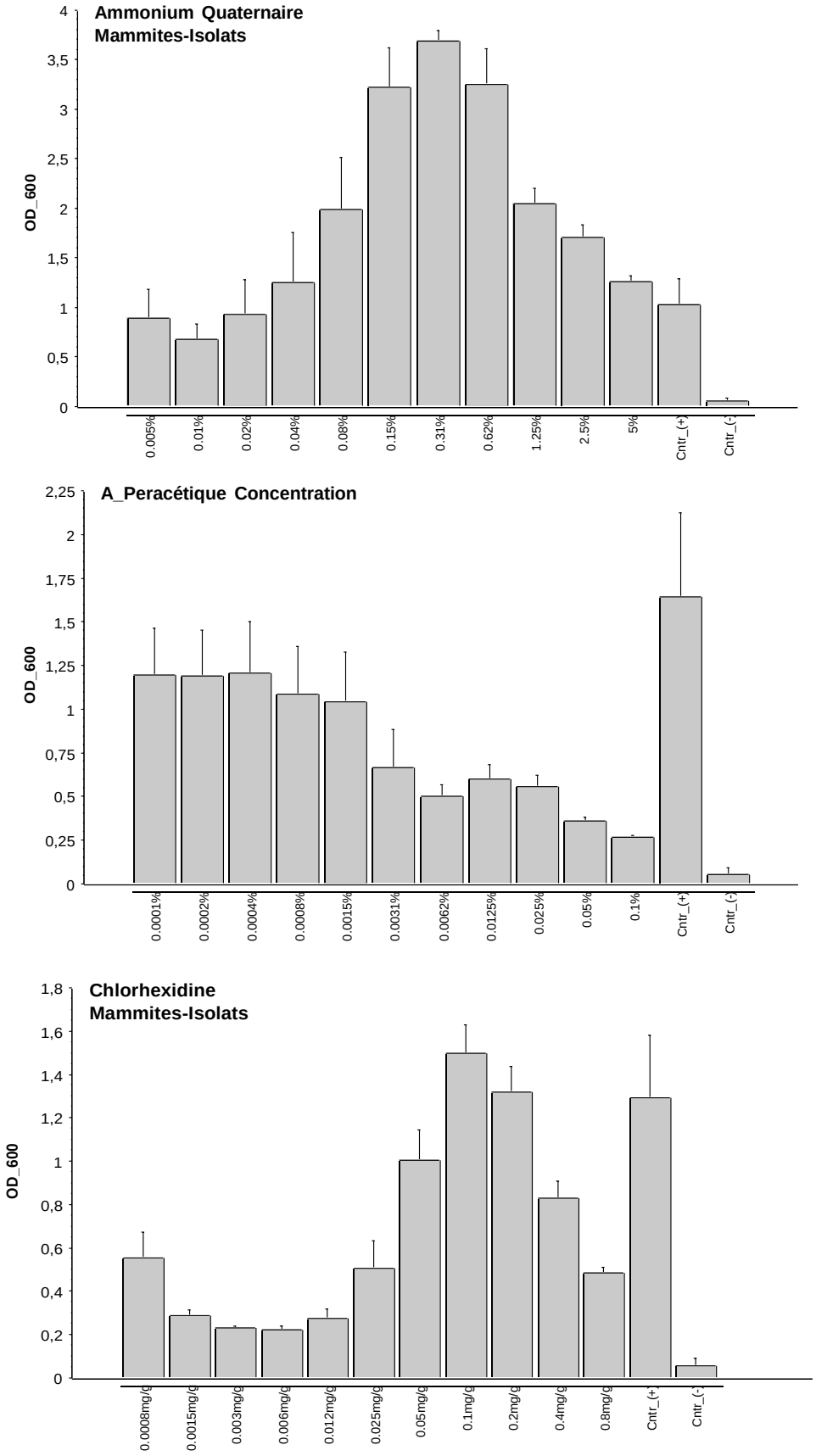


Figure 27 : La susceptibilité aux désinfectants (A.Q - CHX - AP) sur les isolats des mammites en terme du potentiel de production de biofilm.

IV.6. Résultats aux études de la sensibilité de l'antibiogramme :

Les résultats des antibiogrammes effectués sur les différents isolats d'entérobactéries (celles du aviaires et du bovines) qui ont choisis en termes de leurs potentiels de production de biofilm., Après avoir mesuré les diamètres des zones d'inhibition et comparé-les aux diamètres critique (annexe), on trouve l'action des bactéries aux antibiotiques divisé en trois catégories résistance, intermédiaire ou sensible.

Tableau 15 : Interprétation des zones d'inhibition des différents antibiotiques sur les souches Volailles (E.coli).

Les antibiotiques testés	Interprétation						
	A3	**A5**	**A7**	**A9**	**A10**	**A21**	**A25**
Gentamicine (CN 30)	S	S	S	S	S	S	S
Enrofloxacine (CIP)	I	I	S	S	I	S	S
L'Ampicilline (AM-10)	R	R	R	R	R	R	R
Amoxicilline (AML)	R	R	R	R	R	R	R
Céfalotine (KF-30)	R	R	R	R	R	R	R
Colistine (CT10)	S	S	S	S	R	S	S
Chloramphénicol (C30)	S	R	S	S	R	R	S
Tétracycline (TE)	R	R	R	R	R	R	R
Kanamycine (K-30)	R	I	S	R	R	R	S
Triméthoprime + Sulfamethoxazole (SXT)	S	S	R	R	R	S	R
Acide nalidixique (NA)	R	R	R	R	R	R	R

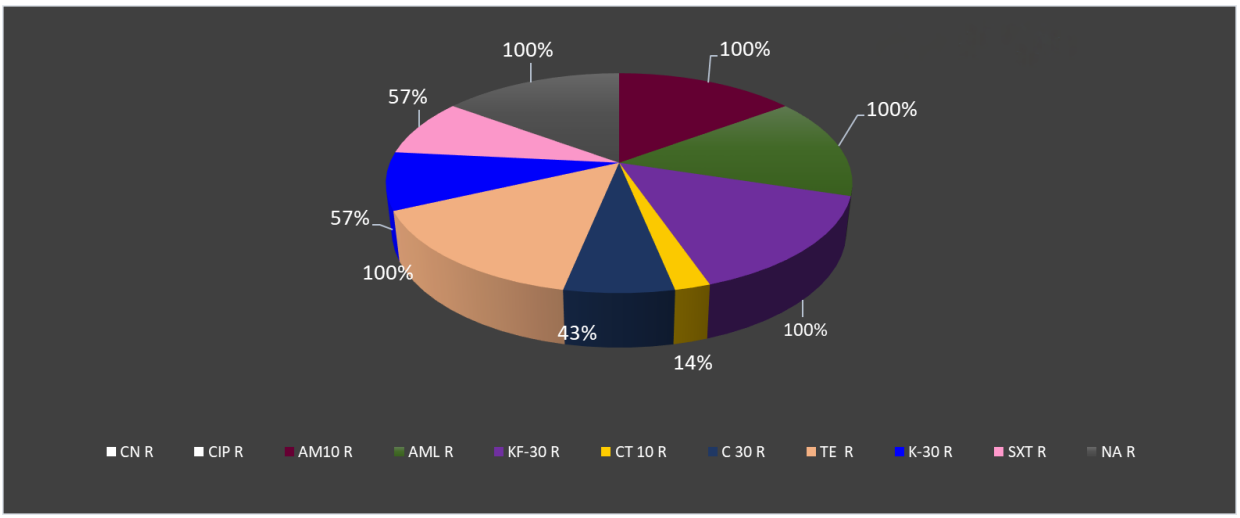


Figure 28 : Circle représente le pourcentage de résistance des souches volailles (e.coli).

IV.6.1. Profil de résistance des souches *d'Escherichia coli* isolées des volailles :

Le profil de résistance d'Escherichia coli aux antibiotiques, comme indiqué sur la figure, a montré une résistance importante à l'Amoxicilline (AML), Ampicilline (AM10), Céfalotine (KF 30), Tétracycline (TE) et Acide nalidixique avec un pourcentage de 100% et Triméthoprime + sulfamethoxazole (SXT) avec un taux de 57% par contre on note une résistance très faible pour la gentamicine (CN 30), colistine (CT 10) et l'Enrofloxacine (CIP).

Tableau 16 : Interprétation des zones d'inhibition des différents antibiotiques sur les souches lait (E.coli).

Les antibiotiques testés	Interprétation					
	M2	**M38**	**M62**	**M69**	**M70**	**M77**
Gentamicine (CN 30)	I	S	I	I	S	S
Enrofloxacine (CIP)	S	S	S	S	S	S
L'Ampicilline (AM-10)	I	R	R	S	S	R
Amoxicilline (AML)	S	R	R	S	S	I
Céfalotine (KF-30)	I	R	R	R	I	R
Colistine (CT10)	S	R	R	S	S	R

Chloramphénicol (C30)	S	R	S	S	S	S
Tétracycline (TE)	R	R	R	R	I	R
Kanamycine (K-30)	S	R	S	I	R	R
Triméthoprime + Sulfamethoxazole (SXT)	S	S	S	S	S	S
Acide nalidixique (NA)	S	S	S	S	S	S

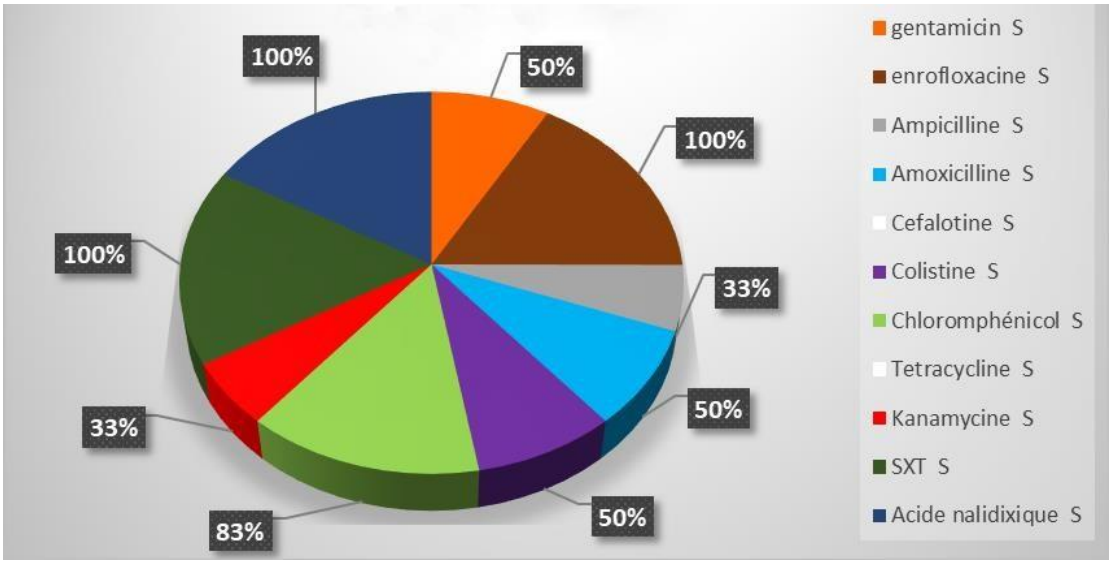


Figure 29 : Circle représente le pourcentage de sensibilité des souches lait (e.coli).

IV.6.2. Profil de sensibilité des souches *d'Escherichia coli* isolées des bovines :

La figure ci-dessous montre une sensibilité presque totale à l'acide nalidixique (Na), Enrofloxacine (CIP), Triméthoprime+ sulfamethoxazole (SXT) et la chloramphénicol (C30), en revanche On note une résistance élevée vis-à-vis de le Céfalotine (KF-30) et la tétracycline (TE).

Tableau 17 : Interprétation des zones d'inhibition des différents antibiotiques sur les souches lait (K. Pneumonie).

Les antibiotiques testés	Interprétation	
	M11	**M18**
Gentamicine (CN 30)	R	S
Enrofloxacine (CIP)	S	S
L'Ampicilline (AM-10)	S	R
Amoxicilline (AML)	S	R
Céfalotine (KF-30)	S	S
Colistine (CT10)	S	S
Chloramphénicol (C30)	S	S
Tétracycline (TE)	I	S
Kanamycine (K-30)	S	S
Triméthoprime + Sulfamethoxazole (SXT)	S	S
Acide nalidixique (NA)	S	S

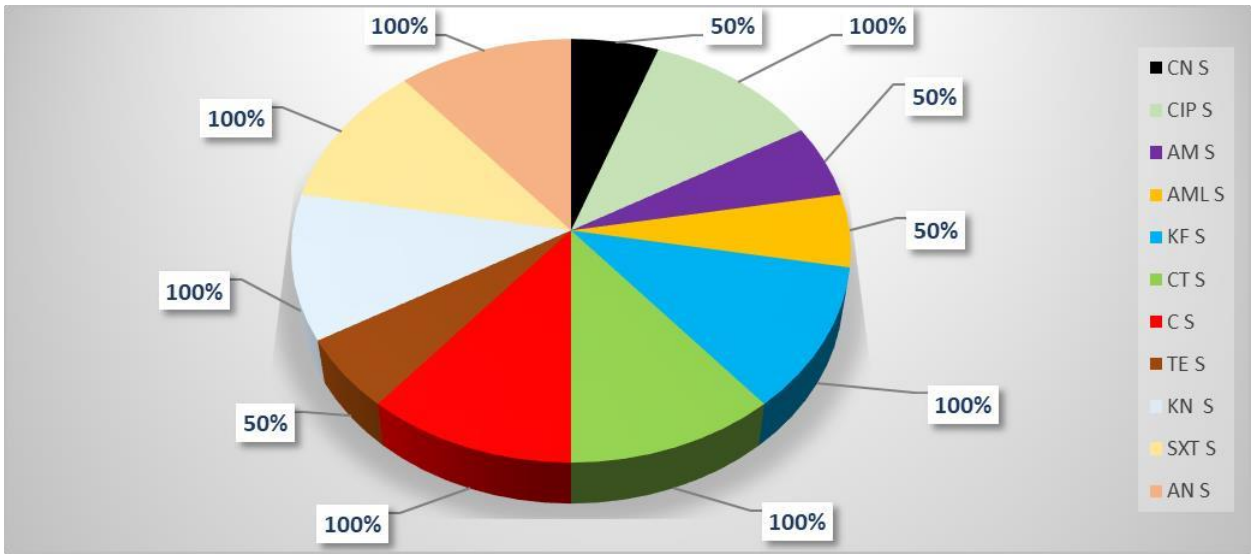


Figure 30 : Circle représente le pourcentage de sensibilité des souches lait (k. pneumonie).

IV.6.3. Profil de sensibilité des souches *Klebsiella pneumoniae* isolées des bovines :

La figure (30) montre que *Klebsiella pneumoniae* est totalement sensible vis-à-vis NA, SXT, KN, C30, CT10, KF-30, CIP et présente une sensibilité avec des taux de 50%, aux CN30, AM10, AML, TE.

Lorsque l'on compare les résultats de sensibilité aux différents antibiotiques entre les deux espèces, E. coli et Klebsiella pneumoniae pour les isolats des mammites , on constate que le même profil de résistance est observé pour les antibiotiques suivants : l'acide nalidixique (NA) , Enrofloxacine (CIP) , Triméthoprime+ sulfamethoxazole (SXT) et chloramphénicol (C30) en revanche les espèces E. coli des souches des volailles présentent une résistance importante à l'acide nalidixique et Triméthoprime+ sulfamethoxazole (SXT)

Concernant l'état actuel de résistance des Entérobactéries d'origine animale aux antibiotiques peut être justifié par l'utilisation abusive de ces molécules a entrainé l'émergence de résistances à ces antibiotiques, notamment chez Klebsiella pneumoniae (Chevet et al., 2012)

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

Les aminosides, notamment la gentamycine, demeurent parmi les antibiotiques les plus actifs sur toutes les Entérobactéries

La hausse de la résistance à l'amoxicilline a été notée à l'échelle mondiale amenant à l'élimination de cette molécule de la liste des traitements probabilistes recommandés dans l'IU (AFSSPS, 2008).

L'utilisation des fluoroquinolones et la durée du traitement par cette classe d'antibiotique semblent être les facteurs de risque les plus importants d'émergence de résistance aux fluoroquinolones et de résistance croisée.

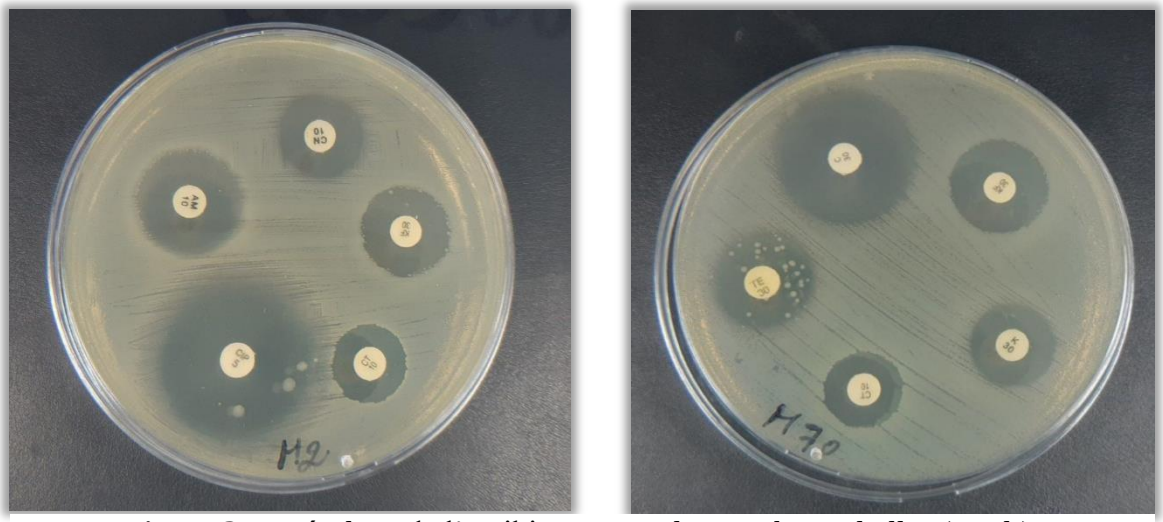


Figure 31 : Résultats de l'antibiogramme des souches volailles (e.coli).

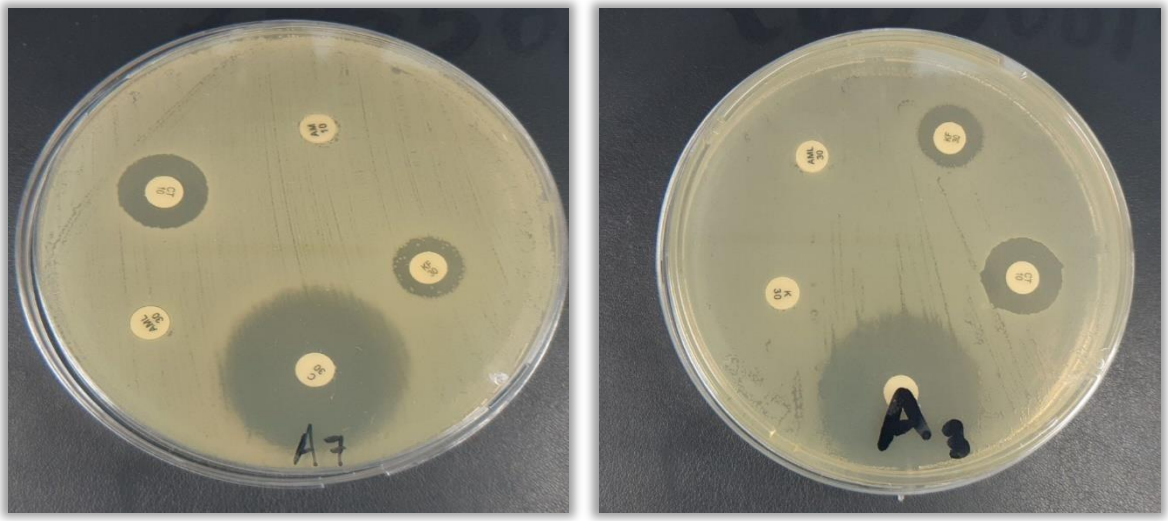


Figure 32 : Résultats de l'antibiogramme des souches lait (e.coli).

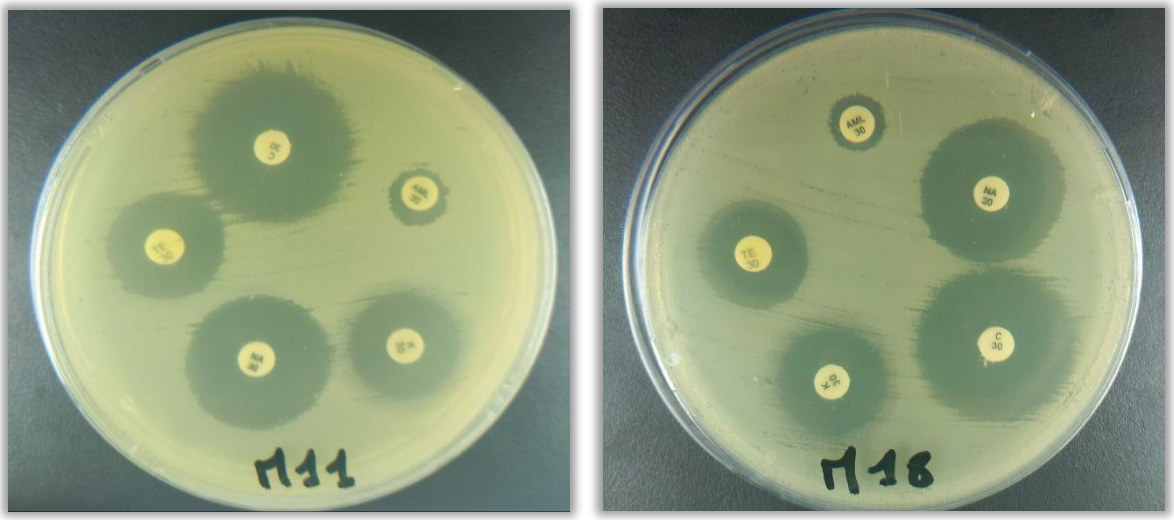


Figure 33 : Résultats de l'antibiogramme des souches lait (k. pneumonie).

IV.6.4. Recherche de la production des β-lactamases à spectre étendu (BLSE) chez les entérobactéries :

IV.6.4.1. Test de synergie :

Dans notre étude, on a réalisé des tests phénotypiques pour la recherche des BLSE (test de synergie et doubles disques) chez 15 souches, Le test de synergie a révélé la présence d'une image de synergie (bouchon de champagne ou entonnoir) entre un disque d'amoxicilline + l'acide clavulanique (AMC) et les disques de la céphalosporine de troisième génération Céfotaxime (CTX). Cela indique la présence de bêta lactamase à spectre élargi (BLSE) produite par les souches étudiées.

Ce travail a montré un taux de 73,33% d'apparition de l'image de synergie ou du bouchon de champagne entre les disques d'antibiotiques parmi les 15 isolats sélectionnés. Ce pourcentage est nettement supérieur à celui rapporté par Belmahdi et *al*, en 2016 dans les élevages de poulets de chair de la région de Bejaïa (32,78%). Cette différence notable peut s'expliquer par l'utilisation de méthodes d'isolement différentes pour les souches d'E. coli. En effet, Belmahdi et *al*, ont utilisé une méthode d'isolement sélective en ajoutant des céphalosporines de 3e génération (C3G) au milieu d'enrichissement, ce qui augmente les chances d'isoler un pourcentage assez élevé de souches productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE)

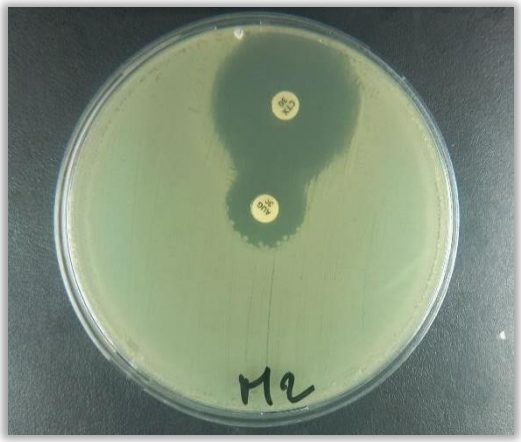
33.33% représente le taux des souches qui n'a pas montré des profils relevant de la présence des enzymes de β- lactamases à spectre élargi (pas d'apparition d'une image de synergie ou bouchon de champagne entre les disques d'antibiotiques).

Les isolats des mammites cliniques sont 100% productrices de bêta lactamase qui représentent les souches hautement formatrices de biofilm par rapport aux isolats issus de cas de colibacillose.

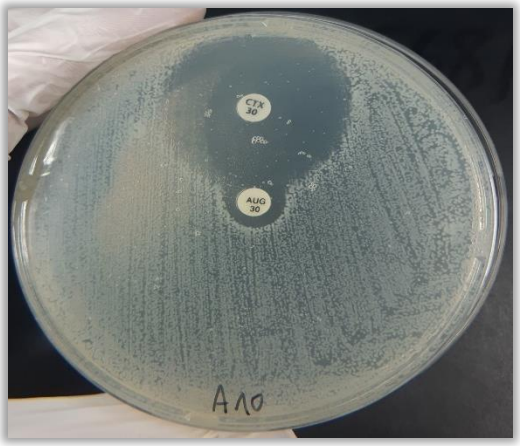
La plupart des souches d'entérobactéries (*E. coli*, *K. pneumoniae*) ont une tendance de résister à diverses classes d'antibiotiques et produire des β-lactamases à spectre élargi Parmi les souches E-BLSE, 73.33% sont des *K. pneumoniae* et *E. coli*. Ce taux plus proche au résultat obtenu (2014) en Turquie (80%) par Seniha et *al* et plus élevée celle enregistrée en l'Amérique latine (24,5%) par Manuel et *al*.



Photos de test de synergie pour recherche de BLSE chez klebsielle pneumonie.



Photos de test de synergie pour recherche de BLSE chez E. coli (lait).



Photos de test de synergie pour recherche de BLSE chez E. coli (volaille).

Figure 34 : Visualisation des résultats des tests de synergie pour la recherche des BLSE : Comprendre les mécanismes d'inactivation des bêtalactamines"

IV.6.5. Relation entre potentiel de production de biofilm et profil de l'antibiorésistance :

Les résultats de l'étude, qui mettent en évidence l'interaction entre le potentiel de formation de biofilm des souches bactériennes et leur profil de résistance aux antibiotiques, sont présentés de manière synthétique dans le Tableau 15.

Tableau 18 : Interaction entre capacité de formation de biofilm et l'antibiorésistance.

Les échantillons (ID)	Espèce	Moyenne 48h	Interprétation	Profil d'antibiorésistance	Multi résistance (MDR)
A3	*E. coli*	0.15	WBF	AM-AML -KF CT-TE -K-NA	Oui
A5	*E. coli*	0.26	MBF	AM-AML-KF-C-TE -NA	Oui
A7	*E. coli*	0.22	MBF	AM-AML-KF-TE -CXT-NA	Oui
A9	*E. coli*	0.95	SBF	AM-AML-KF-TE-K -CXT-NA	Oui
A10	*E. coli*	0.15	WBF	AM-AML-KF-CT-C -TE-K-CXT-NA	Oui
A21	*E. coli*	0.20	MBF	AM-AML-KF-C-TE-K-NA	Oui
A25	*E. coli*	0.37	MBF	AM-AML-KF-TE-CXT-NA	Oui
M18	*K. Pneumonie*	1.81	SBF	AM-AML	Non
M38	*E. coli*	0.15	WBF	AM-AML-KF-CT-C-TE-K	Oui
M62	*E. coli*	0.06	NBF	AM-AML-KF-CT-TE-K	Oui
M69	*E. coli*	1,59	SBF	KF-TE	Non
M77	*E. coli*	0.09	NBF	AM-KF-CT-TE-K	Oui

Parmi les résultats obtenus, il a été observé que 10 souches d'Escherichia coli présentaient un profil de multirésistance (Multi Drug Resistance, MDR). Ces souches étaient résistantes à au moins trois antibiotiques appartenant à des classes différentes. En revanche la souche Klebsiella pneumoniae n'a pas manifesté de profil de multirésistance.

Effectivement, les souches d'E. coli présentent un potentiel de formation de biofilm variable, allant de (NBF) à (SBF). Ces résultats indiquent donc une relation faible entre la résistance aux antibiotiques et la capacité de formation de biofilm. Cela suggère que d'autres facteurs peuvent influencer la formation de biofilm, indépendamment de la résistance aux antibiotiques.

La formation de biofilm est reconnue comme un facteur de virulence qui confère à la bactérie une plus grande agressivité, prolongeant ainsi sa persistance dans l'environnement. Cette persistance accrue entraîne une diminution de l'efficacité de l'antibiothérapie. Les bactéries formant des biofilms sont enrobées dans une matrice extracellulaire protectrice qui entrave la diffusion et la pénétration des molécules d'antibiotiques vers leur cible spécifique (Ito et al., 2009).

IV.7. Evaluation de la qualité et la quantité d'ADN extrait :

Les résultats de l'application du protocole d'extraction d'ADN sur 16 échantillons démontrent la présence d'ADN, confirmée par l'observation d'une électrophorèse sur gel d'agarose à des concentrations de 1,5%, 2% et 2,5%.

IV.8. Technique de PCR :

L'amplification PCR est allée bien à un nécessaire et à une partie intégrante de recherche clinique et diagnostique. Cette technique et ses plusieurs variantes avancées agissent en tant que les puissants outils qui activent une multitude d'applications spécialisées qui ont été par le passé considérées impossibles par le monde scientifique (Uttayamakul et al., 2005).

Dans notre étude, nous avons effectué une PCR classique ciblant les gènes fimH et papC. Le gène papC, associé à l'adhésion du biofilm, était attendu à une taille de 501 pb, tandis que le gène fimH, lié à la formation de fimbriae, était attendu à une taille de 508 pb. Les résultats de notre PCR classique ont confirmé la présence des gènes fimH parmi certaines souches, comme en témoigne l'apparition d'une seule bande fluorescente correspondant à la taille attendue de l'ADN dans le gel d'agarose.

L'ajout de bromure d'éthidium au gel d'agarose a permis de visualiser les fragments d'ADN sur le gel. Le bromure d'éthidium s'intercale entre les paires de bases de l'ADN, ce qui permet,

Lors de l'illumination du gel sous une lumière UV, l'apparition de bandes fluorescentes représentant l'ADN.

Pour valider nos résultats, nous avons utilisé "DNA ladder" (échelle d'ADN) comme un marqueur en électrophorèse pour estimer la taille des fragments d'ADN et deux souches de référence, l'une possédant les gènes fimH et papC recherchés, tandis que nous avons utilisé de l'eau comme témoin négatif.

PCR 15 µl	**ID ® / Charge**	**Concentrat°**	**µl / React°**	**Nombre**	**Program: Biofilm Factors**
Water		-	13	**286**	**508 bp *fim-H* -> Fimbria**
Master Mix	**SolisFAST® Master Mix Ready To Load, 5x**	5X	4	**88**	
Forwarde primer	EurogenTec ® Belgium	12.5 pmol	0.5	**11**	
Reverse primer	EurogenTec ® Belgium	12.5 pmol	0.5	**11**	
				396	
			18		Init. Denatur. 98°C 2 min
Template DNA			2		Denatur 98°C 10s
					Annealing 58°C 30s
					Extension 72°C 30s
					Cycle 30
					Extension 72°C 2min
					Agarose-Gel 2 % 100V 30 min

Résultat :

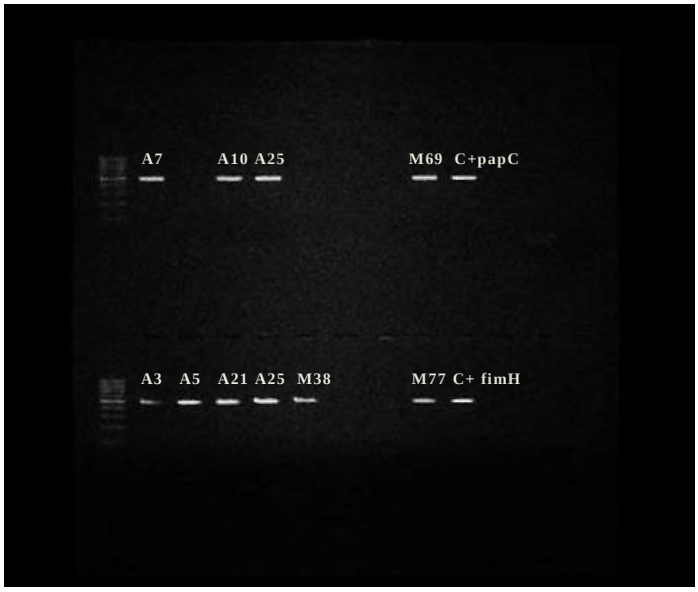


Figure 35 : Profil électrophorétique d'ADN obtenu âpres l'extraction des souches présente dans le **tableau 19**, électrophorèse sur un gel d'agarose à (2%) après coloration au BET suivie d'une visualisation sous U. V

IV.8.1. Discussion :

Les résultats de notre étude montrent la présence des gènes fimH dans les échantillons d'ADN extrait après une PCR. Les amplifications spécifiques du gène fimH ont été réalisées en utilisant des amorces "fimH forwarde / reverse" responsable de cette région génique.

L'électrophorèse sur gel d'agarose a été utilisée pour analyser les produits de PCR. Une "DNA ladder" a été utilisée comme référence de taille des fragments d'ADN. Les échantillons ont été chargés sur le gel aux côtés de marqueurs de taille connue pour faciliter l'identification des produits amplifiés.

Les résultats montrent la présence de bandes spécifiques correspondant aux gènes fimH dans certains échantillons. Par exemple, les échantillons A3, A5, A7, A10, A21, A25, M38, M69, M77 et le contrôle positif, présentent des bandes d'une taille attendue d'environ 500 pb, correspondant à la taille attendue des produits amplifiés du gène fimH.

Cependant, certains échantillons, tels que A9, M2, M11, M18, M62 et M70, ne présentent pas de bandes spécifiques correspondant aux gènes fimH. Ces échantillons peuvent être considérés comme négatifs pour la présence de ce gène.

L'interprétation de ces résultats suggère que certains échantillons de notre étude contiennent les gènes fimH, ce qui indique la présence potentielle de certaines souches bactériennes, telles que E. coli, capables de former des biofilms. Les études menées par Pratt et Roberto Kolter ont démontré que la protéine FimH, présente dans les pili fimbriae adhésifs de type 1 d'Escherichia coli, joue un rôle crucial dans la formation du biofilm. Cette protéine est essentielle pour l'attachement initial des bactéries aux tissus hôtes et aux surfaces abiotiques. En se liant spécifiquement à des récepteurs à la surface, FimH favorise l'adhésion bactérienne et facilite le développement ultérieur du biofilm. Ainsi, l'interaction entre FimH et les récepteurs de surface joue un rôle déterminant dans l'initiation du processus de formation du biofilm. (Pratt and Kolter, 1998).

Il convient également de souligner que notre étude présente certaines limitations, telles que la taille limitée de l'échantillon et l'utilisation d'un seul système de détection. Des études futures pourraient étendre l'analyse à un plus grand nombre d'échantillons et utiliser des techniques complémentaires, telles que le séquençage, pour confirmer l'identité et la fonctionnalité des gènes fimH identifiés.

PCR 15 µl	ID ® / Charge	Concentrat°	µl / React°	Nombre	Program: Biofilm Factors
Water		-	13	**286**	**501 bp *pap-C* -> Adhesion F**
Master Mix	**SolisFAST® Master Mix Ready To Load, 5x**	5X	4	**88**	
Forwarde primer	EurogenTec ® Belgium	12.5 pmol	0.5	**11**	
Reverse primer	EurogenTec ® Belgium	12.5 pmol	0.5	**11**	
				396	
			18		Init. Denatur. 98°C 2 min
Template DNA			2		Denatur 98°C 10s Annealing 58°C 30s Extension 72°C 30s Cycle 30 Extension 72°C 2min
					Agarose-Gel 2 % 100V 30 min

Résultat :

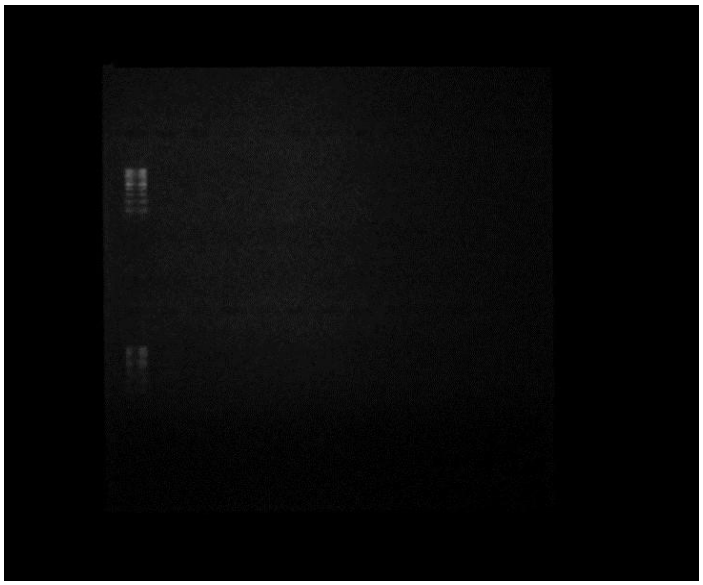


Figure 36 : Profil électrophorétique d'ADN obtenu âpres l'extraction des souches présente dans le **tableau 20**, électrophorèse sur un gel d'agarose à (2%) après coloration au BET suivie d'une visualisation sous U. V

IV.8.2. Discussion :

Les résultats de notre étude montrent la présence des gènes papC dans les échantillons d'ADN extrait après une PCR. Les amplifications spécifiques du gène papC ont été réalisées en utilisant des amorces "fimH forwarde / reverse" responsable de cette région génique.

Les résultats obtenus révèlent l'absence de bandes spécifiques correspondant aux gènes papC dans tous les échantillons étudiés. Par conséquent, il est approprié de considérer ces échantillons comme négatifs pour la présence de ce gène

L'absence des gènes papC dans les souches, telle qu'identifiée par PCR, constitue une découverte intéressante qui mérite d'être discutée plus en détail. Selon les recherche de Norgren. *Et al* Les gènes papC codent pour la production des pili de type P, connus pour leur rôle dans l'adhésion aux cellules hôtes et la colonisation des voies urinaires. La présence de ces pili adhésifs est souvent associée à la virulence et à la capacité de formation de biofilm chez les souches d'E. coli. (Norgren, *et al.*, 1987)

En somme, l'étude des gènes fimH et papC dans nos souches a permis d'obtenir des informations importantes sur leur capacité à former des biofilms et leur adhérence aux tissus hôtes. Ces résultats contribuent à notre compréhension des mécanismes d'interaction bactérienne et peuvent avoir des implications pour le développement de stratégies de prévention et de traitement des infections associées à ces derniers.

Conclusion

Cette étude faite a évalué également l'aptitude des entérobactéries pour la formation de biofilm avec une exploration de la tolérance aux désinfectants des isolats d'entérobactéries responsables de mammites cliniques et colibacillose et étudier la relation entre formation de biofilm ces souches et la résistance croisé aux désinfectants et aux antibiotiques et au final la détection des gènes fimH et PapC sur quelques souches choisies.

On a constaté que les souches responsables de mammites cliniques étaient des bonnes formatrices du biofilm par rapport aux celles des volailles mais l'ensemble des souches ont la capacité de production de biofilm avec une grande variabilité ce potentiel entre les différentes souches et au sein de la même espèce dont huit souches sont fortement formatrices de biofilm.

Huit isolats (quatre souches de chaque espèce) qui ont été choisies selon le potentiel de formation du biofilm pour déterminer leurs susceptibilités aux trois désinfectants (Ammonium Quaternaire, Chlorhexidine et Acide peracétique) par la détermination de CMI et CMB les résultats montrent le CHX s'avère le plus actif avec des valeurs plus faibles de MIC et MIC90 pour inhiber la croissance bactérienne des différents isolats et sur tout l'ammonium quaternaire à un effet très faible.

Chez les souches de mammites qui sont choisies pour l'étude de la résistance de l'antibiogramme (8/25) (E. coli et Klebsiella), Le niveau de la sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques est élevé pour certains antibiotiques comme L'Enrofloxacine, l'acide nalidixique et Triméthoprime+ sulfamethoxazole.

En revanche les souches des volailles, Les entérobactéries présentent une importante résistance aux pénicillines et les céphalosporines. Ceci étant en relation étroite avec la production de BLSE. Et aussi aux tétracyclines et l'acide nalidixique.

Les EBLSE ont été détecté par le test de synergie, et en dernier la présence des gènes du fimH sur quelques souches testées.

Pour préserver la qualité des viandes de volaille et le lait des bovines, il est essentiel de combattre la contamination par des bactéries résistantes. Cela implique de garantir l'hygiène à chaque étape de la chaîne alimentaire, depuis les élevages jusqu'à la consommation des viandes et de lait, tout en surveillant de manière coordonnée l'évolution de la résistance des bactéries aux antibiotiques

Références

Introduction :

1. Di Somma, A., et al. (2020). Biofilm formation: A multi-faceted process for engineering bacterial consortia. Frontiers in Microbiology, 11, 587782.
2. Guiraud, J.-P. (2012). Les Entérobactéries. Médecine et Maladies Infectieuses, 42(10), 405-414.
3. Wenz, J. R., et al. (2011). Biofilms in Urogenital Pathologies: Etiology and Potential Therapeutic Interventions. Pathogens, 4(2), 1-14.
4. Smith, G. W., Constable, P. D., & Morin, D. F. (2001). Enteric Bacterial Pathogens: Prevalence, Infection Site, and Antimicrobial Susceptibility Patterns of Escherichia coli Isolated from Postweaned Diarrheic Calves. Journal of Veterinary Internal Medicine, 15(4), 341-346.
5. Allison, D. G. (2003). The biofilm matrix. Biofouling, 19(3), 139-150.
6. Cohen, M. L., et al. (2011). Antimicrobial resistance: Challenges and perspectives. Comprehensive Medicinal Chemistry II, 7, 791-802.
7. Basmaci, R., & Cohen, R. (2018). Antimicrobial resistance: A cause for global concern. Médecine et Maladies Infectieuses, 48(5), 322-331.
8. Ben redjeb, S., et al. (2000). Adaptative response to antibiotic exposure by Bacteroides thetaiotaomicron strains from a human intestinal flora. Journal of Medical Microbiology, 49(8), 747-754.

CHAPITRE 1 :

9. Costerton J. W., Leweandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R., Lappin-Scott H. M. 1995. Microbial biofilms. Annu. Rev. Microbiol. 49 : 711-745.
10. . Lasa I. 2006. Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. Int. Microbiol. 9 : 21–28.
11. Costerton, J.W. *et al.* (2008) 'Biofilms in chronic wounds', *Wound Repair and Regeneration*, 16(1), pp. 37–44. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2007.00321.x.
12. Thomas Bjarnsholt., Claus Moser., Peter strup Jensen., Niels Høiby. 2011. Biofilm infections. Springer science+Business media. Berlin. Germany, 330 p.
13. Karatan E, Watnick P (2009) Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. Microbiol Mol Biol Rev 73 :310–347.

14. Donlan RM (2002). Biofilms: Microbial life on surface. Emerging Infectious Disease journal. 8 (9) : 881-890

15. Quorum Sensing (Davey et al., 2000 ; Costerton et al., 1995 ; Kumar et Anand, 1998;Stoodley et al., 2002; Shirtliff et al., 2002).

16. Roux A., Ghigo J M. (2006). Les biofilms bactériens. Bull. Acad. Vét. ; 159 (3) : 261-268.

17. Garret, TR, Bhakoo, M.,Zhang ,Z.(2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. Progress in Natural Science :18(9) :1049-1056.

18. Banerjee, P., Singh, M.,Sharma, V.(2015). BIOFILM Formation: A Comprehensive Review. International Journal of Pharma Research and Health Sciences ;3(2) :556-560.

19. Brauge, T. Étude des exopolysaccharides de la matrice extracellulaire des biofilms de Listeria monocytogenes.415p. Thèse de doctorat, école doctorale des Sciences de la Matière du Rayonnement et de l'Environnement, Université Lille 1,2015.

20. Mckenney D, et al. The ica locus of Staphylococcus epidermidis encodes production of the capsular polysaccharide/ adhesin. Infect Immunity. 1998 ; 66: 4711-4720.

21. Jacobsen, S.M., Stickler, D.J. Mobley, M.L.& Shirtliff, M.E. (2008). Complicated Catheterassocited urinary tract infectious due to Escherichia coli and Proteus mirabilis. Clin Microbiol Rev 21,26-59.

22. Filloux A, Vallet I. (2003). Biofilm: set-up and organization of a bacterial community. Medecine sciences 19(1): 77-83.

23. SCHEMBRI MA, KJAERGAARD K, KLEMM P (2003) Global gene expression in Escherichia coli biofilms. Mol. Microbiol., 48, 253-267.

24. Schembri MA, Kjaergaard K, Klemm P. (2003). Global gene expression in Escherichia coli biofilms. Mol Microbiol.

25. Ren D, Bedzyk LA, Thomas SM, Ye RW, Wood TK. (2004a). Gene expression in Escherichia coli biofilms. Appl Microbiol Biotechnol.

26. Hall-Stoodley, L., Costerton.J.W. et Stoodley. (2004). "Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases." Nat Rev Microbial 2, 95-108.

27. Kaplan, J. B. (2010). "Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications and potential therapeutic uses." J Dent Res 89(205-218).

28. Costerton J, et al. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Sci. 1999; 284: 1318-1322.

29. Khan S, et al. Isolation of Shigella species and their resistance patterns to a panel of fifteen antibiotics in mid and far western region of Nepal. Asian Pacific J Tropical Dis. 2014; 4: 30-34.

30. Parsek MR and Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. Annu Rev Microbiol. 2003 ; 57 : 677-701.

31. Miller MB and Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. Annu Rev Microbiol. 2001; 55: 165-199.

32. Fux C, et al. Survival strategies of infectious biofilms. Trends Microbiol. 2005 ; 13 :34-40.

33. Ma L, et al. Assembly and development of the Pseudomonas aeruginosa biofilm matrix. PLoS Pathogens. 2009; 5: e1000354.

34. Naves P, et al. Effects of human serum albumin, ibuprofen and N-acetyl-l-cysteine against biofilm formation by pathogenic Escherichia coli strains. J Hospital Infect. 2010; 76: 165-170.

35. Larson EL, et al. Microbial flora of hands of homemakers. American J Infect Control. 2003; 31: 72-79.

36. Miller AA and Miller PF. Emerging trends in antibacterial Discovery: Answering the call to arms. Horizon Scientific Press. 2011.

37. . Podschun R and Ullmann U. Klebsiella spp. As nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev. 1998 ; 11 : 589-603.

38. Donlan R.M., Costerton J.W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical Microbiological Reviews. 15, pp 167-193.

39. Nobbs A.H., Lamount R.J. and Jenkinson H. 2009. Streptococcus adherence and colonization. Microb and Mole Bio Rev. 73(3), pp 407-505.

40. Bellifa Samia (2014). Evaluation de la formation de biofilm des souches de Klebsiella pneumoniae isolées des dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de Doctorat Université Abou Beker Belkaid Tlemcen.

41. Boutaleb N. (2007). "Étude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable." 174.

42. Martinez LR, Casadevall A. (2007). " Cryptococcus neoformans biofilm formation depends on Cryptococcus neoformans biofilm formation depends on surface support and carbone source and reduces fungal cells susceptibility to heat, cold and UV light". Applied and Environmental Microbiology. 4592- 4601.

43. Spormann, AM. (2008). "Physiology of Microbes in Biofilms Stability of Burkholderia Cenocepacia Biofilms." Applied and Environmental Microbiology, 5208- 5218.

44. Vestby, L. K., Moretro, T., Langsrud, S., Heir, E., & Nesse, L. L. (2009). Biofilm forming abilities of Salmonella are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. BMC Veterinary Research, 5, 20.

45. Tomlin, KL., Malott, R., Ramage, G., Storey, Dg., Sokol, Pa., Ceri, H. (2005). Quorumsensing mutations affect attachment and stability of Burkholderia cenocepacia biofilms. Appl environ microbial ;71(9) :5208-5218.

46. Irie, Y., Parsek, MR. (2008). Quorum sensing and microbial biofilms. Curr Top Microbiol immunol ;322 :67-84.

47. Clutterbuck, AL., Woods, E., Knottenbelt, D.,Clegg , PD., Cochrane , CA.,Percival , SL.(2007). Biofilms and their relevance to veterinary medicine. Veterinary Microbiology ;121(1-2): 1-17.

48. Queck, S Y., Weitere, M., Moreno, AM.,Rice, Sa.,Kjelleberg, S .(2006) .The role of quorum sensing mediated developmental traits in the resistance of Serratia marcescens biofilms against protozoan grazing. Environ. Microbiol ;8(6) :1017- 1025.

49. Akel Z. 2014. Profil épidémiologique des entérobactéries productrices de carbapénémases isolées au CHU IBN SINA-RABAT [thèse]. Rabat : Université Mohamed V de Rabat.

50. Mion S, Rémy B, Plener L, ÉChabrière, Daudé D. 2019. Quorum sensing et quorum Quenching Comment bloquer la communication des bactéries pour inhiber leur virulence. Méd/sci. 35, pp 31-8.

CHAPITRE 2 :

51. Rutala, W.A. (1990) ‘APIC guideline for selection and use of disinfectants’, American Journal of Infection Control, 18(2), pp. 99–117.

52. QUITTET C., NELIS H. (1999) : HACCP pour PME et artisanats. Secteurs produits laitiers. Monographie. Ed : faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux. Belgique. P 495.

53. Trueman J. R. 1971. The Halogens. In: Inhibition and Destruction of the Microbial Cell. Hugo W.B. ed Academic press, London. pp : 137-183.

54. Massicotte R.2009.Désinfectants et désinfection en hygiène et salubrité : principes fondamentaux. Édition : La Direction des communications du ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec.

55. BIMBENET J.J et DUQUENOY A. (2002) : Hygiène des procédés in « industrie alimentaire. Génie des procédés alimentaires. Des bases aux applications »

56. Faure, S. (2010) 'Antiseptiques', Actualités Pharmaceutiques, 49(494), pp. 45–48.

57. Tong, C. *et al.* (2021) 'Disinfectant resistance in bacteria: Mechanisms, spread, and resolution strategies', *Environmental Research,* 195, p. 110897.

58. Li, X.Z. & Nikaido, H. 2009. Efflux-mediated drug resistance in bacteria- An update. Drugs 69 : 1555-1623.

59. , X.Z. & Nikaido, H. 2004. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. Drugs 64: 159- 204.

60. Delihas N.2011. Impact of small repeat sequences on bacterial genome evolution. Genome Biol. Evol. 3, 959–973.

61. Zhou Q, Tang M, Zhang J.2017. Is the potential Interconnection between antibiotic susceptibility and disinfectant resistance a threat to food safety. Agric. Sci. Technol. 18, 1033–1037.

62. Kim M, Weigand MR, Oh S. 2018. Widely used benzalkonium chloride disinfectants can promote antibiotic resistance. Appl. Environ. Microbiol. 84, 7– 19.

63. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. 2018. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. Clin. Microbiol. Rev. 31, 1–61.

64. Johnson CM, Grossman AD. 2015. Integrative and Conjugative Elements (ICEs): what they do and how they work. Annu. Rev. Genet. 49, 577–601.

65. Delavat, F, Miyazaki, R, Carraro, N. 2017. The hidden life of integrative and

66. Conjugative elements. FEMS Microbiol. Rev. 41, 512–537.

67. Basiry, D. et al. (2022) 'The effect of disinfectants and antiseptics on co- and cross-selection of resistance to antibiotics in aquatic environments and wastewater treatment plants', Frontiers in Microbiology, 13, p. 1050558.

68. De Beer D, Srinivasan R, Stewart PS. 1994. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. Appl Environ Microbiol 60 :4339– 4344.

69. Mangalappalli-Illathu AK, Korber DR. 2006. Adaptive resistance and differential protein expression of Salmonella enterica serovar Enteritidis biofilms exposed to benzalkonium chloride. Antimicrob Agents Chemother 50 :3588–3596.

70. Mangalappalli-Illathu AK, Vidovic S, Korber DR. 2008. Differential adaptive response and survival of Salmonella enterica serovar Enteritidis planktonic and biofilm cellsexposed to benzalkonium chloride. Antimicrob Agents Chemother 52 :3669–3680.

71. Lambert RJW, Johnston MD. 2001. The effect of interfering substances on the disinfection process: a mathematical model. J Appl Microbiol 91 :548–555.

72. Stewart PS, Costerton JW. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet 358 :135–138.

MATÉRIELS METHODES :

73. Donlan RM, Costerton JW. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical Microbiological Reviews. 15, pp 167-193

74. Musk, D.J., Banko, D.A., Hergenrother, P.J., 2005. Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of Pseudomonas aeruginosa. Chemistry & biology12, 789- 796.

75. Ramzi, A. *et al.* (2020) 'Evaluation of Antibacterial Activity of Three Quaternary Ammonium Disinfectants on Different Germs Isolated from the Hospital Environment', *BioMed Research International*. Edited by A.K. Gebre, 2020, pp. 1–6.

76. Tendolkar, Arto S. Baghdayan, Michael S. Gilmore, Nathan Shankar. 2004.https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/IAI.72.10.6032-6039.2004.

77. François Denis., Marie-Cécile Ploy., Christian Martin., Édouard Bingen., Roland Quentin. 201. Bactériologie médicale techniques usuelles. Elsevier Masson SAS, Paris, 615 p.

78. Qachaou A. 2011. Entérobactéries productrice des béta-lactamse à spectre élargi : épidémiologie et profil de résistance. Thèse de doctorat d'état, université de Mohammed V, Rabat,54p.

79. Raoudha A., Amel S., Hassen G. et Azeiz O.B. 2012. Extraction de l'ADN et optimisation de la PCR (Polymorphism Chain Reaction) pour l'application des marqueurs RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) chez Stipa lagascae. Acta Botanica Gallica 159(1) : 73–78.

80. Surzycki S. 2000. Basic Techniques in Molecular Biology. Springer-Verlag, Berlin, 444 p.

81. Garibyan L. et Avashia N. 2013. Polymerase Chain Reaction. Journal of Investigative Dermatology 133(3):1–4.

82. . Poitras E. et Houde A. 2002. La PCR en temps réel : principes et applications. Biology and Biotechnology 2(2) : 2–11.

83. Bakour S., Touati A., Bachiri T., Sahli F., Tiouit D., Naim M., Azouaou M. & Rolain J. M.,2014. First report of 16S rRNA methylase ArmA-producing Acinetobacter baumannii and rapid spread of metallo-beta-lactamase NDM-1 in Algerian hospitals. Journal ofInfection and Chemotherapy, 20 : 696-701.

RESULTATS ET DISCUSSION :

84. Barnes H.J, Nolan LK, Vaillancourt JP (2008) Colibacillosis in poultry in Diseases of Poultry-12th Edition, pp 691-738.

85. Kabir SML (2010) Avian Colibacillosis and Salmonellosis: A Closer Look at Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, Control and Public Health Concerns. Int J Environ Res Public Health 7 :89-114

86. Zhuang QY, Wang ASC, Li AJP, Liu AD, Shuo Liu AB, Ming Jiang AW, Ming Chen J (2014) A Clinical Survey of Common Avian Infectious Diseases in China. Avian Dis 58:297–302.

87. Landman WJM, van Eck JHH (2015) The incidence and economic impact of the Escherichia coli peritonitis syndrome in Dutch poultry farming. Avian Pathol 44(5):370–378

88. Fauchère, J. L., Avril, J. L. 2002. Bactériologie générale et médicale. Ed Ellipses. Paris. P.368.

89. Robert M.Q. Shanks., Jennifer L. Sarget., Raquel M. Martinez., Martha L. Graber., George A. Toole. (2006). Catheter lock soltions influence staphylococcal biofilm formation on abiotic surfaces –Nephrol Dial transplant, Oxford University Press; 21:2247-2255.

90. Allison, D.G., 2003. The biofilm matrix. Biofouling, 19(2) : 139-50.

91. Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R. and Lappin-Scott, H.M., 1995. Microbial Biofilms. Annual Review of Microbiology, 49(1): 711-745.

92. Stepanović, S. et al. (2007) 'Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci', APMIS, 115(8), pp. 891–899.

93. Ito A, Taniuchi A, May T, Kawata K, Okabe S.2009. Increased antibiotic resistance of Escherichia coli in mature biofilms. Appl Environ Microbiol. 2009 Jun ; 75(12) :4093-100.

94. Pratt, L.A. and Kolter, R. (1998) 'Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili', *Molecular Microbiology*, 30(2), pp. 285–293. Available at : https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01061.x.

95. Lebeaux D, Ghigo J.M (2012) *Infections associées aux biofilms Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale*. Médecine/sciences, 28(8-9): 727-39.DOI : 10.1051/medsci/2012288015.

96. Mion, S. *et al.* (2019) '*Quorum sensing et quorum quenching* : Comment bloquer la communication des bactéries pour inhiber leur virulence ?', *médecine/sciences*, 35(1), pp. 31–38. Available at: https://doi.org/10.1051/medsci/2018310.

97. Ruddaraju, L.K. *et al.* (2020) 'A review on anti-bacterials to combat resistance: From ancient era of plants and metals to present and future perspectives of green nano technological combinations', *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(1), pp. 42–59. Available at : https://doi.org/10.1016/j.ajps.2019.03.002

98. Ruddaraju, L.K. *et al.* (2020) 'A review on anti-bacterials to combat resistance: From ancient era of plants and metals to present and future perspectives of green nano technological combinations', *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(1), pp. 42–59. Available at : https://doi.org/10.1016/j.ajps.2019.03.002.

Annexe 1

1. Appareillage :

Les appareils et les petits matériels utilisées :

Appareillage	Petit matériel
•Autoclave (MEMMERT) • Agitateur magnétique chauffant (SELECTA) •Appareil d'éléctrophorese • Bain marie (MEMMERT) • Balance (Denever instrument) • Balance de précision à **KERN ALS 220-4N** • Centrifugeuse (Sigma) • Congélateur •Densitmétre • Etuve bactériologique 37°C (MAMMERT) •Incubateur (MEMMERT) •Lecteur 96 **(Safas monaco)** • Réfrigérateur à 4C° •Thermo Agitateur (optic evymen système) •Thermocycleur •Transluminateur • Vortex	• Anse de platine • Barreaux magnétiques • Bec bunsen • Béchers • Boites de Pétrie en plastique • Ecouvillons • Embous Jaunes, bleus et blanc • Eprouvettes • Erlen mayer • Flacons de 200 ml stériles • Les eppendorf 1,5 ml ; 2ml • Micropipettes (200µl 1000µl 10µl) • Microplaques • Pince • Plaque d'amplification. • Portoirs pour tubes • Spatule • Tubes à essai stériles

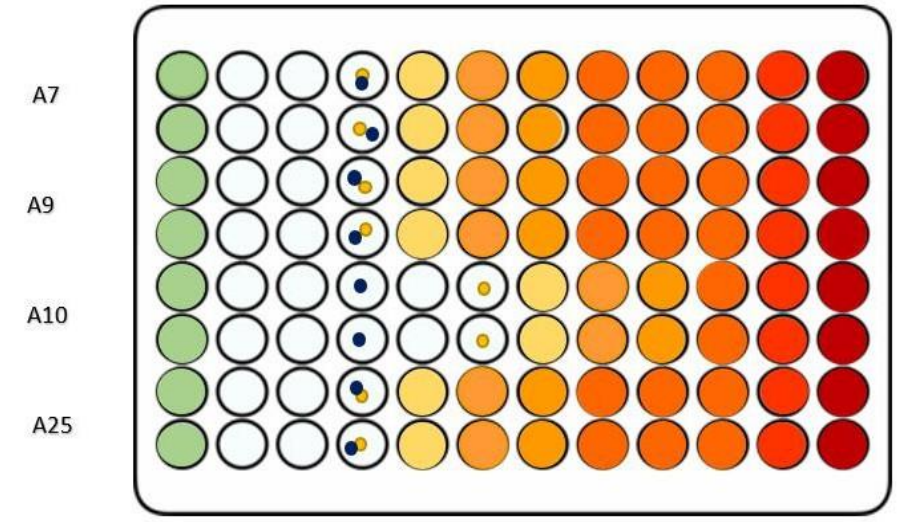
Figure 1 : Les Appareils et les matériels utilisés.

2. Milieux, réactifs et solutions utilisées :

Milieux	Réactifs
Milieux solides • Gel d'agarose 2% • Gélose mac conkey • Gélose Mueller Hinton **Milieux liquides** • TSB	• Acide péracitique 5% • Ammonium quaternaries 10% • Bromure d'ethidium • Chlorhexidine • Cristal violet • Disques d'antibiotiques en cartouche • DNA lader • Eau distillée • Eau physiologique (0,9 %); • Esopropanol • Ethanol 9% • Glycérol (80%); • HCl • Master mix **SolisFAST® Master Mix Ready to Load, 5x** • NaOH • Primers • Tampon PBS • TBE

Figure 2 : les milieux, réactifs et solutions utilisées.

3. CMI/CMB :



CMI – CMB (Acide peracétique 0.1%) Souches des volailles

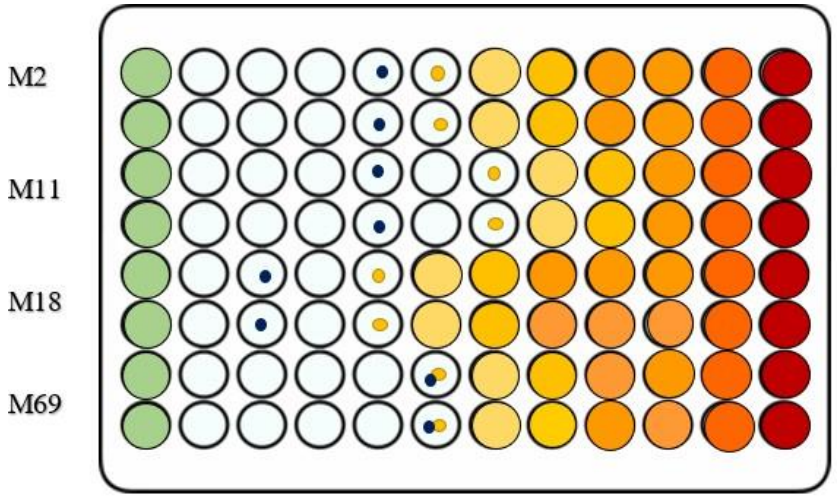
Contrôle négatif

Inoculum

CMI

CMB

Gradient de concentration



CMI – CMB (Acide peracétique 0.1%) Souches du lait mammiteux

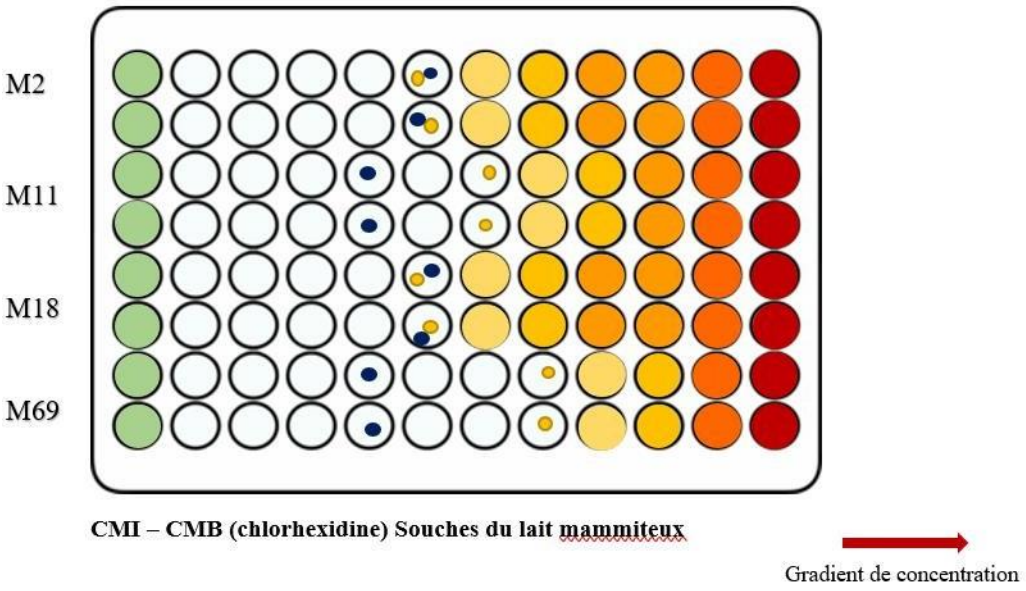
Gradient de concentration

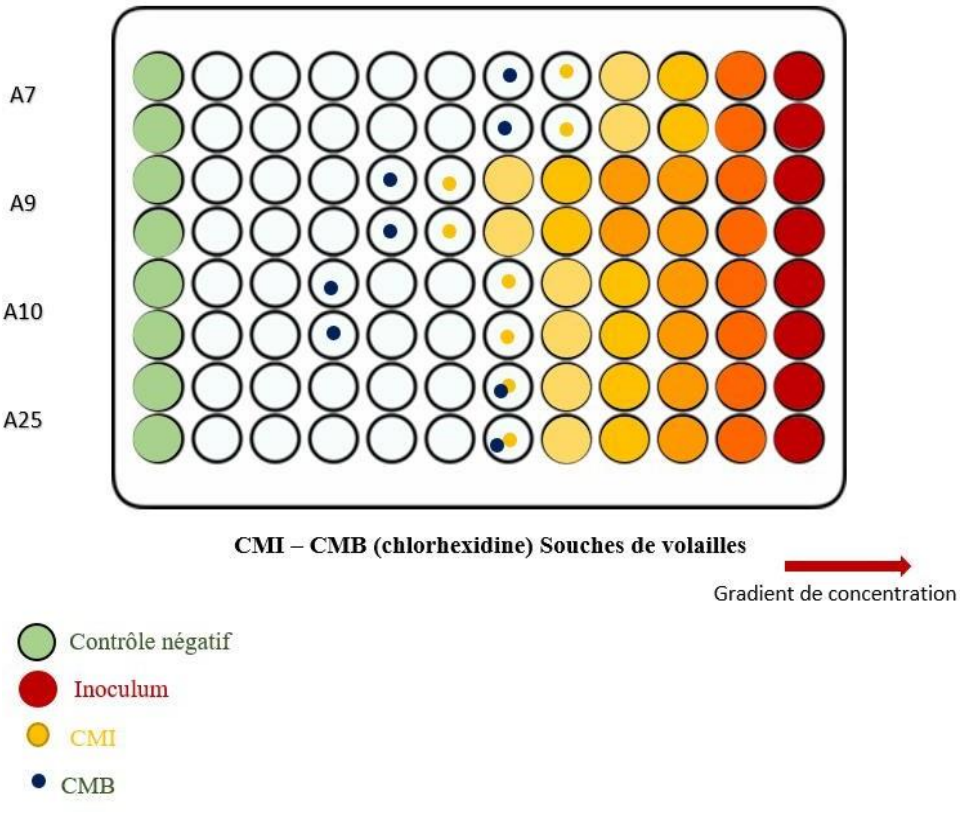
Contrôle négatif

Inoculum

CMI

CMB


M2
M11
M18
M69
CMI – CMB (chlorhexidine) Souches du lait mammiteux
Gradient de concentration
Contrôle négatif
Inoculum
CMI
CMB


A7
A9
A10
A25
CMI – CMB (chlorhexidine) Souches de volailles
Gradient de concentration
Contrôle négatif
Inoculum
CMI
CMB

4. Diamètres critique des zones d'inhibition :

Table de lecture 21 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour Entérobactéries(En médecine vétérinaire)

Antibiotiques testés	Charge du disque	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)			Commentaires
		R	I	S	R	I	S	
Ampicilline	10µg	≤13	14-16	≥17	≥32	16	≤8	La réponse pour l'ampicilline est valable pour l'amoxicilline
Chien : *Escherichia coli*	-	-	-	-	≥1	-	≤0,25	La valeur ≤8 doit être utilisée pour les infections du tractus urinaire, cette valeur correspond à une administration orale de 25.6mg/kg Pour l'amoxicilline , elle est de 11 mg / kg administrées cinq doses consécutives à 8 heures d'intervalle . La concentration des urines produites chez le chien est > 300µ/ml
Amoxicilline+ Acide clavulanique*	20/10 µg	≤13	14-17	≥18	≥32/16	16/8	≤8/4	Le disque d'AMC doit être appliqué près du disque de CTX ou TIO, une image de synergie indique la présence d'une BLSE, Apres confirmation, la souche BLSE+doit être rendue résistantes à toutes les ß-lactamases (sans tenir compte des valeurs critiques
Céfalotine	30 µg	≤14	15-17	≥18	≥32	16	≤8	La réponse à la cefalotine est valable pour toutes les céphalosporines de première génération.
Céftiofur	30 µg	≤17	18-20	≥21	≥8	4	≤2	
Bovins (Mammites à *Escherichia coli*)		≤17	18-20	≥21	≥8	4	≤2	
Néomycine/ Kanamycine	30 µg	≤13	14-17	≥18	≥64	32	≤16	La réponse pour la néomycine est valable pour la kanamycine
Gentamicine**	10 µg	≤12	13-14	≥15	≥16	8	≤4	
Espèce canine	10 µg	≤12	13-15	≥16	≥8	4	≤2	Ces valeurs sont inspirées de la pharmacocinétique (utilisant des doses cliniques acceptables) et des données pharmacodynamiques, pour les chiens, la dose de la gentamicine modifiée est : 10mg /kg /24h en IM.
Espèce équine	10 µg	≤12	13-15	≥16	≥8	4	≤2	Ces valeurs sont inspirées de la pharmacocinétique (utilisant des doses cliniques acceptables) et des données pharmacodynamiques, pour les chevaux, la dose de la gentamicine modifiée est : 6.6mg /kg /24h en IM.

Suite table de lecture 21 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Entérobactéries* (En médecine vétérinaire)

Antibiotiques testés	Charge du disque	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)			Commentaires
		R	I	S	R	I	S	
Sulfisoxazole	300 µg	≤12	13-16	≥17	≥512	-	≤256	La réponse pour le sulfisoxazole est valable pour les sulfonamides
Triméthoprime+ Sulfaméthoxazole	1,25/23,75µg	<10	11-15	≥16	≥4/76	-	≤2/38	La valeur ≤2/38 peut être utilisée pour les isolats des infections du tractus urinaire.
Tétracyclines	30 µg	≤14	15-18	≥19	≥16	8	≤4	Le test de sensibilité à la tétracycline est valable pour tester la sensibilité aux chlortétracyclines, doxycyclines et oxytétracyclines .Les organismes sensibles à la tétracycline sont aussi considérés comme sensibles à la doxycycline mais certains organismes classés comme intermédiaires ou résistants à la tétracycline peuvent être sensibles à la doxycycline ou à la minocycline ou aux deux.
Acide nalidixique/ fluméquine	30 µg	≤13	14-18	≥19	≥32	-	≤16	La réponse pour l'acide nalidixique est valable pour la fluméquine
Enrofloxacine	5 µg	≤16	17-20	≥21	≥2	0,5-1	≤0,25	
Aviaire (poulet et dinde)	5 µg	≤16	17-22	≥23	≥2	0,5-1	≤0,25	
Espèce féline et canine	5 µg	≤16	17-22	≥23	≥4	1-2	≤0,5	
Marbofloxacine (même valeurs pour l'espèce féline et canine)	5 µg	≤14	15-19	≥20	≥4	2	≤1	
Colistine	10 µg	≤10	-	≥11	-	-	-	
Nitrofurantoine**	300 µg	≤14	15-16	≥17	≥128	64	≤32	
Chloramphénicol**	30 µg	≤12	13-17	≥18	32≥	16	≤8	

5. Contrôle de qualité des souches FimH positive après une PCRclassique :

