

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE BATNA 2

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE DES ORGANISMES

Thèse en vue de l'obtention du diplôme de

Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle

**Filière:** Sciences biologiques

**Spécialité:** Biotechnologie des Molécules Bioactives et Pathologie Moléculaire

### Thème

*Etude phénotypique et moléculaire de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées à partir des fientes de la cigogne blanche (*Ciconia ciconia*) de la commune d'El Madher wilaya de Batna*

Présentée par: Mme. BOUAZIZ Amira

#### Membres de jury:

|                     |                           |                     |
|---------------------|---------------------------|---------------------|
| Directeur de thèse: | Pr. AYACHI Ammar          | Université Batna 1  |
| Président:          | Pr. Si Bachir Abdelkrim   | Université Batna 2  |
| Examineur:          | Pr. Aissat Kamel          | Université Batna 2  |
| Examinatrice:       | Pr. Gacemi-Kirane Djamila | Université d'Annaba |
| Membre invité:      | MCA. Loucif lotfi         | Université Batna 2  |

Année universitaire 2018-2019

A l'issue de ce travail, je remercie avant tout **DIEU**, tout puissant, de m'avoir donné volonté, courage et patience pour enfin arriver à mon but.

Mes remerciements s'adressent d'abord, à mon directeur de thèse **M. AYACHI Ammar**, Professeur en médecine vétérinaire à l'université de Batna 1. Je le remercie pour son encadrement, sa gentillesse et la confiance qu'il m'accorde en acceptant de diriger ce travail.

Un hommage particulier est adressé à :

**M. SI BACHIR Abdelkrim**, Professeur à l'université de Batna 2, qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury. Pour les orientations pédagogiques et documentaires ainsi que ses nombreuses remarques et suggestions. Veuillez recevoir mes sincères remerciements.

**M. AISSAT Kamel**, Professeur à l'université de Batna 2. C'est un réel plaisir et grand honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail.

**Mme. GACEMI-KIRANE Djamil**a, Professeur à l'Université de Annaba, qui m'a fait l'honneur d'analyser ce travail et d'en être l'un des examinateurs. Nous nous sommes sincèrement reconnaissants d'avoir accepté de vous déplacer à Batna.

**M. LOUCIF Lotfi**, Maître de conférences (classe A) à l'université de Batna 2, pour sa disponibilité, son soutien indéfectible et ses conseils tout au long de ce travail. J'apprécie fortement ses hautes qualités scientifiques et valeurs humaines. Je tenais également à vous écrire un « Merci » sincère pour m'avoir montré les clés du succès : avoir confiance en soi et en ses capacités, croire en soi et toujours tenter de se dépasser. Les mots ne peuvent exprimer toute ma gratitude, car quel que soit la formulation adoptée ça sera très en dessous de la réalité. Mes vifs remerciements s'adressent également à :

**Mme. BENDJAMA Esma**, Maître assistante en microbiologie à l'université de Batna 2. Merci de m'avoir donné du courage et de force nécessaire tout au long de ces années. Soyez rassurez de ma profonde considération, sincères remerciements et profonde gratitude.

**Pr. Rolain Jean Marc** qui m'a permis de finaliser mes recherches en biologie moléculaire au niveau de son Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes (URMITE), Faculté de Médecine et de Pharmacie, Aix-Marseille-Université, Marseille, France. Veuillez recevoir mes sincères remerciements.

**Dr. BOURAFA Nadjette** pour sa contribution dans la caractérisation moléculaire des souches de la deuxième série de prélèvement.

**Melle. GUEHAZ Karima** pour sa contribution au criblage des souches de la deuxième série de prélèvement.

**M. BENAMMAR Abdelkrim**, ex-président de l'APC d'El Madher, pour son aide précieuse par le camion-nacelle en vue d'accéder aux nids de la cigogne blanche à la commune d'El Madher.

**M. BENCHOURI Yakine**, directeur du barrage de Koudiet M'douar, **M. MERADI Abd-Elouahab** et **M. BENALI Faycel** de la conservation des forêts de la Wilaya de Batna pour leurs aides et leurs disponibilités.

Merci à mes parents, ma famille, mes amis surtout à **Zineb, Widad, Naima** et **Rima**, ces remerciements ne seraient pas complets sans associer toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

*Je dédie cette thèse,*

*A mon très cher PAPA*

*De tous les pères, tu as été le meilleur, tu as su m'entourer d'attention, m'inculquer les valeurs nobles de la vie, m'apprendre le sens du travail, de l'honnêteté et de la responsabilité.*

*Merci d'avoir été toujours là pour moi, un grand soutien tout au long de mes études.*

*A ma très chère MAMAN*

*Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. T'as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.*

*Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur.*

*A mon très cher MARI*

*Tes sacrifices, ton soutien moral et matériel, ta gentillesse sans égal, ton profond attachement m'ont permis de réussir mes études.*

*A mon fils, mon ange DJOUD*

*Ta joie de vivre et ton sourire ont été pour moi le meilleur encouragement que je puisse avoir.*

*Que Dieu te garde et te protège.*

*A mon très cher frère Amine*

*A mes très chères sœurs*

*SOUHEYR, son époux NASSIM et sa perle NISSAM*

*Aux futurs Drs NABILA et LINA*

*A MAISSA et DOUAA*

*À tous les membres de ma famille sans aucune exception.*

*Et à tous ceux que ma réussite leur tient à cœur.*

*AMIRA*

*Sommaire**Liste des abréviations**Liste des figures**Liste des tableaux**Introduction* \_\_\_\_\_ **1***Partie 1. Revue bibliographique**Chapitre I. L'antibiorésistance et les entérobactéries***1 Les antibiotiques** \_\_\_\_\_ **4**1.1 Historique \_\_\_\_\_ **4**1.2 Définition \_\_\_\_\_ **5**1.3 Notion de spectre d'activité \_\_\_\_\_ **5**1.4 Effets des antibiotiques \_\_\_\_\_ **6**1.5 Critères de classification des antibiotiques \_\_\_\_\_ **6**1.6 Mécanismes d'action \_\_\_\_\_ **7**1.6.1 Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane \_\_\_\_\_ **14**1.6.2 Antibiotiques agissant au niveau de la membrane cytoplasmique \_\_\_\_\_ **18**1.6.3 Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique \_\_\_\_\_ **18**1.6.4 Antibiotiques inhibiteurs du métabolisme des acides nucléiques \_\_\_\_\_ **19****2 Résistance aux antibiotiques** \_\_\_\_\_ **19**2.1 Définition \_\_\_\_\_ **19**2.2 Types de résistance \_\_\_\_\_ **19**2.2.1 Résistance naturelle \_\_\_\_\_ **19**2.2.2 Résistance acquise \_\_\_\_\_ **19**2.3 Origine et évolution de la résistance des bactéries aux antibiotiques \_\_\_\_\_ **20****3 L'antibiorésistance chez les entérobactéries** \_\_\_\_\_ **21**3.1 Généralité sur les entérobactéries \_\_\_\_\_ **21**3.1.1 Définition \_\_\_\_\_ **21**3.1.2 Taxonomie \_\_\_\_\_ **21**3.1.3 Habitat \_\_\_\_\_ **21**3.1.4 Caractères culturels \_\_\_\_\_ **22**

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 3.1.5      | Caractères biochimiques  | 22        |
| 3.1.6      | Caractères antigéniques  | 22        |
| <b>3.2</b> | <b>Résistance naturelle</b>  | <b>24</b> |
| <b>3.3</b> | <b>Résistance acquise</b>  | <b>24</b> |
| 3.3.1      | Résistance aux $\beta$ -lactamines                                   | 24        |
| 3.3.2      | Résistance aux quinolones  | 35        |
| 3.3.3      | Résistance aux aminosides  | 36        |
| <b>4</b>   | <b><i>Évolution de l'antibiorésistance chez l'espèce E. coli</i></b> | <b>36</b> |
| 4.1        | Historique   | 37        |
| 4.2        | L'antibiorésistance chez l'homme                                     | 37        |
| 4.2.1      | Résistance aux pénicillines  | 37        |
| 4.2.2      | Résistance aux $\beta$ -lactamines à spectre étendue                 | 38        |
| 4.2.3      | Résistance aux céphalosporines                                       | 38        |
| 4.2.4      | Résistance aux carbapénèmes  | 39        |
| 4.3        | L'antibiorésistance chez l'animal et autre source                    | 39        |
| 4.3.1      | Résistance aux pénicillines  | 39        |
| 4.3.2      | Résistance aux $\beta$ -lactamines a spectre étendue                 | 40        |
| 4.3.3      | Résistance aux céphalosporines                                       | 41        |
| 4.3.4      | Résistance aux carbapénèmes  | 41        |
| <b>1</b>   | <b><i>Description et identification de l'espèce</i></b>              | <b>44</b> |
| 1.1        | Description  | 44        |
| 1.1.1      | Les caractéristiques moyennes  | 44        |
| 1.1.2      | Identification   | 46        |
| <b>2</b>   | <b><i>Phylogénie</i></b>   | <b>46</b> |
| <b>3</b>   | <b><i>Habitat et régime alimentaire</i></b>                          | <b>47</b> |
| <b>4</b>   | <b><i>Répartition géographique</i></b>                               | <b>48</b> |
| 4.1        | Dans le Monde  | 48        |
| 4.2        | En Algérie   | 49        |
| <b>5</b>   | <b><i>Migration</i></b>  | <b>50</b> |
| 5.1        | Voies de migration   | 50        |
| 5.1.1      | La population de l'Ouest   | 52        |
| 5.1.2      | La population de l'Est   | 52        |
| 5.1.3      | Les cigognes blanches de l'Algérie                                   | 52        |
| <b>1</b>   | <b><i>Site d'étude</i></b>   | <b>54</b> |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>2</b> | <b><i>Echantillonnage</i></b>   | <b>55</b> |
| <b>3</b> | <b><i>Prélèvement</i></b>   | <b>55</b> |
| <b>4</b> | <b><i>Screening des souches d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération et/ ou aux carbapénèmes</i></b> | <b>56</b> |
| 4.1      | <b>Premier protocole de screening</b>   | <b>56</b> |
| 4.1.1    | Préparation de la suspension mère et les dilutions décimales  | 56        |
| 4.1.2    | Isolement sélectif  | 56        |
| 4.2      | <b>Deuxième protocole de screening</b>  | <b>57</b> |
| 4.2.1    | Préparation et Pré-enrichissement des échantillons  | 57        |
| 4.2.2    | Enrichissement sélectif   | 58        |
| 4.2.3    | Isolement sélectif  | 58        |
| <b>5</b> | <b><i>Sélection et purification des colonies suspectes</i></b>  | <b>58</b> |
| <b>6</b> | <b><i>Identification</i></b>  | <b>60</b> |
| 6.1      | <b>Identification biochimique</b>   | <b>60</b> |
| 6.1.1    | Test de fermentation du glucose   | 60        |
| 6.1.2    | Galerie biochimique   | 60        |
| 6.2      | <b>La spectrométrie de masse douce MALDI-TOF MS</b>   | <b>60</b> |
| 6.2.1    | Principe  | 60        |
| 6.2.2    | Méthode de réalisation  | 61        |
| <b>7</b> | <b><i>Détermination de la sensibilité aux antibiotiques</i></b>   | <b>63</b> |
| 7.1      | <b>Antibiogramme</b>  | <b>63</b> |
| 7.2      | <b>Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)</b>  | <b>64</b> |
| 7.3      | <b>Etude phénotypique de la résistance aux <math>\beta</math>-lactamines</b>  | <b>64</b> |
| 7.3.1    | Identification phénotypique de BLSE   | 64        |
| 7.3.2    | Identification phénotypique des céphalosporinases hyperproduites  | 66        |
| 7.3.3    | Identification phénotypique des carbapénémases  | 66        |
| <b>8</b> | <b><i>Caractérisation moléculaire de la résistance aux <math>\beta</math>-lactamines</i></b>  | <b>68</b> |
| 8.1      | <b>Extraction de l'ADN bactérien</b>  | <b>68</b> |
| 8.2      | <b>Screening moléculaire rapide des mécanismes de résistance</b>  | <b>69</b> |
| 8.3      | <b>Détermination des variants des gènes de résistance</b>   | <b>72</b> |
| 8.3.1    | Polymerase chain reaction (PCR) standard  | 72        |
| 8.3.2    | Electrophorèse sur gel d'agarose  | 74        |
| 8.3.3    | Séquençage  | 75        |

|           |   |            |
|-----------|---|------------|
| <b>9</b>  | <b><i>Etude de la transférabilité de la carbapénémase</i></b>   | <b>78</b>  |
| 9.1       | Conjugaison   | 78         |
| 9.2       | Transformation  | 78         |
| 9.2.1     | Extraction de plasmide  | 79         |
| 9.2.2     | Électroporation   | 80         |
| 9.2.3     | Transformation chimique   | 81         |
| <b>10</b> | <b><i>Etude de la clonalité des souches</i></b>   | <b>82</b>  |
| <b>1</b>  | <b><i>Echantillonnage</i></b>   | <b>85</b>  |
| <b>2</b>  | <b><i>Screening des souches d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération et/ ou carbapénèmes</i></b> | <b>85</b>  |
| 2.1       | Isolement sélectif  | 85         |
| 2.2       | Identification des souches isolées  | 87         |
| 2.2.1     | Identification biochimique  | 87         |
| 2.2.2     | Identification par MALDI-TOF MS   | 89         |
| <b>3</b>  | <b><i>Détermination de la sensibilité aux antibiotiques</i></b>   | <b>98</b>  |
| 3.1       | Antibiogramme   | 98         |
| 3.2       | Répartition des entérobactéries par milieux d'isolement   | 95         |
| 3.3       | Etude de la sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries isolées   | 97         |
| 3.3.1     | Etude de la sensibilité aux antibiotiques des souches de <i>E. coli</i> de la première série de prélèvement                             | 97         |
| 3.3.2     | Etude de la sensibilité aux antibiotiques des souches de <i>E. coli</i> de la deuxième série de prélèvement                             | 98         |
| 3.3.3     | Etude de la sensibilité aux antibiotiques des souches d'entérobactéries autres que <i>E. coli</i>                                       | 105        |
| 3.4       | Concentration minimale inhibitrice  | 111        |
| <b>4</b>  | <b><i>Etude phénotypique de la résistance aux <math>\beta</math>-lactamines</i></b>   | <b>111</b> |
| 4.1       | Identification phénotypique de BLSE   | 113        |
| 4.2       | Identification phénotypique des carbapénémases  | 114        |
| 4.2.1     | Test de Hodge modifié   | 114        |
| 4.2.2     | Carba NP test modifié   | 115        |
| 4.2.3     | Test à l'EDTA   | 116        |
| 4.3       | Fréquence des phénotypes de résistance enzymatique chez les entérobactéries isolées   | 116        |

|   |            |
|---|------------|
| 4.4 Répartition des phénotypes de résistance enzymatique acquise par espèce _____ |            |
| bactérienne _____   | 116        |
| <b>5 Détermination des supports génétiques de la résistance _____</b>             | <b>119</b> |
| 5.1 Détection moléculaire des gènes codant pour les $\beta$ -lactamases _____     | 119        |
| 5.1.1 PCR en temps réel _____   | 119        |
| 5.1.2 PCR standard _____  | 121        |
| 5.2 Séquençage _____  | 122        |
| 5.2.1 BLSE de type CTX-M _____  | 125        |
| 5.2.2 BLSE de type TEM _____  | 127        |
| 5.2.3 $\beta$ -lactamase de type OXA-48 _____                                     | 129        |
| <b>6 Conjugaison bactérienne _____</b>  | <b>130</b> |
| <b>7 Typage des souches _____</b>   | <b>131</b> |
| <b>Conclusion et perspectives _____</b>   | <b>135</b> |
| <b>Références bibliographiques _____</b>  | <b>138</b> |
| <i>Résumés</i>  |            |
| <i>Annexes</i>  |            |

## A

**Ag:** Antigène

**AK:** Amikacine

**AMC:** Amoxicilline + Acide clavulanique

**AmpC:** Céphalosporinase de classe C  $\beta$ -lactamase

**AMX:** Amoxicilline

**API 20E:** Analytical profile index 20E (E : Entérobactéries).

**ATM:** Aztréonam

## B

**BCC:** Bouillon coeur cerveau

**BET:** Bromure d'éthidium

**BGN:** Bacille à Gram négatif

**BLSE:**  $\beta$ -lactamases à spectre étendu

**BTS:** Bacterial test standard

## C

**C1G:** Céphalosporines de première génération

**C2G:** Céphalosporines de deuxième génération

**C3G:** Céphalosporines de troisième génération

**C4G:** Céphalosporines de quatrième génération

**cAmpC:**  $\beta$ -lactamase de classe C (céphalosporinase chromosomique)

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

**CAZ:** Céfotaxime

**CIP:** Ciprofloxacine

**CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute

**CMI:** Concentration minimale inhibitrice

**CMY:** Résistance aux Céphamycines

**CN:** Gentamicine

**CT:** Colistine

**CTAB:** Cetyl trimethyl ammonium bromide

**CTX:** Céfotaxime

**CTX-M:** Résistance au céfotaxime, premier isolement à Munich

**CTX<sup>R</sup>**: Résistance au céfotaxime



**dNTP**: Désoxynucléotides triphosphate



**EDS**: Eau distillée stérile

**EDTA**: Éthylène diamine tétra-acétique

**ETP**: Ertapénème



**F**: Forward

**FEP**: Cefepime

**FF**: Fosfomycine

**FOX**: Céfoxitine



**GES**: Guyana extended spectrum  $\beta$ -lactamase

**GS**: Gélose au sang



**HCCA**: Alpha cyano-4- hydroxy-cinnamic acid

**HPLC**: High-performance liquid chromatography



**I**: Intermédiaire

**IMP**: Imipenem resistant *Pseudomonas*

**IPM**: Imipénème



**KPC**: *Klebsiella pneumoniae* carbapénémase



**LB**: Luria–Bertani

**LPS**: Lipopolysaccharides

## M

**MALDI-TOF MS:** Matrix-assisted laser desorption/ionisation, TOF : Time-of flight mass spectrometry

**MBL:** Métallo  $\beta$ -lactamase

**MC:** MacConkey

**MCNP test:** Carba-Nordmann Poirel-Test modifié

**MH:** Muller-Hinton

**MLST:** Multi-locus sequence typing

## N

**NDM:** New Delhi metallo  $\beta$ -lactamase

## O

**OXA:** Oxacillinase

## P

**pAmpC:**  $\beta$ -lactamase de classe C (céphalosporinase plasmidique)

**Pb:** Paire de bases

**PCR:** Polymerase chain reaction

**PER:** *Pseudomonas* extended resistance

**PLP:** Protéines liant les pénicillines

## R

**Rv:** Reverse

## S

**SHV:** Sulfi-Hydroxile variable

**SOC:** Super Optimal avec répression Catabolite

**SXT:** Triméthoprime/Sulfaméthoxazole

## T

**TBE:** TRIS, borate, EDTA

**TE:** Tampon d'elution

**TFA:** Acide TriFluoroacétique

**TGC:** Tigécycline

**T/m:** Tour par minute

**TRI:** Témoins résistantes aux inhibiteurs

**TS:** Trypticase soja

**TSB:** Trypticase Soja Bouillon

**TSI:** Triple sugar iron

*U*

**UP:** Ultra pure

*Q*

**VEB:** Vietnam extended spectrum  $\beta$ -lactamase

**VIM:** Verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1.</b> Chronologie du développement d'antibiotiques et l'évolution de la résistance aux antibiotiques .....  | 5  |
| <b>Figure 2.</b> Différents modes d'action des antibiotiques.....  | 7  |
| <b>Figure 3.</b> Les structures chimiques des principales $\beta$ -lactamines et les inhibiteurs des $\beta$ -lactamases cliniquement disponible.....  | 14 |
| <b>Figure 4.</b> Exemples de distribution de l'espèce <i>E. coli</i> productrice de BLSEs, AmpC et carbapénèmases chez l'humain, les animaux de compagnie, le poulet, le bétail et les oiseaux sauvages dans les pays sur les voies de migration de la cigogne blanche ( <i>Ciconia ciconia</i> )..... | 42 |
| <b>Figure 5.</b> La cigogne blanche ( <i>Ciconia ciconia</i> ).....  | 43 |
| <b>Figure 6.</b> Phylogénétique de la famille <i>Ciconidae</i> selon <b>Kahl (1979)</b> .....  | 46 |
| <b>Figure 7.</b> Les aires de reproduction et d'hivernage de la cigogne blanche ( <i>Ciconia ciconia</i> )..   | 50 |
| <b>Figure 8.</b> Les voies de migration de la cigogne blanche ( <i>Ciconia ciconia</i> ).....  | 52 |
| <b>Figure 9.</b> Situation géographique du site d'étude.....   | 53 |
| <b>Figure 10.</b> Schéma général du premier protocole de screening sélectif.....   | 55 |
| <b>Figure 11.</b> Schéma général du deuxième protocole de screening sélectif.....  | 57 |
| <b>Figure 12.</b> Principe de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.....   | 59 |
| <b>Figure 13.</b> Schéma explicatif de la disposition des disques d'antibiotique pour la détection d'une BLSE par le test de synergie.....   | 64 |
| <b>Figure 14.</b> Schéma présentant le programme de PCR en temps réel utilisé.....   | 69 |
| <b>Figure 15.</b> Schéma présentant le programme de PCR standard utilisé.....  | 71 |
| <b>Figure 16.</b> Schéma représentant le programme de l'amplification de la PCR BigDye.....  | 74 |
| <b>Figure 17.</b> Protocole de conjugaison utilisé.....  | 77 |

|  |            |
|--|------------|
| <b>Figure 18.</b> Schéma générale représente le protocole du screening utilisé .....   | <b>82</b>  |
| <b>Figure 19.</b> Répartition des souches isolées de la première série de prélèvement selon les milieux sélectifs utilisés.....                      | <b>84</b>  |
| <b>Figure 20.</b> Répartition des souches isolées de la deuxième série de prélèvement selon les milieux sélectifs utilisés.....                      | <b>85</b>  |
| <b>Figure 21.</b> Prévalence globale des souches fermentaires dans l'ensemble des prélèvements...86  |            |
| <b>Figure 22.</b> Fréquences des souches bactériennes identifiées par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF dans l'ensemble des prélèvements..... | <b>88</b>  |
| <b>Figure 23.</b> Répartition des entérobactéries par milieux d'isolement.....   | <b>94</b>  |
| <b>Figure 24.</b> Pourcentages de l'antibiorésistance des souches de <i>E. coli</i> du 1 <sup>er</sup> prélèvement.....                              | <b>96</b>  |
| <b>Figure 25.</b> Pourcentages de l'antibiorésistance des souches de <i>E. coli</i> de 2 <sup>ème</sup> série de prélèvement.....                    | <b>97</b>  |
| <b>Figure 26.</b> Pourcentages de l'antibiorésistance des entérobactéries isolées autres que <i>E. coli</i> .....                                    | <b>100</b> |
| <b>Figure 27.</b> Pourcentages de l'antibiorésistance de l'espèce <i>C. freundii</i> .....   | <b>101</b> |
| <b>Figure 28.</b> Pourcentages de l'antibiorésistance de l'espèce <i>K. pneumoniae</i> .....   | <b>103</b> |
| <b>Figure 29.</b> Pourcentages de l'antibioresistance chez <i>E. aerogenes</i> .....   | <b>104</b> |
| <b>Figure 30.</b> Illustration de l'image de synergie entre les disques d'antibiotiques.....   | <b>107</b> |
| <b>Figure 31.</b> Fréquences des entérobactéries productrices de BLSEs.....  | <b>108</b> |
| <b>Figure 32.</b> Test de Hodge modifié positif pour une souche de <i>E. coli</i> (A1) productrice d'une carbapénémase.....                          | <b>109</b> |
| <b>Figure 33.</b> Fréquences des phénotypes de résistance enzymatique chez les entérobactéries isolées.....  | <b>110</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>Figure 34.</b> Fréquences des phénotypes de résistance enzymatique acquise aux $\beta$ -lactamines par espèce bactérienne.....   | <b>111</b> |
| <b>Figure 35.</b> Amplification du gène <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> par Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel.....  | <b>114</b> |
| <b>Figure 36.</b> Amplification du gène <i>bla</i> <sub>TEM</sub> par Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel.....  | <b>114</b> |
| <b>Figure 37.</b> Amplification du gène <i>bla</i> <sub>SHV</sub> par Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel.....  | <b>115</b> |
| <b>Figure 38.</b> Gel d'agarose après électrophorèse des produits de PCR du gène <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> et <i>bla</i> <sub>TEM</sub> des souches isolées.....  | <b>116</b> |
| <b>Figure 39.</b> Fréquences des $\beta$ -lactamases et différents variants obtenus chez l'espèce <i>E. coli</i> ..   | <b>118</b> |
| <b>Figure 40.</b> Répartition des souches de <i>E. coli</i> productrices de <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> et <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> chez les oiseaux sauvages dans le monde.....                              | <b>121</b> |
| <b>Figure 41.</b> Distribution de <i>E. coli</i> ST38 productrice de carabapénémase de type OXA-48 dans la plupart des pays inclus dans les principales voies de migration de la population de cigognes blanches..... | <b>128</b> |
| <b>Figure 42.</b> Arbre phylogénétique à base de MLST de la plupart des clones de <i>E. coli</i> productrices de $\beta$ -lactamases isolés chez les oiseaux migrateurs de la région méditerranéenne.....             | <b>130</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>Tableau 1.</b> Origines, structures chimiques, effet et spectre d'activité des principaux antibiotiques disponibles.....                  | <b>8</b>   |
| <b>Tableau 2.</b> Quelques caractéristiques de genres sélectionnés parmi les <i>Enterobacteriaceae</i> ...                                   | <b>22</b>  |
| <b>Tableau 3.</b> Phénotypes de résistance naturelle chez les entérobactéries.....   | <b>24</b>  |
| <b>Tableau 4.</b> Caractéristiques des BLSEs, AmpC et carbapénèmases.....  | <b>29</b>  |
| <b>Tableau 5.</b> Interprétation des scores d'identification bactérienne obtenue par MALDI-TOF MS.....                                       | <b>61</b>  |
| <b>Tableau 6.</b> Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI des antibiotiques utilisés chez les entérobactéries..... | <b>63</b>  |
| <b>Tableau 7.</b> Amorces et sondes utilisées pour les PCR en temps réel.....  | <b>67</b>  |
| <b>Tableau 8.</b> Composition des mélanges réactionnels pour les PCRs en temps réel.....   | <b>70</b>  |
| <b>Tableau 9.</b> Amorces utilisées en PCR standard et au séquençage.....  | <b>70</b>  |
| <b>Tableau 10.</b> Composition des mélanges réactionnels pour les PCR standard.....  | <b>72</b>  |
| <b>Tableau 11.</b> Composition du mélange réactionnel pour la PCR BigDye.....  | <b>74</b>  |
| <b>Tableau 12.</b> Tailles des séquences cibles, fonctions des gènes, et amorces utilisées en MLST.....                                      | <b>81</b>  |
| <b>Tableau 13.</b> Références, milieux d'isolement et identification des souches isolées.....  | <b>89</b>  |
| <b>Tableau 14.</b> Sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries isolées.....  | <b>92</b>  |
| <b>Tableau 15.</b> Résultats des tests de la détection phénotypique des $\beta$ -lactamases.....   | <b>105</b> |
| <b>Tableau 16.</b> Profil moléculaire des souches de <i>E. coli</i> productrices de BLSE.....  | <b>117</b> |
| <b>Tableau 17.</b> Séquences types des souches de <i>E. coli</i> testées des deux prélèvements.....  | <b>125</b> |

# *INTRODUCTION*

L'introduction de la pénicilline et d'autres antibiotiques dans le monde clinique, il y a environ 75 ans, a permis de réduire considérablement le nombre de décès, causées par des infections bactériennes, et de sauver des millions de vies (**Paitan, 2018**). Leur découverte a été un tournant dans l'histoire de l'humanité mais malheureusement, l'utilisation de ces médicaments miracles s'est accompagnée de l'apparition rapide de souches résistantes, les experts médicaux avertissent maintenant d'un retour à l'ère des pré-antibiotiques (**Davies et Davies, 2010**). La résistance des bactéries aux médicaments antimicrobiens présente donc un problème monumental de santé publique qui est inévitable au fil du temps (**Narver, 2017**).

Le problème de la résistance aux antibiotiques a fait l'objet d'une attention considérable en raison de l'émergence et de l'expansion rapide des bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques. Jusqu'à la fin des années 1990, les bactéries résistantes aux antibiotiques étaient essentiellement isolées chez les patients hospitalisés, ce n'est plus le cas aujourd'hui, la résistance aux antibiotiques étant également observée en dehors de l'hôpital (**Material, 2012**). A cet égard, différentes études ont signalé la mise en évidence des bactéries multirésistantes chez les animaux de compagnie, les animaux d'élevage ainsi que les aliments (**Dierikx et al., 2013**). Le rôle prédominant des activités humaines dans la génération de réservoirs environnementaux de résistance aux antibiotiques ne peut être contesté. Depuis les années 1940, des quantités croissantes d'antibiotiques désignés pour des applications humaines ont été fabriquées, utilisées cliniquement, rejetées dans l'environnement et largement diffusées, assurant ainsi une pression constante de sélection et de maintenance pour les populations de souches résistantes dans tous les environnements (**Davies et Davies, 2010**).

Les espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* sont connues pour causer divers types d'infections. L'épidémiologie des *Enterobacteriaceae* multirésistantes augmente rapidement et est devenue une menace globale. Le traitement des maladies causées par ces bactéries résistantes est beaucoup plus difficile lorsque les choix de traitement sont limités (**Niumsup et al., 2017**). Au cours des dernières années, les choix thérapeutiques pour les entérobactéries se contraignent sévèrement en raison du développement de la résistance aux antibiotiques multiples, la plus notable parmi celles-ci étant la résistance au groupe de  $\beta$ -lactamines tels que les céphalosporines et les carbapénèmes (**Sanjit Singh et al., 2017**). La résistance des *Enterobacteriaceae* aux  $\beta$ -lactamines est de plus en plus fréquente et est habituellement médiée par la production de  $\beta$ -lactamases (**Niumsup et al., 2017**).

La diffusion mondiale des *Enterobacteriaceae* productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSEs) et de carbapénèmases est un problème majeur qui pose un sérieux défi au traitement des maladies infectieuses. Ces bactéries ont également été signalées de plus en plus chez les bétails et les animaux de compagnie. Depuis la première détection des *Enterobacteriaceae* productrices de BLSEs d'origine sauvage en 2006, de nombreuses études ont révélé leur apparition. À ce jour, au moins de 80 espèces sauvages ont été considérées comme des porteurs de *Enterobacteriaceae* productrices de BLSEs, la plupart étant des oiseaux sauvages (Wang et al., 2017). De nombreuses études à l'échelle mondiale ont montré le rôle des oiseaux migrateurs comme porteurs de bactéries multirésistantes, cependant il existe très peu d'informations disponibles sur les entérobactéries productrices de carbapénèmases isolées chez ces espèces (Oteo et al., 2018).

La cigogne blanche (*Ciconia ciconia*) est l'un des oiseaux migrateurs qui a une grande distribution en Europe, couvrant la majeure partie du continent, ainsi que le sud de la Méditerranée, où il se reproduit dans le nord de l'Algérie et le Maroc (Shephard et al., 2013). Chez les oiseaux migrateurs, les niveaux de résistance peuvent être élevés en raison en grande partie de leur comportement d'alimentation. La plupart d'entre eux ont l'habitude de chercher de la nourriture dans les zones agricoles et urbaines, les égouts et les poubelles, ce qui facilite l'acquisition de bactéries résistantes provenant de sources humaines et animales (Alcalá et al., 2015).

C'est dans cette optique que notre étude a comme objectif principal de vérifier l'éventualité de la transmission et la dissémination des gènes de résistance à travers cette espèce migratrice. C'est pour cette raison nous nous sommes intéressés par le criblage des entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3<sup>me</sup> génération et/ou aux carbapénèmes, isolées des fientes d'une colonie de la cigogne blanche (*Ciconia ciconia*) de la Commune d'El Madher de la wilaya de Batna, l'identification du support moléculaire de la résistance aux  $\beta$ -lactamines et les types de séquences ainsi que l'étude de la possibilité de transférabilité des gènes résistants aux carbapénèmes. Ce travail est présenté en trois parties:

-La première partie de ce document traite deux chapitres, le premier présente une synthèse bibliographique sur les différents mécanismes de résistance aux antibiotiques et le deuxième est consacré aux données sur l'espèce de la cigogne blanche (*Ciconia ciconia*).

-La seconde partie est réservée pour la présentation de tous les outils et les protocoles expérimentaux utilisés pour la réalisation de ce travail. Deux séries de prélèvements ont été

effectuées et un protocole de criblage sélectif a été appliqué. Les souches isolées font l'objet d'une identification biochimique, une étude du profil de la résistance aux antibiotiques et une caractérisation phénotypique de différents mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines. Ces différentes études ont été réalisées au niveau du laboratoire de microbiologie du département de microbiologie et biochimie à l'université de Batna 2.

-L'identification par spectrométrie de masse douce MALDI-TOF des entérobactéries, la caractérisation moléculaire des gènes responsables de la résistance aux  $\beta$ -lactamines, les essais de transférabilité des souches productrices de carbapénèmases ainsi que le typage moléculaire ont été réalisés au niveau de l'Unité de Recherche Sur Les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes (URMITE), UM 63, CNRS 7278, IRD 198, INSERM 1095, IHU Méditerranée Infection, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Aix-Marseille-Université, Marseille, France.

-La troisième partie est consacrée à la présentation des résultats et leur discussion qui se terminera par une conclusion et des perspectives pour les futures recherches.

*Partie 1.*

***REVUE***

***BIBLIOGRAPHIQUE***

Chapitre 1

***ANTIBIORÉSISTANCE***

***ET***

***ENTÉROBACTÉRIES***

## 1 Les antibiotiques

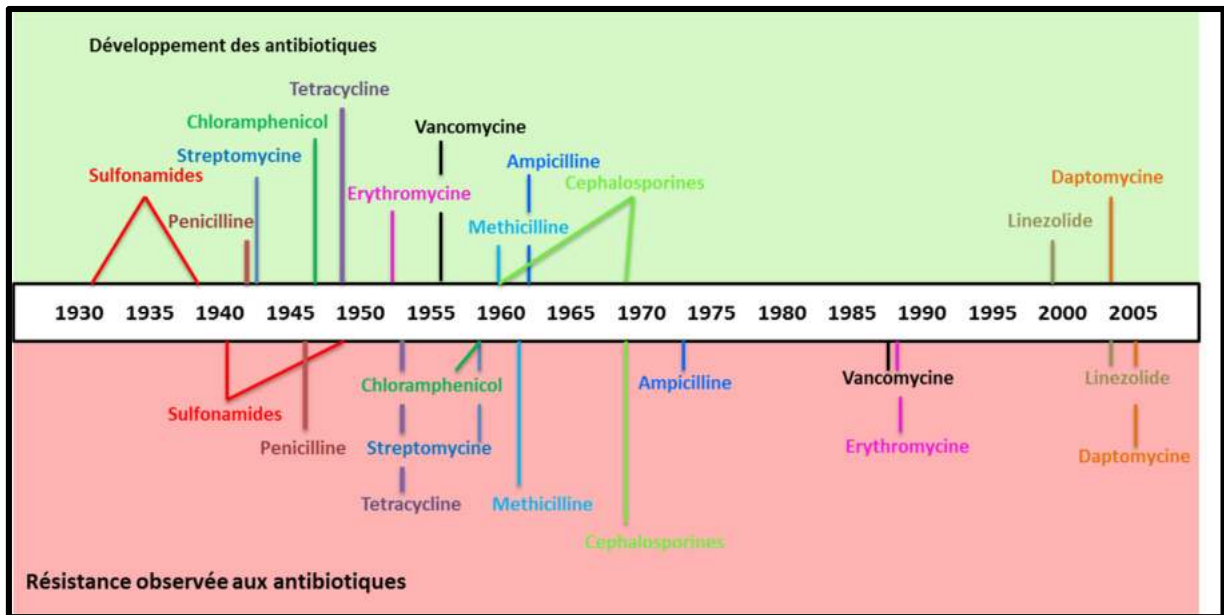
### 1.1 Historique

La découverte des antibiotiques fut un réel tournant pour la thérapeutique des maladies infectieuses humaines et animales (**Guardabassi et al., 2004**). Le terme d'antibiose qui signifie (qu'un micro-organisme peut en détruire un autre) a été introduit par Pasteur en 1877 (**Scheper, 2004**). Mais c'est beaucoup plus tard, et en 1929, que le docteur Alexander Fleming redécouvrit ce phénomène. Dans sa recherche, Fleming s'est intéressé aux staphylocoques. Il remarqua que les colonies de staphylocoques proches de la moisissure *Penicillium Notatum* étaient mortes (**Sköld, 2006**). Trois ans plus tard, il a été montré que cette inhibition de croissance était due à la pénicilline. Le travail a été examiné bien avant à l'université d'Oxford par le pathologiste Howard Florey et les biochimistes Ernst Chain et Norman Heatley. Les premiers essais cliniques avec la pénicilline n'ont été entrepris qu'en 1941 (**Scheper, 2004**).

L'énorme succès de la pénicilline comme agent antibactérien isolé d'un organisme vivant a induit une recherche intensive pour la découverte de plus d'antibiotiques. A l'université de Rutgers un autre célèbre antibiotique a été découvert, c'est la streptomycine. Elle est produite par un micro-organisme vivant dans le sol, *Streptomyces griseus*. Cette substance fut découverte par Selman Waksman en 1943 (**Sköld, 2006**).

Plus de 12 000 composés d'origine microbienne avec une activité antimicrobienne ont été isolés après 80 ans de la découverte des antibiotiques (**Gualerzi et al., 2013**). Certains antibiotiques semi synthétiques correspondent à la modification chimique d'antibiotiques naturels. D'autres enfin sont produits synthétiquement (**Dedet, 2007**).

Depuis ce temps et jusqu'à il y a quelques années seulement, les antibiotiques ont été considérés comme des médicaments dont l'efficacité clinique n'était quasiment jamais mise en défaut. Cela n'est plus vrai aujourd'hui, car on a pris pleinement conscience de la capacité des bactéries à développer facilement et rapidement différents mécanismes de résistance (**Mesaros, 2005**). L'intervalle de temps entre l'introduction d'un nouvel antibiotique et l'apparition de la résistance a rapidement augmenté depuis les années 1930, en grande partie en raison de l'abus et l'usage irraisonné d'antibiotiques (**Meredith et al. 2015**). La chronologie du développement d'antibiotiques et l'évolution de leurs résistance est présenté dans la figure 1.



**Figure 1.** Chronologie du développement d'antibiotiques et l'évolution de la résistance aux antibiotiques (Clatworthy et al., 2007).

## 1.2 Définition

Selon l'étymologie du mot "antimicrobien" (du grec anti, signifiant "contre", mikros, signifiant "petit", et bios, qui signifie "la vie"), les agents antimicrobiens sont des substances qui ont la capacité d'agir contre la vie de micro-organismes (Guardabassi et Courvalin, 2006).

On a longtemps appelé antibiotique toute substance chimique produite par un micro-organisme (bactérie ou champignon) et capable d'inhiber la croissance ou de détruire d'autres micro-organismes. A l'heure actuelle, cette définition trop restrictive doit être abandonnée, car des substances obtenues par synthèse chimique possèdent les mêmes propriétés (Walsh, 2000).

Leurs cibles d'activité sont des structures moléculaires, spécifiquement bactériennes. Elles ont donc une toxicité sélective pour les cellules procaryotes et une toxicité faible pour les cellules eucaryotes (Pittsburgh, 2003).

## 1.3 Notion de spectre d'activité

Le spectre d'activité d'un antibiotique, c'est le groupe des espèces sur lesquelles il est actif. Pour un antibiotique donné l'activité antibactérienne ne s'exerce que vis-à-vis de certaines espèces bactériennes. Les espèces constamment résistantes possèdent ce qu'on appelle une

résistance naturelle. Lorsque dans une espèce, la sensibilité, des souches résistantes à un antibiotique, apparaît, on utilise le terme de résistance acquise (**Nauciel et Vildé, 2005**).

Lorsqu'une antibiothérapie probabiliste est mise en place, l'étude de la concentration minimale inhibitrice (CMI) permet d'évaluer précisément le niveau de sensibilité ou de résistance d'une souche et guidera le choix de la molécule, de la posologie et participera dans les mesures à prendre pour la surveillance du traitement antibiotique (**Aubert et Carricajo, 2004**).

La CMI est la méthode de référence pour mesurer l'activité d'un antibiotique, vis-à-vis d'une souche bactérienne donnée (**Nauciel et Vildé, 2005**). Elle convient à la plus faible concentration capable d'inhiber toute croissance visible des bactéries d'un inoculum dont la taille est déterminée ( $10^4$  à  $10^5$  bactéries) dans un milieu de croissance spécifique et en conditions de cultures standardisées (18 à 24 heures d'incubation, à pression atmosphérique et à une température comprise entre 35 et 37°C pour les bactéries aérobies et aéro-anaérobies) (**Muylaert et Mainil, 2012**).

#### 1.4 Effets des antibiotiques

En fonction de leur concentration et le temps de contact sur la bactérie, les antibiotiques peuvent être bactéricides ou bactériostatiques.

-L'effet bactéricide est la destruction complète du germe.

-L'effet bactériostatique est l'inhibition de la croissance du germe (**Nauciel et Vildé, 2005**).

Cette classification, comme la plupart des classifications, est tout à fait arbitraire car le même antibiotique peut avoir soit un effet bactériostatique ou bactéricide selon sa concentration, le type, la quantité et l'état de croissance de la bactérie, ainsi que les conditions expérimentales dans lesquelles son activité est évaluée (**Guardabassi et Courvalin, 2006**).

#### 1.5 Critères de classification des antibiotiques

La classification des antibiotiques peut se faire en se basant sur différents critères: leurs origines, naturelles ou synthétiques, leur effet sur les bactéries, bactéricide ou bactériostatique et leur mode d'action. Selon leurs structures chimiques, ils sont classés en différentes familles: les  $\beta$ -lactamines, les polymyxines, les aminoglycosides, les quinolones, les phénicolés et les cyclines (**Kohanski et al., 2010**).

Les différentes caractéristiques (origines, structures chimiques, effet et spectre d'activité) des principaux antibiotiques disponibles sont résumées dans le tableau 1.

## 1.6 Mécanismes d'action

Les mécanismes d'action de la plupart des antibiotiques ont été élaborés après la découverte des effets des molécules sur la croissance bactérienne, soit par une activité bactériostatique ou bactéricide (Walsch, 2003). Quatre grands mécanismes d'actions, montrées dans la figure 2 ont été classés.

### a. Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane

Ce sont les  $\beta$ -lactamines, les glycopeptides et la fosfomycine.

### b. Antibiotiques agissant au niveau de la membrane cytoplasmique

Ce sont les polymyxines.

### c. Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique

Ce sont les aminosides, les macrolides, les lincosamines et les streptogramines, l'acide fusidique, le chloramphénicol.

### d. Antibiotiques inhibiteurs du métabolisme des acides nucléiques

Ce sont les quinolones, les rifamycines et les sulfamides (Walsch, 2003).

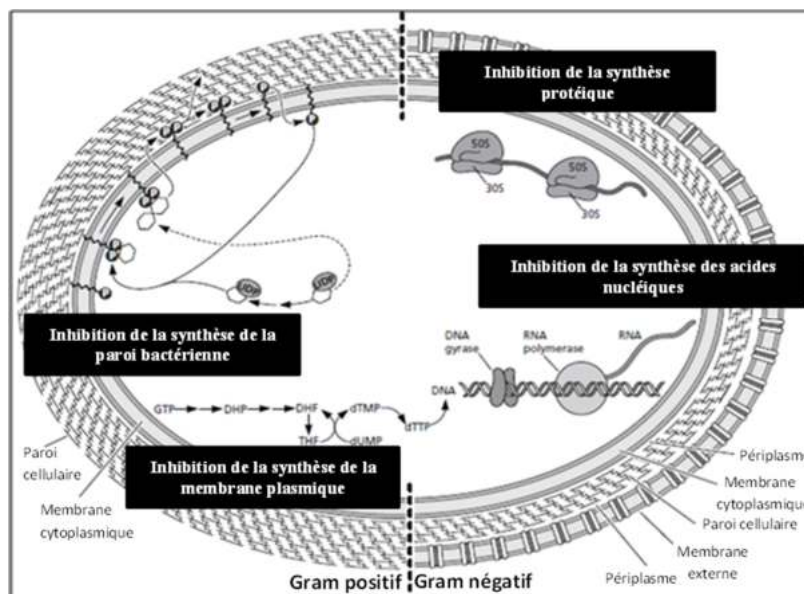


Figure 2. Différents modes d'action des antibiotiques (Walsch, 2003).

**Tableau 1.** Origines, structures chimiques, effet et spectre d'activité des principaux antibiotiques disponibles.

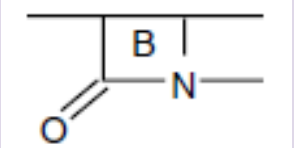
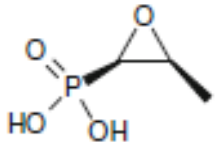
| Antibiotiques  | Origines   | Structure chimique   | Effet   | Spectre d'activité  |
|--|--|--|---|---|
| <b>β-lactamines</b><br>(Pénicillines,<br>céphalosporines,<br>monobactames,<br>et carbapénèmes) | - Naturelle: <i>Filamentous fungus, Acremonium chrysogenum</i><br><b>(Scheper, 2004)</b><br>-Semi synthétique <b>(Cavallo et al., 2004)</b>                            | <br>Noyau β-lactame<br><b>(Finche et al., 2010)</b> | Bactéricide<br><b>(Cavallo et al., 2004)</b>          | Active sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif <b>(Katzung et al., 2012)</b>   |
| <b>Fosfomycine</b>   | - Naturelle :<br><i>Streptomyces spp.</i><br><i>Pseudomonas syringae</i><br><b>(Gualerzi et al., 2013)</b><br>- Synthétique<br><b>(Guardabassi et Courvalin, 2006)</b> | <br><b>(Costa et Wright, 2009)</b>                  | Bactéricide<br><b>Guardabassi et Courvalin, 2006)</b> | Excellente activité contre les cocci à Gram positif et une très bonne activité contre de nombreuses bactéries à Gram négatif<br><b>(Michalopoulos et al., 2008)</b> |

Tableau 1. (Suite)

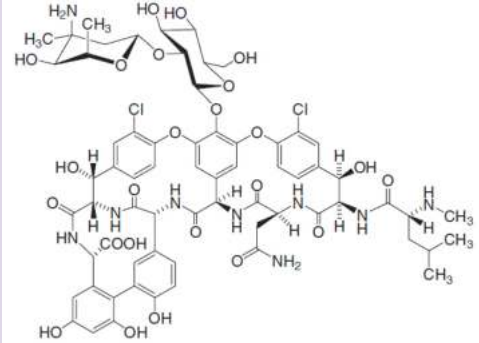
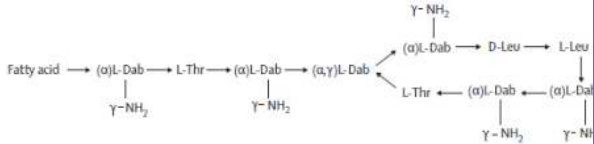
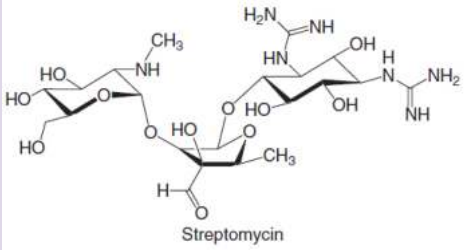
| Antibiotiques  | Origines   | Structure chimique   | Effet   | Spectre d'activité   |
|--|--|--|---|--|
| <b>Glycopeptides et glycolipopeptides:</b><br>(vancomycine, teichoplanine)<br>(Sköld, 2006)    | -Naturelle : <i>Streptomyces orientalis</i> (Sköld, 2006)<br>-Semi-synthétique (Michalopoulos et al., 2008)  |  <p>(Sköld, 2006)</p>                    | Bactéricide<br>(Singh et Barrett, 2006)         | Bactérie à Gram positif<br>(Gallagher et MacDougall, 2011)                     |
| <b>Colistine (polymyxine E)</b>  | -Naturelle : <i>Bacillus polymyxa</i> (Singh et Barrett, 2006)   |  <p>(Singh et Barrett, 2006)</p>         | Bactéricide<br>(Michalopoulos et al., 2008)     | Bactéries à Gram négatif<br>(Singh et Barrett, 2006)                           |
| <b>Aminoglycosides</b><br>(gentamicine, tobramycine, amikacine, streptomycine, spectinomycine) | - Naturelle: <i>Streptomyces</i> spp. <i>Micromonospora</i> spp. (Singh et Barrett, 2006)<br>;Guardabassi et |  <p>Streptomycin<br/>(Sköld, 2006)</p> | Bactéricide<br>(Guardabassi et Courvalin, 2006) | Cocci à Gram positif et les bacilles à Gram négatif<br>(Kohanski et al., 2010) |

Tableau 1. (Suite)

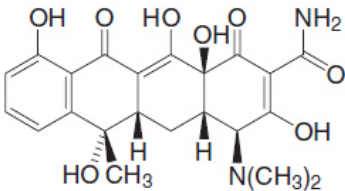
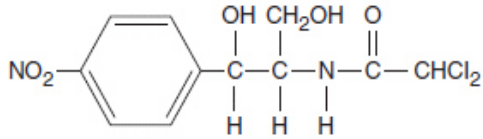
| Antibiotiques  | Origines   | Structure chimique   | Effet  | Spectre d'activité  |
|--|--|--|--|---|
| (Finche et <i>al.</i> , 2010)                                      | Courvalin, 2006)   |  |  |   |
| <b>Tetracyclines :</b><br>(doxycycline, minocycline, tetracycline) | -Naturelle :<br><i>Streptomyces aureofaciens</i> ,<br><i>Streptomyces rimosus</i> ,<br><i>Micromonospora</i> et<br><i>Actinomadura brunea</i><br>(Gualerzi et <i>al.</i> , 2013)<br>-Semi-synthétique<br>(Kohanski et <i>al.</i> , 2010) |  <p style="text-align: center;">Tetracycline<br/>(Sköld, 2006)</p>                     | Bactériostatique<br>(Katzung et <i>al.</i> , 2012)   | Bactéries aérobies à Gram positif et à Gram négatif<br>(Kohanski et <i>al.</i> , 2010)  |
| <b>Phénicolés :</b><br><b>Chloramphénicol</b>                      | - Naturelle<br><i>Streptomyces venezuelae</i><br>(Guardabassi et Courvalin, 2006)  |  <p style="text-align: center;">Chloramphenicol<br/>(Katzung et <i>al.</i>, 2012)</p> | Bactériostatique<br>(Guardabassi et Courvalin, 2006) | Cocci à Gram positif<br>(Katzung et <i>al.</i> , 2012)<br>Certaines espèces à Gram négatif<br>(Kohanski et <i>al.</i> , 2010) |

Tableau 1. (Suite)

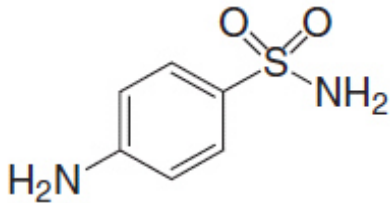
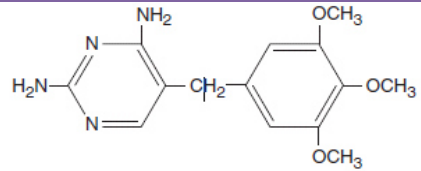
| Antibiotiques  | Origines   | Structure chimique  | Effet   | Spectre d'activité   |
|--|--|---|---|--|
| <b>Phénicolés :</b><br><b>Chloramphénicol</b><br>(suite)                     | -Semi-synthétique<br>(Singh et Barrett,<br>2006) |   |   |  |
| <b>Sulfamide</b>   | -Synthétique<br>(Gualerzi et al., 2013)          |  <p>(Sköld, 2006)</p>                     | Bactériostatique<br>(Guardabassi et<br>Courvalin, 2006) | Bactéries à Gram positif et à<br>Gram négatif (Finche et al.,<br>2010) |
| <b>Trimethoprim-<br/>sulfamethoxazole</b><br>(Trimethoprim<br>Pyrimethamine) | -Synthétique<br>(Muylaert et Mainil,<br>2012)    |  <p>Trimethoprim</p> <p>(Sköld, 2006)</p> | Bactériostatique<br>(Guardabassi et<br>Courvalin, 2006) | Bactéries à Gram négatif<br>(Finche et al., 2010)                      |

Tableau 1. (Suite)

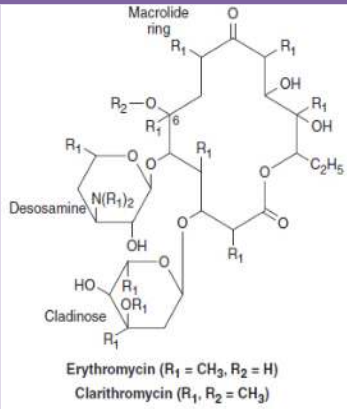
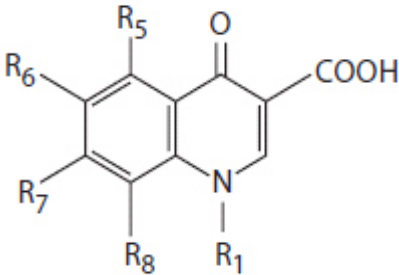
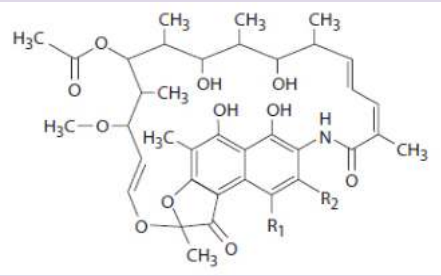
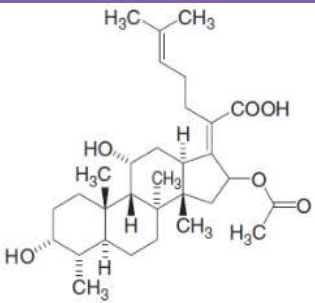
| Antibiotiques   | Origines   | Structure chimique  | Effet   | Spectre d'activité  |
|---|--|---|---|---|
| <b>MLSB:</b><br><b>macrolides,</b><br><b>lincosamides et</b><br><b>streptogramin B</b><br>(clarithromycine,<br>azithromycine,<br>Erythromycine) | - Naturelle:<br><i>Streptomyces erythreus</i><br><b>(Guardabassi et Courvalin, 2006)</b><br>- Synthétique<br><b>(Sköld, 2006).</b> |  <p style="text-align: center;"><b>(Katzung et al., 2012)</b></p> | Bactériostatique<br><b>(Guardabassi et Courvalin, 2006)</b> | Bactéries à Gram négatif et à Gram positif<br><b>(Kohanski et al., 2010)</b><br><b>(Katzung et al., 2012)</b>   |
| <b>Quinolones</b>   | -Synthétique<br><b>(Singh et Barrett, 2006)</b>  |  <p style="text-align: center;"><b>(Finche et al., 2010)</b></p> | Bactéricide<br><b>(Gallagher et MacDougall, 2011)</b>       | Excellente activité contre les bactéries aérobies à Gram négatif et une activité limitée contre les bactéries à Gram positif<br><b>(Katzung et al., 2012)</b> |

Tableau 1. (Suite)

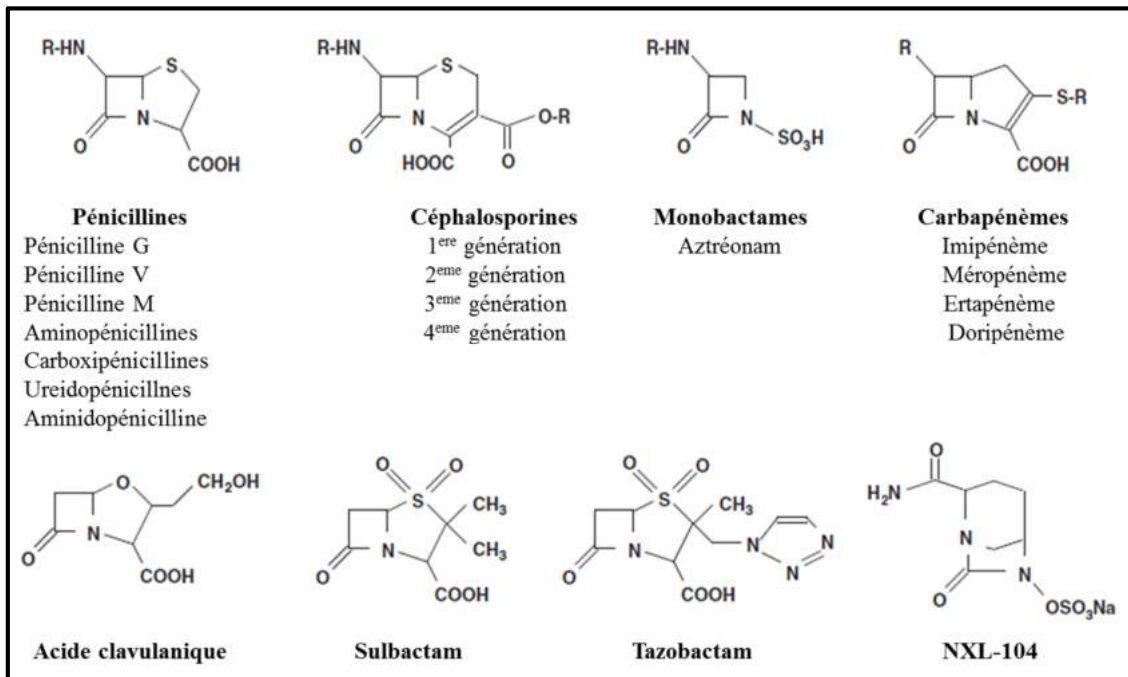
| Antibiotiques  | Origines  | Structure chimique   | Effet  | Spectre d'activité  |
|--|---|--|--|---|
| <b>Rifamycines:</b><br>(rifabutine,<br>rifapentine,<br>rifaximine) | -Naturelle :<br>Actinomycetes:<br><i>Amycolatopsis<br/>           mediterranei</i><br><b>(Finche et al.,<br/>           2010)</b><br>-Semi synthétique<br><b>(Gualerzi et al.,<br/>           2013)</b> |  <p style="text-align: center;"><b>(Finche et al., 2010)</b></p> | Bactéricide<br><b>(Guardabassi et<br/>           Courvalin, 2006)</b><br>Bactériostatique<br>contre les bactéries à<br>Gram négatif<br><b>(Kohanski et al.,<br/>           2010)</b> | Bactéries à Gram négatif<br><b>(Kohanski et al., 2010)</b> et<br>à Gram positif <b>(Gualerzi<br/>           et al., 2013)</b> |
| <b>Acide fusidique</b>   | - Naturelle:<br><i>Fusidium<br/>           coccineum</i><br><b>(Finche et al.,<br/>           2010)</b>   |  <p style="text-align: center;"><b>(Sköld, 2006)</b></p>        | Bactériostatique<br><b>(Guardabassi et<br/>           Courvalin, 2006)</b>   | Active contre les<br>bactéries à Gram positif<br><b>(Gualerzi et al., 2013)</b>   |

## 1.6.1 Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane

### 1.6.1.1 $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -lactamines ont la capacité de détruire les bactéries sensibles en inhibant la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane, un constituant fondamental de la paroi bactérienne. Elles se fixent sur la transpeptidase, l'enzyme de la dernière étape de synthèse du peptidoglycane selon leur affinité pour une ou plusieurs protéines liant la pénicilline (PLP) (Mesaros, 2005). Leur reconnaissance par les transpeptidases aboutit à la fixation du cycle  $\beta$ -lactame sur le site actif de ces enzymes cibles. Cette fixation entraîne une ouverture du cycle  $\beta$ -lactame par rupture de la liaison amide et une acylation du site actif sérine avec formation d'un complexe pénicillo-enzymatique covalent qui aboutit à l'inactivation du site actif de l'enzyme, provoquant une inhibition de la synthèse du peptidoglycane et l'arrêt de la croissance bactérienne (Cavallo *et al.*, 2004).

La famille des  $\beta$ -lactamines comprend un nombre important de molécules, toutes présentent un cycle  $\beta$ -lactame indispensable à l'activité d'antibiotique: les pénames (pénicillines), les céphèmes (céphalosporines), les monobactames, les pénèmes (carbapénèmes) et les inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases. Ces classes sont présentées dans la figure 3 (Nordmann *et al.*, 2012).



**Figure 3.** Les structures chimiques des principales  $\beta$ -lactamines et les inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases cliniquement disponible (Nordmann *et al.*, 2012).

#### 1.6.1.1.1 Pénames

La classe des pénicillines est composée d'un grand groupe de composés bicycliques pénames qui diffèrent par la nature du radical fixé sur le carbone 6 (**Gallagher et MacDougall, 2011**) et se répartissent en six sous-groupes.

- Groupe 1: la benzylpénicilline et ses formes parentérales à longue durée d'action.
- Groupe 2: les pénicillines absorbées par voie orale similaire à la benzylpénicilline.
- Groupe 3: les isoxazoypénicillines, des pénicillines qui sont relativement stables pour Les  $\beta$ -lactamases, mais qui n'ont pas d'activité utile contre les bacilles à Gram négatif, plusieurs sont structurellement liées.
- Groupe 4: se sont des composés avec une activité élevée contre certains bacilles à Gram négatif, y compris de nombreuses entérobactéries et de *Haemophilus influenzae*, mais qui sont inactivés par les staphylocoques et beaucoup de  $\beta$ -lactamases de la famille des entérobactéries.
- Groupe 5: pénicillines actives contre *Pseudomonas aeruginosa*. Il s'agit notamment de carboxypénicillines (et leurs esters absorbés par voie orale) et les dérivés d'ampicilline.
- Groupe 6: pénicillines résistantes aux  $\beta$ -lactamases de la famille des entérobactéries (**Finche et al., 2010**).

#### 1.6.1.1.2 Céphèmes

Les céphalosporines se distinguent chimiquement des pénicillines par le remplacement du cycle thiazolidine par un cycle dihydrothiazine (**Gallagher et MacDougall, 2011**). Elles sont classées en fonction de leur date d'apparition, qui correspond à chaque fois à l'acquisition de nouvelles propriétés.

##### a. Céphalosporines de première génération (C1G)

Relativement résistantes aux pénicillines, peuvent être ainsi actives sur des souches résistantes aux pénicillines à large spectre. Détruites par les céphalosporinases de nombreux bacilles à Gram négatif.

- Exp: Céfaclor, Céfadroxil, Céfalexine, Céfapirine, Céfatrizine, Céfazoline, Céfradine.

##### b. Céphalosporines de deuxième génération (C2G)

Elles se distinguent des C1G par une relative résistance à certaines céphalosporinases et un léger gain d'activité sur les souches sensibles.

Exp: Céfoxitine, Céfotétan, Céfuroxime.

#### c. Céphalosporines de troisième génération (C3G)

Elles ont une meilleure activité que les C2G sur les souches sensibles et une résistance accrue à l'inactivation par les céphalosporinases.

- Exp: Ceftizoxime, Ceftriaxone, Céfotaxime, Ceftazidime.

#### d. Céphalosporines de quatrième génération (C4G)

Elles restent actives chez les entérobactéries ayant acquis une résistance aux C3G par hyperproduction d'une céphalosporinase, et inactives en cas de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE).

- Exp: Céfépime, Cefpirome (**Cavallo et al., 2004**).

#### 1.6.1.1.3 Carbapénèmes

Les carbapénèmes présentent un cycle de base qui diffère de celui des pénicillines par la présence d'une double liaison et d'un atome de carbone au lieu d'un soufre en position 1 (**Gallagher et MacDougall, 2011**). Ils présentent un spectre d'activité plus large en comparaison avec la pénicilline, les céphalosporines et les associations  $\beta$ -lactamines/ $\beta$ -lactamases. En général, les carbapénèmes ayant différentes activités antibactériennes. L'imipénème, le panipénème et le doripénème sont efficaces contre les bactéries à Gram positif, tandis que, l'ertapénème, le méropénème, le biapénème et le doripénème étaient un peu efficace contre les bactéries à Gram négatif (**El-gamal et al., 2017**).

#### 1.6.1.1.4 Monobactames

Le noyau des monobactames est limité au cycle  $\beta$ -lactame (**Cavallo et al., 2004**). Les premiers monobactames ont été isolés de substances naturelles produites par *Chromobacterium violaceum*, mais les produits récents sont entièrement synthétiques. Le seul produit utilisé actuellement est l'aztréonam qui a une forte activité contre les bactéries aérobies à Gram négatif, mais il est pratiquement inactive contre les bactéries à Gram positif et les anaérobies (**Cojocel, 2007**).

### 1.6.1.2 La fosfomycine

La fosfomycine modifie de façon covalente l'enzyme MurA, une protéine essentielle nécessaire à la synthèse de l'acide N-acétylmuramique l'un des constituants de peptidoglycane de la paroi bactérienne (**Gualerzi et al., 2013**).

## 1.6.2 Antibiotiques agissant au niveau de la membrane cytoplasmique

### 1.6.2.1 Les polymyxines

Les polymyxines agissent comme des détergents cationiques, en attaquant les groupes phosphates de phospholipides membranaires. Les premières interactions avec la cellule semblent dépendre de la reconnaissance par les lipopolysaccharides (LPS) dans la membrane externe suivie de la translocation de cette dernière à la membrane cytoplasmique. Le résultat final est la fuite du contenu cytoplasmique et la mort de la cellule. Divers facteurs, y compris la phase de croissance et la température d'incubation, peuvent modifier l'équilibre des acides gras au sein de la membrane cellulaire des bactéries, ce qui peut en même temps avoir une incidence sur la réponse aux polymyxines (**Finche et al., 2010**).

## 1.6.3 Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique

### 1.6.3.1 Les aminosides

Les aminosides sont les seuls antibiotiques bactéricides ciblant le ribosome. Tous les membres de cette classe se lient irréversiblement à un site de l'ARNr 16S, mais il existe des différences dans le nombre et l'emplacement des sites cibles (**Guardabassi et Courvalin, 2006**). Le principal mode d'interaction est prévu par la liaison hydrogène et les contacts ioniques entre les groupes amines et hydroxyles d'antibiotique et l'ARNr 16S (**Guardabassi et Courvalin, 2006**).

### 1.6.3.2 Les tétracyclines

Elles se lient aux différents sites sur la sous-unité 30S, mais seulement la liaison au site cible principal à proximité du site "A" a montré un effet sur la synthèse des protéines. Les études biochimiques indiquent que la tétracycline n'empêche pas la liaison de l'aminoacétyle ARNt au site A, mais supprime plutôt le mouvement de l'ARNt le long du ribosome, avec l'inhibition conséquente de la liaison du premier peptide (**Guardabassi et Courvalin, 2006 ;Gualerzi et al., 2013**).

## 1.6.4 Antibiotiques inhibiteurs du métabolisme des acides nucléiques

### 1.6.4.1 Les quinolones

Les quinolones exercent leur effet en inhibant l'action des topoisomérases de type II: l'ADN gyrase et la topoisomérase IV. Ces enzymes sont indispensables à la croissance bactérienne en contrôlant la topologie de l'ADN lors des étapes de réplication, de transcription, et de recombinaison/réparation de l'ADN. Ces enzymes tétramériques, homologues entre elles, sont composées de deux sous-unités GyrA et GyrB (ADN gyrase) ou ParC et ParE (topoisomérase IV) (Cattoir, 2012).

### 1.6.4.2 Les sulfamides

L'effet sélectif des sulfamides sur les bactéries est dû à leur effet inhibiteur sur la formation de l'acide folique. Les sulfamides étaient montrés comme interférant avec l'acide folique par sa similitude structurale avec l'acide para-aminobenzoïque (Sköld, 2006). Ils agissent comme des inhibiteurs compétitifs de dihydroptéroate synthétase, une enzyme impliquée dans la synthèse du folate (Gualerzi et al., 2013).

## 2 Résistance aux antibiotiques

### 2.1 Définition

Il existe un grand nombre de définitions pour l'expression « résistance bactérienne aux antibiotiques », qui sont basées sur des différents critères (génétiques, biochimiques, microbiologiques et cliniques) et qui ne se regroupent pas forcément (Guardabassi et Courvalin, 2006). Selon la définition microbiologique du terme, une souche est dite résistante lorsqu'elle se cultive en présence de concentration plus élevée en antibiotique comparativement à d'autres souches qui lui sont phylogénétiquement liées (Courvalin et Trieu-cuot, 2001).

### 2.2 Types de résistance

#### 2.2.1 Résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque est celle qui est présente dans toutes les souches de l'espèce considérée. Elle est toujours transmissible à la descendance, car son support génétique est le chromosome. La résistance naturelle détermine les phénotypes sauvages des espèces bactériennes vis-à-vis des antibiotiques (Ploy et al., 2005 ; Muylaert et Mainil, 2012).

#### 2.2.2 Résistance acquise

Contrairement à la résistance intrinsèque, la résistance acquise apparaît au sein d'une espèce suite à l'utilisation des antibiotiques. Elle existe grâce à l'acquisition d'un (ou de plusieurs) mécanisme de résistance qui détermine un phénotype bien précis. On décrit deux phénomènes principaux à la base de l'acquisition de résistances par modifications du génome bactérien, les mutations responsables des résistances endogènes, et l'acquisition horizontale de matériel génétique étranger responsable des résistances exogènes (**Mesaros et al., 2005 ; Muylaert et Mainil, 2012**).

### 2.3 Origine et évolution de la résistance des bactéries aux antibiotiques

Les gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques et les mécanismes de transfert qui y sont associés existent probablement depuis bien avant l'introduction des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire (**Muylaert et Mainil, 2012**). Actuellement, le pourcentage de souches résistantes à un antibiotique donné a souvent tendance à augmenter en fonction du temps d'utilisation de cet antibiotique. C'est le résultat de la pression de sélection des antibiotiques. Chez les bactéries, les gènes de résistance sont transmis à la descendance (transmission verticale), ils peuvent aussi être transmis à d'autres bactéries de la même espèce et rarement à des bactéries appartenant à des espèces différentes (transmission horizontale) (**Finche et al., 2010**). Les véhicules les plus importants de ce transfert de résistance sont les plasmides, les transposons et les intégrons.

#### - Plasmides

Des molécules d'ADN indépendantes du chromosome et capables d'autoréplication, de structure en général circulaire et de taille variable. Elles se caractérisent par la présence des gènes nécessaires au transfert par conjugaison (**Ploy et al., 2005 ; Muylaert et Mainil, 2012**).

#### - Transposons

Des éléments génétiques mobiles ont la capacité de se déplacer d'une région à une autre du chromosome ou bien du chromosome vers un plasmide et inversement (**Nauciel et Vildé, 2005**).

#### - Intégrons

Des éléments génétiques contenant un ou plusieurs gènes de résistance sous forme de cassettes qui sont des unités mobiles peuvent être facilement intégrées dans un intégron par un mécanisme de recombinaison spécifique du site (**Ploy et al., 2005**).

Le transfert horizontal par la conjugaison, la transformation et la transduction, est le principal mécanisme responsable de la dissémination des gènes de résistance au sein du monde bactérien et concerne 80% des cas de résistances aux antibiotiques retrouvés en médecine humaine (Ploy et al., 2005).

### 3 L'antibiorésistance chez les entérobactéries

#### 3.1 Généralité sur les entérobactéries

##### 3.1.1 Définition

La famille des *Enterobacteriaceae* est constituée par des genres bactériens qui sont rassemblés en raison de caractères bactériologiques communs :

- Bacilles à Gram négatif, le plus souvent courts (varient de 1 à 6 µm de long et de 0,3 à 1 µm de large).
- Immobiles ou mobiles par ciliatures péritriches (rare exception).
- Se développent aisément sur milieux nutritifs en aéro-anaérobiose.
- Acidifient le glucose par voie fermentative avec souvent production de gaz.
- Ne possèdent pas d'oxydase.
- Réduisent les nitrates en nitrites (Denis et al., 2007).

##### 3.1.2 Taxonomie

Règne: Bacteria.

Embranchement: Proteobacteria.

Classe: Gamma-proteobacteria.

Ordre: *Enterobacteriale*.

Famille: *Enterobacteriaceae*.

Sur le plan taxonomique, la famille des *Enterobacteriaceae* a actuellement 53 genres (et plus de 170 espèces). La nomenclature des *Enterobacteriaceae* a été créée sur les caractéristiques biochimiques et antigéniques. Récemment, l'application de nouvelles technologies telle que l'hybridation de l'ADN a abouti aux nombreux changements dans la classification des *Enterobacteriaceae* (Anonyme, 2015).

##### 3.1.3 Habitat

Les entérobactéries sont pour la plupart des hôtes normaux du tractus digestif de l'homme. Certaines sont trouvées dans l'environnement, d'autres chez les végétaux ou les animaux.

On trouve *Escherichia coli* en abondance dans la flore commensale, en particulier dans le tube digestif. Par ailleurs, elle est très répandue dans l'environnement: eaux, sols, et dans les aliments (Avril et al., 2000).

Les *Citrobacter* sont des bactéries commensales du tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud. Ils se présentent dans l'environnement et dans les eaux.

*Klebsiella pneumoniae* et *Klebsiella oxytoca* sont les espèces les plus souvent rencontrées. Elles sont fréquemment isolées des eaux, du sol et des végétaux. Elles sont présentes dans la flore fécale de l'homme et sont souvent commensales de la peau, des muqueuses et des voies respiratoires (Avril et al., 2000).

Les *Enterobacter* sont des commensaux du tube digestif de l'homme et des animaux. On les trouve dans les eaux, sur le sol, sur la peau et les muqueuses (Davin-regli et Pagès, 2015).

### 3.1.4 Caractères cultureux

L'ensemble de ces bactéries pousse habituellement très aisément sur milieux ordinaires. La température optimale de croissance est généralement de 35 à 37°C (Denis et al., 2007).

Les colonies sont lisses, bombées, brillantes et humides, elles ont 2 à 4 mm de diamètre (Avril et al., 2000).

### 3.1.5 Caractères biochimiques

Comme les entérobactéries ont une morphologie très semblable, on utilise des tests biochimiques pour les identifier après un examen préliminaire de leur morphologie, de leur mobilité et de leur croissance. Parmi les tests les plus communément utilisés sont: le type de fermentation, l'utilisation du lactose et du citrate, la production d'indole à partir du tryptophane, l'hydrolyse de l'urée et la production de sulfure d'hydrogène (Dedet, 2007).

### 3.1.6 Caractères antigéniques

L'identification biochimique doit être complétée pour certains genres par la sérotypie. Au sein de chaque genre, on individualise des espèces, par l'étude des caractères biochimiques ou antigéniques. Les entérobactéries se caractérisent toutes par des antigènes (Ag) de paroi («

somatiques ») ou antigènes O. Les entérobactéries mobiles possèdent en plus des antigènes de flagelle (« flagellaires ») ou antigènes H. Enfin, certains possèdent un antigène d'enveloppe ou antigène K (Prescott et al., 2003).

-Ag O: Ag de paroi constitué de LPS thermostable.

-Ag H: Ag flagellaire, il n'est présent que chez les souches mobiles. Il est constitué de flagelline thermolabile.

-Ag K: Ag capsulaire généralement constitué d'une couche externe de polysaccharides.

-Ag de Kunitz: ou *Enterobacteriaceae Common Antigen*. Ag spécifique des entérobactéries constituées d'un glycophospholipide.

-Ag d'adhésine (pili, fimbriae) (Denis et al., 2007).

Quelques caractéristiques de genres sélectionnés parmi les *Enterobacteriaceae* sont résumées dans le tableau 2.

**Tableau 2.** Quelques caractéristiques de genres sélectionnés parmi les *Enterobacteriaceae* (Prescott et al., 2003).

| Caractéristiques              | <i>Escherichia</i> | <i>Klebsiella</i> | <i>Enterobacter</i> | <i>Citrobacter</i> |
|-------------------------------|--------------------|-------------------|---------------------|--------------------|
| Rouge de méthyle              | +                  | (+) <sup>a</sup>  | (-) <sup>b</sup>    | +                  |
| Voges-proskauer               | -                  | +                 | +                   | -                  |
| Production d'indole           | +                  | d <sup>c</sup>    | -                   | d <sup>c</sup>     |
| Utilisation du citrate        | -                  | +                 | +                   | +                  |
| Production d'H <sub>2</sub> S | -                  | -                 | -                   | d <sup>c</sup>     |
| Uréase                        | -                  | +                 | -                   | +                  |
| β-galactosidase               | +                  | +                 | +                   | +                  |
| Gaz à partir de glucose       | +                  | +                 | +                   | +                  |
| Acide à partir de lactose     | +                  | +                 | +                   | d <sup>c</sup>     |
| Phénylalanine désaminase      | -                  | -                 | -                   | -                  |
| Lysine décarboxylase          | +                  | +                 | d <sup>c</sup>      | -                  |
| Ornithine décarboxylase       | +                  | -                 | +                   | +                  |

Tableau 2. (Suite)

| Caractéristiques                   | <i>Escherichia</i>  | <i>Klebsiella</i>                     | <i>Enterobacter</i>                     | <i>Citrobacter</i>                 |
|------------------------------------|---|---------------------------------------|---|------------------------------------|
| Mobilité                           | d <sup>c</sup>  | -                                     | +                                       | +                                  |
| Liquéfaction de la gélatine (22°C) | -   | -                                     | d <sup>c</sup>                          | -                                  |
| % GC                               | 48-52   | 53-58                                 | 52-60                                   | 50-52                              |
| Autres caractéristiques            | 1,1-1,5 sur<br>2,0-6,0 µm<br>Flagelles<br>péritriches si<br>mobiles | 0,3-1,0 sur<br>0,6-6,0 µm<br>Capsulés | 0,6-1,0 sur<br>1,2 -3,0 µm<br>Flagelles | 1,0 sur 2,0-6,0<br>µm<br>Flagelles |

(+)<sup>a</sup> généralement présent.

(-)<sup>b</sup> généralement absent.

d<sup>c</sup> variation entre souche et espèce dans la possession de ce caractère.

### 3.2 Résistance naturelle

Le mécanisme fondamental de résistance naturelle aux  $\beta$ -lactamines chez les entérobactéries est la production de  $\beta$ -lactamases. Elle est observée naturellement dans la plupart des espèces. Historiquement, quatre groupes d'entérobactéries ont été déterminés sur la base de phénotype de résistance naturelle aux  $\beta$ -lactamines. Depuis, l'évolution de la taxonomie et des connaissances dans le domaine des  $\beta$ -lactamases a conduit à la création de nouveaux groupes. Ainsi, 7 groupes d'entérobactéries peuvent être classés (**Robin et al., 2012**). Des phénotypes de résistance naturelle chez les entérobactéries sont présentés dans le tableau 3.

### 3.3 Résistance acquise

#### 3.3.1 Résistance aux $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -lactamines constituent la famille d'antibiotiques la plus importante, aussi bien par le nombre et la diversité des molécules utilisables que par leurs indications en thérapeutique des infections bactériennes. Cette famille, qui regroupe les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames, est caractérisée par la présence constante du cycle  $\beta$ -lactame associé à des cycles et des chaînes latérales variables (**Cavallo et al., 2004**).

Tableau 3. Phénotypes de résistance naturelle chez les entérobactéries (Robin et al., 2012).

| Groupes         | Espèces  | Gènes   | Phénotype de résistance  |
|-----------------|--|---|--|
| <b>Groupe 0</b> | <i>Proteus mirabilis</i> ,<br><i>Salmonella</i> .  | Aucun gène codant pour une $\beta$ -lactamase.  | Naturellement sensibles à toutes les $\beta$ -lactamines.  |
| <b>Groupe 1</b> | <i>Escherichia coli</i> ,<br><i>Shigella</i> .   | Un gène <i>ampC</i> codant pour une céphalosporinase constitutive de très bas niveau. | Sensibilité à toutes les $\beta$ -lactamines et/ou sensibilité intermédiaire aux C1G et/ou aux aminopénicillines avec et sans inhibiteurs. |
| <b>Groupe 2</b> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> ,<br><i>K. oxytoca</i> , <i>Citrobacter koseri</i> ,<br><i>Raoultella planticola</i> ,<br><i>Raoultella ornithinolytica</i> ,<br><i>Raoultella terrigena</i> ,<br><i>Escherichia hermannii</i> ,<br><i>Citrobacter gillenii</i> . | Pénicillinase chromosomique, constitutive exprimée à bas niveau.                      | Résistance aux aminopénicillines et aux carboxypénicillines.   |

Tableau 3. (Suite)

| Groupes         | Espèces  | Gènes  | Phénotype de résistance   |
|-----------------|--|--|---|
| <b>Groupe 3</b> | Principales bactéries:<br><i>Enterobacter cloacae</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. asburiae</i> ,<br><i>Serratia marcescens</i> ,<br><i>Citrobacter freundii</i> , <i>C. braakii</i> , <i>C. youngae</i> ,<br><i>Morganella morganii</i> ,<br><i>Providencia rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i> et <i>Hafnia alvei</i> . | Céphalosporinase AmpC inductible, résistante aux inhibiteurs et inductible par les $\beta$ -lactamines.  | Résistance aux aminopénicillines seules ou associées aux inhibiteurs et une résistance aux C1G.   |
| <b>Groupe 4</b> | <i>Yersinia enterocolitica</i> ,<br>et <i>Serratia fonticola</i> .   | Chez <i>Yersinia enterocolitica</i> :<br>céphalosporinase inductible + enzyme sensible aux inhibiteurs et une pénicillinase chromosomique de bas niveau.<br>Chez <i>Serratia. fonticola</i> une BLSE chromosomique et inductible). | Résistance aux aminopénicillines, aux carboxypénicillines et aux C1G ainsi qu'une résistance aux associations aminopénicillines-inhibiteurs qui est généralement présente chez <i>Y. enterocolitica</i> . |

Tableau 3. (Suite)

| Groupes          | Espèces  | Gènes                                  | Phénotype de résistance  |
|------------------|--|--|--|
| <b>Groupe 5</b>  | <i>Proteus vulgaris</i> et <i>Proteus penneri</i> .  | Céfuroximase inductible.               | Résistance aux aminopénicillines, aux C1G et au céfuroxime, ainsi qu'une sensibilité aux associations d'aminopénicillines-inhibiteurs. |
| <b>Groupes 6</b> | La plupart des espèces de <i>Kluyvera</i> ( <i>K. ascorbata</i> , <i>K. cryocrescens</i> , <i>K. georgiana</i> ), <i>Rahnella aquatilis</i> , <i>Erwinia perscinia</i> et <i>Citrobacter</i> ( <i>C. amalonaticus</i> , <i>C. farmeri</i> et <i>C. sedlakii</i> ). | BLSE de bas niveau ou BLSE inductible. | Résistances aux aminopénicillines, aux carboxypénicillines, aux C1G et au céfuroxime.  |

### 3.3.1.1 Résistances non enzymatiques

Cette résistance est liée à un défaut d'accumulation au contact de la cible (les PLP) suite à une de ces mécanismes :

#### 3.3.1.1.1 Modification de la cible

Les cibles des  $\beta$ -lactamines sont des protéines enzymatiques (PLP) insérées dans la surface externe de la membrane cytoplasmique. Les PLP interviennent dans la synthèse du peptidoglycane le constituant principal de la paroi bactérienne (Alanis et al., 2005). Ce mécanisme de résistance est très rare chez les entérobactéries (Robin et al., 2012).

#### 3.3.1.1.2 Diminution de la perméabilité

Les  $\beta$ -lactamines se retrouvent dans la membrane externe des entérobactéries via des porines. À ce titre, les changements de nombre des porines, la taille ou de sélectivité influencent le taux de diffusion de ces antibiotiques. La résistance acquise par imperméabilité est aussi décrite en liaison avec le dysfonctionnement d'une porine (Kumar et Schweizer, 2005).

La modification ou la perte de porines est assez remarquable chez les entérobactéries. À partir de ces modifications, on peut apercevoir trois phénotypes de résistance qui sont: une résistance de bas niveau à la céfoxitine, associée ou non à une résistance de bas niveau aux C1G et C2G, une résistance isolée aux C4G chez des souches hyperproductrices de céphalosporinases et une résistance aux carbapénèmes chez des souches hyperproductrices de céphalosporinases ou de BLSEs (Robin et al., 2012).

#### 3.3.1.1.3 Hyperproduction de système d'efflux

Le système d'efflux est responsable de la sécrétion des antibiotiques hors de la cellule et donc empêchant son accumulation intracellulaire à travers des pompes (ou des transporteurs). Ces pompes couvrent l'ensemble de l'enveloppe des bactéries à Gram négatif et sont donc particulièrement aptes à créer une synergie avec la réduction de la perméabilité de la membrane externe (absorption) pour lui donner une résistance aux antibiotiques. Les gènes chromosomiques codant des protéines membranaires de transport peuvent être responsables de la résistance à divers antibiotiques (Kumar et Schweizer, 2005).

### 3.3.1.2 Résistances enzymatiques

#### 3.3.1.2.1 Production de $\beta$ -lactamases

La production de  $\beta$ -lactamases est le mécanisme le plus fréquent trouvé chez les entérobactéries (Rubin et Pitout, 2014).

##### 3.3.1.2.1.1 Définition et mode d'action des $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases hydrolysent le cycle  $\beta$ -lactame en clivant le lien amine des  $\beta$ -lactamines. L'hydrolyse irréversible du noyau  $\beta$ -lactame entraîne alors l'inactivation de l'antibiotique et la perte totale de son activité antibactérienne. En fonction du substrat hydrolysé, on les appelle donc les pénicillinases, les céphalosporinases, les BLSE ou encore les carbapénémases. Plus de 400  $\beta$ -lactamases ont été signalés à ce jour, et de nouvelles  $\beta$ -lactamases continuent d'apparaître rapidement dans le monde entier (Li et al., 2007).

##### 3.3.1.2.1.2 Classification des $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont le plus souvent classés en deux: une classification moléculaire des  $\beta$ -lactamases, impliquant la connaissance de la structure primaire des  $\beta$ -lactamines a été proposée par Ambler (1980). Une classification fonctionnelle a été proposée par Bush et al. (1995), dans laquelle les auteurs tiennent compte de la fonctionnalité des  $\beta$ -lactamases (substrat, profil d'inhibition) et divisent ces enzymes en quatre groupes (1 à 4) avec plusieurs sous-groupes.

La classification moléculaire proposée par Ambler divise les  $\beta$ -lactamases en quatre groupes (A à D), qui portent sur des différences sur le plan phylogénétique. Les  $\beta$ -lactamases des classes A, C et D font partie des enzymes à sérine active, c'est-à-dire qui contiennent dans leur site actif une sérine qui intervient dans le mécanisme d'acétylation au cours de l'hydrolyse des  $\beta$ -lactamines. Par contre la classe B compris les métallo  $\beta$ -lactamases dont l'activité nécessite la présence d'ions métalliques (Philippon et Arlet, 2012). Les caractéristiques de BLSEs, AmpC et carbapénémases sont présentées dans le tableau 4.

**Tableau 4.** Caractéristiques des BLSEs, AmpC et carbapénèmases (Rubin et Pitout, 2014).

| Enzyme        | Classification d'Ambler            |          | Exemples   | Spectre de résistance   | Inhibiteurs                                      |
|---------------|------------------------------------|----------|--|---|--|
| BLSE          | Classe A et D                      |          | TEM (à l'exception de TEM-1, 2 et 13), SHV, CTX-M, OXA | Pénicillines, céphalosporines sauf les céphamycines et monobactames   | Acide clavulanique, tazobactame, sulbactame      |
| AmpC          | Classe C                           |          | CMY, FOX, ACT, MOX, ACC, DHA                           | Pénicillines, céphalosporines, céphamycines, monobactames             | Cloxacilline, acide boronique                    |
| Carbapénèmase | Metallo- $\beta$ -lactamases (MBL) | Classe B | NDM, VIM, IMP  | Pénicillines, céphalosporines, céphamycines, carbapénèmes             | EDTA   |
|               | Type KPC                           | Classe A | KPC  | Pénicillines, céphalosporines, céphamycines, carbapénème, monobactame | Acide clavulanique, tazobactame, acide boronique |
|               | Type OXA                           | Class D  | OXA-48   | Pénicillines, monobactame, carbapénème                                | NaCl   |

### 3.3.1.2.1.2.1 Pénicillinases acquises

La production de pénicillinases acquises attribue aux différents niveaux de résistance en fonction de la quantité d'enzyme produite. Le phénotype peut donc diversifier entre une résistance limitée aux amino et carboxypénicillines, et une résistance à haut niveau à toutes les pénicillines associées ou non aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases et aux C1G, voire celles de C2G (**Robin et al., 2012**). Elles sont en majorité d'origine plasmidique (**Lavigne et al., 2002**).

### 3.3.1.2.1.2.2 Pénicillinases résistantes aux inhibiteurs

Récemment, des pénicillinases résistantes aux inhibiteurs généralement de type TEM (TRI) ont été décrites. La bactérie serait résistante aux inhibiteurs suicides de  $\beta$ -lactamases (acide clavulanique, sulbactam, tazobactam) (**Lavigne et al., 2002**).

Un plus haut niveau de résistance comprend l'association pipéracilline/tazobactam, souvent une sensibilité intermédiaire aux C1G et parfois une résistance intermédiaire aux C4G est due lors d'une activité des enzymes résistantes aux inhibiteurs de type OXA ( $\beta$ -lactamases de classe D) (**Robin et al., 2012**).

### 3.3.1.2.1.2.3 $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE)

Les  $\beta$ -lactamases appartenant à la classe A sont les plus abondants, avec plus de 500 enzymes, y compris les plus importantes sur le plan clinique qui sont les  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) (**Liakopoulos et al., 2016**).

Classiquement, les BLSEs sont définies comme des enzymes appartenant à la classe A ou D de la classification d'Amblar, capables d'hydrolyser les pénicillines, les C1G, C2G, C3G et C4G et l'aztréonam. Les BLSEs n'hydrolysent pas les céphamycines telles que la céfoxitine mais peuvent inactiver les C4G (céfépime ou cefpirome) (**Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006**).

#### 3.3.1.2.1.2.3.1 $\beta$ -lactamases de type TEM

La TEM-1 a été signalée pour la première fois en 1965 à partir d'un isolat de *E. coli* provenant d'un patient à Athènes, en Grèce, dénommé Témoinira (d'où la désignation TEM) (**Paterson et Bonomo, 2005**). Les  $\beta$ -lactamases de type TEM est couramment rencontrés chez les bactéries à Gram négatif (**Bradford, 2001; Bradford et Dean, 2008**). La majorité des  $\beta$ -lactamases de ce type dérivent par quatre à sept mutations ponctuelles de l'enzyme originale (TEM-1 ou TEM-2). Ces mutations rendent l'enzyme capable d'hydrolyser les C3G, mais aussi

plus vulnérable à l'action des inhibiteurs (acide clavulanique) (**Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006**). Le TEM-1 est capable d'hydrolyser l'ampicilline, à un degré moindre l'oxacilline ou la céfalotine, et a une activité négligeable vis-à-vis des céphalosporines à spectre étendu (**Paterson et Bonomo, 2005**). Des modifications au niveau des promoteurs du gène *bla*<sub>TEM</sub> a conduit à l'identification de nouveaux dérivés comme le gène *bla*<sub>TEM-ID</sub> (**Leflon-Guibout et al., 2000**). Cependant il faut noter que les  $\beta$ -lactamases de type TEM-1, TEM-2, et TEM-13 ne sont pas des BLSEs (**Paterson et Bonomo, 2005**).

### 3.3.1.2.1.2.3.2 $\beta$ -lactamases de type SHV

Les  $\beta$ -lactamases de type SHV peuvent être plus fréquemment trouvés dans des isolats cliniques que tout autre type de BLSE. SHV désigne une variable sulfhydroxyle. Cette désignation a été faite parce qu'on pensait que l'inhibition de l'activité des SHV par le p-chloromercuribenzoate était liée au substrat et était variable selon le substrat utilisé pour le dosage (**Paterson et Bonomo, 2005**). Comme les enzymes de type TEM, les enzymes de type SHV dérivent par des mutations ponctuelles de l'enzyme originale SHV-1 (**Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006**). L'enzyme codée SHV-1 présente son activité contre les pénicillines et les C1G (**Bradford, 2001**). Un nombre de 189 variantes alléliques de type SHV ont été décrites, ayant développé une résistance aux C3G, monobactames et carbapénèmes. Les  $\beta$ -lactamases de type SHV-1 et SHV-12 ne sont pas des BLSEs (**Liakopoulos et al., 2016**).

### 3.3.1.2.1.2.3.3 $\beta$ -lactamases de type CTX-M

En dehors de ces enzymes dérivées de TEM et SHV, d'autres familles de BLSEs inhibées par l'acide clavulanique, sont placées dans la classe A. Le type CTX-M (en référence à son activité hydrolytique contre le céfotaxime) (**Bonnet, 2004**), constitue un nouveau groupe de  $\beta$ -lactamases plasmidiques qui détectait à l'origine, chez les entérobactéries (**Cavallo et al., 2004 ; Philippon, 2013**). Au niveau mondial, ces enzymes «émergentes» pourraient représenter très prochainement les BLSEs les plus fréquentes au sein des entérobactéries, après leur diffusion rapide (**Cattoir, 2008**). Les BLSEs de type CTX-M sont les plus performantes en termes de propagation et, dans plusieurs contextes, leur impact est actuellement comparable ou même supérieur à celui des BLSEs de type TEM et SHV (**Rossolini et al., 2008**). Les  $\beta$ -lactamases de type CTX-M peuvent hydrolyser le céfotaxime plus efficacement que la ceftazidime (**Paterson et Bonomo, 2005**). Certaines d'entre elles ont ensuite évolué vers un haut niveau de résistance à la ceftazidime telles que les enzymes CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-

M-19, CTX-M-23 ou encore CTX-M-32 dérivant par simple mutation de CTX-M-1 (**Philippon, 2013**). Les enzymes CTX-M sont fortement inhibées par le tazobactam que par l'acide clavulanique. Elles ont été retrouvées majoritairement chez *E. coli* et *Salmonella enterica*. Leur émergence est rapide parmi d'autres espèces et genres d'entérobactéries (**Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006**).

#### 3.3.1.2.1.2.3.4 $\beta$ -lactamases de type OXA

Les  $\beta$ -lactamases de type OXA (oxacilline) sont une autre famille de BLSE. Elles diffèrent des enzymes TEM et SHV par la présence sous la classe moléculaire D (**Bradford, 2001**). Les  $\beta$ -lactamases de type OXA sont ainsi nommées en raison de leurs capacités d'hydrolyser de l'oxacilline (**Paterson et Bonomo, 2005**). Ces enzymes possèdent une grande activité pour la cloxacilline, l'oxacilline et la méticilline. À l'exception de l'OXA-18, elles ne peuvent pas être inhibées par l'acide clavulanique (**Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006**).

#### 3.3.1.2.1.2.3.5 Autres types de BLSEs

Des variétés rares de BLSEs, appartenant à la classe A, sont récemment découverts incluent GES (Guyana extended spectrum  $\beta$ -lactamase), VEB (Vietnam extended spectrum  $\beta$ -lactamase) et PER (*Pseudomonas* extended resistance). Elles sont inhibées par l'acide clavulanique et en général ont le même substrat que TEM et SHV.

#### 3.3.1.2.1.2.4 Céphalosporinases de classe C AmpC $\beta$ -lactamases

Les céphalosporinases ou case,  $\beta$ -lactamases de la classe C qui peuvent hydrolyser les C3G, sans être affectés par les inhibiteurs de la  $\beta$ -lactamase (**Harris, 2015**). La  $\beta$ -lactamase de classe C est constitutivement présente dans le chromosome de plusieurs entérobactéries comme *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii* et *Serratia marcescens* (**Jacoby, 2009**). De plus, les gènes de la  $\beta$ -lactamase de classe C peuvent être présents dans des plasmides transférables (**Delgado-valverde et al., 2013**).

Ce type d'enzyme lors d'hyperproduction (mutation d'un gène du métabolisme du peptidoglycane, ampD) montre un phénotype de résistance plus large que celui d'une BLSE. Car, en plus de la résistance aux C3G, émerge celle vis-à-vis des céphamycines (céfoxitine, céfotetan) et celle aux associations avec les inhibiteurs enzymatiques tel l'acide clavulanique (**Philippon et Arlet, 2006**). Un nombre élevé de gènes *bla<sub>pAmpC</sub>* (céphalosporinase de classe C  $\beta$ -lactamase plasmidique) ont été observés chez les entérobactéries. Jusqu'à présent, CMY-2

(résistance aux céphamycines) est l'AmpC le plus répandu chez les *Enterobacteriaceae* et largement réparti géographiquement (**Iabadene et al., 2009**). Les gènes DHA référant au site de découverte, l'hôpital Dhahran en Arabie saoudite et FOX selon la résistance au céfoxitine, ont une prévalence élevée dans certaines régions géographiques (**Lupo et al., 2013**).

#### 3.3.1.2.1.2.5 Carbapénèmases

Le problème de la résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries s'est élevé actuellement par celui de la résistance aux carbapénèmes (**Nordmann et Carrer, 2010**). Les carbapénèmases produites par les entérobactéries peuvent appartenir à trois des quatre classes d'Amber KPC (Classe A), les métallo- $\beta$ -lactamases (Classe B) et les oxacillinases de type OXA-48 (Classe D) (**Rubin et Pitout, 2014**).

##### 3.3.1.2.1.2.5.1 Les carbapénèmases de type KPC

Les enzymes de type KPC ont un spectre d'hydrolyse comparable à celui des BLSEs de type TEM, SHV, CTX-M ou VEB (hydrolyse des céphalosporines à l'exception des céphamycines et sensibilité à l'inhibition par l'acide clavulanique) avec, en plus, une extension de ce spectre aux carbapénèmes, elles peuvent être donc confondues avec des BLSEs (**Cuzon et al., 2010**).

Elles sont peu inhibées par les inhibiteurs traditionnels tel que le clavulanate, mais sont sensibles à l'effet inhibiteur de certains acides boroniques qui sont parfois utilisés dans les tests de détection (**Robin et al., 2012**). Les carbapénèmases de classe A peuvent être codées par le chromosome ou codées par un plasmide (**Lupo et al., 2013**).

##### 3.3.1.2.1.2.5.2 Les carbapénèmases métallo-enzyme ou MBL ( $\beta$ -lactamase de classe B)

Plus de 20 enzymes ont été décrites dans ce groupe, regroupées sous la nomination de métallo- $\beta$ -lactamases (**Cavallo et al., 2004**). Elles peuvent facilement inactiver les pénicillines, les céphalosporines, et les carbapénèmes, les monobactames ne sont pas affectées (**Delgado-valverde et al., 2013**). Ces enzymes peuvent être inhibées par la présence des agents chélateurs d'ions comme l'EDTA, leur activité n'est inhibée ni par la présence d'acide clavulanique ni par le tazobactam. Dans de nombreux cas, les souches des entérobactéries productrices de MBL produisent ainsi de BLSEs (**Nordmann et Carrer, 2010**).

Ces enzymes généralement portées par des éléments génétiques mobiles, elles peuvent se situer sur le chromosome ou sur des plasmides. Les premières carbapénèmases plasmidiques acquises de classe B sont les enzymes de type IMP (Imepenem resistant *Pseudomonas*), puis d'autres enzymes de type VIM (Verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase) et NDM (New Delhi metallo  $\beta$ -lactamase) ont été décrites dans différentes régions du monde (Cavallo et al., 2004; Robin et al., 2012).

### 3.3.1.2.1.2.5.3 Les carbapénèmases de type OXA-48 ( $\beta$ -lactamase de classe D)

Les  $\beta$ -lactamases de classe D ont été appelées oxacillinasés parce qu'elles ont la capacité de cliver l'oxacilline en plus de la pénicilline (Potter et al., 2016). Chez les entérobactéries, les carbapénèmases de classe D sont principalement représentées par OXA-48 like enzymes (par exemple, OXA-48, -162 et -181) (Lupo et al., 2013). Ces  $\beta$ -lactamases ont un spectre d'hydrolyse plus limité que celui des deux autres groupes de carbapénèmases (Nordmann et al., 2013).

Elles hydrolysent les pénicillines à haut niveau et les carbapénèmes à bas niveau, mais elles ont une activité très faible contre les céphalosporines à spectre étendu. Leur activité n'est pas inhibée par l'acide clavulanique (Nordmann, 1998). Il est intéressant de noter que l'OXA-48 est la  $\beta$ -lactamase de classe D avec l'efficacité catalytique la plus élevée connue pour l'imipénème (Poirel et al., 2012). Plus de 80% des entérobactéries exprimant l'OXA-48 co-expriment une BLSE (CTX-M) leur conférant une résistance associée aux C3G et C4G, ce qui contribue à la multirésistance des souches (Tani et Arlet, 2014). En absence d'autres  $\beta$ -lactamases, les souches qui ne produisent que l'OXA-48 présentent une légère diminution de la sensibilité aux carbapénèmes (Nordmann et Carrer, 2010). Le gène OXA-48 le plus souvent situé sur un seul plasmide, qui s'est propagé dans de nombreuses souches et espèces de *Enterobacteriaceae* (Nordmann et al., 2011).

### 3.3.2 Résistance aux quinolones

Chez les entérobactéries la résistance chromosomique aux quinolones résulte essentiellement d'accumulation de mutations dans l'ADN gyrase puis dans la topoisomérase IV (Tani et Arlet, 2014) et plus rarement par une diminution de la concentration intracellulaire de ces antibiotiques par imperméabilité membranaire et/ou surexpression des systèmes d'efflux (Nordmann et al., 2011).

Récemment, trois mécanismes de résistance plasmidique aux quinolones responsables d'un phénotype de résistance de bas niveau, ont aussi été trouvés chez les entérobactéries (Cattoir, 2008). Les protéines Qnr, codées par le gène qnr, agissent en protégeant les topoisomérases de l'action des quinolones. Le premier mécanisme s'explique par la présence d'un gène qnr attribue un bas niveau de résistance aux quinolones (Nordmann, 1998). Le deuxième mécanisme comporte l'acétyltransférase qui inactive certaines fluoroquinolones (norfloxacine et ciprofloxacine) avec une légère diminution de sensibilité (Cattoir, 2008). D'autres gènes de résistance aux quinolones sont souvent associés à cet enzyme, tels les différents variants qnr, les BLSEs, les céphalosporinases plasmidiques et les carbapénémases (Tani et Arlet, 2014). Enfin, le troisième mécanisme de résistance est un efflux actif plasmidique responsable d'une diminution de sensibilité aux fluoroquinolones de type hydrophiles. Il faut noter que, même si tous ces mécanismes de résistance plasmidique ne donnent pas de phénotypes de résistance de haut niveau, ils facilitent la sélection *in vitro* et *in vivo* de mutants résistants à haut niveau (Cattoir, 2008).

### 3.3.3 Résistance aux aminosides

La résistance aux aminosides chez les entérobactéries est généralement due à l'inactivation enzymatique. Cette dernière est due par l'intermédiaire des différents enzymes: les aminoglycosides acétyl transférases, les aminoglycosides-nucléo-tidyl transférases et les aminoglycosides phosphotransférases (Tani et Arlet 2014 ; Lupo et al., 2013). Ces antibiotiques agissent en se liant à l'ARN 16S de la petite sous-unité ribosomale 30S des procaryotes et interfèrent avec la synthèse des protéines. L'utilisation des aminosides a contribué à la sélection de souches résistantes par différents mécanismes incluant: les enzymes-modifiant les aminosides, la diminution de la perméabilité membranaire, l'altération structurale de la cible ribosomale et l'expulsion de l'antibiotique par système d'efflux (Kumar et Schweizer, 2005).

## 4 Évolution de l'antibiorésistance chez l'espèce *E. coli*

Le problème de la résistance aux agents antimicrobiens ne se limite pas aux bactéries pathogènes, il implique également la flore bactérienne commensale, qui peut devenir un réservoir majeur de souches résistantes (Erb et al., 2007). L'effet cumulatif des agents antimicrobiens traditionnels a été complété par la découverte continue et l'introduction de nouveaux médicaments thérapeutiques, ce qui pousse les bactéries à être entraînées à des

changements constants en choisissant des phénotypes et des génotypes appropriés de résistance à ces agents (Szmolka and Nagy, 2013).

## 4.1 Historique

L'espèce *E. coli* représente en général l'un des organismes bactériens les plus et les mieux étudiés (Dobrindt, 2005). *E. coli* est un bacille à Gram négatif de la famille des *Enterobacteriaceae*. Sa taille varie en fonction des conditions de croissance (entre 0,5 à 3 µm), pesant de 0,5 à 5 picogrammes (Bremer et Dennis, 1996). Cette espèce a été initialement décrite en 1885 (comme *Bacterium coli*) par le médecin allemand Theodor Escherich (Escherich, 1885). Il était intéressé à déterminer la cause de la diarrhée infantile, une maladie dévastatrice qui a causé la mort d'un grand pourcentage d'enfants (Friedmann, 2006). *E. coli* est la principale espèce bactérienne commensale dans la flore intestinale des humains et des animaux. Les variants pathogènes provoquent des infections intestinales et extra-intestinales, y compris une gastro-entérite, une infection des voies urinaires, une méningite, une péritonite et une septicémie (Tadesse et al., 2012). Différentes options ont été suggérées pour traiter les infections dangereuses causées par divers *E. coli* pathogènes. Dans la plupart des cas, en particulier les cas d'infections extra-intestinales, les antibiotiques constituent le traitement de base. À cet égard, les β-lactamines ont longtemps été utilisés avec succès (Pfeifer et al., 2011).

## 4.2 L'antibiorésistance chez l'homme

### 4.2.1 Résistance aux pénicillines

La résistance bactérienne à la pénicilline a été soigneusement étudiée depuis 1940 quand Abraham et Chain ont découvert que les souches résistantes de *E. coli* possédaient une enzyme, la pénicillinase, qui a la capacité de détruire la pénicilline (Abraham, 1940). Cette substance était probablement intracellulaire (Kirby, 1944). Les pénicillinases sont également largement distribuées parmi les bactéries à Gram négatif, mais l'efficacité relativement faible de ces enzymes pourrait difficilement expliquer la résistance plutôt élevée de la plupart des organismes. Cette contribution inexplicée à la résistance était souvent qualifiée « intrinsèque » (Boman et al., 1974). *E. coli* est intrinsèquement résistante aux niveaux thérapeutiques de la pénicilline G, le premier β-lactame introduit dans la pratique clinique (Allocati et al., 2013). La pénicillinase de type TEM-1 a été signalée pour la première fois en 1965 à partir d'un isolat de *E. coli*. L'enzyme TEM-1 est capable d'hydrolyser l'ampicilline et a une activité négligeable contre les céphalosporines à spectre étendu (Paterson et Bonomo, 2005).

#### 4.2.2 Résistance aux $\beta$ -lactamines à spectre étendu

À la fin des années 1970, la plupart des souches de *E. coli* contenaient des plasmides codant à des pénicillinases, telles que TEM-1, TEM-2 et SHV-1. Ces  $\beta$ -lactamases étaient incapables de conférer une résistance aux céphalosporines de troisième génération ou à l'aztréonam avant que l'enzyme SHV-2 ait été décrite pour la première fois en 1983 à partir des souches cliniques de *E. coli* et de *K. pneumoniae* (**Shah et stille, 1983**). A partir de là, une série de nouvelles  $\beta$ -lactamases ont été découverts, Ils hydrolysent les céphalosporines de troisième génération et l'aztréonam. Comme la céfotaxime et la ceftazidime sont les céphalosporines de troisième génération les plus utilisées, une classification préliminaire distingue les céfotaximases (telles que TEM-3) et les ceftazidimases (telles que TEM-6) en fonction de leur activité relative contre ces deux substrats (**Bauemfeind, 1990**). En 1989, une souche de *E. coli* résistante au céfotaxime a été isolée de l'exsudat de l'oreille d'un nouveau-né en Allemagne. L'analyse des  $\beta$ -lactamases de cette souche indique l'apparition d'une  $\beta$ -lactamase à large spectre de type céfotaximase nettement différente de l'enzyme TEM-3. Le type CTX-M a été signalé comme un nouveau membre de la famille BLSE n'appartenant pas aux types TEM ou SHV (**Bauemfeind, 1990**). Depuis la fin des années 1990, la propagation mondiale de *E. coli* productrices de CTX-M a été spectaculaire et on considère maintenant qu'ils sont les principaux producteurs de BLSEs et apparues de plus en plus responsables des infections communautaires acquises (**Chong et al., 2011**). En Algérie, **Touati et al. (2006)** ont signalé pour la première fois la présence de  $\beta$ -lactamase de type CTX-M-15. Les isolats de *Enterobacteriaceae* obtenus à partir d'échantillons cliniques ont été étudiés sur une période de 13 mois, de mars 2004 à avril 2005.

#### 4.2.3 Résistance aux céphalosporines

La première enzyme bactérienne signalée comme AmpC  $\beta$ -lactamase était en 1940, chez *E. coli*, bien qu'elle n'ait pas été ainsi nommée (**Jacoby, 2009**). *E. coli* possède un gène chromosomique qui code pour une  $\beta$ -lactamase AmpC. Habituellement, de faibles quantités de ces  $\beta$ -lactamases sont produites parce que le gène AmpC est régulé par un promoteur faible et un fort système atténuateur (**Pitout, 2012**). En 1989, une souche multirésistante de *E. coli* a été isolée chez un patient initialement traité au Pakistan. La résistance aux céphalosporines à spectre étendu et à l'acide clavulanique exprimée par cette souche pourrait être transférée à des souches réceptrices de trois genres différents. D'autres investigations ont révélé que le déterminant de la résistance responsable de ce phénomène était un plasmide désigné BIL-1

d'après le nom du patient (Bilal) (Payne et al., 1992 ; Phillipon et al., 2002). En Algérie, un pAmpC a été détecté chez deux souches de *E. coli* qui ont été isolées au Laboratoire de Microbiologie de l'Hôpital Central de l'Armée à Alger à partir de divers échantillons pathologiques (Messai et al., 2006).

#### 4.2.4 Résistance aux carbapénèmes

La propagation des BLSEs entraînant l'utilisation des carbapénèmes qui sont en effet les  $\beta$ -lactamines du dernier recours et ont le spectre d'activité le plus large (Nordmann et al., 2013). La résistance aux carbapénèmes chez les *Enterobacteriaceae* est un nouveau problème émergent provoqué principalement par les carbapénémases codées par un plasmide ou récemment par le chromosome (Turton et al., 2016). À ce jour, ces enzymes se retrouvent principalement dans les isolats nosocomiaux de *K. pneumoniae* et *E. coli*. Chez les *Enterobacteriaceae*, les principales  $\beta$ -lactamases qui hydrolysent les carbapénèmes sont les  $\beta$ -lactamases de classe A d'Ambler (KPC) et les  $\beta$ -lactamases de classe B d'Ambler (IMP, VIM et NDM). En outre, la  $\beta$ -lactamase de classe D OXA-48 (et ses variantes) possédant une activité carbapénémase faible mais significative et elle est de plus en plus signalée chez les *Enterobacteriaceae* (Poirel et al., 2012b). Le gène *bla*<sub>OXA-48</sub> a été identifié pour la première fois chez un isolat de *K. pneumoniae* en Turquie (Poirel et al., 2004). Depuis ce rapport, plusieurs autres isolats des espèces entérobactériennes productrices d'enzyme OXA-48 y compris *E. coli* ont été signalés, principalement en Turquie (Gülmez et al., 2008). La présence de l'enzyme OXA-48 en Algérie a été signalée pour la première fois par Agabou et al. (2014), les souches de *E. coli* ont été collectées du 1<sup>er</sup> mars 2011 au 31 décembre 2012 de patients hospitalisés dans un hôpital militaire.

### 4.3 L'antibiorésistance chez l'animal et autre source

#### 4.3.1 Résistance aux pénicillines

Au cours des dernières décennies, avec l'utilisation de  $\beta$ -lactamines chez les animaux, à des niveaux thérapeutiques et subthérapeutiques pour améliorer le taux de croissance, il n'est pas surprenant qu'une résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines ait été observée chez les bactéries présentant un risque pour la santé animale et humaine (Li et al., 2007). Les bactéries résistantes isolées des animaux peuvent infecter les humains par contact direct ainsi que via des produits alimentaires d'origine animale (Allocati et al., 2013). En outre, l'élimination non réglementée des antimicrobiens dans l'environnement ont été désignés comme les facteurs prédominants de

la persistance de la résistance aux antibiotiques (**Seni et al., 2017**). Au Royaume-Uni à 1992, la résistance aux  $\beta$ -lactamines a été élargie, une souche de *E. coli* productrice d'une  $\beta$ -lactamase de type TEM-1 a été isolée pour la première fois de matière fécale de veaux (**Hunter et al., 1993**).

#### 4.3.2 Résistance aux $\beta$ -lactamines à spectre étendu

Les animaux de compagnie représentent des sources potentielles de propagation de la résistance antimicrobienne en raison de l'utilisation intensive des agents antimicrobiens et de leur contact étroit avec les humains (**Guardabassi et al., 2004**). En 1986, au Japon, une souche de *E. coli* héberge une BLSE de type CTX-M, a été isolée pour la première fois à partir de matière fécale d'un chien préalablement administré par des  $\beta$ -lactamines (**Matsumoto et al., 1988**). La présence de différentes BLSEs comme CTX-M-1, -2, -3, -9, -13 ont été largement diffusées dans plusieurs pays tel que le Portugal, le Japon et l'Espagne (**Carattoli, 2008**). En Algérie, chez la volaille, une étude sur *E. coli* productrice de BLSE provenant d'isolats aviaires a été menée par **Meguenni et al. (2012)**. Les auteurs ont cité la présence des enzymes BLSEs de type CTX-M-1 et CTX-M-15 dans des isolats de *E. coli* provenant des régions centrales algériennes.

La dissémination des bactéries productrices de  $\beta$ -lactamases, et en particulier *E. coli*, de l'homme vers les animaux de compagnie et les animaux destinés à l'alimentation a atteint les animaux sauvages ou la plupart des bactéries pathogènes productrices de BLSE sont *E. coli*. À ce jour, au moins 80 espèces sauvages ont été trouvées comme porteurs d'entérobactéries productrices de BLSE, la plupart étant des oiseaux sauvages (**Wang et al., 2017**). Au Portugal, **Costa et al. (2006)** ont pu isoler pour la première fois à partir de matière fécale des animaux sauvages des souches de *E. coli* productrices de BLSEs. L'isolement des souches de *E. coli* possédant une résistance aux  $\beta$ -lactamines par la production de  $\beta$ -lactamases de type CTX-M-14 et TEM-52 a été signalé chez des oiseaux de proie (**Costa et al., 2006**). Dès ce premier rapport, plusieurs publications ont noté l'apparition des isolats de *E. coli* producteurs de BLSEs dans différentes espèces d'oiseaux sauvages en Europe, en Afrique, en Asie, en Amérique du Sud, en Amérique du Nord et en Australie (**Wang et al., 2017**). En Algérie le premier rapport était sur la présence d'isolats de *E. coli* multirésistants provenant de sangliers et de macaques de Barbarie produisant des BLSEs de type CTX-M-15 par **Bachiri et al., (2017)**.

#### 4.3.3 Résistance aux céphalosporines

Les  $\beta$ -lactamases de type AmpC ont émergé dans le monde entier, chez les animaux destinés à l'alimentation, la volaille, le bétail et les animaux de compagnie (Smet et al., 2009 ; Ewers et al., 2012). Une céphamycine de type CMY-2 a été identifiée chez des isolats bactériens obtenus à partir d'urine et de plaies de chiens à Georgia (Sanchez et al., 2002). La diversité parmi les gènes codant pour les BLSEs chez les *Enterobacteriaceae* provenant des animaux destinés à l'alimentation est de loin supérieure à celle observée pour les gènes codant pour AmpC. Jusqu'à présent, la présence de BLSE chez les *Enterobacteriaceae* commensaux s'est révélée être comprise entre 0,2% et 40,7% (Smet et al., 2009). À ce jour, 20 espèces différentes d'animaux sauvages, principalement des oiseaux, ont été identifiées comme étant des porteurs de *bla*<sub>CMY-2</sub>. Comme en médecine humaine et vétérinaire, *bla*<sub>CMY-2</sub> est la  $\beta$ -lactamase de type AmpC la plus fréquemment détectée chez les animaux sauvages, bien que son identification ait été limitée aux isolats de *E. coli* (Wang et al., 2017). En Algérie, la CMY-2 est détectée chez quatre souches de *E. coli* isolés de poulet de chair dans la wilaya de Bejaia (Belmahdi et al., 2016).

#### 4.3.4 Résistance aux carbapénèmes

Les bactéries résistantes aux antibiotiques qui sont sélectionnées chez les poulets et les animaux d'élevage peuvent être transmises à l'intestin humain via la chaîne alimentaire ainsi que dans les milieux environnementaux (Agabou, 2016). Il est également important de noter que la première étude estimant les tendances mondiales de l'utilisation des antimicrobiens dans l'élevage a montré que la consommation mondiale des antibiotiques augmentera dans le futur et qu'elle sera probablement due à la croissance de la demande des consommateurs des produits d'origine animale et le virage vers des fermes à grande échelle où les agents antimicrobiens sont couramment utilisés (Van Boeckel et al., 2015). Le premier rapport d'isolement de *E. coli* productrice d'OXA-48 était de l'espèce de volaille *Gallus domesticus* au cours d'une étude visant à détecter les gènes codant pour la carbapénémase chez les volailles au Liban en 2013 (Al Bayssari et al., 2015). La première détection d'OXA-48 provenant des animaux de compagnie était signalée en Allemagne à partir d'un isolat de *E. coli*, prélevé d'un bulldog de 11 ans portant un stimulateur cardiaque, présentant plusieurs facteurs de comorbidité (Stolle et al., 2013). En Algérie, cinq *E. coli* producteurs d'OXA-48 ont été détectés chez des chiens et chats sains et chez un chat malade (soumis à une investigation diagnostique) entre 2014 et 2015. Chez les animaux sauvages Bachiri et al. (2017) ont signalé la détection de deux souches de *E. coli* productrices d'OXA-48 isolées de sangliers sauvages. Quelques exemples de distribution

de l'espèce *E. coli*, productrice de BLSEs, AmpC et carbapénèmes chez l'humain, les animaux de compagnie, le poulet, le bétail et les oiseaux sauvages dans les pays sur les voies de migration de la cigogne blanche (*Ciconia ciconia*) sont présentés dans la figure 4 (**Hupkova et al., 1995 ; Edelstein et al., 2003 ; Eisner et al., 2006 ; Coque et al., 2008 ; Bonnedahl et al. 2009 ; Jones et al., 2009 ; Bogaerts et al., 2011 ; Huemer et al., 2011 ; Ewers et al., 2012 ; Gregova et al. 2012 ; Husickova et al. 2012 ; Laube et al., 2013 ; Székely et al., 2013 ; Aqel et al., 2014 ; Girlich et al., 2014 ; Micenková et al., 2014 ; Ibrahim et Youssef, 2015 ; Yandaï et al., 2014 ; El-Aziz, 2015 ; Jamborova et al. 2015 ; Kuziemski et al., 2015 ; Maciucaet al., 2015 ; Reuland et al., 2015 ; Sallem et al., 2015 ; Spaleniak et al., 2015 ; Ebrahimi et al., 2016 ; Abass et al., 2017 ; Alonso et al., 2017 ; Aslantaş and Yilmaz, 2017 ; Dahab et al., 2017 ; Ferjani et al. 2017 ; Mairi et al., 2017 ; Mathlouthi et al., 2017 ; Melo et al., 2017 ; Mischnik et al., 2017 ; Münch et al., 2017 ; Muthupandian et al., 2017 ; Sangare et al., 2017 ; Skalova et al., 2017 ; Van Duin et Doi, 2017).**

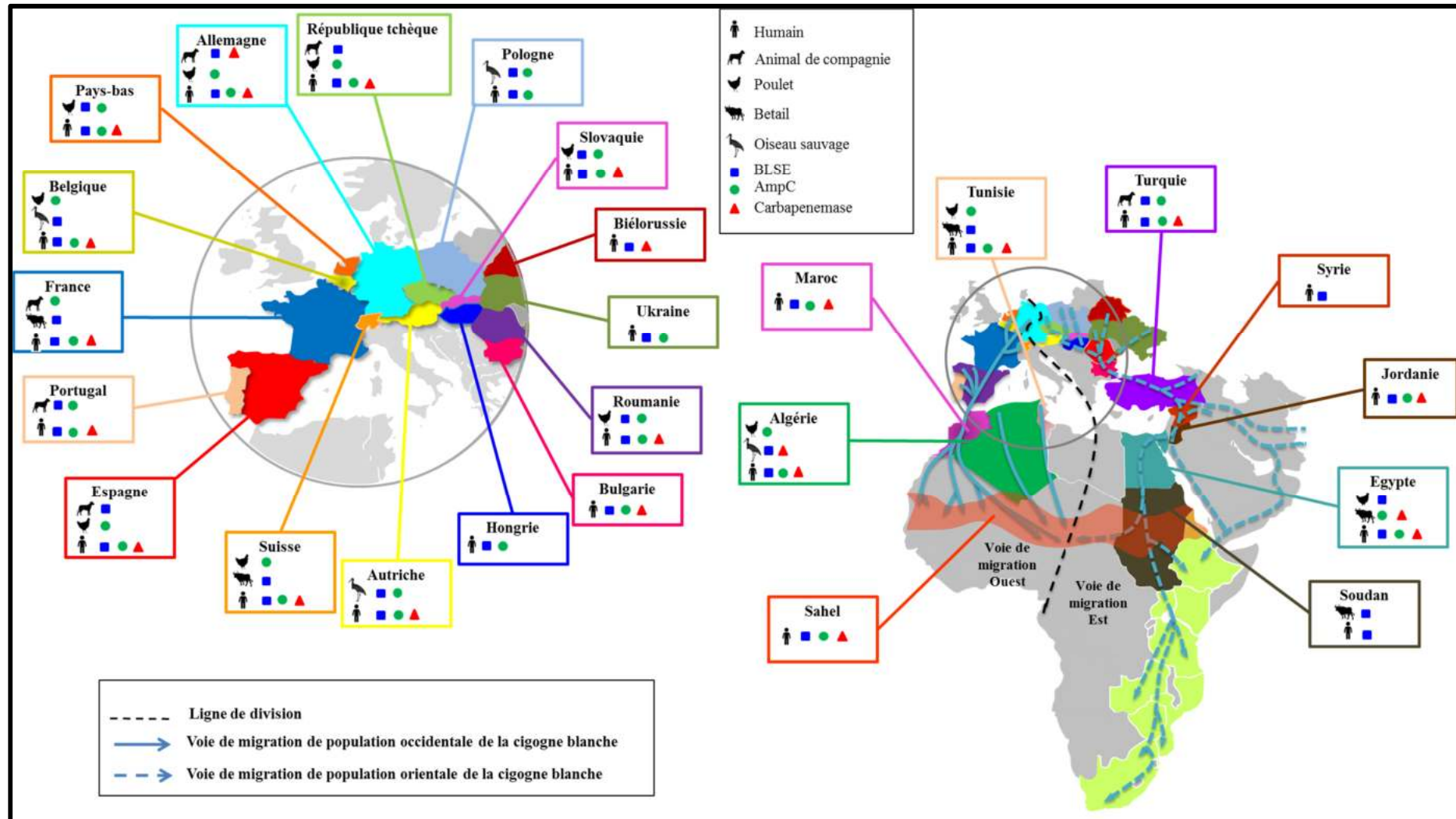


Figure 4. Exemples de distribution de l'espèce *E. coli* productrice des BLSEs, AmpC et carbapénèmes chez l'humain, les animaux de compagnie, le poulet, le bétail et les oiseaux sauvages dans les pays sur les voies de migration de la cigogne blanche (*Ciconia ciconia*).

Chapitre II

***LA CIGOGNE***

***BLANCHE***

***(CICONIA CICONIA)***

## 1 Description et identification de l'espèce

La cigogne blanche est l'une des espèces d'oiseaux les plus connues, un échassier anthropophile qui a attiré l'attention de plusieurs auteurs grâce au rôle qu'elle joue dans l'équilibre écologique des écosystèmes. Elle doit sa popularité à son allure imposante et au fait qu'elle vit à proximité de l'homme (**Kestenholz et al, 2010 ; Tricot, 1973**). Elle fait un bon indicateur et un modèle biologique idéal pour l'étude de l'état de santé et l'évolution des milieux grâce à la place bio-écologique qu'occupe cette espèce protégée dans plusieurs régions du monde (**Benharzallah et Si Bachir, 2011**). Une photo de la cigogne blanche (*Ciconia ciconia*) est présentée dans la figure 5.



**Figure 5.** La cigogne blanche (*Ciconia ciconia*).

### 1.1 Description

#### 1.1.1 Les caractéristiques moyennes

La cigogne blanche possède une taille environ d'un m, ayant une envergure de 1,65 m et plus. Le bec mesure de 15 à 19 cm chez le mâle, la femelle de 14 à 17cm, pesant de 3,5 à 3,9 kg. La cigogne se caractérise par une coloration blanche de la tête, le corps et la queue. La couverture des ailes est blanche mais les rémiges primaires et secondaires (grandes plumes des ailes) sont noires (**Cuisin, 2005 ; Surmacki et Kosicki, 2009**).

### 1.1.1.1 Les adultes

Les cigognes blanches adultes des deux sexes présentent une coloration rouge vif de leur bec, leurs pattes, la peau nue de leur menton et de leur gorge (**Surmacki et Kosicki, 2009**). Des études récentes ont révélé que ces téguments sont colorés par l'astaxanthine, qui est un pigment caroténoïde. Les pattes des oisillons nouvellement éclos sont roses et avec l'âge deviennent gris-noir (**Negro et Garrido-Fernandez, 2000**).

### 1.1.1.2 Les jeunes

Le plumage juvénile est acquis quand les cigogneaux quittent leur nid la fin juillet et il est généralement similaire à celui de l'adulte sauf que le plumage est teinté en marron, le bec et les pattes sont de couleur rouge brunâtre qui vont graduellement changer en rouge (**Surmacki et Kosicki, 2009**). Typiquement, la coloration rouge terne des pattes des juvéniles n'apparaît qu'après leur mue. Dans certaines populations espagnoles de cigognes blanches qui ont un régime riche en caroténoïdes, les oisillons ont un bec et des pattes presque aussi rouges que ceux des adultes (**Negro et Garrido-Fernandez, 2000**). Un tel développement rapide de la coloration chez les juvéniles semble être une exception. Cependant, dans certaines populations, les oisillons présentent une coloration des pattes gris-noir accompagnée de taches jaune pâle à orange pâle. Ces observations suggèrent que certains pigments caroténoïdes peuvent exister dans les pattes des juvéniles de populations autres que la population espagnole (**Surmacki et Kosicki, 2009**).

### 1.1.1.3 Les différences entre mâle et femelle

Il n'y a pas de détails précis infaillibles pour bien distinguer le mâle de la femelle. Cependant, le bec des mâles a presque toujours plus de 17 cm de long et est plus massif que celui des femelles. En outre, chez les mâles, la mandibule inférieure est un peu anguleuse, alors que celle des femelles est généralement rectiligne. Cependant, il y a des femelles semblables aux mâles et il existe aussi des chevauchements entre les dimensions du bec (**Cuisin, 2005**).

Seuls les poussins affichent un phénotype différent, le blanc du plumage étant nuancé de gris, le noir teinté de brun, les pattes rouges brunâtres et le bec successivement noir, brun puis rougeâtre à pointe sombre (**Benharzallah, 2016**).

### 1.1.2 Identification

#### 1.1.2.1 La voix

Les adultes sont surtout silencieux dû à l'absence des organes vocaux, mais peuvent produire des cris monotones sous forme de claquement du bec. L'oiseau remonte alors lentement sa tête en ouvrant et fermant son bec rapidement surtout pendant les parades nuptiales. Les cigognes donc ne sont pas des oiseaux chanteurs, silencieux mais sifflent si inquiétés. En revanche, les jeunes émettent des vocalisations ressemblant à de curieux miaulements et grincements lors des nourrissages au nid (**Bouriach, 2016 ; Heinzl, 1995**).

#### 1.1.2.2 Le vol

En vol, la cigogne blanche tient le cou allongé, les pattes tendues dépassant nettement sa courte queue, les rémiges primaires restent nettement écartées les unes des autres (**Benharzallah, 2016**). Les cigognes blanches sont des migrateurs de longue distance qui utilisent un vol plané à long terme pour parcourir de longues distances avec de faibles dépenses d'énergie métabolique (**Bossche et al., 2002**). Elle utilise le vol battu que pour des trajets très courts (**Benharzallah, 2016**).

## 2 Phylogénie

La cigogne blanche *Ciconia ciconia* est une espèce polytypique, **Kahl (1972, 1979)** a divisé la famille *Ciconidae* en 6 genres qui se subdivisent en 17 espèces appartenant aux 5 groupes, respectivement: *Mycteria*, *Anastomus*, *Ciconia*, *Ephippiorhynchus*, *Jabiru* et *Leptoptilos*, avec une exception que *Jabiru* et *Ephippiorhynchus* sont dans le même groupe, la cigogne blanche *Ciconia ciconia* appartient au troisième groupe (**Wood, 1984**). D'après **Wood (1984), Kahl (1972)**, Il existe dans le monde trois sous espèces de la cigogne blanche:

- *Ciconia ciconia ciconia* (Linnaeus, 1758): répartie en Europe, en Afrique du Nord (du Maroc à la Tunisie), et dans la zone septentrionale du Moyen-Orient (**Kahl, 1972 ; Tricot, 1973**).
- *Ciconia ciconia asiatica* (Severtzov, 1872): son aire de reproduction se situe en Asie centrale et niche donc au Turkestan au sud-est de la Mer d'Aral (**Kahl, 1972 ; Tricot, 1973**).
- *Ciconia ciconia boyciana* (Swinhoe, 1873): se distribue dans l'Est Sibérien, en Mandchourie centrale et orientale, en Corée et au Japon (**Kahl, 1972 ; Tricot, 1973**).

La phylogénétique de la famille *Ciconidae*, selon **Kahl (1979) (Wood, 1984)**, est montré dans la figure 6.

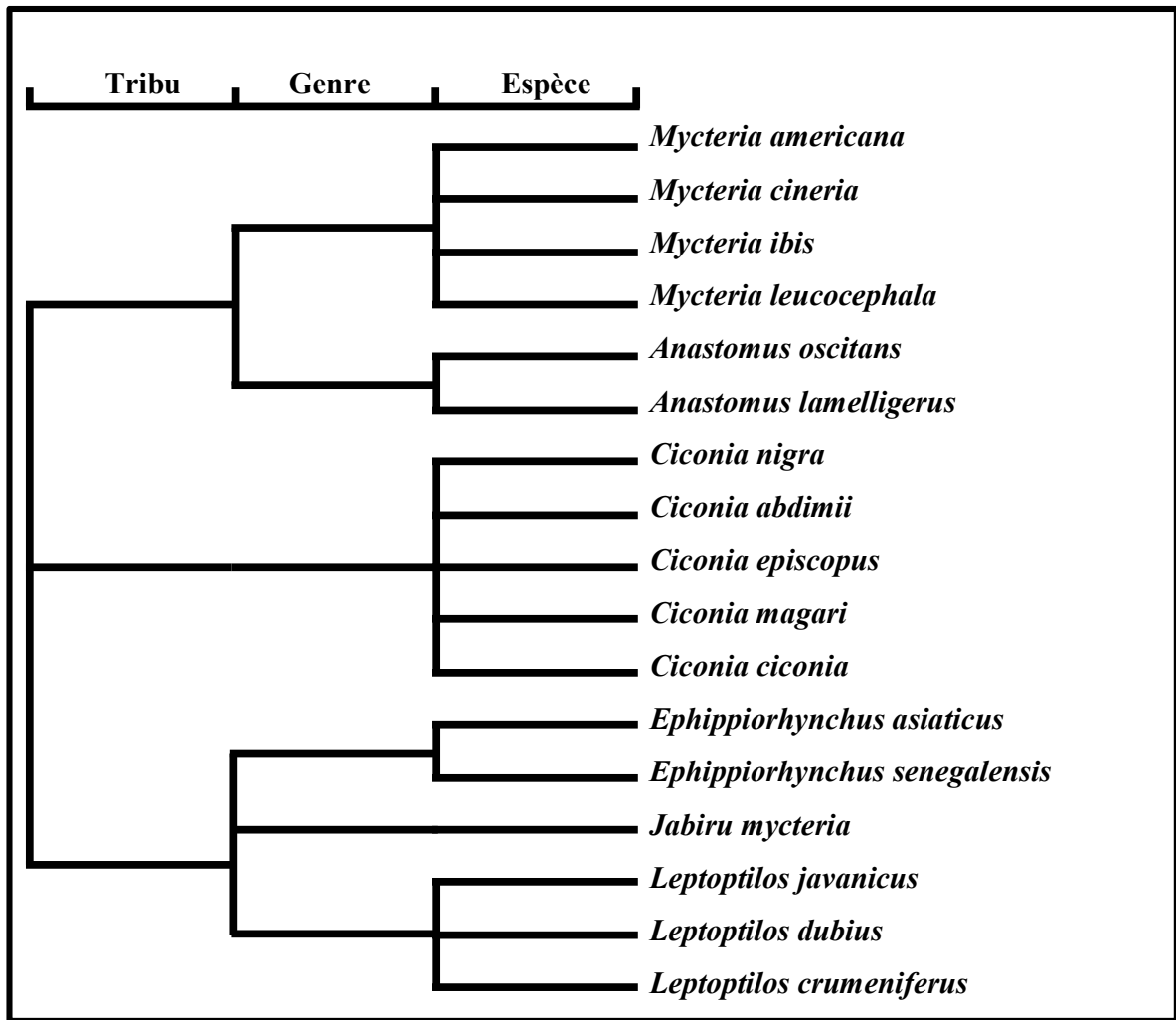


Figure 6. Phylogénétique de la famille *Ciconiidae* selon Kahl (1979) (Wood, 1984).

### 3 Habitat et régime alimentaire

La cigogne blanche est avant tout un échassier marcheur, qui, pour satisfaire ses besoins en alimentation, recherche les milieux ouverts à végétation basse, qui l'autorisent à décoller ou atterrir facilement. Elle fréquente les zones caractérisées par des prairies naturelles, marais, cultures, et zones bocagères dont la végétation n'est pas trop haute et situés principalement dans les régions marécageuses (Bouriach, 2016).

C'est une espèce opportuniste, qui s'adapte facilement. Elle vit dans les campagnes ouvertes et cultivées, près des zones urbaines et joue un rôle important dans l'équilibre écologique des écosystèmes qu'elle colonise (Boukhemza et al., 2007). Cette espèce construit des nids larges perpétuels sur de différents supports tels que les arbres, les pylônes, les toits, les

cheminées qui sont réutilisés pour des années et même des décades. En Algérie, les nids de la cigogne blanche sont bâtis surtout sur des arbres, sans négliger les pylônes électriques qui sont en train de prendre de l'ampleur (**Djerdali et al., 2013**).

En Algérie et à la wilaya de Batna, **Si Bachir et al. (2013)** ont été intéressés par l'étude de principaux facteurs environnementaux affectant la distribution, la taille des colonies et les paramètres de reproduction de la cigogne blanche. Les auteurs ont suggéré que les plus grandes colonies de la cigogne blanche ont été établies à proximité des zones urbaines et des déchets, et par conséquent dans les zones les plus peuplées.

Dans la wilaya de Batna, **Djeddou et al. (2007)** ont réalisé une approche sur le régime alimentaire des colonies de la cigogne blanche. Le spectre alimentaire comporte une large gamme de proies tant invertébrées que vertébrées. Les insectes sont les proies les plus communes et les plus abondantes dans l'alimentation de l'espèce. Parmi les insectes consommés, c'est l'ordre de coléoptères. Les dermoptères et les orthoptères sont également notés mais avec des taux d'abondance moindres.

Une autre étude comparative entre deux zones d'étude dans la wilaya de Batna par **Boukhetache et Si Bachir (2010)** a montré que le régime alimentaire de la cigogne blanche se base principalement sur les invertébrés et les petits vertébrés. Une variation du régime alimentaire entre les deux zones a été remarquée ainsi que les principaux ordres de proies qui composent le régime alimentaire de la cigogne blanche varient d'un mois à un autre dans la même zone.

Les habitudes et le comportement alimentaire de la cigogne blanche interviennent dans le contrôle de son régime alimentaire et de sa variation temporelle, car récemment, l'espèce se nourrit de plus en plus dans les décharges et avec les déchets de l'aviculture (**Chenchouni et al., 2015**).

## 4 Répartition géographique

### 4.1 Dans le monde

La cigogne blanche possède une vaste aire de reproduction couvrant la majeure partie du continent européen, de la Biélorussie et l'Ukraine à l'Est jusqu'à la Scandinavie au Nord. Au Sud de la méditerranée, ils se reproduisent dans le Nord de l'Algérie, au Maroc et en Tunisie.

Cette population est divisée en deux sous-populations, les cigognes de la population de l'Ouest et de la population de l'Est (**Shephard et al., 2013 ; Nevoux et al., 2008**). En Asie, la cigogne blanche se rencontre spécialement dans le plateau anatolien, au sud, vers le versant nord des montagnes de taureau d'Asie, au Moyen-Orient, elle se distribue en Turquie, l'Azerbaïdjan, l'Ouest de l'Iran, le Nord de l'Iraq et en Asie de Sud-ouest, se reproduit aussi en Syrie et en Palestine (**Bouriach, 2016**).

La population de l'Ouest est estimée à 112000 individus et de l'Est à environ 552000 oiseaux. Tandis que depuis le début du siècle et même en 1984, les populations continuaient à diminuer, une tendance positive importante dans le développement de la population a été notée en 1994-1995. La forte augmentation de la population de l'Ouest a été clairement observée dans les stations d'observation du détroit de Gibraltar. À partir de 50281 cigognes à l'automne 1976, le nombre a diminué à 27414 à l'automne 1985 et a augmenté à 91416 en 1996 et 113006 en 1998 (**Van den Bossche et al., 2002**). L'augmentation des populations de cigogne blanche en Afrique du Nord est due en partie à une augmentation des superficies agricole irriguée, bien que d'autres facteurs telles que les conditions climatiques hivernales (**Si Bachir et al., 2013**).

#### 4.2 En Algérie

La cigogne blanche niche communément dans la partie méditerranéenne de l'Algérie, des plaines du littoral jusqu'aux hauts-plateaux steppiques (**Djeddou et al., 2007**). Au Nord de l'Algérie la répartition des populations de la cigogne blanche suit une ligne Saida-Tiaret-Batna-Tebessa (**Biber et al., 1994**).

L'espèce *Ciconia ciconia* L. 1758 est une espèce commune dans la région de Batna (**Boukhatache et Si Bachir, 2010**). Des recensements nationaux ont été exécutés dans le cadre d'un projet d'étude de la dynamique des populations d'oiseaux en Algérie. En 2007, 6601 couples nicheurs ont été recensés, 220 sont à partir de wilaya de Batna (**Moali-Grine et al., 2013**). Dans cette région, l'augmentation des populations reproductrices locales de la cigogne blanche est en accord avec les résultats du sixième recensement international (2004-2005) qui a mis en évidence une augmentation d'environ 39% depuis 1994-1995 sur l'ensemble de la zone de reproduction (**Si Bachir et al., 2013**). En Algérie, les habitats utilisés par la cigogne blanche se retrouvent peu perturbés et sont même riches en proies potentielles en raison des caractéristiques de l'agriculture pratiquée actuellement. En prendre en considération de ces paramètres, il est aisé de suggérer une continuité de la dynamique des populations de cette

espèce dans toute son aire de nidification correspondant à la partie tellienne du pays (**Moali-Grine et al., 2013**).

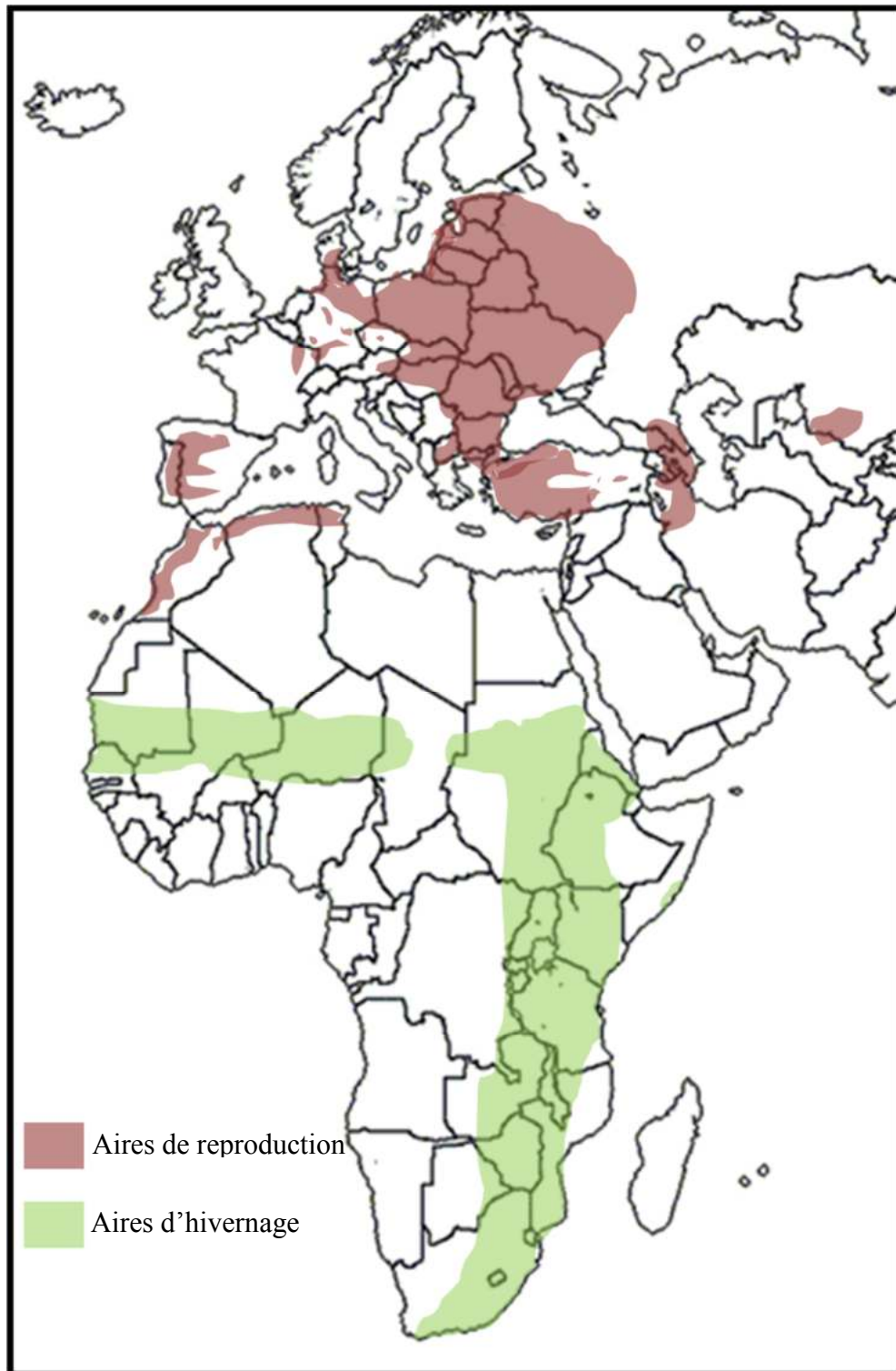
La survie et la reproduction des jeunes peuvent être affectées par les paramètres de croissance. Il est donc important d'estimer la variabilité du taux de croissance intraspécifique et les facteurs environnementaux affectant la croissance telles que la date d'occupation des nids, la date de ponte, la taille de la couvée, l'ordre de l'éclosion, la réduction du couvain, et l'identité du nid (**Benharzallah et al., 2015**).

## 5 Migration

Les cigognes sont des oiseaux qui effectuent une migration annuelle. Au début de l'automne, les cigognes blanches migrent sur de longues distances, quittent leurs lieux de reproduction et se rendent en Afrique pour y passer l'hiver (**Van den Bossche et al., 2002**). Pour la première migration, les jeunes cigognes inexpérimentées (sans l'aide des adultes) comptent sur un mécanisme d'orientation primaire héréditaire, pour trouver leur quartier d'hiver (**Chernetsov et al., 2004**). Elles resteront 3 ans en Afrique avant de revenir, là où elles sont nées, pour se reproduire (**Van den Bossche et al., 2002**). Les facteurs limitant la répartition hivernale de la cigogne blanche sont la pluviométrie et le type de végétation. En dehors de la saison de migration, les cigognes se rencontrent rarement dans les régions où la pluviométrie annuelle est inférieure à 200 mm et évitent les zones forestières (**Van den Bossche et al., 2002**).

### 5.1 Voies de migration

La cigogne blanche dispose d'une vaste distribution des lieux de reproduction couvrant la majeure partie de l'Europe ainsi qu'au sud de la méditerranée où ils se reproduisent au nord de l'Algérie, la Tunisie et le Maroc (**Shephard et al., 2013 ; Azefzef, 2002**). La direction et les voies de migration des cigognes blanches semblent être influencées par des facteurs génétiques, aussi bien que par la topographie, les sites d'alimentation potentiels et les conditions météorologiques (**Van den Bossche et al., 2002**). Sur la base de son parcours migratoire les populations européennes peuvent être divergées en populations de l'Ouest et de l'Est séparées par une ligne allant du nord de l'Allemagne à la Hongrie (**Nevoux et al., 2008**). Les aires de reproduction et d'hivernage de la cigogne blanche (*Ciconia ciconia*) (**Biber et al., 1994**) sont montrés dans la figure 7.



**Figure 7.** Les aires de reproduction et d'hivernage de la cigogne blanche (*Ciconia ciconia*)  
(Biber et al., 1994).

### 5.1.1 La population de l'Ouest

Les cigognes qui se reproduisent à l'ouest de la « ligne de migration » migrent vers le sud-ouest. Certaines cigognes qui se reproduisent aux Pays-Bas ont utilisé la voie de l'est, mais les oiseaux de la population rétablie s'envolent vers le sud-ouest. Ils volent à travers la France et l'Espagne, sont rejoints par des cigognes de la France et celles de la Péninsule Ibérique et traversent la mer Méditerranée au détroit de Gibraltar pour hiverner dans l'Ouest Sahélien ou l'Afrique de l'Ouest (**Van den Bossche et al., 2002 ; Shephard et al., 2013**). Les quartiers d'hivernage de la population du Sud de la méditerranée s'étendent du Sahel du Sénégal au lac Tchad (**Biber et al., 1994**).

### 5.1.2 La population de l'Est

La population de l'Est passe de l'Europe à travers le Bosphore en Turquie, puis migre vers le sud à travers le Moyen-Orient traversant la mer Rouge au Sud du Sinaï pour rejoindre ses quartiers d'hivernage en Afrique de l'Est et l'Afrique du Sud (**Shamoun-Baranes et al., 2003**). Cependant, notamment certains individus peuvent migrer le long des deux voies (**Shephard et al., 2013**).

### 5.1.3 Les cigognes blanches de l'Algérie

La migration des cigognes de l'Algérie pour rejoindre la région de Sahel semble se faire sur un large front à travers le Sahara, bien qu'il se précède d'une voie privilégiée empruntant l'Est de l'Algérie par El Goléa, Ain Salah, Arak et Tamanrasset. Après un séjour de quelques mois sur le continent africain, le comportement héréditaire rappelle peu à peu les cigognes vers le nord et la migration reprend. La cigogne blanche retourne aux régions de reproduction rejoignant les mêmes voies de l'automne que ce soit à l'Est ou à l'Ouest (**Sbiki, 2016**). Les voies de migration de la cigogne blanche (*Ciconia ciconia*) (**Biber et al., 1994**) sont illustrées dans la figure 8.

En Algérie, l'arrivée des nicheurs commence à partir de la mi-décembre et se poursuit sur plusieurs semaines. La durée du séjour est d'environ 8 mois. Les premiers départs des lieux de reproduction auront lieu la deuxième semaine du mois d'août (**Biber et al., 1994**).



**Figure 8.** Les voies de migration de la cigogne blanche (*Ciconia ciconia*) (Biber et al., 1994).

*Partie 2.*

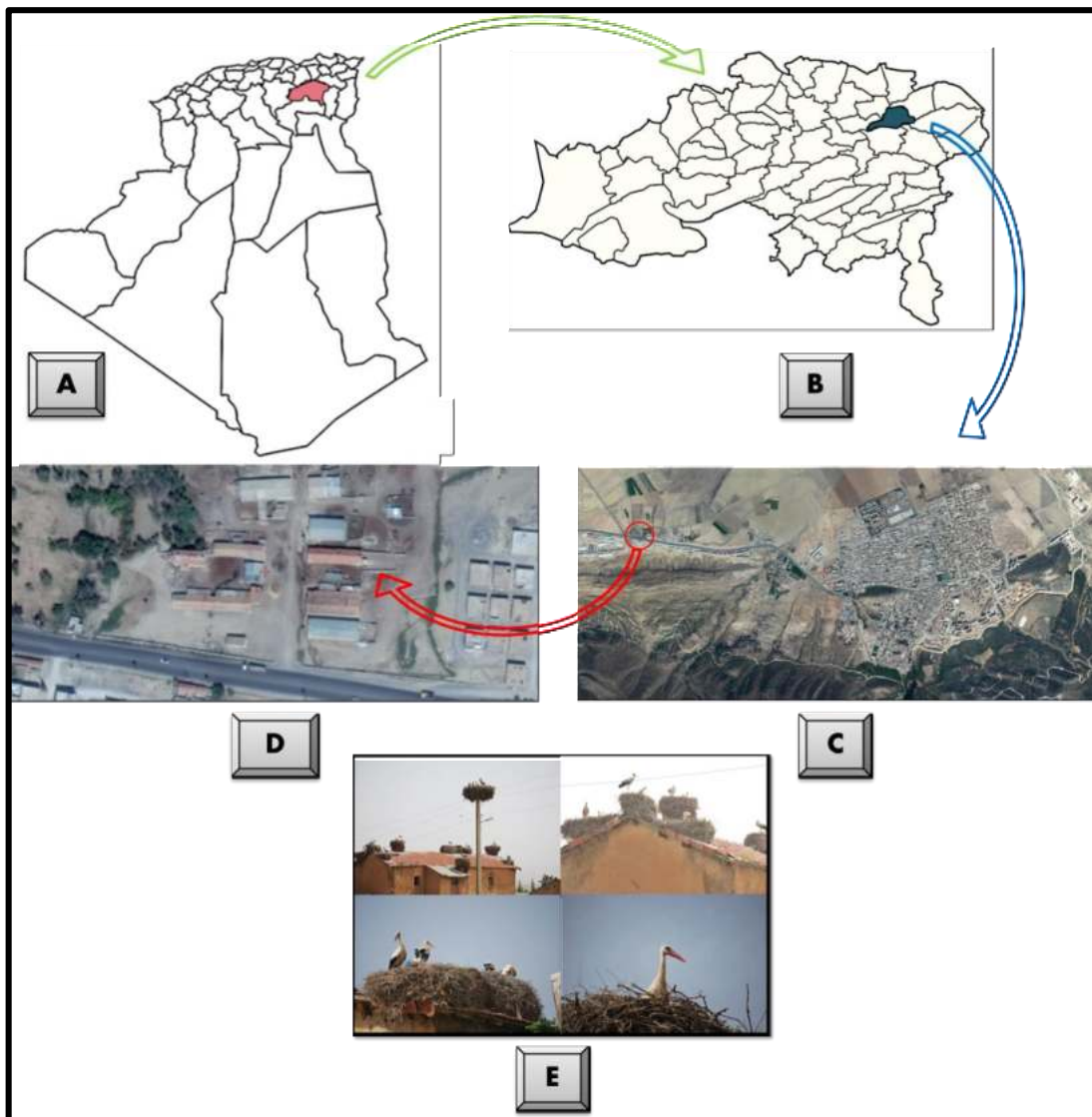
***MATERIEL***

***ET***

***METHODES***

## 1 Site d'étude

Notre travail a été réalisé sur des échantillons de fientes d'une colonie de la cigogne blanche (*Ciconia ciconia*) d'El Madher. La commune d'El Madher (latitude 35° 37' 52" Nord et longitude 6° 22' 9" Est) située au Nord Est de la wilaya de Batna. Cette zone de 100 km<sup>2</sup> est dominée par un relief simple et comparativement plat. La pente est d'environ 8%, d'où elle est souvent dite « la plaine d'El Madher ». Les nids ciblés dans cette étude sont localisés dans la ferme " Ben Ahmed Boudjemaa " ou ferme " Riche ", sise à 900 m à l'Ouest de la zone urbaine d'El Madher. La situation géographique du site d'étude est présentée dans la figure 9.



**Figure 9.** Situation géographique du site d'étude.

**A:** Wilaya de Batna. **B:** Commune d'El Madher. **C:** Image satellitaire de la commune d'El Madher. **D:** Image satellitaire de la ferme. **E:** La colonie d'étude de la cigogne blanche de la commune d'El Madher.

## 2 Echantillonnage

Au cours de cette étude, deux séries de prélèvement ont été réalisées. La première série a été effectuée au mois de Juin 2014 où onze échantillons de fientes fraîches de la cigogne blanche (*Ciconia ciconia*) ont été prélevés. La deuxième série a été réalisée au mois de Mars 2015 au niveau du même site où trente-deux échantillons de fientes fraîches de la cigogne blanche ont été récoltés. Les nids qui ont fait l'objet de l'échantillonnage sont construits sur les poteaux électriques et les toits de maisons de la ferme.

## 3 Prélèvement

Le prélèvement des échantillons de fientes fraîches a été réalisé aseptiquement dans des pots stériles en polyéthylène (50 ml de volume) à l'aide de spatules stériles d'une manière à éviter toute contamination externe. Les pots sont soigneusement renseignés puis transportés immédiatement au laboratoire dans une glacière isotherme à 4 °C pour analyse.

## 4 Criblage des souches d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération et/ou aux carbapénèmes

Dans notre étude nous avons suivi deux protocoles de criblage différents.

### 4.1 Premier protocole de criblage

#### 4.1.1 Préparation de la suspension mère et les dilutions décimales

Le premier protocole consiste à préparer une suspension mère avec un facteur de dilution de  $10^{-1}$  dans de l'eau distillée stérile (Poirel et al., 2012a). Après une homogénéisation avec un vortex, une série de dilutions décimales jusqu'à la dilution  $10^{-8}$  a été effectuée (Horton et al., 2011).

#### 4.1.2 Isolement sélectif

A partir de la suspension mère et de chaque dilution, 0,1 ml a été ensemencé sur les milieux MacConkey (MC) et gélose au sang (GS) frais (Columbia enrichie de 5% du sang de mouton) rendus sélectifs comme suit :

MC additionné de 2 µg/ml de céfotaxime (CTX) et 16 µg/ml de vancomycine (VAN).

MC additionné de 2 µg/ml d'imipinème (IPM) et 16 µg/ml de vancomycine.

GS additionné de 2 µg/ml de céfotaxime (CTX) et 16 µg/ml de vancomycine.

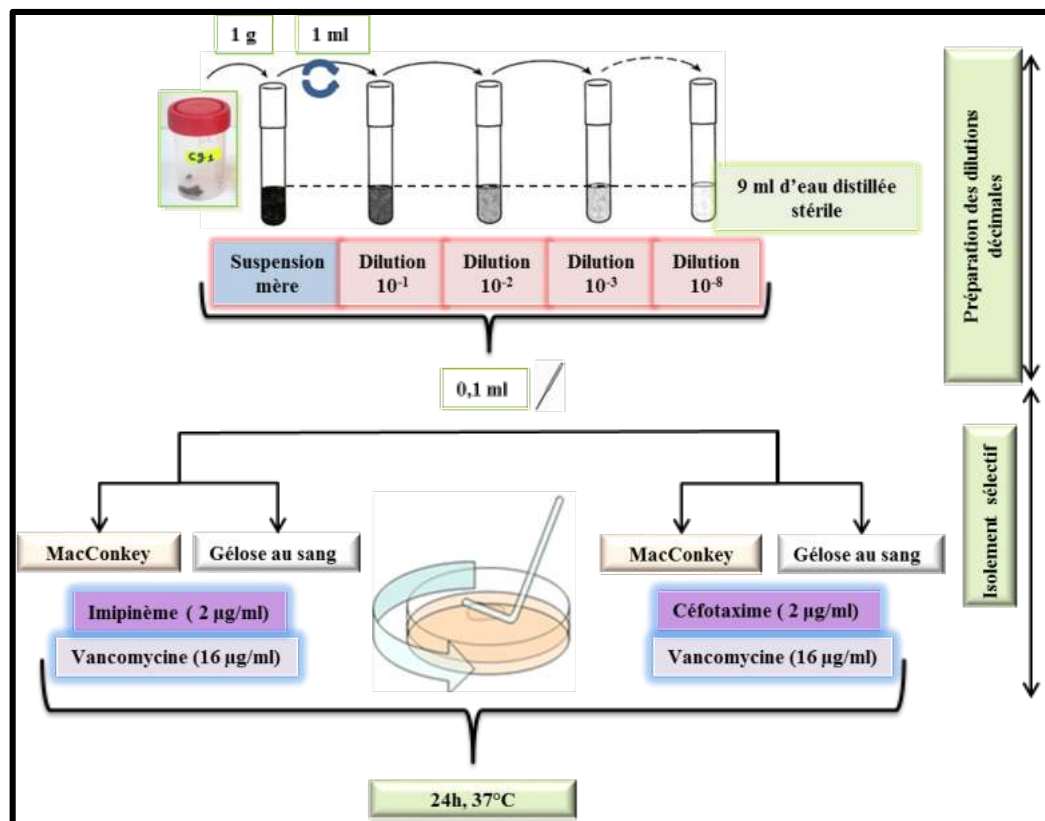
GS additionné de 2 µg/ml d'imipinème (IPM) et 16 µg/ml de vancomycine.

L'ensemencement s'est effectué en surface et l'incubation à 37°C pendant 24 h.

La vancomycine a été utilisée d'une concentration de 16 µg/ml pour but d'éliminer les bactéries à Gram positif (**Wallensten et al., 2011**).

Le céfotaxime a été utilisé à une concentration de 2 µg/ml pour la sélection des bactéries résistantes aux C3G, en se référant aux concentrations critiques établies par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) (**Poeta et al., 2008 ; CA-SFM, 2013**). L'imipénème a été utilisé à une concentration de 2 µg/ml pour la sélection des bactéries résistantes aux carbapénèmes, en se référant aux concentrations critiques établies par le **CA-SFM (2013)**.

Le premier protocole réalisé sur les échantillons de la première série de prélèvement est présenté dans la figure 10.



**Figure 10.** Schéma général du premier protocole de criblage sélectif.

## 4.2 Deuxième protocole de criblage

Des changements ont été apportés au premier protocole de criblage dont le but de l'optimiser. Le deuxième protocole réalisé sur les échantillons de la deuxième série de prélèvement est présenté dans la figure 11. Ce dernier a été effectué en respectant les étapes suivantes :

### 4.2.1 Préparation et Pré-enrichissement des échantillons

Les échantillons ont été poolés à raison de 'deux ou trois' dans des pots stériles, vingt-deux à raison de deux échantillons par pool, neuf à raison de trois échantillons par pool et un échantillon est resté sans être poolé (Foti et al., 2011). Ensuite ils ont été additionnés du Bouillon Coeur Cerveille (BCC), à raison de 9 ml pour 1 g de la fiente (Agero et al., 2012). Après agitation, les échantillons ont été incubés à 37 °C pendant 4 h (Shobrak et Abo-Amer, 2014).

Cette étape permettra aux bactéries de s'adapter et de se préparer à leur transfert aux milieux sélectifs.

### 4.2.2 Enrichissement sélectif

L'enrichissement sélectif a été réalisé en transférant 1 ml de la suspension de pré-enrichissement dans deux tubes de milieu BCC contenant deux combinaisons différentes d'agents sélectifs (antibiotiques):

-Première combinaison: 9 ml du milieu BCC supplémenté de 64 µg/ml de la vancomycine et de 2 µg/ml de céfotaxime.

-Deuxième combinaison: 9 ml du milieu BCC supplémenté de 64 µg/ml de la vancomycine et de 1 µg/ml de l'ertapénème (ETP). Cette étape permet une première culture des bactéries résistantes présentes et une prolifération facilitant leur mise en évidence à la surface d'un milieu gélosé.

L'ertapénème a été utilisé d'une concentration de 1 µg/ml pour la sélection des bactérie résistantes aux carbapénèmes, en se référant aux concentrations critiques établies par CA-SFM (CA-SFM, 2013).

### 4.2.3 Isolement sélectif

Les tubes d'enrichissement positif feront l'objet d'un isolement sélectif sur le milieu gélosé MC additionné des mêmes combinaisons d'agents sélectifs de la source.

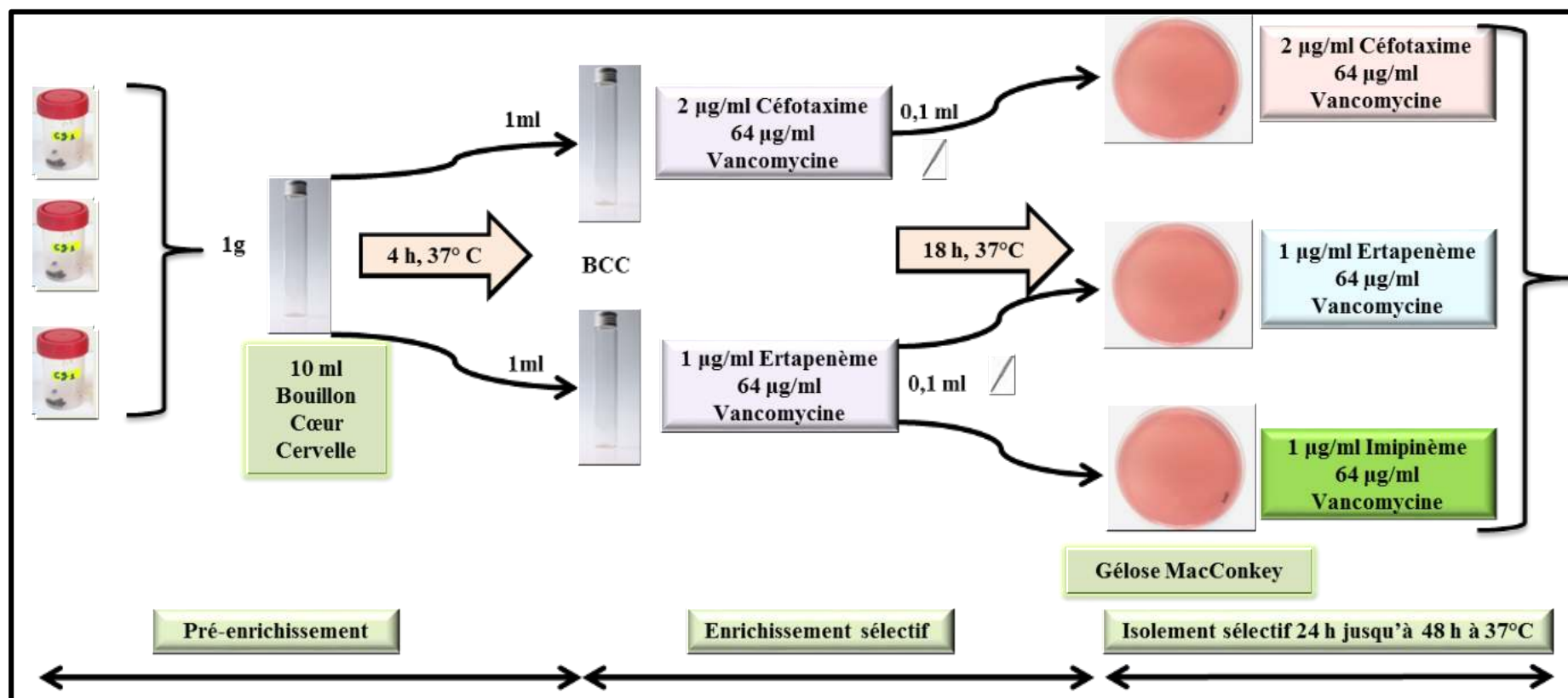


Figure 11. Schéma général du deuxième protocole de criblage sélectif.

## 5 Sélection et purification des colonies suspectes

Des colonies représentatives présentant les caractères cultureux d'entérobactéries à savoir la couleur rose ou rouge, ont été repiquées sur le même milieu en vue de les obtenir en culture pure afin de les identifier.

Les cultures obtenues ont fait l'objet de l'examen microscopique à l'objectif X100 à immersion après coloration de Gram, permettant la sélection de celles répondant aux caractéristiques microscopiques des entérobactéries (bacilles ou coccobacilles à Gram négatif) et de vérifier la taille, la forme ainsi que l'arrangement cellulaire. La technique est décrite dans la partie annexe (N°1). Les cultures pures font l'objet d'une purification sur le même milieu d'isolement.

## 6 Identification

Les cultures pures obtenues ont fait l'objet de l'identification jusqu'à l'échelle de l'espèce en respectant les étapes suivantes :

### 6.1 Identification biochimique

#### 6.1.1 Test de fermentation du glucose

Nous avons vérifié le caractère de fermentation du glucose caractéristique des entérobactéries sur le milieu TSI (Triple Sugar Iron). La technique est présentée dans la partie annexe (N°2).

#### 6.1.2 Galerie biochimique

Dans cette étape nous avons procédé à une identification des entérobactéries obtenues en se basant sur leurs caractères biochimiques étudiées par la galerie API 20E. l'incubation, la lecture et l'interprétation des résultats de la galerie API 20E ont été effectués en se référant aux instructions du fabricant. Cette technique est présentée dans la partie annexe (N°3).

### 6.2 La spectrométrie de masse douce MALDI-TOF MS

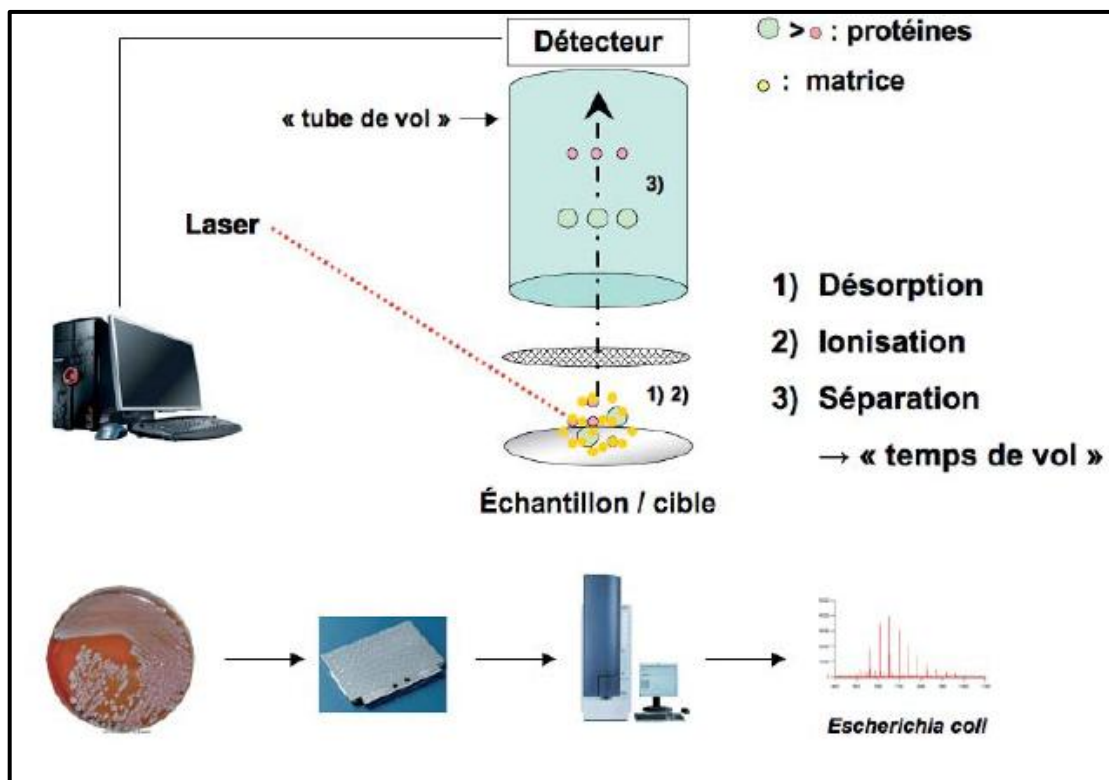
La spectrométrie de masse douce MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation, TOF : Time-Of Flight) a été réalisée en utilisant le spectromètre de type Microflex LT (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne) en suivant le protocole déjà décrit par (Seng *et al.*, 2009).

### 6.2.1 Principe

Une des utilisations de la spectrométrie de masse douce à travers les spectromètres tel que le microflexe LT (Bruker Daltonics), est l'identification des micro-organismes à différents niveaux taxonomiques jusqu'à l'échelle de l'espèce.

L'identification est basée sur le spectre de masse des protéines cellulaires du micro-organisme en question qui fera l'objet de comparaison contre les banques de données de spectre des micro-organismes disponibles à l'aide d'un logiciel généralement fourni avec le spectromètre.

Le spectre protéique d'un micro-organisme est le résultat d'un bombardement du dépôt du lysat cellulaire (contenant les protéines cellulaires) recouvert d'une matrice, par un laser. Ce bombardement conduit à la libération des électrons qui vont voler à différentes vitesses tout le long du tunnel du spectromètre. Les temps de vol jusqu'à l'arrivée à la fin du tunnel sont enregistrés et permettent d'exprimer les masses des protéines présentes dans le dépôt sous forme d'un spectre spécifique (empreinte) du micro-organisme en question. Le principe de la spectrométrie de masse douce est illustré dans la figure 12.



**Figure 12.** Principe de la spectrométrie de masse douce de type MALDI-TOF (Courcol, 2009).

## 6.2.2 Méthode de réalisation

Avant de réaliser l'analyse, il faut procéder à certaines étapes essentielles commençant par le lavage de la cible, ensuite le dépôt des échantillons et l'introduction de la cible dans le spectromètre.

### 6.2.2.1 Lavage de la cible

Cette étape consiste en une alternance d'étape de rinçage à l'eau chaude et à l'éthanol à 70% suivie du frottement à l'aide d'un papier fin (dédié). Ensuite la cible est frottée en présence de 500 µl de TFA (Acide TriFluoroacétique) à 80%. Finalement la lame doit être rincée à l'eau pure et mise à sécher à l'air libre avant d'être utilisée.

### 6.2.2.2 Préparation de la matrice

Un millilitre de la matrice doit être préparé d'une solution saturée d'alpha cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (HCCA) dans un tube stérile de 1,5 ml contenant 500 µl d'acétonitrile HPLC (High-Performance Liquid Chromatography), 475 µl d'eau HPLC, et 25 µl de TFA (trifluoroacetic acid). Le tube doit être vortexé et fera l'objet d'une sonication pendant 10 minutes dans un bain sonicateur, puis centrifugé 5 minutes à 13000 tours par minute (t pm), le surnageant est transféré dans un autre tube stérile. La matrice est ainsi prête pour l'utilisation, sa conservation doit être dans un tube à 4°C à l'abri de la lumière. La matrice servira aussi comme témoin négatif.

### 6.2.2.3 Préparation du témoin positif

Le témoin positif s'agit de protéines cellulaires de l'espèce *E. coli* (DHα50) Bacterial Test Standard (BTS) (#255343, Bruker) lyophilisées dans un tube fourni par le fabricant auquel on rajoute 500 µl d'une solution contenant 475 µl d'eau HPLC, 25 µl du TFA et 500 µl d'acétonitrile HPLC. Ensuite les tubes sont mélangés et laissés reposer 5 minutes. Le BTS est prêt à l'emploi et peut être conservé en aliquotes de 10 µl pendant 6 mois à - 20°C.

### 6.2.2.4 Préparation des échantillons pour l'analyse spectrométrique

A partir d'une culture bactérienne de 24 h on prélève les colonies à identifier, et on les dépose sous forme d'un fin frottis, sur les spots de la plaque métallique servant de cible au laser. Pour chaque souche, on applique 4 spots pour réduire le risque d'erreur. Une fois tous les dépôts effectués, on dépose 1,5 µl de matrice sur chaque spot ensuite on laisse sécher pendant 15 minutes pour permettre sa co-cristallisation avec l'échantillon bactérien.

### 6.2.2.5 Lecture et interprétation des résultats

Les spectres protéiques spécifiques de chaque isolat obtenu par MALDI-TOF MS seront interrogés devant une base de données locale des spectres protéiques spécifiques des espèces des bactéries disponibles en utilisant un logiciel MALDI Biotyper version 3.1 (Bruker Daltonics). Les résultats de la comparaison des spectres sont exprimés par des scores dont les valeurs déterminent l'échelle de l'identification allant de l'absence de l'identification jusqu'à l'échelle de l'espèce. Les valeurs définissant le niveau de l'identification taxonomique par MALDI-TOF MS sont présentés dans le tableau 5.

Les résultats obtenus peuvent être validés une fois que le T+ et T- sont confirmés comme suit:

- T+ doit correspondre à *E. coli* avec un score > 1.9.
- T- doit correspondre à un score sans identification.

**Tableau 5.** Interprétation des scores d'identification bactérienne obtenue par MALDI-TOF MS.

| Score             | Description                | Couleur |
|-------------------|----------------------------|---------|
| 1.900...<br>3.000 | Identification de l'espèce | Vert    |
| 1.700...<br>1.899 | Identification du genre    | Jaune   |
| 0.000...<br>1.699 | Aucune identification      | Rouge   |

## 7 Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

### 7.1 Antibiogramme

Afin de tester la sensibilité des souches d'entérobactéries aux antibiotiques, un antibiogramme est généralement nécessaire, il se réalise généralement par la méthode de diffusion en gélose. Les antibiogrammes des souches ont été réalisés sur des boîtes de Muller-Hinton (MH) suivant la technique recommandée par le comité de l'antibiogramme CA-SFM (2016).

Les boîtes de gélose MH sont ensemencées par écouvillonnage à partir d'une suspension bactérienne correspondant à 0,5 Mac Farland et les disques d'antibiotiques y sont déposés sur la gélose. Les antibiotiques testés sont mentionnés dans le tableau 6.

Les boîtes sont ensuite, incubées pendant 24 h à 37°C. À l'aide d'un pied à coulisse, les différents diamètres des zones d'inhibition obtenues autour des disques d'antibiotiques sont mesurés et l'interprétation en sensible (S) intermédiaire (I) ou résistante (R) est effectuée selon les critères définis par **CA-SFM (2016)** sauf pour les antibiotiques: le céfotaxime, la céftazidime et la gentamicine qui ont été interprétés selon **CA-SFM (2013)**.

## **7.2 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)**

Le principe de la CMI par E-test est basé sur la combinaison des deux concepts : dilution et diffusion. Le système E-test se compose d'une bande en plastique, non poreuse, calibrée par un gradient pré établi de concentration d'antibiotiques, couvrant différentes dilutions pour déterminer la CMI en µg/ml d'une souche testée en milieu gélosé. Les concentrations critiques d'antibiotiques utilisées sont mentionnées dans le tableau 6.

A partir d'une culture sur gélose nutritive de 24 h, un inoculum de 0.5 Mac Farland a été préparé pour chacune des souches étudiées. Imbiber un écouvillon stérile de la suspension bactérienne et essorer sur le rebord du tube. Passer l'écouvillon sur toute la surface de la gélose par simple rotation de 120°. S'assurer que toute la boîte est bien ensemencée. Lorsqu'une bandelette E-test est appliquée sur une boîte de gélose ensemencée, l'antibiotique est immédiatement libéré de la surface du support et se dépose sur la surface de la gélose.

Après 24 h d'incubation, on observe une zone d'inhibition en forme d'ellipse, répartie symétriquement de chaque côté de la bandelette, le point d'intersection entre la bandelette et l'extrémité inférieure de la zone d'inhibition indique la CMI de la souche. On peut l'exprimer directement en microgrammes par millilitre en se référant à l'échelle graduée inscrite sur la bandelette. Les résultats de la CMI sont interprétés selon **CA-SFM (2016)**.

Dans notre étude nous avons testé la CMI d'imipinème pour confirmer les résultats d'antibiogramme, ainsi que la colistine et la tigécycline en se référant aux recommandations de **CA-SFM (2016)**. Les valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et les CMI des antibiotiques utilisés dans notre étude chez les entérobactéries sont présentés dans le tableau 6.

### 7.3 Etude phénotypique de la résistance aux $\beta$ -lactamines

#### 7.3.1 Identification phénotypique de BLSE

##### 7.3.1.1 Principe de la technique

Pendant la technique d'antibiogramme, la recherche des BLSEs a été faite phénotypiquement d'une manière systématique sur gélose MH. Elle s'exécute en recherchant les éventuelles images de synergie en « bouchon de champagne » ou en « entonnoir » qui peuvent apparaître, sur gélose, entre une céphalosporine de troisième génération, une céphalosporine de quatrième génération ou l'aztréonam, et une association contenant l'acide clavulanique (Sirot, 1996).

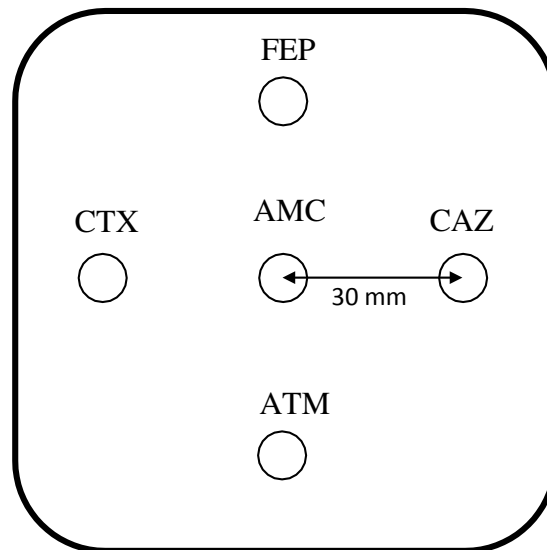
**Tableau 6.** Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI des antibiotiques utilisés chez les entérobactéries (CA-SFM, 2016).

| Familles                             | Antibiotiques                     | Abréviations | Diamètres critiques (mm) |     | Concentrations critiques (mg/L) |     |
|--------------------------------------|-----------------------------------|--------------|--------------------------|-----|---------------------------------|-----|
|                                      |                                   |              | S $\geq$                 | R < | S $\leq$                        | R > |
| <b><math>\beta</math>-lactamines</b> | Amoxicilline                      | AMX          | 19                       | 19  | /                               |     |
|                                      | Amoxicilline + Acide clavulanique | AMC          | 19                       | 19  | /                               |     |
|                                      | Céfoxitine                        | FOX          | 19                       | 15  | /                               |     |
|                                      | Céfotaxime                        | CTX          | 26                       | 23  | /                               |     |
|                                      | Céftazidime                       | CAZ          | 26                       | 21  | /                               |     |
|                                      | Céfépime                          | FEP          | 24                       | 21  | /                               |     |
|                                      | Ertapénème                        | ETP          | 25                       | 22  | /                               |     |
|                                      | Imipénème                         | IPM          | 22                       | 16  | 2                               | 8   |
| <b>Aminosides</b>                    | Aztréonam                         | ATM          | 24                       | 21  | /                               |     |
|                                      | Amikacine                         | AK           | 17                       | 15  | /                               |     |
|                                      | Gentamicine                       | GN           | 18                       | 16  | /                               |     |
| <b>Quinolones</b>                    | Ciprofloxacine                    | CIP          | 22                       | 19  | /                               |     |
| <b>Tétracyclines</b>                 | Tigécycline                       | TGC          | 18                       | 15  | 1                               | 2   |
| <b>Autres</b>                        | Triméthoprime /Sulfaméthoxazole   | SXT          | 16                       | 13  | /                               |     |
|                                      | Colistine                         | CT           | 15                       | 15  | 2                               | 2   |
|                                      | Fosfomycine                       | FF           | 14                       | 14  | /                               |     |

##### 7.3.1.2 Méthode de réalisation

La préparation de la suspension bactérienne ainsi que l'ensemencement d'une gélose MH sont réalisés selon la technique de l'antibiogramme. Les disques d'antibiotiques suivants:

l'amoxicilline/acide clavulanique, la céftazidime, le céfotaxime, l'aztréonam et le céfépime sont placés sur la gélose MH selon le schéma présenté dans la figure 13. La distance entre deux disques est 30 mm centre à centre. L'incubation des boîtes se fait 24 h à 37°C.



**Figure 13.** Schéma explicatif de la disposition des disques d'antibiotique pour la détection d'une BLSE par le test de synergie.

### 7.3.1.3 Interprétation des résultats

Après incubation, l'obtention d'une image caractéristique « bouchon de champagne » ou un entonnoir entre les disques d'antibiotiques utilisés montre un résultat positif de synergie, donc une production de BLSE (Sirot, 1996).

## 7.3.2 Identification phénotypique des carbapénèmases

### 7.3.2.1 Test de Hodge modifié

Ce test permet la mise en évidence d'une synergie d'activité enzymatique entre une souche productrice de carbapénémase (souche à tester) et une souche sauvage de référence sensible. Les souches à tester sont ensemencées par la méthode de stries déposées à partir du centre jusqu'à la périphérie de la boîte contenant la gélose MC, préalablement ensemencée avec une souche *Escherichia coli* ATCC 25922 (Lee et al., 2010).

Après 15min, un disque d'imipénème est appliqué au centre et la boîte est incubée à 37°C pendant 20 h.

La déformation de la zone d'inhibition à l'intersection entre une strie et la culture d'*E. coli* indique la présence d'une carbapénémase.

### 7.3.2.2 Carba-NP-Test Modifié (MCNP test)

Le Carba-NP-Test est un test biochimique permettant de mettre en évidence la production de n'importe quel type de carbapénémase (classes A, B, ou D). Depuis sa découverte en 2012, très récemment et en 2015, le Carba-NP-Test a été encore développé par **Bakour et al. (2015)**. Le protocole a subi des modifications, en plus d'amélioration du temps et l'obtention des résultats ont conduit au développement du Carba NP-Test modifié (MCNP test).

#### 7.3.2.2.1 Principe

Le principe du Carba-NP-Test est basé sur la mise en évidence d'une acidification du milieu due à la dégradation de l'IPM in vitro par les bactéries lysées, ceci est possible par la détection du changement du pH en utilisant un indicateur de couleur (le rouge du phénol) en observant un virage du rouge vers le jaune ou l'orange. Il se réalise sur des souches provenant des antibiogrammes qui ont été effectués sur gélose MH (**Nordmann et al., 2012**).

#### 7.3.2.2.2 Etapes de réalisation

Au but de détecter les phénotypes de carbapénémases probables au sein de souches des entérobactéries isolées, nous avons suivi les étapes du Carba-NP-Test Modifié, un test plus rapide et plus facile.

A partir d'une culture sur gélose MH, on récupère la souche à tester à l'aide d'une oese 10 µl et on la suspend dans 200 µl du tampon de lyse qui est le CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) de 0.02%. Après homogénéisation à l'aide d'un vortex pendant une à deux minutes, dans un premier tube eppendorf, 100 µl de la suspension bactérienne lysée est ajoutée à 100 µl de la solution du rouge de phénol diluée de 2 ml du rouge de phénol de 0.5% (p/vol) avec 16.6 ml de l'eau distillée contenant 0.1 mM du ZnSO<sub>4</sub> (pH=7.5), il s'agit d'un contrôle négatif.

Dans un deuxième tube eppendorf, on ajoute 100 µl de la suspension bactérienne lysée qui reste à 100 µl de la solution du rouge de phénol diluée supplémentée de 6 mg/ml de l'imipénème. Les deux tubes eppendorf ont été portés au vortex, puis incubés à 37 °C pendant maximum 2 h (**Bakour et al., 2015**).

### 7.3.2.2.3 Interprétation des résultats

Le virage d'indicateur coloré du rouge vers le jaune ou l'orange présente un résultat positif.

### 7.3.2.3 Test à l'EDTA

Ce test phénotypique consiste à mettre en évidence la production des carbapénèmases de la classe B d'Ambler (métallo- $\beta$ -lactamases) sensible à l'action de l'EDTA (Ethylène Diamine Tetra acetic Acid), agent chélateur qui chélate les ions du zinc ( $Zn^{++}$ ).

Réaliser le test à l'EDTA, on suit le même protocole que le MCNP test, en ajoutant un troisième tube eppendorf contenant 100  $\mu$ l de la solution de lyse, ajouté de 50  $\mu$ l du rouge de phénol supplémenté de l'IPM, et de 50  $\mu$ l de la solution de l'EDTA de 10 mM (pH = 8). Le tube est porté au vortex et incubé par la suite à 37°C pendant 2 h au maximum (**Nordmann *et al.*, 2012**).

Le résultat positif se traduit après un virage de la couleur au jaune et la persistance de la couleur rouge dans le tube avec EDTA.

## 8 Caractérisation moléculaire de la résistance aux $\beta$ -lactamines

Cette partie de notre étude a été consacrée pour la caractérisation moléculaire de la résistance aux  $\beta$ -lactamines identifiée phénotypiquement en respectant les étapes suivantes:

### 8.1 Extraction de l'ADN bactérien

L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée d'une manière automatique en utilisant l'automate EZ1 en respectant les recommandations du fabricant comme suit:

#### a- Digestion enzymatique

Quelques colonies d'une culture pure et fraîche de 18 à 24 h sont mises en suspension dans un microtube stérile de 2 ml (tube d'échantillon). Ce dernier contenant 20  $\mu$ l de la protéinase K (Qiagen Courtaboeuf, France) et 180  $\mu$ l du tampon de lyse G2. Ensuite le tube fermé est porté au vortex puis incubé 70°C pendant 10 minutes dans un bain sec.

#### b- Extraction automatique

Les produits de digestion enzymatique feront l'objet d'une extraction automatique à l'automate EZ1 en utilisant le consommable fourni par le fabricant. Cette opération dure 15

min où l'extrait de l'ADN est récupéré dans un microtube stérile de 1,5 µl contenant un volume de 100 µl déjà sélectionné au début de l'opération. En utilisant cet automate, 14 échantillons peuvent faire l'objet de l'extraction en même temps. Cinquante microlitres de l'ADN obtenu est conservé à -20°C pour des utilisations ultérieures. Les 50 µl qui restent étaient mis à 4°C pour l'utilisation dans cette étude.

## 8.2 Criblage moléculaire rapide des mécanismes de résistance

La PCR en temps réel connue par la haute spécificité à travers l'utilisation de deux amorces et une sonde et sa rapidité d'expression des résultats, a été utilisée dans cette étude pour la détection moléculaire rapide des déterminants génétiques des mécanismes de résistance aux β-lactamines identifiés phénotypiquement.

Dans cette étape nous avons ciblé les gènes suivants : *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>CTX</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* (Aubert et al., 2006 ; Jarlier et al., 1988 ; Mesli et al., 2013; Roschanski et al., 2014) .

Les amorces forward (F) et reverse (Rev) ainsi que les sondes utilisées pour la PCR en temps réel sont présentées dans le tableau 7.

**Tableau 7.** Amorces et sondes utilisées pour les PCR en temps réel.

| Gène                        | Amorce                                | Séquence des amorces  | Taille d'amplicon (bp) |
|-----------------------------|---------------------------------------|---|------------------------|
| <i>bla<sub>OXA-48</sub></i> | OXA-48-F<br>OXA-48-Rv<br>OXA-48 sonde | TTGGTGGCATCGATTATCGG<br>GAGCACTTCTTTTGTGATGGC<br>6-FAM-AGCTTGATCGCCCTCGATTTGG-TAMRA | 125                    |
| <i>bla<sub>KPC</sub></i>    | KPC-F<br>KPC-Rv<br>KPC sonde          | GATACCACGTTCCGTCTGGA<br>GGTCGTGTTTCCCTTTAGCC<br>6-FAM-CGCGCGCCGTGACGGAAAGC-TAMRA    | 180                    |
| <i>bla<sub>NDM</sub></i>    | NDM-F<br>NDM-Rv<br>NDM sonde          | GCGCAACACAGCCTGACTTT<br>CAGCCACCAAAGCGATGTC<br>FAM-CAACCGCGCCCAACTTTGGC-TAMRA       | 155                    |

Tableau 7. (Suite)

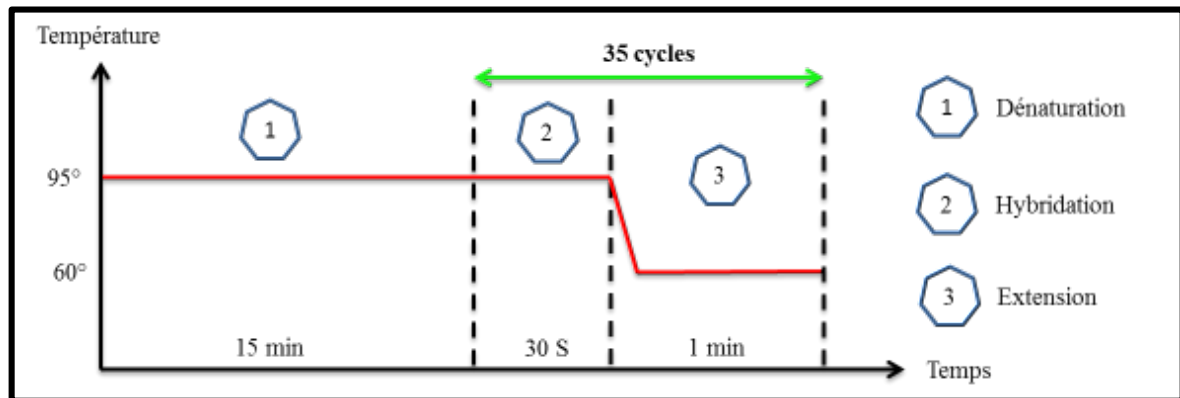
| Gène                                      | Amorce   | Séquence des amorces  | Taille d'amplicon (bp) |
|---|--|---|------------------------|
| <i>bla<sub>VIM</sub></i>                  | VIM-F<br>VIM-R <sub>v</sub><br>VIM sonde       | CACAGYGGCMCTTCTCGCGGAGA<br>GCGTACGTYGCCACYCCAGCC 6-FAM-<br>AGTCTCCACGCACTTTTCATGACGACCGC<br>GTCGGCG-TAMRA | 132                    |
| <i>bla<sub>CTX-M</sub></i><br>groupe<br>A | CTX-M-F<br>CTX-M-R <sub>v</sub><br>CTX-M sonde | CGGGCRATGGCGCARAC<br>TGCRCGGTSGTATTGCC<br>CCARCGGGCGCAGYTGGTGAC   | 105                    |
| <i>bla<sub>CTX-M</sub></i><br>groupe<br>B | CTX-M-F<br>CTX-M-R <sub>v</sub><br>CTX-M sonde | ACCGAGCCSACGCTCAA<br>CCGCTGCCGGTTTTATC<br>CCCGCGYGATAACCACCACGC   | 221                    |
| <i>bla<sub>TEM</sub></i>                  | TEM-F<br>TEM-R <sub>v</sub><br>TEM sonde       | TTCTGCTATGTGGTGCGGTA<br>GTCCTCCGATCGTTGTCAGA<br>AACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCA<br>GA                        | 213                    |
| <i>bla<sub>SHV</sub></i>                  | SHV-F<br>SHV-R <sub>v</sub><br>SHV sonde       | TCCCATGATGAGCACCTTTAAA<br>TCCTGCTGGCGATAGTGGAT<br>TGCCGGTGACGAACAGCTGGAG                                  | 105                    |

La PCR en temps réel utilise le principe de base de la PCR classique (amplification cyclique d'un fragment d'ADN, basée sur une réaction enzymologique) mais l'amplification mesurée non pas en final mais tout au long de la réaction, donc en temps réel.

Un cycle de PCR, ou cycle d'amplification est composé d'une étape de dénaturation d'ADN, suivie de l'hybridation des amorces sur leur séquence spécifique et de l'extension de ces amorces par l'ADN polymérase. Le schéma du programme de PCR en temps réel utilisé est présenté dans la figure 14.

Tous les systèmes de PCR en temps réel reposent donc sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification et l'augmentation du signal d'émission fluorescente est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons

générés durant la réaction. Les sondes fluorescentes présentent un des principes généraux pour la détection quantitative des amplicons. La technologie Taqman est basée sur l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase pour hydrolyser une sonde hybridée à sa séquence cible sur l'amplicon durant l'étape d'hybridation/extension de la PCR. Un fluorochrome émetteur (reporter) est fixé à l'extrémité 5' de la sonde d'hybridation et son émission est inhibée par un second fluorochrome suppresseur (quencher) présent à l'extrémité 3'.



**Figure 14.** Schéma présentant le programme de PCR en temps réel utilisé.

Lors de la dénaturation, les deux brins d'ADN sont séparés, puis les amorces se fixent sur leur séquence cible au cours de l'hybridation. Pendant l'élongation, la polymérase va cliver la sonde TaqMan®. Le fluorophore va donc s'éloigner du quencher, qui n'absorbera plus la fluorescence émit par le premier, et un signal pourrait être détecté.

L'amplification par PCR, corrélée à un nombre de fluorophore clivés (donc émettant un signal fluorescent) augmente exponentiellement. Ceci va se traduire par une courbe de PCR en temps réel, retraçant l'intensité du signal émis en fonction du nombre de cycle PCR. Au début, le signal fluorescent émis ne se démarque pas du bruit de fond. Ensuite, une phase exponentielle d'amplification du signal apparaît jusqu'à une phase plateau, correspondant au signal maximal détectable lorsque toutes les sondes ont été clivées. Une fois que la quantité d'ADN permet aux sondes fluorescentes de dépasser ce seuil, alors, on obtient un numéro de cycle PCR appelé "Ct" pour "Cycle Threshold" ou cycle seuil. Le cycle seuil correspond au nombre de cycle de PCR qui doivent avoir lieu avant le début de la phase exponentielle.

On réalise cette technique en utilisant un thermocycleur CFX C1000. Dans une plaque pour thermocycleur CFX C1000, on dépose 20 µl du mélange réactionnel décrit dans le tableau 8 dans chaque puits, cette dernière est introduite par la suite dans le thermocycleur.

**Tableau 8.** Composition des mélanges réactionnels pour les PCRs en temps réel.

| Mix RT-PCR pour une réaction           | Quantité PCR en temps réel |
|--|----------------------------|
| <b>Quantitect Probe PCR Master Mix</b> | <b>10 µl</b>               |
| <b>Amorce Forward</b>                  | <b>0.5 µl</b>              |
| <b>Amorce Reverse</b>                  | <b>0.5 µl</b>              |
| <b>Sonde</b>                           | <b>2 µl</b>                |
| <b>H2O physiologique</b>               | <b>2 µl</b>                |
| <b>ADN à amplifier</b>                 | <b>5 µl</b>                |
| <b>Volume total</b>                    | <b>20 µl</b>               |

### 8.3 Détermination des variants des gènes de résistance

#### 8.3.1 Polymerase chain reaction (PCR) standard

Les extraits d'ADN présentant un résultat positif en PCR en temps réel ainsi que *bla<sub>VEB</sub>*, *bla<sub>PER</sub>* et *bla<sub>GES</sub>* feront l'objet d'une PCR standard ciblant l'amplification de la totalité du gène de résistance détecté en vue de le séquencer afin de déterminer le variant du gène de résistance en question. Les amorces utilisées pour la PCR standard sont présentées dans le tableau 9 (Djamdjian et al., 2011 ; Mesli et al., 2013).

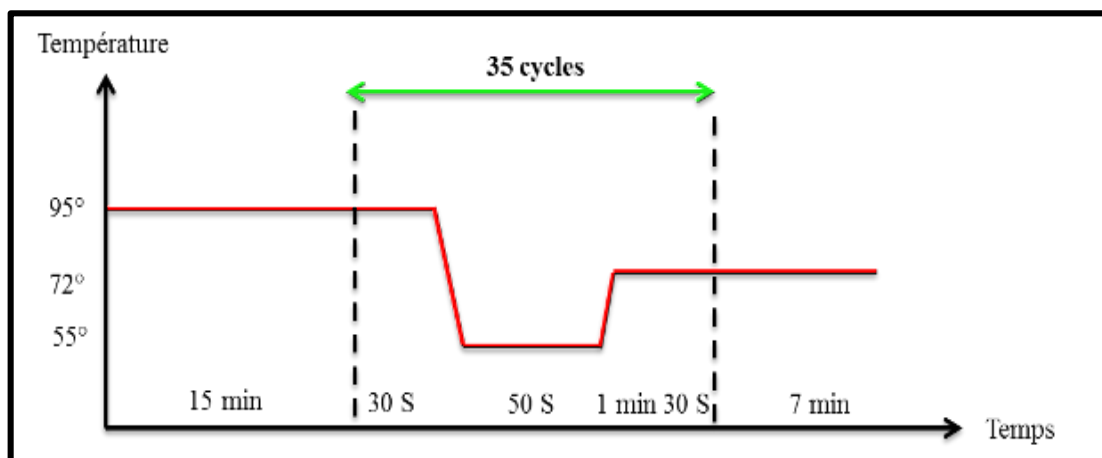
**Tableau 9.** Amorces utilisées en PCR standard et au séquençage.

| Gene                     | Amorce    | Séquence des amorces (5'→3') | Taille d'amplicon (pb) |
|--------------------------|-----------|------------------------------|------------------------|
| <i>bla</i><br>OXA-48     | OXA-48-F  | TTGGTGGCATCGATTATCGG         | 744                    |
|                          | OXA-48-Rv | GAGCACTTCTTTTGTGATGGC        |                        |
| <i>bla<sub>KPC</sub></i> | KPC-F     | ATGTCACTGTATCGCCGTCT         | 893                    |
|                          | KPC-Rv    | TTTTCAGAGCCTTACTGCC          |                        |
| <i>bla<sub>VIM</sub></i> | VIM-F     | ATTGGTCTATTTGACCGCGTC        | 780                    |
|                          | VIM-Rv    | TGCTACTCAACGACTGCGCG         |                        |
| <i>bla<sub>IMP</sub></i> | IMP-F     | GGAATAGAGTGGCTTAAAYTC        | 132                    |
|                          | IMP-Rv    | TCGGTTTAAAYAAAACAACCACC      |                        |
| <i>bla<sub>NDM</sub></i> | NDM-F     | CATTTGCGGGGTTTTTATG          | 1022                   |
|                          | NDM-Rv    | CTGGGTCGAGGTCAGGATAG         |                        |
| <i>bla<sub>CTX</sub></i> | CTX-F     | TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA      | 544                    |
|                          | CTX-Rv    | CGATATCGTTGGTGGTGCCATA       |                        |

Tableau 9. (Suite)

|                           |                             |  |      |
|---------------------------|-----------------------------|--|------|
| <i>bla</i> <sub>TEM</sub> | TEM-F<br>TEM-R <sub>v</sub> | ATGAGTATTCAACATTTCCGTG<br>TTACCAATGCTTAATCAGTGAG | 861  |
| <i>bla</i> <sub>SHV</sub> | SHV-F<br>SHV-R <sub>v</sub> | TTTATGGCGTTACCTTTGACC<br>ATTTGTGCGCTTCTTTACTCGC  | 1051 |
| <i>bla</i> <sub>VEB</sub> | VEB-F<br>VEB-R <sub>v</sub> | CGACTTCCATTTCCCGATGC<br>GGACTCTGCAACAAATACGC     | 374  |
| <i>bla</i> <sub>PER</sub> | PER-F<br>PER-R <sub>v</sub> | ATGAATGTCATTATAAAAGC<br>AATTTGGGCTTAGGGCAGAA     | 925  |
| <i>bla</i> <sub>GES</sub> | GES-F<br>GES-R <sub>v</sub> | GTTTTGCAATGTGCTCAACG<br>TGCCATAGCAATAGGCGTAG     | 371  |

Le principe de la Polymerase Chain Reaction (PCR) standard, consiste à amplifier une séquence cible afin d'obtenir rapidement une quantité importante et exploitable d'un segment précis d'ADN en utilisant une paire d'amorce (sens et anti sens). Le schéma du programme de PCR standard est présenté dans la figure 15.



**Figure15.** Schéma présentant le programme de PCR standard utilisé.

Les réactions d'amplification des gènes sont réalisées dans un thermocycleur de type BioRad. Les amplicons sont ensuite purifiés et séquencés, les séquences obtenues ont été comparées à celles déposées et blastées contre ARG-ANNOT (Gupta et al., 2014).

Une réaction de PCR classique comprend une étape de dénaturation initiale de l'ADN double brin pendant 15 min à 95°C. Cette étape est suivie de 35 cycles d'amplification de l'ADN d'intérêt avec 30 secondes à 95°C (dénaturation), 50 secondes à 55°C (appariement des

amorces, la température est variable selon les amorces) et 1 min 30 secondes à 72°C (élongation, le temps est variable selon la taille du fragment à amplifier).

Dans une plaque pour thermocycleur BioRad on dépose 20 µl du mélange réactionnel qui est décrit dans le tableau 10 dans chaque puits, cette dernière est introduite par la suite dans le thermocycleur.

**Tableau 10.** Composition des mélanges réactionnels pour les PCR standard.

| Composants                             | Quantité de PCR standard |
|--|--------------------------|
| <b>Quantitect Probe PCR Master Mix</b> | <b>10 µl</b>             |
| <b>Qiagen</b>                          | <b>0.5 µl</b>            |
| <b>Amorce Forward</b>                  | <b>0.5 µl</b>            |
| <b>Amorce Reverse</b>                  | <b>4 µl</b>              |
| <b>H<sub>2</sub>O</b>                  | <b>5 µl</b>              |
| <b>ADN à amplifier</b>                 |                          |
| <b>Volume total</b>                    | <b>20 µl</b>             |

### 8.3.2 Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel est une méthode de séparation des macromolécules en fonction de leur taille et leur charge électrique. Pour vérifier la présence et l'amplification du gène cible, les produits de PCR sont déposés sur un gel d'agarose à 1% dans une cuve à électrophorèse contenant du tampon TBE (TRIS, Borate, EDTA). La migration se fait pendant 20 minutes sous un voltage de 135 V.

#### 8.3.2.1 Protocole de préparation du gel d'agarose

La préparation du gel d'agarose se fait dans une bouteille ou flacon en verre stérile, en mélangeant la poudre d'agarose à une concentration de 1% dans du tampon TBE à 0,5%. Ensuite la préparation est mise au four micro-ondes pendant 4 à 6 minutes, jusqu'à la dissolution complète de l'agarose et l'obtention d'un mélange parfaitement transparent. Après refroidissement, une solution de bromure d'éthidium BET diluée (12,5 µl pour 50 ml du gel d'agarose chauffé) est ajoutée puis le mélange est bien homogénéisé. Le gel est coulé dans le support du gel en présence des peignes qui permettent la formation des puits, et laissé refroidir jusqu'à solidification.

### 8.3.2.2 Electrophorèse des produits d'amplification

Après polymérisation, les peignes sont retirés et le gel est placé dans la cuve d'électrophorèse remplie avec le tampon TBE 0,5% (le gel doit être totalement émergé). Ensuite on dépose 4 µl d'ADN marqueur de taille (G7521) avec un intervalle entre 126 et 2645 pb (BenchTop pGEM® DNA Marker, Promega, USA), dans le premier et/ou le dernier puits. Puis, 4 µl du produit de PCR amplifié sont mélangés avec une goutte du bleu de bromophénol (Blue Juice loading buffer). Un témoin négatif (Mix de PCR sans ADN) et un témoin positif (produit de PCR de gène de résistance recherché) sont déposés avec le produit amplifié. Par la suite, le couvercle de la cuve est fermé et la cuve est branchée au générateur sous tension de 135 V à une durée de migration environ 20 min.

### 8.3.2.3 Révélation des bandes d'ADN aux rayons ultra-violet

Le gel d'agarose est ensuite exposé sous rayons ultra-violet pour visualiser les bandes. Les bandes obtenues sont comparées avec le poids moléculaire du gène et celle du témoin positif.

## 8.3.3 Séquençage

### 8.3.3.1 Principe

Les produits de PCR révélés positifs feront l'objet d'un séquençage selon la méthode de Sanger modifiée (Sanger *et al.*, 1992), en utilisant le kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) et le séquenceur ABI 3130 XL (Applied Biosystems), selon les recommandations du fabricant.

La technique est basée sur la synthèse des brins d'ADN qui sont complémentaires à un brin d'ADN matrice. Cette technique est une PCR abortive au cours de laquelle sont introduits des désoxynucléotides (dNTP) chimiquement modifiés par un marqueur fluorescent et par un groupement chimique inhibant la formation de liaisons phosphodiester, ce qui entraîne la fin de l'extension de l'ADN par l'ADN polymérase à chaque fois qu'un dNTP est incorporé.

Le produit de cette PCR fera l'objet d'une électrophorèse réalisée par le séquenceur afin de déterminer la séquence nucléotidique du gène amplifié.

### 8.3.3.2 Purification du produit de PCR standard

Une quantité de 100 µl d'eau ultra pure est ajoutée au produit PCR, puis le tout est transféré dans une plaque Machery Nagel à filtre pour faire la première purification. Ensuite,

cette dernière est déposée sur une pompe sous vide pendant 20 min (filtration sous vide). Avant de mettre la plaque en agitation pendant 20 min sur un agitateur, 20 µl d'eau distillée stérile (EDS) est ajoutée. Le produit pur fera l'objet d'une PCR BigDye.

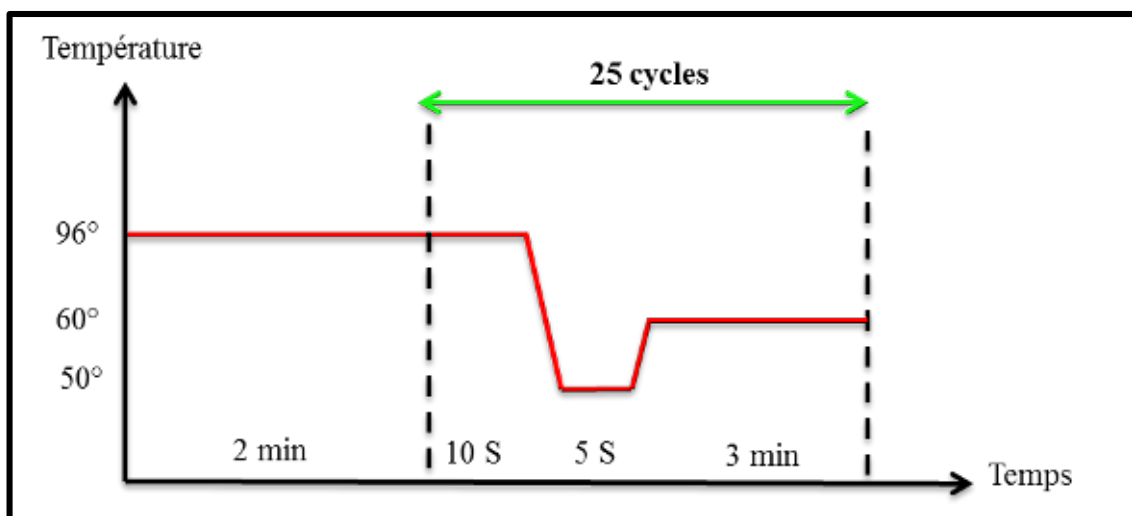
### 8.3.3.3 PCR BigDye

Cette PCR consiste à amplifier le forward et le reverse séparément pour pouvoir les séquencer par la suite. Le protocole utilisé pour effectuer une PCR BigDye dont le mélange réactionnel est présenté dans le tableau 11, est consisté à déposer 20 µl du mélange dans chaque puits de la plaque à PCR.

**Tableau 11.** Composition du mélange réactionnel pour la PCR Big Dye.

| Composants pour Forward | Composants pour Reverse | Quantité de PCR BigDye |
|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| Tampon BigDye           | Tampon BigDye           | 3 µl                   |
| Big Dye terminator      | Mix Big Dye terminator  | 2 µl                   |
| Amorce F                | Amorce Rev              | 1 µl                   |
| ADN à amplifier         | ADN à amplifier         | 4 µl                   |
| H <sub>2</sub> O UP     | H <sub>2</sub> O UP     | 10 µl                  |
| <b>Volume total</b>     | <b>Volume total</b>     | <b>20 µl</b>           |

Pour chaque produit de PCR, nous faisons 2 mélanges réactionnels séparés, un pour le Forward et l'autre pour le Reverse, exécuté selon le programme porté dans la figure 16.



**Figure 16.** Schéma représentant le programme de l'amplification de la PCR BigDye.

Une fois l'étape de thermocyclage effectuée, il est nécessaire de procéder à une purification.

#### 8.3.3.4 Purification des produits de PCR BigDye

Dans une plaque à filtre spécifique à la purification par Sephadex (G-50, Sigma), une poudre de Sephadex est mise dans les puits de la plaque auxquelles 300 µl d'eau ultra pure sont ajoutées puis le gel est laissé gonfler 2 à 3 h. Par la suite la plaque à filtre a été mise au-dessous d'une plaque contenant des puits, et centrifugée à 12000 t/m pendant 5 min à 10°C pour récupérer l'excédent d'eau dans les puits qui sera jeté. Les produits PCR BigDye sont mis dans la plaque à filtre qui sera placée sur une deuxième plaque à puits pour collecter les produits de PCR purifiés après une centrifugation à 12000 t/m pendant 10 min à 10°C. Cette plaque est ensuite recouverte par un tapis de protection. Enfin le produit récupéré est alors prêt à être séquencer.

#### 8.3.3.5 Analyse des données du séquençage

Les séquences nucléotidiques obtenues feront l'objet d'assemblage et de vérification pour éventuelle correction en faisant appel au logiciel CodonCode Aligner. Les séquences traitées seront alignées et interrogées avec les séquences des gènes de résistance disponibles dans la base de données du logiciel ARG-ANNOT (Gupta et al., 2014).

Cette opération permet l'identification du variant du gène de résistance en question en se basant sur le degré d'homologie et de couverture obtenu lors de l'alignement.

## 9 Etude de la transférabilité des carbapénèmases

Dans le cadre d'évaluation de la possibilité de dissémination de gène de résistance codant pour la production de carbapénémase, la transférabilité de ces gènes a été étudiée en utilisant la technique de conjugaison et la transformation par électroporation et par choc thermique.

### 9.1 Conjugaison

La conjugaison a été réalisée entre les souches productrices de carbapénèmases (souches donatrices) et la souche *E. coli* J 53 résistante à l'azide de sodium (souche réceptrice). L'étude du transfert du support génétique des gènes de type carbapénémase a été faite selon la méthode de conjugaison en bouillon. À partir d'une culture jeune de 24 h, la souche réceptrice et les

souches donatrices font l'objet d'un ensemencement dans des tubes en double contenant 9 ml du bouillon de Trypticase soja (TSB) (Becton, Dickinson and Company, France).

Chacun des tubes de la souche réceptrice reçoit 1 ml de la culture donatrice afin d'optimiser le contact. Le transfert a été effectué après incubation 4 h et 24 h à 37°C. L'incubation a été faite 24 h à 37°C. Ensuite, des milieux sélectifs des transconjugants ont été préparés en utilisant la gélose Trypticase soja (Becton, Dickinson and Company, France) additionné des concentrations d'azide de sodium et d'ertapénème, 200 µg/ml et 20 µg/ml respectivement. Dix microlitres du mélange du milieu de conjugaison ont été ensemencés sur la moitié haute des boîtes de sélection. La sélectivité des milieux utilisés a été vérifiée en ensemençant la souche donatrice et la souche réceptrice dans l'autre moitié des boîtes de Pétri. Après une incubation de 24 à 48 h à 37°C, un antibiogramme a été réalisé pour confirmer l'acquisition du phénotype de résistance des transconjugants (**Batah et al. 2015 ; Yang et al., 2016**). Le protocole de conjugaison utilisé est montré dans la figure 17.

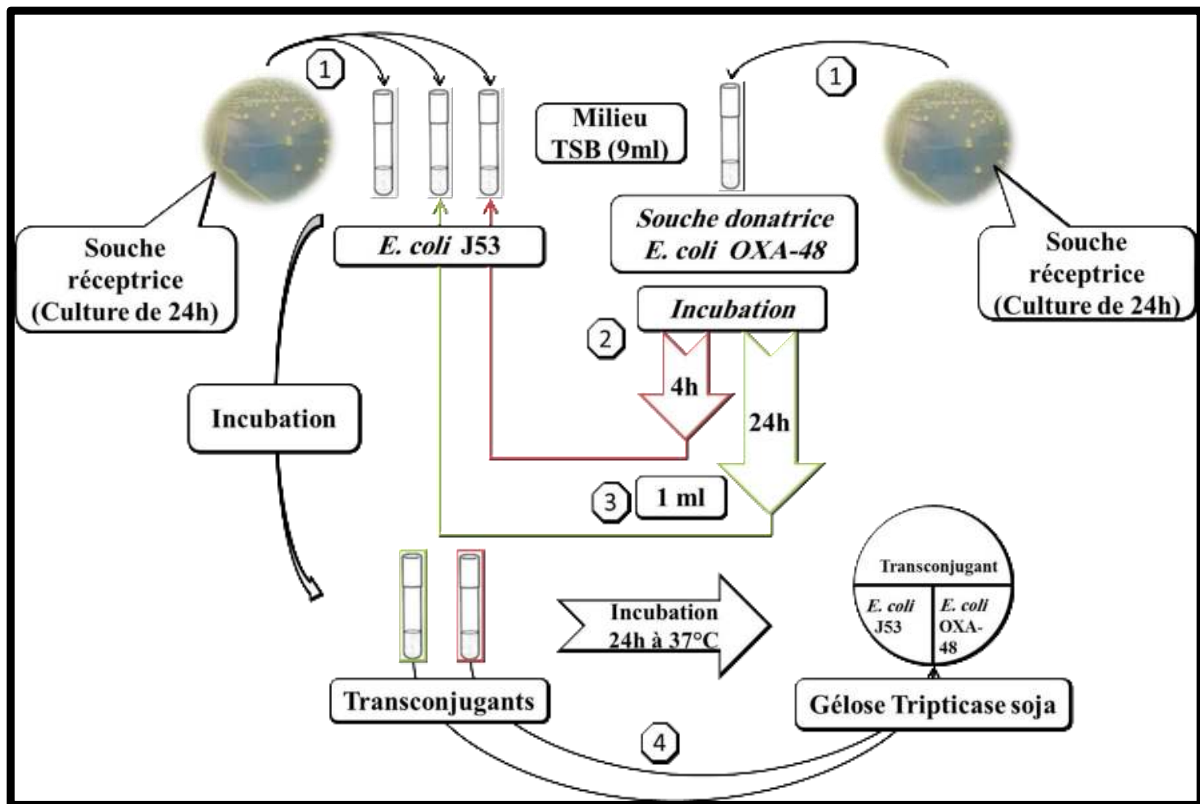
## 9.2 Transformation

Les souches productrices de carbapénèmases ont fait l'objet d'une extraction plasmidique en utilisant High Purity Plasmid Miniprep Kit, en respectant les instructions du fabricant.

### 9.2.1 Extraction de plasmide

A partir d'une culture jeune sur milieu LB, 1,5 µl faisant l'objet d'une centrifugation à 13000 t/m (au moins 8000 t/m) pendant 3 min à une température entre 15 et 25°C. Ensuite, le surnageant est éliminé complètement du culot cellulaire qui est resuspendu dans 250 µl d'une solution de resuspension et transféré dans un tube à centrifuger. Les bactéries doivent être mises complètement en suspension par agitation au vortex ou pipetage de haut en bas jusqu'à ce qu'il ne reste plus d'agrégats de cellules (il faut s'assurer que l'ARNase a été ajoutée à la solution de resuspension). Puis, 250 µl de la solution de lyse sont ajoutés et bien mélangés en retournant le tube 4 à 6 fois jusqu'à ce que la solution devienne visqueuse et légèrement limpide (ne pas vortexer pour éviter le cisaillement de l'ADN chromosomique et ne pas incuber pendant plus de 5 min pour éviter la dénaturation de l'ADN plasmidique surenroulé). Par la suite, 350 µl de la solution de neutralisation est ajoutée et mélangée immédiatement et soigneusement en inversant le tube 4 à 6 fois (il est important de mélanger soigneusement et délicatement après

l'ajout de la solution de neutralisation pour éviter la précipitation des débris de cellules bactériennes).



**Figure 17.** Protocole de conjugaison utilisé.

**1 :** Ensemencement des souches donatrices et réceptrices dans le TSB.

**2 :** Transfert des souches donatrices après 4 h. **3 :** Transfert des souches donatrices après 24 h

**4 :** Ensemencement des transconjugants sur gélose TS sélective.

Le lysat bactérien neutralisé d'un aspect trouble et visqueux sera par la suite centrifugé pendant 10 min à 14 000 t/m (12 000 t/m) pour agglomérer les débris cellulaires et l'ADN chromosomique. Le surnageant est alors transféré dans une colonne spinale en évitant de prélever le précipité blanc. Une centrifugation est effectuée pendant 1 min ensuite on jette l'écoulement, la colonne est ensuite placée dans le même tube de collecte. En utilisant 500  $\mu$ L du tampon de lavage PB, la colonne spinale est lavée puis placée pour une centrifugation pendant 30 à 60 secondes à 14 000 t/m (12 000 t/m), ensuite l'écoulement est jeté et la colonne sera placé dans le même tube de collecte. Un autre lavage en utilisant 500  $\mu$ L du tampon de lavage W a été utilisé pour laver la colonne spinale qui a été centrifugée pendant 30 à 60 secondes à 14 000 t/m (12 000 t/m), par la suite l'écoulement sera jeté et la colonne sera placé dans le même tube de collecte (le tampon de lavage W doit être préalablement dilué avec

l'éthanol à 100%). Après répétition de l'étape précédente, le liquide d'écoulement sera jeté et une centrifugation pendant une minute sera effectuée pour éliminer les résidus de l'éthanol dans les préparations de plasmide. Ensuite, la colonne a été placée dans un tube eppendorf propre de 1,5 mL (non fourni). Une quantité de 30-100 µl de tampon d'élution TE (préchauffage à 60°C) a été pipetée directement au centre de la colonne sans toucher la membrane. Cette dernière a été incubée pendant 2 min à température ambiante et centrifugé pendant 2 min à 14 000 x g (12 000 tr / min). Enfin la colonne a été jetée et l'ADN plasmidique purifié sera conservé à -20 ° C.

### 9.2.2 Électroporation

En faisant appel à un appareil spécialisé qui s'appelle un électroporateur, les cellules sont typiquement placées dans une cuvette d'électroporation. Les bactéries mélangées avec le plasmide sont chargées dans la cuvette d'électroporation et un champ électrique est appliqué pendant plusieurs millisecondes. Ceci fait augmenter la tension à travers la membrane pour amener à un réarrangement de la bicouche phospholipidique qui compose la membrane cellulaire, de manière à former des pores. Dans cet état l'ADN plasmidique passera à travers la membrane et lorsque les impulsions seront stoppées la bicouche se réparera elle-même. Ayant pris le plasmide, les bactéries peuvent alors croître sur les milieux gélosés contenant des antibiotiques appropriés (**Bridge, 2006**).

Pour chaque transformation, nous avons besoin d'un flacon de cellules compétentes et d'au moins une boîte de milieu sélectif. Les cellules qui peuvent rapidement prendre l'ADN sont référencées comme cellules compétentes (One Shot® TOP10 Electrocomp™). L'ADN plasmidique de contrôle pUC19 fourni avec le kit (10 pg/µl dans Tris-HCl 5 mM, EDTA 0,5 mM, pH 8) est recommandé pour l'inclure dans l'expérience de transformation afin de vérifier l'efficacité des cellules compétentes. La première étape consiste à décongeler un flacon de cellules One Shot® TOP10 Electrocomp™ *E. coli* qui sera ensuite ajouté par 1-2 µl de l'ADN (10 pg à 100 ng) et mélangé doucement. Pour le contrôle pUC19, on ajoute 10 pg (1 µl) d'ADN dans un flacon séparé de cellules One Shot® et on mélange doucement. Les cellules sont transférées dans la cuvette d'électroporation refroidie sur glace ensuite elles ont été électroporées conformément au protocole recommandé par le fabricant. Par la suite, une quantité de 250 µl du milieu SOC (Bouillon Super Optimal avec Répression Catabolite) préchauffé est ajouté aseptiquement à chaque flacon. Ensuite, on effectue le transfert de la solution dans un tube à bouchon enfichable de 15 ml qui seront ensuite agités pendant au moins 1 h à 37 ° C pour permettre l'expression du gène de résistance aux antibiotiques. Une fois la

transformation est terminée, 10 à 150 µl de chaque transformation est étalée sur une boîte contenant le milieu LB avec et sans l'antibiotique approprié, l'incubation se fait pendant 24 h à 37 ° C. L'étalement de 10 à 200 µL du témoin pUC19 s'effectue après dilution du mélange de transformation à 1: 50 dans du milieu Luria–Bertani (LB) (par exemple, on élimine 20 µl du mélange de transformation et on ajoute à 980 µl de milieu LB). Le mélange de transformation pourra être conservé à 4°C. Si nécessaire, des cellules supplémentaires peuvent être étalées le lendemain. Les boîtes seront ensuite incubées 24 h à 37° C. Enfin les colonies obtenues seront sélectionnées pour l'analyse par isolement plasmidique, PCR ou séquençage.

### 9.2.3 Transformation par choc thermique

Afin de faciliter la pénétration du plasmide à travers la paroi et la membrane bactérienne, ces dernières sont fragilisées par un traitement au chlorure de calcium à 4°C, ces bactéries ainsi préparées sont appelées bactéries compétentes. En exposant les bactéries à une augmentation soudaine de température, ou un choc thermique, une différence de pression entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule est créée, ce qui induit la formation transitoire de micropores, à travers lesquels l'ADN plasmidique peut entrer (**Tagu et Moussard, 2003**).

Pour réaliser cette technique, un ADN de contrôle pUC19 (10 pg/µL) est fourni pour vérifier l'efficacité de la transformation. L'utilisation d'ADN expérimental exempt de phénol, d'éthanol, de protéines et de détergents pour obtenir une efficacité de transformation maximale. La première étape consiste à décongeler des cellules compétentes (DH5α™ Competent Cells) et de placer le nombre requis de tubes en polypropylène de 17 x 100 mm (Falcon® 2059). Les cellules ont été mélangées doucement, puis 100 µL de cellules compétentes ont été aliquotées dans des tubes de polypropylène réfrigérés. Les cellules inutilisées ont été recongelées dans un bain sec de glace/éthanol pendant 5 minutes avant de les remettre au congélateur à -80 ° C (N'utilisez pas d'azote liquide). L'incubation des cellules a été faite dans la glace pendant 30 minutes. Ensuite elles subissent un choc thermique pendant 45 secondes dans un bain-marie à 42 ° C en évitant leur agitation. Puis les cellules ont été placées dans la glace pendant 2 min. 0,9 mL du milieu SOC de température ambiante ont été ajoutés et le mélange sera centrifugé à 225 rpm (37 °C) pendant 1 h. Les mélanges réactionnels d'ADN plasmidique de contrôle ont été par la suite dilués à raison de 1: 10 dans le milieu SOC, après un étalement de 100 µl a été effectué sur milieu des plaques LB supplémenté de 100 µg/ml d'ampicilline. Les mélanges réactionnels expérimentaux ont été dilués et 100-200 µl ont été étalés comme décrit dans l'étape précédente. L'incubation a été effectuée à 37° C pendant 24 h.

## 10 Etude de la clonalité des souches

Les souches présentant les  $\beta$ -lactamases à spectre étendu obtenues lors de la première série de prélèvement ainsi que celles présentant un niveau de résistance allant jusqu'aux carbapénèmes ont fait l'objet de l'étude de leurs clonalités en vue de l'analyse de la diversité clonale d'une part et d'autre part de proposer l'hypothèse de leur origine.

Cette partie a été réalisée en faisant appel à une technique de MLST (Multi-Locus sequence typing) basée sur l'amplification et le séquençage de 7 gènes de ménages suivants: *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, et *recA*.

La technique implique l'amplification par PCR des gènes déjà cités comprenant les étapes de dénaturation, hybridation et d'extension. Les tailles des séquences cibles, les fonctions des gènes, ainsi que les amorces utilisées sont présentées dans le tableau 12 (**Tartof et al., 2005**).

Le séquençage des produits de PCR obtenus a été réalisé par la même méthode décrite dans la partie séquençage de gènes de résistance, en utilisant les mêmes amorces impliquées dans l'amplification des gènes de ménages. Chacune des séquences de gène de ménage obtenues sera interrogée contre la base de données MLST de l'espèce *E. coli* disponible sur le site web (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>) en vue de la détermination du numéro d'allèle correspondant et par la suite sur le même site web la combinaison des allèles obtenus de chaque souche permet de déterminer sa séquence type.

Dans l'objectif de vérifier la position phylogénétique des clones producteurs de  $\beta$ -lactamases trouvés dans cette étude, un arbre phylogénétique a été construit en utilisant les séquences obtenues dans cette étude et celle de la plupart des souches isolées chez les différents oiseaux migrateurs de la région méditerranéenne. L'arbre phylogénétique a été construit en utilisant le logiciel Mega 6, avec la méthode Neighbor-Joining (**Tamura et al., 2013**), et les distances évolutives ont été calculées en utilisant la méthode Kimura à 2 paramètres (**Kimura, 1980**). L'ensemble des protocoles expérimentaux utilisés dans cette partie est présenté dans la figure 18.

**Tableau 12.** Tailles des séquences cibles, fonctions des gènes, et amorces utilisées en MLST.

| Taille de séquence cible (pb) | Fonction de gène                                 | Amorce            | Séquence (5' → 3')  |
|-------------------------------|--|-------------------|---|
| <i>adk</i><br>(583)           | Adénylate kinase                                 | adk-F<br>adk-Rv   | ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG<br>CCGTCAACTTTTCGCGTATTT                                   |
| <i>fumC</i><br>(806)          | Fumarate hydratase                               | fumC-F<br>fumC-Rv | TCACAGGTCGCCAGCGCTTC<br>GTACGCAGCGAAAAAGATTC                                    |
| <i>gyrB</i><br>(911)          | ADN gyrase                                       | gyrB-F<br>gyrB-Rv | TCGGCGACACGGATGACGGC<br>ATCAGGCCTTCACGCGCATC                                    |
| <i>icd</i><br>(878)           | Isocitrate/<br>isopropylmalate<br>déshydrogénase | icd-F<br>icd-Rv   | ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGC<br>ACA<br>GGACGCAGCAGGATCTGTT                        |
| <i>mdh</i><br>(932)           | Malate<br>déshydrogénase                         | mdh-F<br>mdh-Rv   | ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGC<br>TGGCGG<br>TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGAT<br>ATCTTTCTT |
| <i>purA</i><br>(816)          | Adénylosuccinate<br>déshydrogénase               | purA-F<br>purA-Rv | CGCGCTGATGAAAGAGATGA<br>CATACGGTAAGCCACGCAGA                                    |
| <i>recA</i> (780)             | Motif de liaison<br>ATP / GTP                    | recA-F<br>recA-Rv | CGCATTTCGCTTTACCCTGACC<br>TCTCGATCAGCTTCTCTTTT                                  |

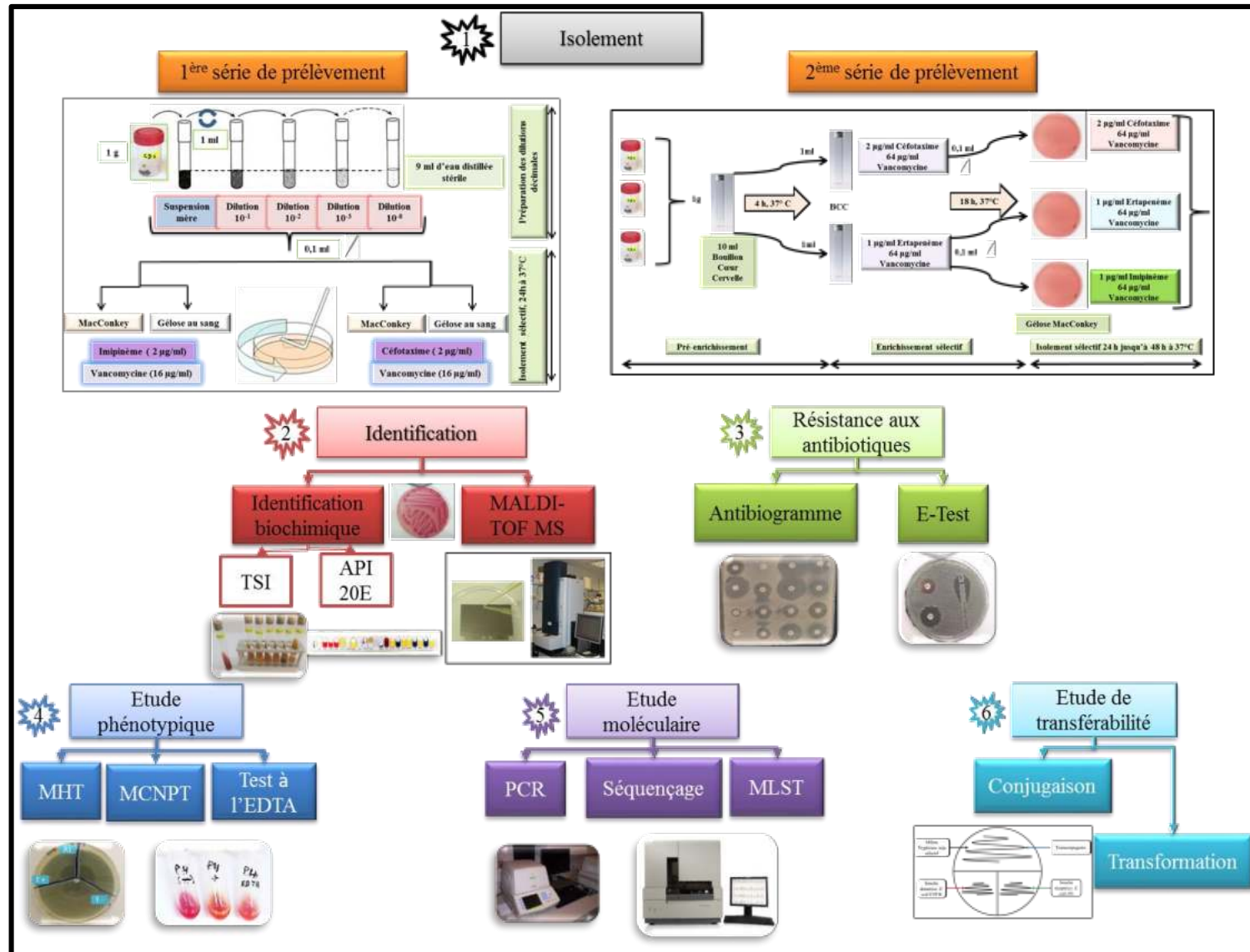


Figure 18. Schéma général représente le protocole du criblage utilisé (MHT : Test de Hodge modifié, MCNPT : Carba NP test modifié).

*Partie 3.*

**RÉSULTATS**

***ET***

**DISCUSSION**

## 1 Echantillonnage

Dans le but d'isoler des entérobactéries résistantes aux  $\beta$ -lactamines, un total de 43 échantillons de fientes fraîches de la cigogne blanche (*Ciconia ciconia*) ont été prélevés de différents nids situés sur les poteaux électriques et les toits de maisons de la ferme « Ben Ahmed Boudjema » de la région d'El Madher, wilaya de Batna. Cette technique de prélèvement est utilisée en raison des difficultés de piégeage des oiseaux (Hessman et al., 2018). En outre le risque de la chute et de l'électrocution d'une part, et d'autre part la menace d'attaque par ces oiseaux ont limité le nombre d'échantillons prélevés. Ce problème d'accessibilité est signalé déjà par Bonnedahl et al. (2015).

## 2 Screening des souches d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération et/ou carbapénèmes

Des colonies représentatives caractéristiques des entérobactéries, de couleur rouge ou rose sur milieu MacConkey due à l'acidification du milieu à cause de la fermentation du lactose ont été repiquées et purifiées sur le même milieu d'isolement.

Les cultures pures font l'objet d'une coloration de Gram qui permettra de confirmer la pureté des souches et d'éliminer les autres bactéries non recherchées (telles que les bactéries à Gram positif). Toutes les bactéries à Gram négatif isolées présentent une forme bacille ou coccobacille.

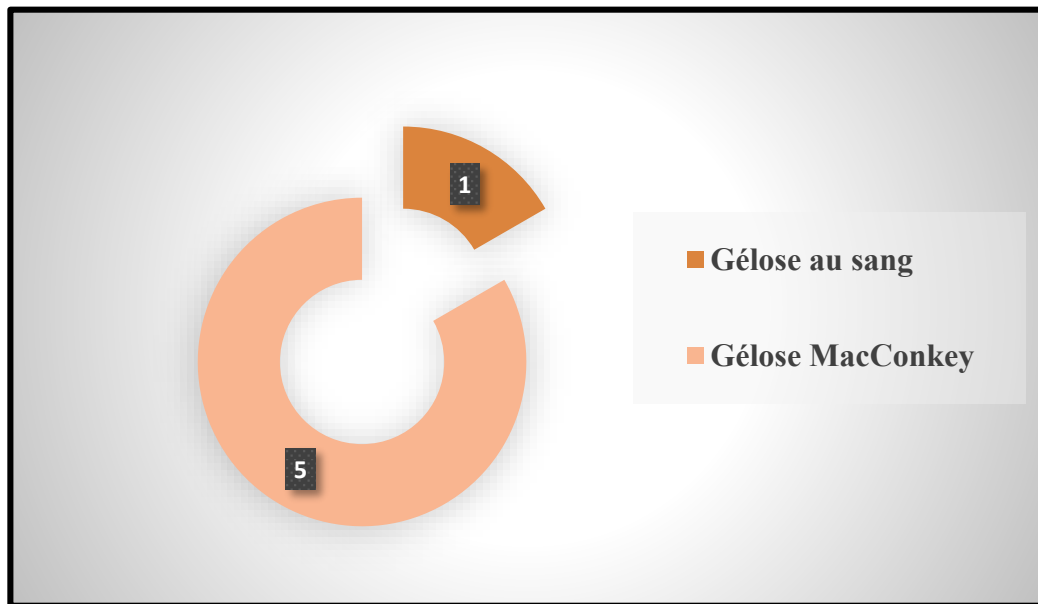
### 2.1 Isolement sélectif

L'isolement sélectif des onze échantillons sur les milieux MacConkey et gélose au sang utilisés nous a permis de détecter 6 souches réparties comme suit: 1 souche à partir du milieu gélose au sang et 5 souches de gélose MacConkey. Les souches C1 et C2 ont été isolées à partir de la dilution  $10^{-3}$  alors que les souches C3, C4, C5, C6 ont été isolées des dilutions  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  et  $10^{-8}$  respectivement.

La répartition des souches isolées de la première série de prélèvement selon les milieux sélectifs utilisés est présentée dans la figure 19.

La gélose Columbia enrichie de 5% du sang de mouton est utilisée comme milieu très nutritif permettant la culture et l'isolement d'une grande variété de microorganismes à savoir

les levures et les champignons qui pourraient potentiellement empêcher le développement des entérobactéries.

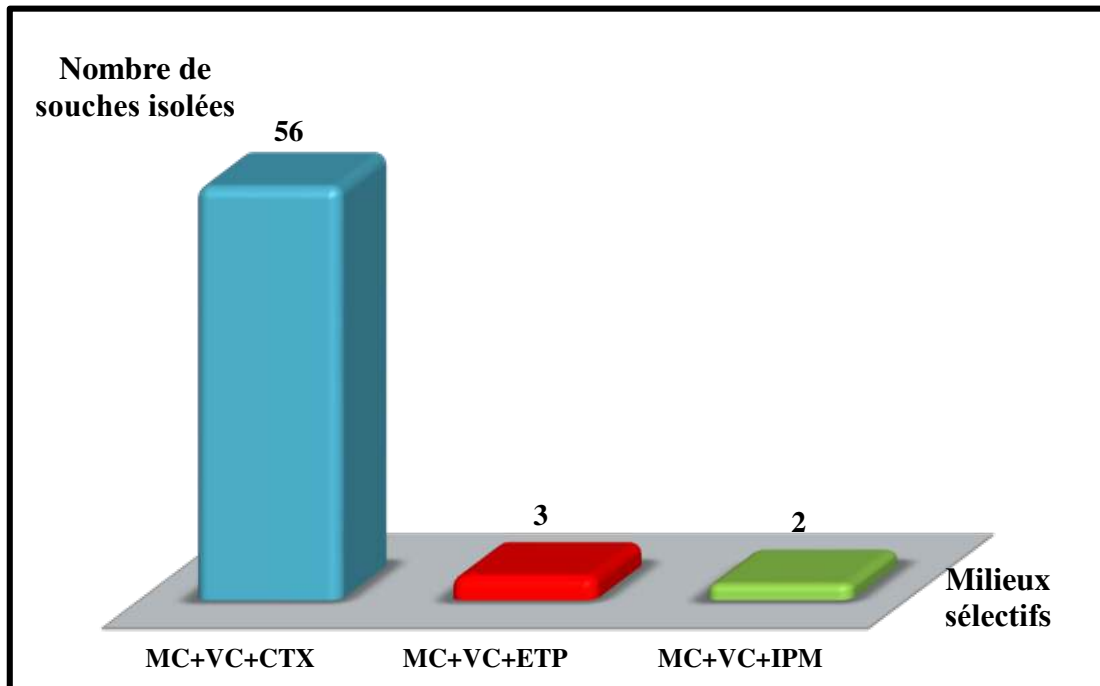


**Figure 19.** Répartition des souches isolées selon les milieux sélectifs utilisés.

La gélose MC présente un milieu sélectif pour l'isolement des entérobactéries. L'inhibition des microorganismes à Gram positif est due à la présence de sels biliaires et de cristal violet ce qui favorise le développement des BGN d'où l'isolement d'un nombre élevé des souches sur ce milieu.

On a examiné la présence des entérobactéries à partir de la deuxième série de prélèvement en utilisant une technique d'isolement sur différents milieux sélectifs, qui nous a permis d'isoler 61 souches bactériennes. La répartition des souches isolées selon les milieux sélectifs utilisés est présentée dans la figure 20.

Un total de 67 souches bactériennes a été isolé à partir de 43 échantillons des fientes analysées. Des études similaires réalisées principalement sur les oiseaux migrateurs dans différents pays ont indiqué des nombres plus élevés d'isolats, 149/75 au Canada par **Parker et al. (2016)** et 85/44 en Suède par **Ardiles-Villegas et al. (2011)**. Mais aussi un taux inférieur en Autriche par **Loncaric et al. (2013)** avec 24/54.



**Figure 20.** Répartition des souches isolées de la deuxième série de prélèvement selon les milieux sélectifs utilisés (MC : MacConkey, VC : vancomycine, CTX : céfotaxime, ETP : ertapénème, IPM : imipénème).

Dans cette étude, le nombre de souches isolées par rapport au nombre des échantillons analysés reste important. L'importance du nombre des isolats malgré la sélection des antibiotiques peut être expliquée par la richesse des échantillons analysés en bactéries résistantes aux antibiotiques particulièrement aux C3G. En outre, une forte concentration d'antibiotiques dans l'environnement offre une pression de sélection aux bactéries aboutissant à l'acquisition de la résistance (Ardiles-Villegas *et al.*, 2011). Ainsi, les oiseaux migrateurs peuvent facilement être infectés par leurs habitudes alimentaires liées aux décharges publiques et aux eaux usées, fréquemment colonisées par ces bactéries résistantes qui se propagent par des produits agricoles ou des environnements contaminés. D'une autre part, l'optimisation du protocole du screening sélectif a permis d'isoler ce nombre important de bactéries résistantes.

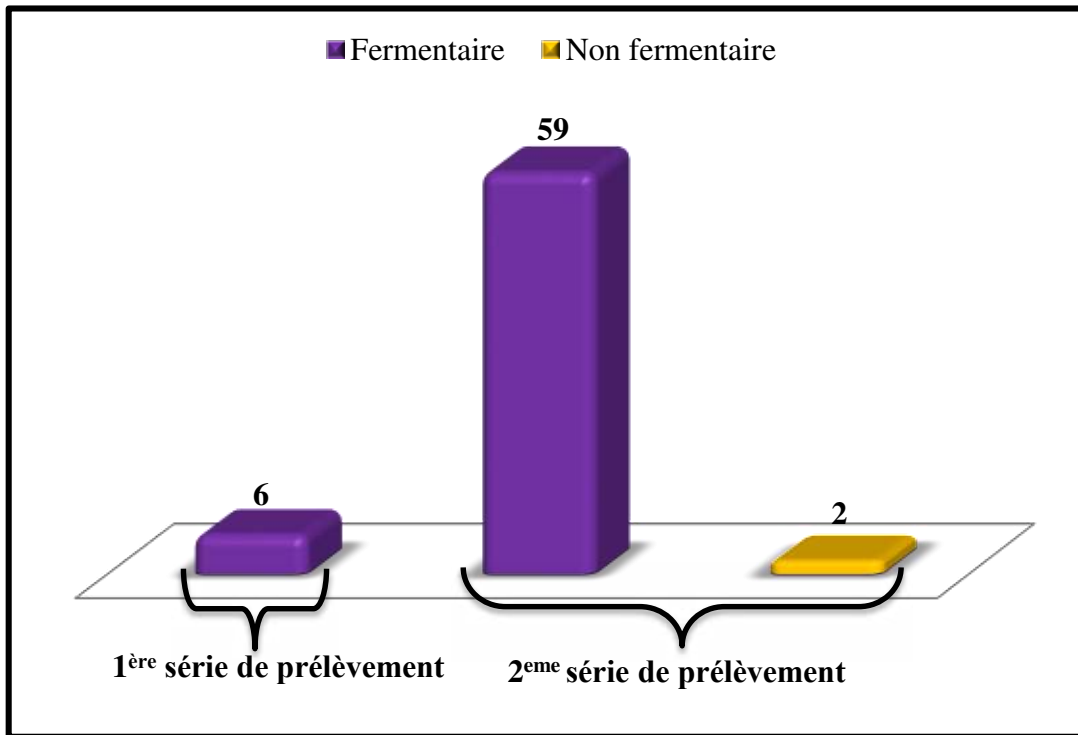
## 2.2 Identification des souches isolées

### 2.2.1 Identification biochimique

#### 2.2.1.1 Test de fermentation du glucose

La gélose TSI permet l'identification des entérobactéries par la mise en évidence rapide de la fermentation du lactose, du glucose (avec ou sans production de gaz), du saccharose et de

la production de sulfure d'hydrogène. Les résultats du test de fermentation utilisé sur milieu TSI ont montré une prédominance des souches fermentaires. Sur l'ensemble de 61 souches isolées des 32 prélèvements, nous avons détecté 59 souches fermentaires, ainsi que les 6 souches isolées de la première série de prélèvement ont présenté le pouvoir fermentaire. Les résultats sont montrés dans la figure 21.



**Figure 21.** Prévalence globale des souches fermentaires dans l'ensemble des prélèvements.

Dans la présente étude nous avons remarqué une prédominance des BGN fermentaires avec un pourcentage de 97,1%. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par **Foti et al. (2011)** lors d'une étude sur une large population d'oiseaux migrateurs passant par le territoire d'Ustica (Italie), une île située sur la route migratoire de nombreuses espèces d'oiseaux vers l'Afrique. Les auteurs ont rapporté la prédominance des BGN fermentaires avec un nombre de 182 souches sur le total de 193, l'équivalent de 95,31%. Par contre, dans une autre étude sur les cailles (*Coturnix coturnix*) en Egypte, **Youssef et Mansour (2014)** ont signalé l'isolement de 48,9% des bactéries fermentaires à partir de prélèvements buccaux et cloacaux. Une autre étude a été faite par **Oteo et al. (2018)** sur un nombre de 668 de prélèvements cloacaux des oiseaux sauvages en Espagne, a révélé la présence de 95 (14,2%) des BGN dont 8 souches sont non fermentaires.

Dans la présente étude notre but était d'isoler des entérobactéries, qui sont caractérisées

par leur fermentation de glucose et certains d'entre elles peuvent en plus fermenter le lactose. L'utilisation de la gélose MC comme milieu d'isolement sélectif des bactéries à Gram négatif, possédant la capacité de révéler la fermentation du lactose, nous a permis de sélectionner les colonies présentant l'aspect des entérobactéries résistantes à cause de la sélectivité de protocole du screening utilisé.

### 2.2.1.2 L'identification par la galerie API 20E

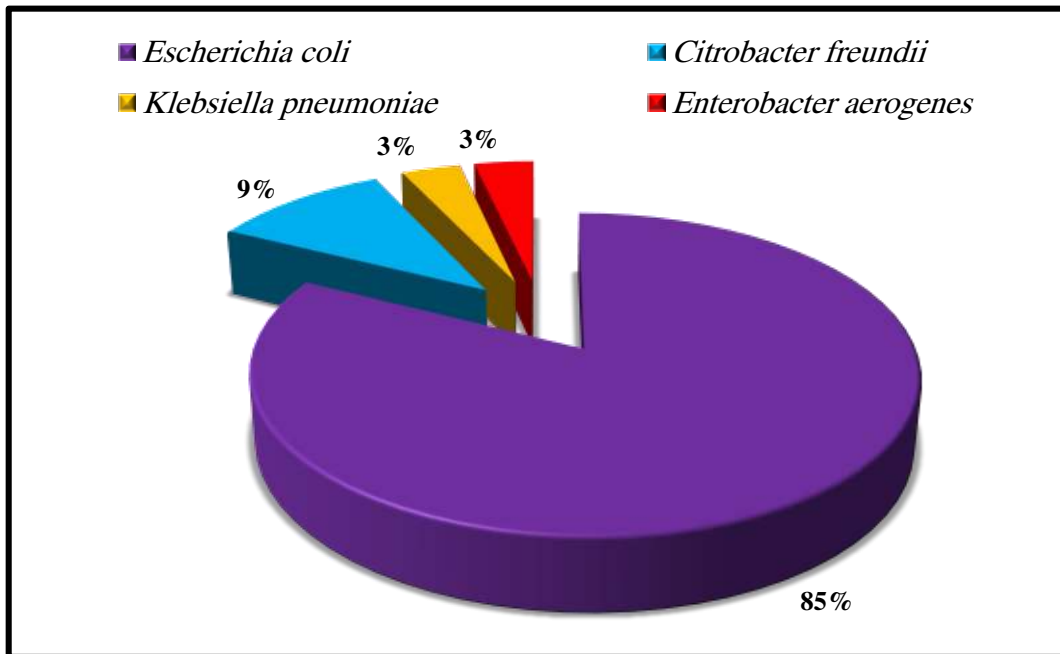
L'identification des entérobactéries par le système Api 20E (Biomérieux, Meylan, France) nous a montré que les 6 souches isolées à partir de la première série de prélèvement répondent aux profils numériques spécifiques de l'espèce *Escherichia coli*. Les souches d'entérobactéries identifiées de deuxième série de prélèvement étaient réparties comme suit: 49 *Escherichia coli*, 6 *Citrobacter freundii*, 2 *Klebsiella pneumoniae* et 2 *Enterobacter aerogenes*. Deux souches ne présentent pas le caractère de fermentation de glucose et ne pouvaient pas être identifiées par API 20E donc n'appartiennent pas à la famille des entérobactéries.

### 2.2.2 Identification par MALDI-TOF MS

Une identification jusqu'à l'échelle de l'espèce a été réalisée par la technique de spectrométrie de masse douce MALDI-TOF. L'identification des souches a été confirmée et les deux souches non fermentaires sont identifiées comme *Pseudomonas xanthomarina*. L'identification de souches isolées a donné de très bons scores et les fréquences des entérobactéries identifiées dans l'ensemble des prélèvements sont présentés dans la figure 22.

Les souches ont été identifiées par MALDI-TOF MS avec des scores élevés, ce dernier a prouvé son efficacité d'identification des entérobactéries (**Freire Martin et al., 2014 ; Abdallah et al., 2015**).

Dans notre étude cette spectrométrie de masse a donné un très bon score d'identification pour toutes les souches bactériennes. En outre, elle reste un moyen très efficace et rapide d'identification des bactéries dans la pratique quotidienne au sein des laboratoires de microbiologie. Elle est basée sur l'ionisation des protéines bactériennes et peut être utilisée en première intention pour l'identification bactérienne à la place de la coloration de Gram, d'autres techniques d'orientations ou encore celles basées sur les caractéristiques biochimiques des bactéries nécessitant beaucoup de temps pour les réaliser.



**Figure 22.** Fréquences des entérobactéries identifiées par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF dans l'ensemble des prélèvements.

L'information concernant la flore bactérienne gastro-intestinale normale est limitée pour la majorité des espèces d'oiseaux, à l'exception de quelques études portant sur des bactéries zoonotiques ou des études portant sur des espèces aviaires d'intérêt commercial (**Ardiles-Villegas et al., 2011**).

L'identification des souches isolées a conduit à la mise en évidence d'une diversité de quatre espèces. Les références des souches, leurs milieux d'isolement et leurs identifications sont montrés dans le tableau 13.

La diversité d'espèces d'entérobactéries chez les oiseaux est en relation avec la recherche de nourriture (**Benskin et al., 2009**). La cigogne blanche est une espèce opportuniste qui se nourrit de tout ce qui est disponible. Le spectre alimentaire comporte une large population de proies tant invertébrées que vertébrées qui semblent être riches en espèces d'entérobactéries (**Djeddou et al., 2007**).

Des résultats similaires ont été signalés par **Steele et al. (2005)** lors d'une étude effectuée sur des oiseaux d'eau dans des centres de rééducation de Californie et Washington aux États-Unis, notant la présence de 79 souches de *E. coli*, 19 *K. pneumoniae*, 17 *C. freundii* et 5 *E. aerogenes*. Ainsi qu' En Espagne, **Blanco et al. (2007)** ont signalé la présence des

*Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *E. coli* et *C. freundii* dans la microflore intestinale des vautours égyptiens.

**Tableau 13.** Références, milieux d'isolement et identification des souches isolées.

| Référence de la souche | Milieu d'isolement | Identification     |         |                   |                                  |                         |                |
|------------------------|--------------------|--------------------|---------|-------------------|----------------------------------|-------------------------|----------------|
|                        |                    | Test de TSI        |         |                   |                                  | API 20E                 | MALDI-TOF MS   |
|                        |                    | Fermentation       |         | Production du gaz | Production de l'H <sub>2</sub> S |                         |                |
|                        |                    | Lactose/saccharose | Glucose |                   |                                  |                         |                |
| A1                     | MC+ETP             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>Escherichia coli</i> | <i>E. coli</i> |
| A2                     | MC+ETP             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>          | <i>E. coli</i> |
| A3                     | MC+ETP             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>          | <i>E. coli</i> |
| C1                     | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>          | <i>E. coli</i> |
| C2                     | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>          | <i>E. coli</i> |
| C3                     | GS+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>          | <i>E. coli</i> |
| C4                     | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>          | <i>E. coli</i> |
| C5                     | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>          | <i>E. coli</i> |
| C6                     | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>          | <i>E. coli</i> |
| D1                     | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>          | <i>E. coli</i> |
| D2                     | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>          | <i>E. coli</i> |
| D3                     | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>          | <i>E. coli</i> |
| D4                     | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>          | <i>E. coli</i> |
| D5                     | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>          | <i>E. coli</i> |
| D6                     | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>          | <i>E. coli</i> |
| 7                      | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>          | <i>E. coli</i> |
| 8                      | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>          | <i>E. coli</i> |
| D7                     | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>          | <i>E. coli</i> |
| D8                     | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>          | <i>E. coli</i> |
| D9                     | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>          | <i>E. coli</i> |
| D10                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>          | <i>E. coli</i> |
| D11                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>          | <i>E. coli</i> |
| D12                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>          | <i>E. coli</i> |
| D13                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>          | <i>E. coli</i> |
| D14                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>          | <i>E. coli</i> |
| D15                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>          | <i>E. coli</i> |

Tableau 13. (Suite)

| Référence de la souche | Milieu d'isolement | Identification     |         |                   |                                  |                            |                    |
|------------------------|--------------------|--------------------|---------|-------------------|----------------------------------|----------------------------|--------------------|
|                        |                    | Test de TSI        |         |                   |                                  | API 20E                    | MALDI-TOF MS       |
|                        |                    | Fermentation       |         | Production du gaz | Production de l'H <sub>2</sub> S |                            |                    |
|                        |                    | Lactose/saccharose | Glucose |                   |                                  |                            |                    |
| D16                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>             | <i>E. coli</i>     |
| D17                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>             | <i>E. coli</i>     |
| D18                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>             | <i>E. coli</i>     |
| D19                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>             | <i>E. coli</i>     |
| D20                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>             | <i>E. coli</i>     |
| D21                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>             | <i>E. coli</i>     |
| D22                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>             | <i>E. coli</i>     |
| D23                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>             | <i>E. coli</i>     |
| D24                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>             | <i>E. coli</i>     |
| D25                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>             | <i>E. coli</i>     |
| D26                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>             | <i>E. coli</i>     |
| D27                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>             | <i>E. coli</i>     |
| D28                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>             | <i>E. coli</i>     |
| D29                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>             | <i>E. coli</i>     |
| 30                     | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>             | <i>E. coli</i>     |
| D30                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>             | <i>E. coli</i>     |
| D31                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>             | <i>E. coli</i>     |
| D32                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>             | <i>E. coli</i>     |
| 33                     | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>             | <i>E. coli</i>     |
| D33                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>             | <i>E. coli</i>     |
| D34                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>             | <i>E. coli</i>     |
| D35                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>             | <i>E. coli</i>     |
| D36                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>             | <i>E. coli</i>     |
| D37                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>             | <i>E. coli</i>     |
| D38                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>             | <i>E. coli</i>     |
| D39                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>             | <i>E. coli</i>     |
| D40                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>             | <i>E. coli</i>     |
| D41                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>             | <i>E. coli</i>     |
| C15                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | +                                | <i>Citobacter freundii</i> | <i>C. freundii</i> |
| C16                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | +                                | <i>C. freundii</i>         | <i>C. freundii</i> |

Tableau 13. (Suite)

| Référence de la souche | Milieu d'isolement | Identification     |         |                   |                                  |                               |                                 |
|------------------------|--------------------|--------------------|---------|-------------------|----------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
|                        |                    | Test de TSI        |         |                   |                                  | API 20 E                      | MALDI-TOF MS                    |
|                        |                    | Fermentation       |         | Production du gaz | Production de l'H <sub>2</sub> S |                               |                                 |
|                        |                    | Lactose/saccharose | Glucose |                   |                                  |                               |                                 |
| C29                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | +                                | <i>C. freundii</i>            | <i>C. freundii</i>              |
| C41                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>Klebsiella pneumoniae</i>  | <i>K pneumoniae</i>             |
| C43                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>K pneumoniae</i>           | <i>K. pneumoniae</i>            |
| C45                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | +                                | <i>C. freundii</i>            | <i>C. freundii</i>              |
| C50                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. coli</i>                | <i>E. coli</i>                  |
| C51                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | +                                | <i>C. freundii</i>            | <i>C. freundii</i>              |
| C53                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | +                                | <i>C. freundii</i>            | <i>C. freundii</i>              |
| C55                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>Enterobacter aerogenes</i> | <i>E. aerogenes</i>             |
| C56                    | MC+CTX             | +                  | +       | +                 | -                                | <i>E. aerogenes</i>           | <i>E. aerogenes</i>             |
| C57                    | MC+IPM             | -                  | -       | -                 | -                                | /                             | <i>Pseudomonas xanthomarina</i> |
| C58                    | MC+IPM             | -                  | -       | -                 | -                                | /                             | <i>P. xanthomarina</i>          |

Dans notre étude nous avons remarqué une prédominance notable des souches de *E. coli* avec un pourcentage de 84%. Le pourcentage élevé des souches de *E. coli* a été également rapportée par l'étude de **Hernandez et al. (2013)**, **Baez et al. (2015)**, **Bonnedahl, et al. (2015)** et **Atterby et al. (2016)**. Cette prédominance peut être expliquée par la raison que *E. coli* est la bactérie entérique la plus fréquente dans le tractus gastro-intestinal des oiseaux (**Shobrak et Abo-amer, 2014**), ou bien par l'alimentation, qui peut être un déterminant important de la flore intestinale (**Steele et al., 2005**).

### 3 Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

#### 3.1 Antibiogramme

En analysant les profils de résistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries isolées dans notre étude, des niveaux de résistance variables ont été remarqués. Le tableau 14 présente le profil de résistance des entérobactéries isolées.

**Tableau 14.** Sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries isolées.

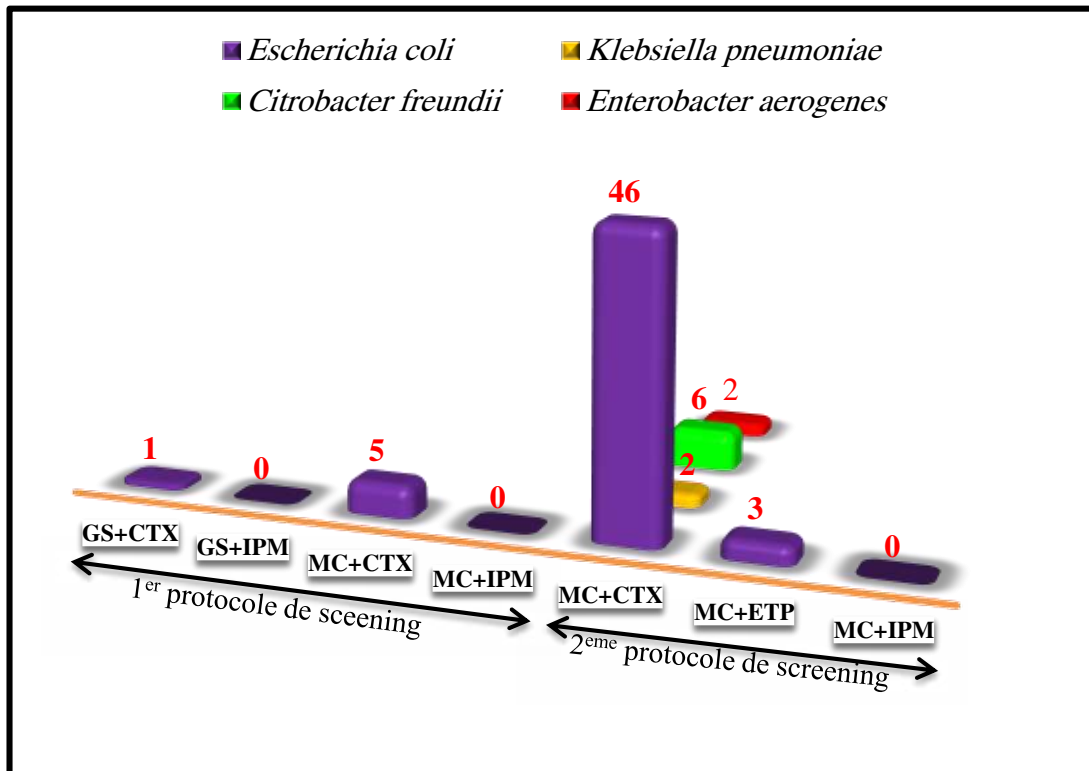
| Souche | Antibiotique |             |             |             |             |             |             |             |             |        |        |             |             |        |        |
|--------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------|--------|-------------|-------------|--------|--------|
|        | A<br>M<br>X  | A<br>M<br>C | F<br>O<br>X | C<br>T<br>X | C<br>A<br>Z | F<br>E<br>P | A<br>T<br>M | E<br>R<br>T | I<br>M<br>P | G<br>N | A<br>K | C<br>I<br>P | S<br>T<br>X | F<br>F | C<br>T |
| A1     | R            | R           | R           | R           | R           | R           | R           | R           | S           | R      | S      | R           | R           | S      | S      |
| A2     | R            | R           | R           | R           | S           | S           | S           | R           | S           | R      | S      | S           | R           | S      | S      |
| A3     | R            | R           | R           | I           | S           | S           | S           | R           | S           | R      | S      | S           | R           | S      | S      |
| C1     | R            | S           | S           | R           | S           | S           | R           | S           | S           | S      | S      | S           | S           | S      | S      |
| C2     | R            | S           | S           | R           | S           | S           | S           | S           | S           | S      | S      | R           | R           | S      | S      |
| C3     | R            | S           | S           | R           | S           | S           | R           | S           | S           | S      | S      | S           | S           | S      | S      |
| C4     | R            | S           | S           | R           | S           | S           | R           | S           | S           | S      | S      | S           | S           | S      | S      |
| C5     | R            | S           | S           | R           | S           | S           | R           | S           | S           | S      | S      | S           | S           | S      | S      |
| C6     | R            | S           | S           | R           | S           | S           | R           | S           | S           | S      | S      | S           | S           | S      | S      |
| D1     | R            | S           | S           | R           | S           | I           | I           | S           | S           | S      | S      | R           | R           | S      | S      |
| D2     | R            | S           | S           | R           | S           | R           | R           | S           | S           | S      | S      | R           | R           | S      | S      |
| D3     | R            | S           | S           | R           | R           | R           | R           | S           | S           | S      | S      | R           | R           | S      | S      |
| D4     | R            | R           | R           | R           | R           | R           | R           | S           | S           | S      | S      | R           | R           | S      | S      |
| D5     | R            | S           | S           | R           | S           | S           | S           | S           | S           | S      | S      | S           | R           | S      | S      |
| D6     | R            | R           | R           | R           | R           | R           | R           | S           | S           | S      | S      | R           | R           | S      | S      |
| 7      | R            | S           | S           | S           | S           | S           | S           | S           | S           | S      | S      | R           | S           | S      | S      |
| 8      | R            | I           | S           | S           | S           | S           | S           | S           | S           | S      | S      | R           | R           | S      | S      |
| D7     | R            | S           | S           | R           | S           | R           | R           | S           | S           | S      | S      | R           | S           | S      | S      |
| D8     | R            | S           | S           | R           | I           | R           | I           | S           | S           | S      | S      | S           | R           | S      | S      |
| D9     | R            | S           | S           | R           | S           | I           | S           | S           | S           | S      | S      | S           | R           | S      | S      |
| D10    | R            | S           | S           | R           | S           | S           | S           | S           | S           | S      | S      | S           | R           | S      | S      |
| D11    | R            | S           | S           | R           | S           | S           | I           | S           | S           | S      | S      | S           | R           | S      | S      |
| D12    | R            | R           | S           | R           | S           | R           | I           | S           | S           | S      | S      | R           | R           | S      | S      |
| C15    | R            | S           | S           | R           | R           | I           | R           | S           | S           | S      | S      | S           | R           | S      | S      |
| C16    | R            | R           | R           | R           | R           | S           | I           | S           | S           | S      | S      | R           | S           | S      | S      |
| D13    | R            | S           | S           | R           | R           | R           | R           | S           | S           | S      | S      | R           | R           | S      | S      |
| D14    | R            | S           | S           | R           | R           | R           | R           | S           | S           | S      | S      | S           | R           | S      | S      |
| D15    | R            | R           | R           | R           | R           | R           | R           | S           | S           | S      | S      | R           | R           | S      | S      |
| D16    | R            | S           | S           | R           | S           | R           | R           | S           | S           | S      | S      | R           | R           | S      | S      |
| D17    | R            | S           | S           | R           | R           | R           | R           | S           | S           | S      | S      | S           | R           | S      | S      |
| D18    | R            | S           | S           | R           | R           | R           | R           | S           | S           | R      | S      | S           | S           | S      | S      |
| D19    | R            | S           | S           | R           | R           | R           | R           | S           | S           | R      | S      | S           | S           | S      | S      |
| D20    | R            | S           | S           | R           | S           | I           | I           | S           | S           | S      | S      | S           | R           | S      | S      |
| D21    | R            | S           | S           | R           | R           | R           | R           | S           | S           | R      | S      | S           | S           | S      | S      |
| D22    | R            | S           | S           | R           | S           | S           | I           | S           | S           | S      | S      | S           | R           | S      | S      |
| D23    | R            | S           | S           | R           | S           | R           | R           | S           | S           | S      | S      | R           | R           | S      | S      |

Tableau 14. (Suite)

| Souche | Antibiotique |             |             |             |             |             |             |             |             |        |        |             |             |        |        |
|--------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------|--------|-------------|-------------|--------|--------|
|        | A<br>M<br>X  | A<br>M<br>C | F<br>O<br>X | C<br>T<br>X | C<br>A<br>Z | F<br>E<br>P | A<br>T<br>M | E<br>R<br>T | I<br>M<br>P | G<br>N | A<br>K | C<br>I<br>P | S<br>T<br>X | F<br>F | C<br>T |
| D24    | R            | S           | S           | R           | R           | R           | R           | S           | S           | S      | S      | S           | R           | S      | S      |
| C29    | R            | R           | R           | R           | R           | S           | I           | S           | S           | S      | S      | R           | S           | S      | S      |
| 30     | R            | R           | S           | S           | S           | S           | S           | S           | S           | S      | S      | R           | R           | S      | S      |
| D25    | R            | S           | S           | R           | R           | R           | R           | S           | S           | R      | S      | R           | R           | S      | S      |
| D26    | R            | S           | R           | R           | I           | I           | I           | S           | S           | S      | S      | S           | R           | S      | S      |
| 33     | R            | I           | S           | S           | S           | S           | S           | S           | S           | S      | S      | R           | R           | S      | S      |
| D27    | R            | S           | S           | R           | I           | I           | R           | S           | S           | S      | S      | S           | R           | S      | S      |
| D28    | R            | S           | S           | R           | I           | R           | R           | S           | S           | S      | S      | S           | R           | S      | S      |
| D29    | R            | S           | S           | R           | I           | R           | R           | S           | S           | S      | S      | S           | R           | S      | S      |
| D30    | R            | S           | S           | R           | I           | R           | R           | S           | S           | S      | S      | R           | R           | S      | S      |
| D31    | R            | S           | S           | R           | R           | R           | R           | S           | S           | S      | S      | S           | R           | S      | S      |
| D32    | R            | I           | S           | R           | R           | R           | R           | S           | S           | S      | S      | S           | R           | S      | S      |
| D33    | R            | S           | S           | R           | S           | I           | I           | S           | S           | S      | S      | S           | R           | S      | S      |
| D34    | R            | S           | S           | R           | S           | I           | R           | S           | S           | S      | S      | S           | R           | S      | S      |
| D35    | R            | S           | S           | R           | I           | R           | R           | S           | S           | S      | S      | S           | R           | S      | S      |
| D36    | R            | R           | R           | R           | S           | R           | I           | S           | S           | S      | S      | R           | R           | S      | S      |
| D37    | R            | I           | S           | R           | S           | R           | R           | S           | S           | S      | S      | R           | R           | S      | S      |
| D38    | R            | S           | S           | R           | R           | R           | R           | S           | S           | S      | S      | S           | R           | S      | S      |
| D39    | R            | R           | R           | R           | R           | R           | R           | S           | S           | S      | S      | S           | R           | S      | S      |
| 50     | R            | S           | S           | S           | S           | R           | S           | S           | S           | S      | S      | R           | R           | S      | S      |
| D40    | R            | I           | R           | R           | S           | R           | I           | S           | S           | S      | S      | R           | R           | S      | S      |
| D41    | R            | R           | R           | R           | R           | R           | R           | S           | S           | S      | S      | R           | R           | S      | S      |
| C51    | R            | R           | R           | R           | R           | R           | S           | S           | S           | S      | S      | R           | S           | S      | S      |
| C53    | R            | R           | R           | R           | R           | S           | I           | S           | S           | S      | S      | R           | S           | S      | S      |
| C41    | R            | R           | R           | R           | S           | R           | S           | S           | S           | S      | S      | R           | R           | S      | S      |
| C44    | R            | S           | S           | R           | S           | R           | S           | S           | S           | S      | S      | R           | S           | S      | S      |
| C45    | R            | S           | S           | R           | S           | S           | I           | S           | S           | S      | S      | S           | R           | S      | S      |
| C55    | R            | R           | R           | R           | I           | R           | I           | S           | S           | R      | S      | S           | S           | S      | S      |
| C56    | R            | R           | R           | R           | I           | I           | S           | S           | S           | S      | S      | S           | R           | S      | S      |

### 3.2 Répartition des entérobactéries par milieux d'isolement

Le protocole de screening sélectif sur différents milieux d'isolement nous a permis d'isoler 65 souches d'entérobactéries. La répartition des entérobactéries isolées en fonction des milieux sélectifs d'isolement est présentée dans la figure 23.



**Figure 23.** Répartition des entérobactéries par milieu d’isolement (GS : gélose au sang, MC : MacConkey, CTX : céfotaxime, IPM : imipénème, ETP : ertapénème).

Notre screening sélectif a permis de récupérer 91 à 100% des entérobactéries exprimant une résistance aux céphalosporines de troisième génération et/ou carbapénèmes. Les 6 entérobactéries identifiées comme *E. coli* isolées de la première série de prélèvement à partir des milieux GS et MC supplémentés du céfotaxime présentent une résistance de 100% à cet antibiotique. Tandis qu’un nombre de 51 souches d’entérobactéries sur l’ensemble de 56 souches isolées de la deuxième série de prélèvement sur le milieu MC supplémenté du céfotaxime présentent une résistance au céfotaxime (CTX<sup>R</sup>), l’équivalent de 91%. Ces résultats confirment l’efficacité de la sélectivité de notre protocole en utilisant le milieu céfotaxime, de même, les 3 souches isolées sur milieu MC supplémenté d’ertapénème présentent une résistance à cet antibiotique à 100%. Donc toutes les concentrations d’antibiotiques utilisées dans cette étude reflètent une forte efficacité de sélection.

Nos résultats corroborent avec ceux trouvés par **Mathys et al. (2017)** où les auteurs ont signalé la détection de 98 à 100% des espèces d’entérobactéries présentent une résistance aux C2G et C3G en utilisant la gélose MC supplémenté de 4 µg/ml du céfotaxime. L’étude est faite sur des populations d’oiseaux chanteurs sauvages migrateurs et non migrateurs dans les laiteries de Columbus à Ohio. Le même protocole suivi par **Li et al. (2016)** a conduit à un pourcentage

de 100% de *E. coli* CTX<sup>R</sup> dans l'ensemble de 142 souches isolées de 160 échantillons de fientes des poulets en Chine.

Cependant, des résultats trouvés dans d'autres études ont montré un niveau de sensibilité plus bas. La culture sélective sur milieu MC au céfotaxime (2 µg/ml) utilisé par **Literak et al. (2010)** a conduit à l'isolement de 3 souches de *E. coli* CTX<sup>R</sup>. L'étude a été effectuée sur un nombre de 365 de fientes d'oiseaux d'eau sur la côte de la mer Baltique en Pologne. Une autre étude utilise la même culture sélective traitant un nombre de 499 de fientes et des prélèvements cloacaux de grands cormorans et des canards colverts en Europe centrale, a mentionné l'isolement de 10 souches résistantes aux CG3 (**Stedt et al., 2015**). En Espagne, **Alcalá et al. (2015)** ont signalé la présence de 16 souches de *E. coli* CTX<sup>R</sup> dans 100 prélèvements de fientes d'oiseaux sauvages. En outre des résultats remarquables par **Baez et al. (2014)** qui ont mentionné la présence de 54% de *E. coli* qui résistent aux C3G parmi l'ensemble de 91 souches isolées des 124 prélèvements cloacaux de mouettes migratrices au Chili.

Pour but de détecter des gènes codant pour la production des carbapénèmases chez les volailles au Liban, 40 échantillons ont été prélevés dans huit fermes d'élevage. Les isolats produisant des carbapénèmases ont été sélectionnés sur milieu MC supplémenté en ertapénème (1 µg/ml). Un isolat positif produisant des carbapénèmases a été détecté (**Al Bayssari et al. 2015**).

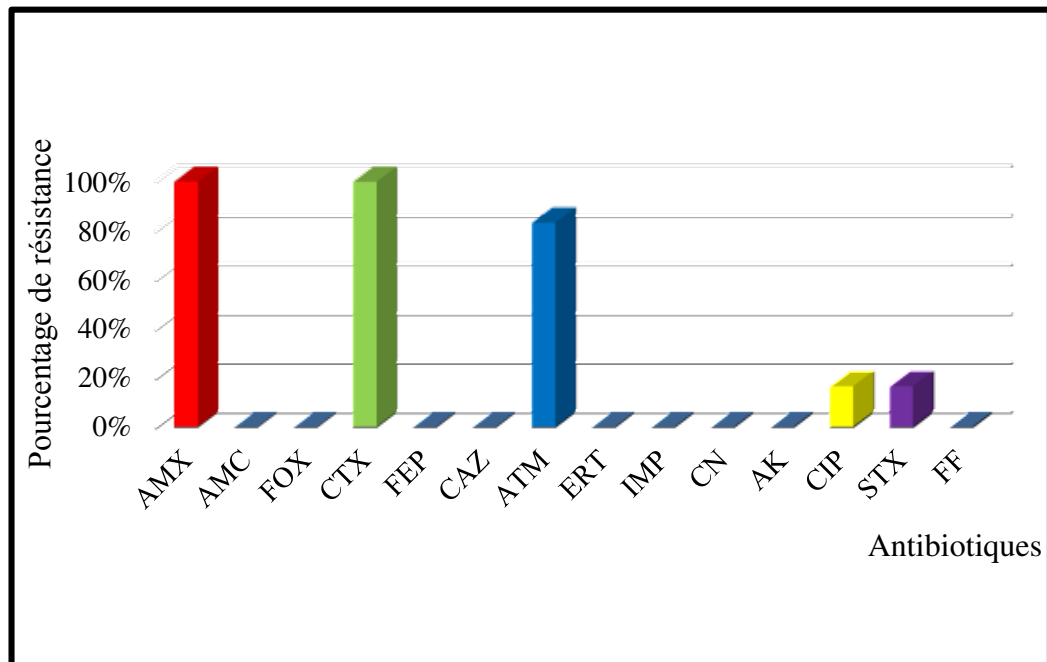
Nos résultats indiquent clairement l'efficacité du protocole établi en utilisant des milieux sélectifs pour la détection des entérobactéries résistantes aux β-lactamines.

### 3.3 Etude de la sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries isolées

#### 3.3.1 Etude de la sensibilité aux antibiotiques des souches de *E. coli* de la première série de prélèvement

En fonction des antibiotiques utilisés dans notre étude, les résultats ont indiqué une résistance élevée vis-à-vis l'amoxicilline et le céfotaxime avec un pourcentage de 100% ainsi qu'une résistance de 83,33% vis-à-vis l'aztréonam. Par contre une sensibilité totale contre l'amoxicilline/acide clavulanique, la céfoxitine, la céftazidime, le céfépime, l'ertapénème, l'imipénème, l'amikacine, la gentamicine et la fosfomycine était signalée. Nous avons noté aussi une résistance de 16,66% vis-à-vis la ciprofloxacine. Le même pourcentage a été noté

contre l'association triméthoprim/sulfaméthoxazole. Les pourcentages de résistance sont illustrés dans la figure 24.

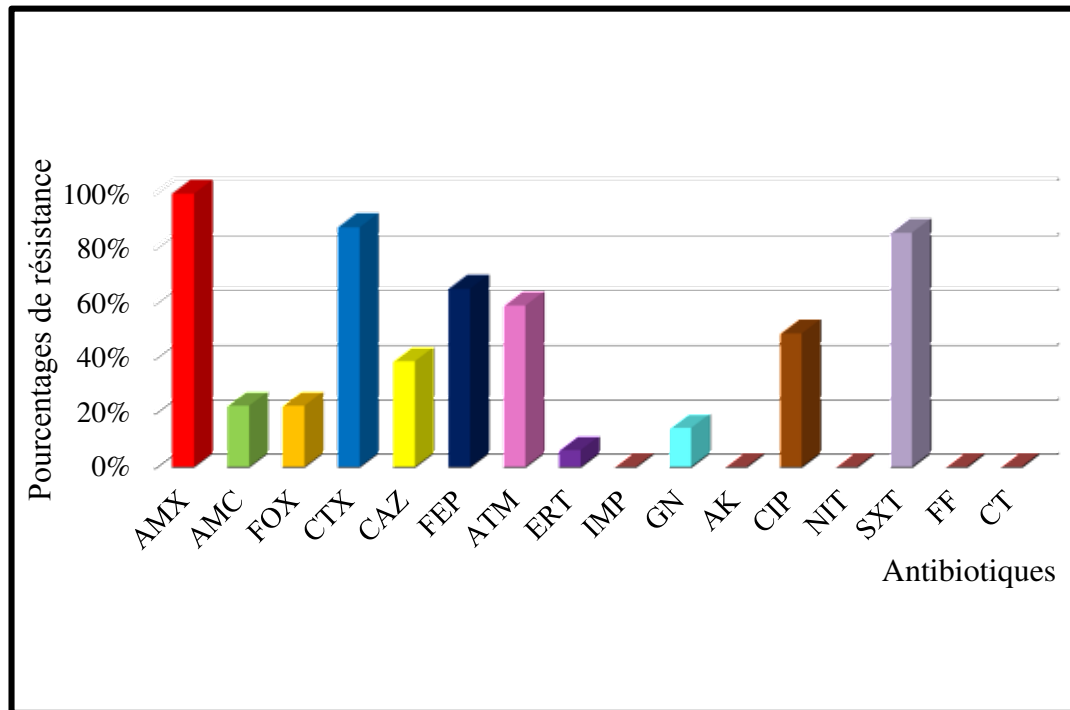


**Figure 24.** Pourcentages de l'antibiorésistance des souches de *E. coli* du 1<sup>er</sup> prélèvement.

### 3.3.2 Etude de la sensibilité aux antibiotiques des souches de *E. coli* de la deuxième série de prélèvement

Nous avons noté une résistance élevée vis-à-vis l'amoxicilline avec un pourcentage de 100% et de 87,75% au céfotaxime. Une résistance moyenne a été remarquée avec 38,77% vis-à-vis la céftazidime, 65,3% pour le céfépime et 59,18% vis-à-vis l'aztréonam. Une sensibilité totale a été signalée vis-à-vis l'imipénème tandis que trois souches présentent une résistance contre l'értapénème l'équivalent de 6,12%. Une résistance assez remarquable pour les aminosides avec 14,28% vis-à-vis la gentamicine et une sensibilité totale vis-à-vis l'amikacine. Pour la résistance aux fluoroquinolones nous avons observé une résistance de 48,97% vis-à-vis la ciprofloxacine. La résistance aux triméthoprim/sulfaméthoxazole était également importante avec un taux de 85,71%. Une sensibilité totale a été remarquée vis-à-vis la céfoxitine, la fosfomycine et la colistine. Les pourcentages de résistance des souches de *E. coli* aux différents antibiotiques utilisés sont présentés dans la figure 25.

La fréquence des bactéries multirésistantes aux antibiotiques a atteint, partout dans le monde, des proportions inquiétantes et est devenue un problème majeur de la santé publique.



**Figure 25.** Pourcentages de l'antibiorésistance des souches de *E. coli* de 2<sup>ème</sup> série de prélèvement.

L'étude de la sensibilité des 49 souches de *E. coli* isolées a indiqué que 43 des souches de *E. coli* étaient résistantes au céfotaxime l'équivalent de 87,75%. Ces résultats corroborent avec ceux de **Li et al. (2016)** en Chine sur des poulets sains ou ils ont signalé un pourcentage de résistance de 88,8%. Au Chili **Baez et al. (2014)** ont rapporté une fréquence de résistance de 54% lors d'une étude sur les mouettes (*Leucophaeus pipixcan*). Une étude effectuée par **Veldman et al. (2013)** sur une large population d'oiseaux sauvages aux Pays-Bas ainsi que des études ont été réalisées au Portugal sur des oiseaux de proies et des mouettes indiquent un niveau de résistance plus élevé au céfotaxime avec un pourcentage de 100% (**Costa et al., 2006 ; Poeta et al., 2008**). Par contre, différentes études ont montré un niveau de résistance beaucoup plus bas, 16% a été signalé par **Alcalá et al. (2015)** dans une étude sur des oiseaux sauvages en Espagne et au Nigeria par **Ojo et al. (2016)** sur des poulets avec un pourcentage de 1%.

Nos résultats sont inférieurs à ceux de **Borges et al. (2017)**, une étude au Brésil a été effectuée sur les pigeons. Elle a montré que 45,5% des souches isolées étaient résistantes pour l'association amoxicilline/acide clavulanique et reste assez supérieur à ceux de **Poeta et al. (2008)** qui rapportent un taux de 9,09% pour l'amoxicilline et l'association amoxicilline/acide clavulanique. Nous avons également noté un taux de résistance de 22,44% à la céfoxitine qui

est largement supérieur à celui rapporté dans une étude effectuée sur des oiseaux sauvages au Canada par **Parker et al. (2016)** avec un taux de 2%. En Chine, une autre étude qui a été réalisée par **Li et al. (2016)** sur les volailles a également montré que 91,5% des souches sont résistantes au triméthoprim/sulfaméthoxazole. Ces résultats sont assez comparables à notre étude. Pour la résistance aux fluoroquinolones on observe une résistance de 48,97% vis-à-vis la ciprofloxacine et 14,28% vis-à-vis la gentamicine. Ces taux restent légèrement inférieurs à ceux rapporté au Pays-Bas dans une étude sur une large population des oiseaux sauvages par **Veldman et al. (2013)** (49,5% et 21,5 respectivement) et supérieurs à ceux publiés au Bangladesh sur des oiseaux domestiques et sauvages par **Hassan et al. (2015)** (27% et 13% respectivement).

Par contre, en Pologne lors d'une étude réalisée sur les fientes des oiseaux migrateurs et les oiseaux d'eau, des pourcentages de résistance aux antibiotiques ont été inférieurs à ceux obtenus dans cette étude 9,37% pour la gentamycine, 12,5% pour la ciprofloxacine, 12,5% pour l'association triméthoprim/sulfaméthoxazole et 6,25% pour l'association amoxicilline/acide clavulanique (**Literak et al., 2010**).

En revanche, le profil de sensibilité aux antibiotiques des 49 souches étudiées montre une sensibilité de 100% à l'imipénème, l'amikacine, la fosfomycine et la colistine, ce qui est en accord avec les résultats de **Bonnedahl et al. (2015)** et **Borges et al. (2017)**.

Le profil de résistance aux C3G est peut-être dû à la production de BLSEs qui coexistent avec la résistance à plusieurs autres antibiotiques. Les BLSEs sont codés par des plasmides qui portent également des gènes de résistance à d'autres antibiotiques. La co-résistance aux quinolones et aux aminoglycosides est courante (**Kaur et al., 2016**).

Dans cette étude, nous rapportons pour la première fois une résistance à l'ertapénème chez la cigogne blanche avec un taux de 6,1% chez l'espèce *E. coli* qui est un germe naturellement sensible aux antibiotiques. En Espagne, **Alcala et al. (2015)** ont effectué une étude sur différentes espèces d'oiseaux sauvages dont la cigogne blanche présente une résistance de 100% à la ciprofloxacine et l'association triméthoprim/sulfaméthoxazole tandis qu'aucune résistance à l'ertapénème n'a été signalée.

La résistance à l'ertapénème a été rarement rapportée chez les entérobactéries du microbiote digestif des oiseaux, **Fischer et al. (2013)** ont pu isoler une souche de *Salmonella enterica* sérovar *corvallis* qui présente une résistance à l'ertapénème chez un oiseau appartenant

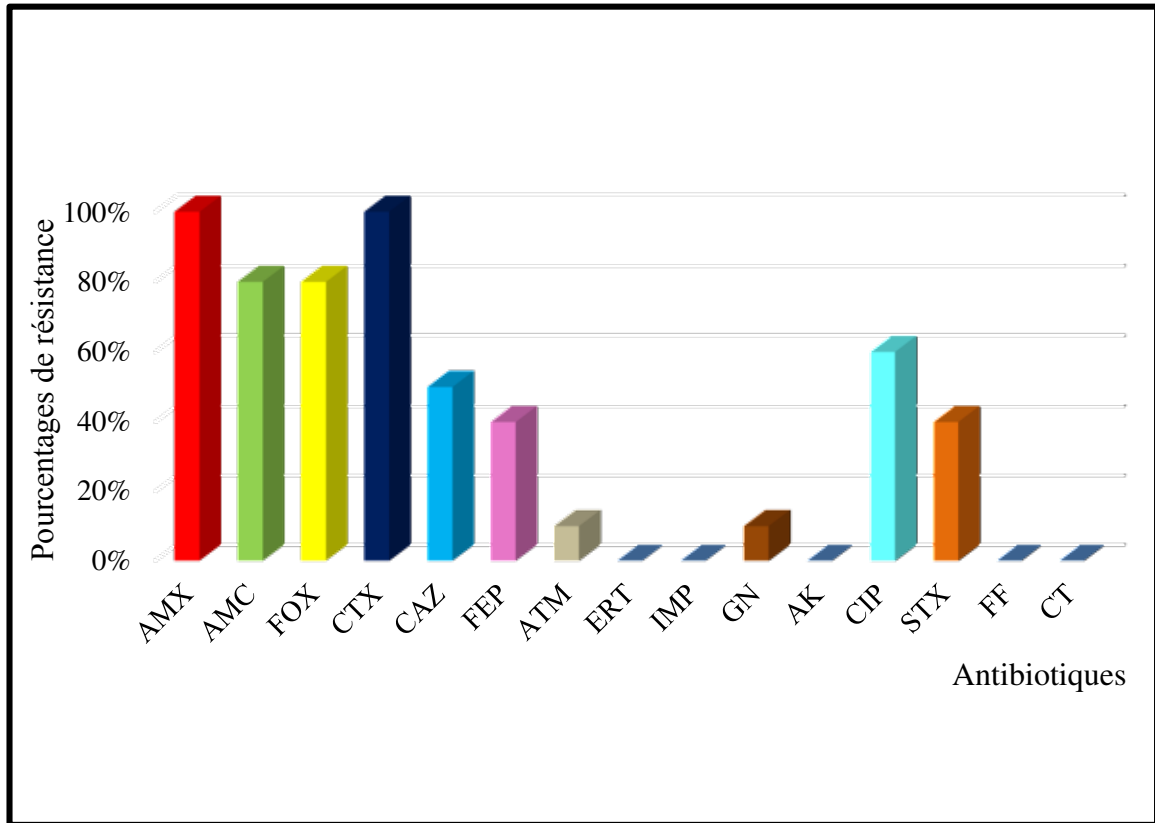
à l'espèce *Milvus migrans* en Allemagne. Lors d'une autre étude sur des espèces de mouettes migratrices (*Chroicocephalus novaehollandiae*) en Australie, **Dolejska et al. (2016)** ont isolé des souches d'entérobactéries autres que *E. coli* résistantes à l'imipénème (6%). En France, **Vittecoq et al. (2017)** ont signalé l'isolement de 22 souches de *E. coli* présentant une résistance à l'imipénème à partir des mouettes aux pattes jaunes. Une autre étude sur la même espèce de mouettes a été effectuée en Espagne par **Vergara et al. (2017)** où ils ont rapporté une résistance à l'imipénème chez 2 souches de *E. coli*.

Même si les populations d'oiseaux sauvages ne sont pas directement influencées par la pratique des antibiotiques, la résistance acquise chez les bactéries isolées des oiseaux sauvages se manifeste par diverses prévalences (**Literak et al., 2010**). Les niveaux de résistance peuvent être élevés en raison, en grande partie, du comportement d'alimentation des oiseaux. La plupart d'entre eux ont l'habitude de chercher de la nourriture dans les zones agricoles et urbaines, les égouts et les poubelles, ce qui facilite l'acquisition de bactéries résistantes provenant de sources humaines et animales (**Alcalá et al., 2015**).

### 3.3.3 Etude de la sensibilité aux antibiotiques des souches d'entérobactéries autres que *E. coli*

Le protocole de screening sélectif des entérobactéries résistantes aux C3G et/ou carbapénèmes que nous avons utilisés a montré une efficacité de 100%. Toutes les entérobactéries isolées sur milieu sélectif au céfotaxime présentent une résistance aux moins à un des C3G, ce résultat confirme l'efficacité de la sélectivité de notre protocole en utilisant des milieux sélectifs.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques par la méthode de diffusion de disque a révélé que les taux de résistance pour l'amoxicilline, le céfotaxime, le céfoxitine et l'amoxicilline/acide clavulanique sont les plus élevés avec 100%, 100%, 80% et 80% respectivement. Suivis des pourcentages moyens pour la ciprofloxacine et la céftazidime avec 60% et 50%, ainsi que le céfépime et l'association triméthoprime/sulfaméthoxazole présentent un taux de 40%. Le taux de résistance le plus faible était la gentamicine et l'aztréonam avec 10%. Aucune résistance n'a été détectée pour l'ertapénème, l'imipénème l'amikacine, la fosfomycine et la colistine avec une sensibilité totale de toutes les souches. Les pourcentages de résistance sont illustrés dans la figure 26.



**Figure 26.** Pourcentages de l'antibiorésistance des entérobactéries isolées autres que *E. coli*.

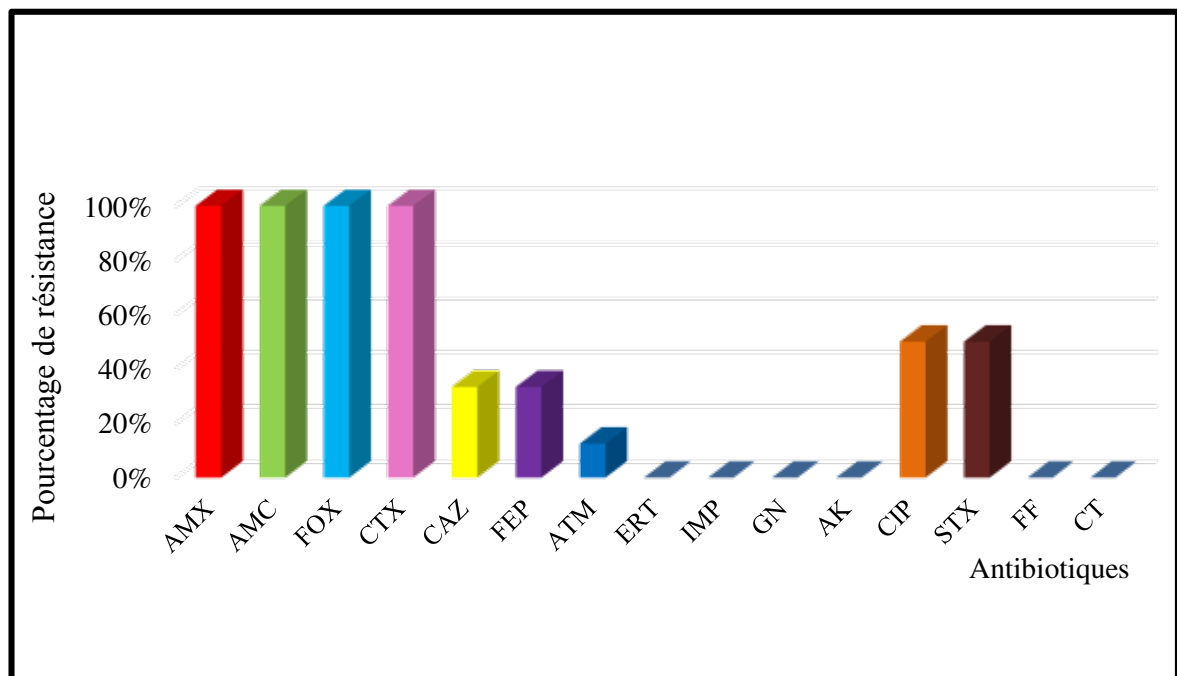
Le microbiote gastro-intestinal aviaire peut être affecté par de nombreux facteurs tels que le régime alimentaire, l'âge, l'environnement, l'administration des antibiotiques et l'infection par des organismes pathogènes. En général, les entérobactéries sont considérées comme des pathogènes secondaires, mais peuvent agir comme des agents pathogènes primaires dans certaines circonstances, en fonction de la virulence de la bactérie et de la réponse de l'hôte aux infections (Vaz et al., 2017). Les oiseaux sauvages sont considérés comme des bio-indicateurs de la résistance aux antibiotiques et de sa diffusion environnementale (Hasan et al., 2015).

### 3.3.3.1 Résistance aux antibiotiques de *Citrobacter freundii*

L'étude de l'antibiorésistance des souches de *C. freundii* révèle des taux de résistance totale pour l'amoxicilline, l'amoxicilline/acide clavulanique, la céfoxitine et le céfotaxime avec un pourcentage de 100%. Alors qu'un niveau de résistance modéré a été obtenu pour la ciprofloxacine et le triméthoprime/sulfaméthoxazole avec un taux de 50% et aux céftazidime et céfépime avec 33,33%. Un faible taux de résistance a été observé pour l'aztréonam avec 13%

et aucune résistance n'a été observée pour, l'ertapénème, l'imipénème, la gentamicine, l'amikacine, la fosfomycine et la colistine.

Nos résultats s'accordent avec ceux signalés par **Loncaric et al. (2013)** en Autriche, lors d'une étude effectuée sur deux populations résidentes et migratrices du corbeau freux (*Corvus frugilegus*) où les souches du genre *Citrobacter* présentent une résistance aux céfotaxime, céftazidime et ciprofloxacine. Dans une autre étude en Arabie Saoudite réalisée par **Hassan et Shobrak (2015)**, une souche de *C. freundii* a été isolée à partir des fientes du perroquet jaco ou gris du Gabon (*Psittacus erithacus*) avec une résistance à la pénicilline, le céfotaxime, la céftazidime ainsi qu'une résistance à l'aztréonam a été marquée. Dans l'étude de **Dolejska et al. (2016)** en Australie lors d'une étude effectuée sur la mouette argentée, dite aussi mouette australienne (*Chroicocephalus novaehollandiae*), les souches ont présenté une résistance au triméthoprime/sulfaméthoxazole. D'autres études réalisées sur différentes espèces d'oiseaux sauvages ont pu isoler des souches du genre de *Citrobacter* ainsi que l'espèce *C. freundii* mais l'étude de l'antibiorésistance n'a pas été mentionnée (**Stedt et al., 2015 ; Hassan et al., 2015**). Les pourcentages de résistance de notre étude chez *C. freundii* sont montrés dans la figure 27.



**Figure 27.** Pourcentages de l'antibiorésistance de l'espèce *C. freundii*.

Les espèces du genre *Citrobacter* sont des pathogènes environnementaux qui peuvent coloniser le tractus intestinal des humains et des animaux. Ils sont généralement considérés comme des agents pathogènes de faible intensité qui causent rarement des infections (Yao et al., 2014). Chez les oiseaux et parmi les espèces de *Citrobacter*, *C. freundii* semble être le plus pathogène du groupe, et les autres espèces sont moins fréquemment rencontrées et ne semblent pas avoir une grande importance pour la santé (Vaz et al., 2017). Sur la base du phénotype de résistance naturelle aux  $\beta$ -lactamines, *C. freundii* appartient au groupe 3 possédant une céphalosporinase de classe C d'Amber résistante aux inhibiteurs et inductible par les  $\beta$ -lactamines (Robin et al., 2012).

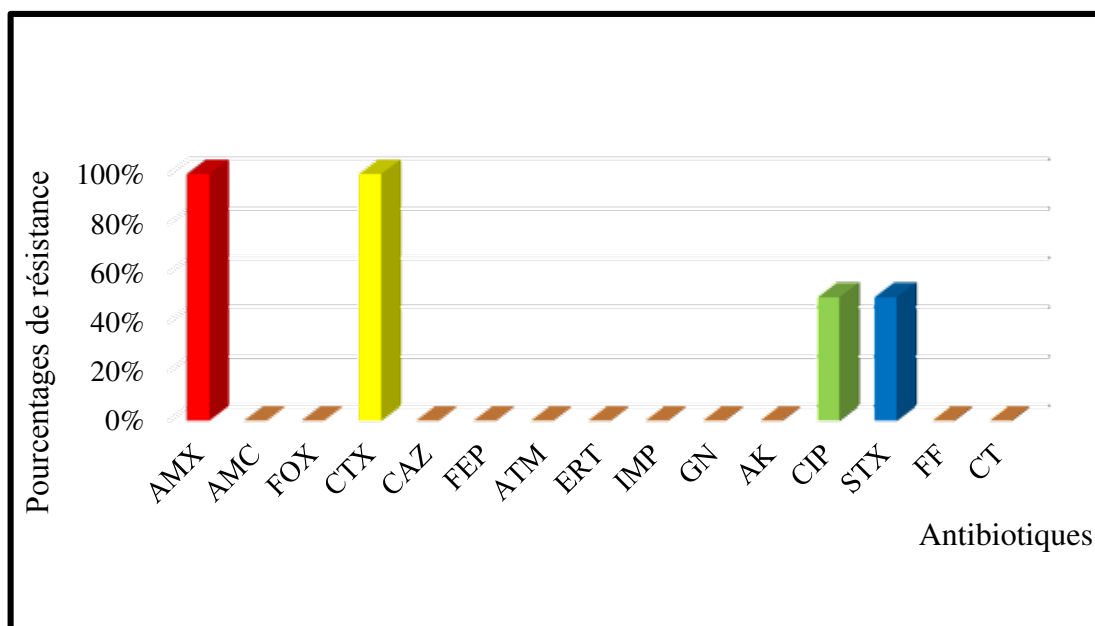
### 3.3.3.2 Résistance aux antibiotiques de *Klebsiella pneumoniae*

Le taux de résistance le plus élevé (100%) chez les souches de *K. pneumoniae* a été observé pour l'amoxicilline et le céfotaxime. Alors qu'un taux de résistance moyen (50%) a été obtenu pour la ciprofloxacine et le triméthoprim/sulfaméthoxazole. L'amoxicilline, la céfoxitine, la céftazidime, le céfépime, l'aztréonam, l'ertapénème, l'imipénème, la gentamicine, l'amikacine, la fosfomycine et la colistine conservent une très bonne activité par une sensibilité totale illustre, le taux de résistance est illustré dans la figure 28.

Dans l'étude de Dolejska et al. (2016) en Australie, des souches de *K. pneumoniae* présentent une résistance au triméthoprim/sulfaméthoxazole (71,42%) et une sensibilité totale à l'imipénème et la ciprofloxacine. Une autre étude réalisée par Loncaric et al. (2013), les souches du genre *Klebsiella* résistent aux céfotaxime, céftazidime, gentamicine et ciprofloxacine. Au Pakistan, Raza et al. (2017) ont pu isoler des souches de *K. pneumoniae* à partir des fientes des espèces d'oiseaux migrateurs qui résistent au céfotaxime, la céftazidime et la gentamicine. Le genre de *Klebsiella* a été isolé dans une étude réalisée par Matias et al. (2016) sur une large population des oiseaux sauvages, la résistance a été observée pour les pénicillines, la ciprofloxacine et le triméthoprim/sulfaméthoxazole. Plusieurs travaux sur les oiseaux sauvages ont signalé la présence des souches de *Klebsiella* spp. mais les profils de leurs résistances n'étaient pas montrés (Bonnedahl et al., 2014 ; Hasan et Jarhult 2015 ; Stedt et al., 2015).

*Klebsiella pneumoniae* est une espèce des entérobactéries responsable d'une variété d'infections et elle présente une grande importance sur le plan microbiologique et clinique (Padmini et al., 2017). Chez les espèces aviaires, *K. pneumoniae* peut causer des maladies

primaires ou secondaires (Vaz et al., 2017). D'après le phénotype de la résistance naturelle *K. pneumoniae* est incluse dans le groupe 2 possédant une pénicillinase chromosomique constitutive exprimée à bas niveau (Robin et al., 2012). Chez l'espèce *K. pneumoniae*, la résistance aux antibiotiques peut être attribuer aux différents mécanismes telles que la pompe d'efflux, la production de différentes enzymes, mais l'un de ses principaux mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines est la production de  $\beta$ -lactamases, notamment des BLSE (Azimi et al., 2015).

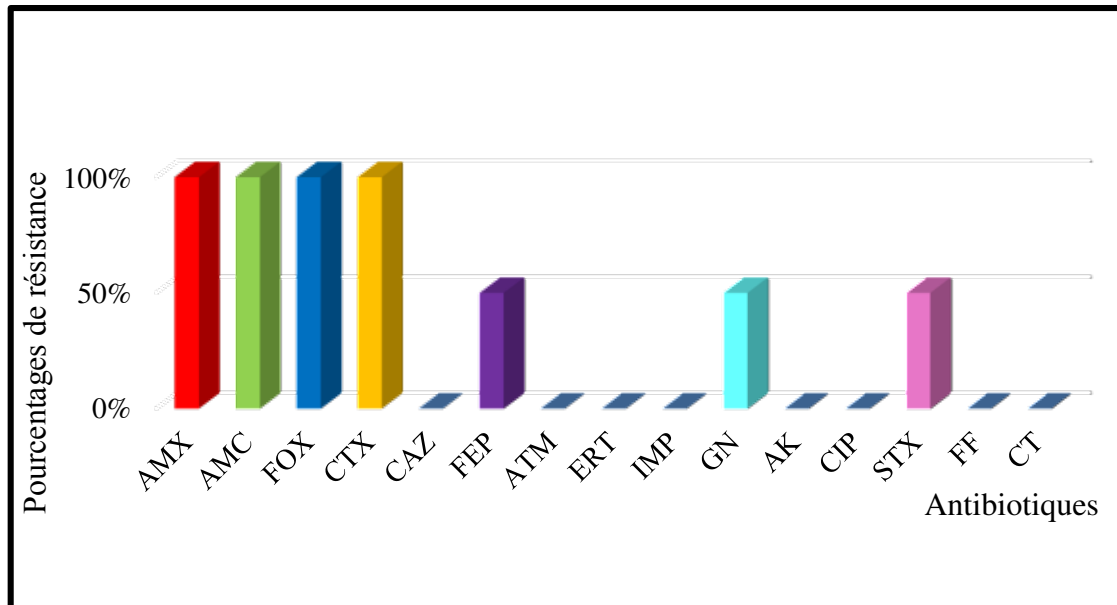


**Figure 28.** Pourcentages de l'antibiorésistance de l'espèce *K. pneumoniae*.

### 3.3.3.3 Résistance aux antibiotiques d'*Enterobacter aerogenes*

Les souches d'*E. aerogenes* ont montré une résistance totale (100%) vis-à-vis l'amoxicilline, l'amoxicilline/acide clavulanique, la céfoxitine, le céfotaxime. En revanche, le céfépime, la gentamicine et le triméthoprim/sulfaméthoxazole présentent une activité moyenne avec un taux de 50%. Une sensibilité totale a été observée pour la céftazidime, l'aztréonam, l'ertapénème, l'imipénème, l'amikacine, la ciprofloxacine, la fosfomycine et la colistine. Le profil de résistance est présent dans la figure 29. L'espèce *E. aerogenes* a été déjà isolée à partir d'une espèce d'oiseaux, le diamant mandarin (*Taeniopygia guttata*) où elle présente une résistance aux pénicillines et au céphalexine (C1G) (Hassan et Shobrak, 2015). Dans la même étude citée précédemment, réalisée par Loncaric et al. (2013), des souches du genre *Enterobacter* ont présenté une résistance à la céftazidime, la gentamicine et la ciprofloxacine. Le genre *Enterobacter* a été décrit dans une étude de différents pays en Europe

chez des espèces de goélands et chez les canards colverts en Suède mais le profil de résistance aux antibiotiques n'a pas été indiqué (Stedt *et al.*, 2015 ; Matias *et al.*, 2016 ; Hessman *et al.*, 2018).



**Figure 29.** Pourcentages de l'antibiorésistance de l'espèce *E. aerogenes*.

*Enterobacter aerogenes* est signalé comme un agent bactérien opportuniste et pathogène pour l'être humain (Davin-regli et Pagès 2015). Cependant, elle avait une faible pathogénicité pour les espèces d'oiseaux (Vaz *et al.*, 2017). Un phénotype particulier de *E. aerogenes* peut être attribué par l'acquisition horizontale de gènes supplémentaires à d'autres espèces de *Enterobacteriaceae* et d'éléments mobiles qui ont rapidement intégré et traduit aussi facilement que leur propre ADN (Davin-regli et Pagès, 2015). Sur la base du phénotype de résistance naturelle aux  $\beta$ -lactamines, *E. aerogenes* appartient au groupe 3 possédant une céphalosporinase de classe C d'Amblar résistante aux inhibiteurs et inductible par les  $\beta$ -lactamines (Robin *et al.*, 2012). En outre, une hyperproduction de cAmpC, peut conduire à une résistance à la céphamycine (céfoxitine et céfotétan) (Reuland *et al.*, 2014).

### 3.4 Concentration minimale inhibitrice

Les CMI ont été déterminées pour les souches de *E. coli* qui ont une sensibilité réduite à l'értapénème. Toutes les souches ont présenté une sensibilité pour l'imipénème (0,094-0,25 mg/l), la colistine (0,016-0,094 mg/l) et la tigécycline (0,047-0,094 mg/l).

La méthode E-test a été réalisée pour la colistine et la tigécycline selon les critères d'interprétation recommandés par **CA SFM (2016)**. En parallèle de la détection de carbapénèmase de type OXA-48, nous avons préféré confirmer le résultat de la diffusion du disque d'imipénème en déterminant la CMI précise en utilisant la méthode E-test.

#### 4 Etude phénotypique de la résistance aux $\beta$ -lactamines

L'étude phénotypique des mécanismes de résistance enzymatique aux  $\beta$ -lactamines, particulièrement les BLSEs et les carbapénèmases a montré une diversité dans les phénotypes. Les résultats des différents phénotypes détectés sont résumés dans le tableau 15.

**Tableau 15.** Résultats des tests de la détection phénotypique des  $\beta$ -lactamases.

| Souche | Test de synergie | Test de Hodge modifié | Carba NP test modifié | Test à l'EDTA | Phénotype de résistance     |
|--------|------------------|-----------------------|-----------------------|---------------|-----------------------------|
| A1     | +                | +                     | +                     | -             | <b>Carbapénèmase + BLSE</b> |
| A2     | -                | +                     | +                     | -             | <b>Carbapénèmase</b>        |
| A3     | -                | +                     | +                     | -             | <b>Carbapénèmase</b>        |
| C1     | +                | /                     | /                     | /             | <b>BLSE</b>                 |
| C2     | +                | /                     | /                     | /             | <b>BLSE</b>                 |
| C3     | +                | /                     | /                     | /             | <b>BLSE</b>                 |
| C4     | +                | /                     | /                     | /             | <b>BLSE</b>                 |
| C5     | +                | /                     | /                     | /             | <b>BLSE</b>                 |
| C6     | +                | /                     | /                     | /             | <b>BLSE</b>                 |
| D1     | +                | /                     | /                     | /             | <b>BLSE</b>                 |
| D2     | +                | /                     | /                     | /             | <b>BLSE</b>                 |
| D3     | +                | /                     | /                     | /             | <b>BLSE</b>                 |
| D4     | +                | /                     | /                     | /             | <b>BLSE</b>                 |
| D5     | +                | /                     | /                     | /             | <b>BLSE</b>                 |
| D6     | -                | /                     | /                     | /             | /                           |
| D8     | +                | /                     | /                     | /             | <b>BLSE</b>                 |
| D9     | +                | /                     | /                     | /             | <b>BLSE</b>                 |
| D10    | +                | /                     | /                     | /             | <b>BLSE</b>                 |
| D11    | +                | /                     | /                     | /             | <b>BLSE</b>                 |
| D12    | +                | /                     | /                     | /             | <b>BLSE</b>                 |
| D13    | +                | /                     | /                     | /             | <b>BLSE</b>                 |
| D14    | +                | /                     | /                     | /             | <b>BLSE</b>                 |
| D15    | +                | /                     | /                     | /             | <b>BLSE</b>                 |
| D16    | +                | /                     | /                     | /             | <b>BLSE</b>                 |
| D17    | +                | /                     | /                     | /             | <b>BLSE</b>                 |

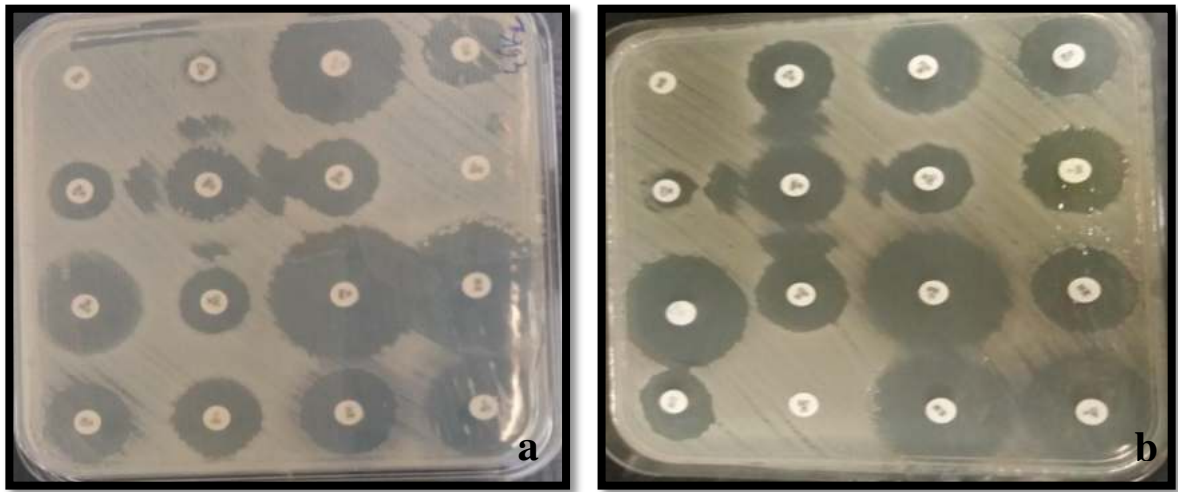
Tableau 15. (Suite)

| Souche | Test de synergie | Test à l'EDTA | Test de Hodge modifié | Carba NP test modifié | Phénotype de résistance |
|--------|------------------|---------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|
| D18    | +                | /             | /                     | /                     | BLSE                    |
| D19    | +                | /             | /                     | /                     | BLSE                    |
| D20    | +                | /             | /                     | /                     | BLSE                    |
| D21    | +                | /             | /                     | /                     | BLSE                    |
| D22    | +                | /             | /                     | /                     | BLSE                    |
| D23    | +                | /             | /                     | /                     | BLSE                    |
| D24    | +                | /             | /                     | /                     | BLSE                    |
| D25    | +                | /             | /                     | /                     | BLSE                    |
| D26    | +                | /             | /                     | /                     | BLSE                    |
| D27    | +                | /             | /                     | /                     | BLSE                    |
| D28    | +                | /             | /                     | /                     | BLSE                    |
| D29    | +                | /             | /                     | /                     | BLSE                    |
| D30    | +                | /             | /                     | /                     | BLSE                    |
| D31    | +                | /             | /                     | /                     | BLSE                    |
| D32    | +                | /             | /                     | /                     | BLSE                    |
| D33    | +                | /             | /                     | /                     | BLSE                    |
| D34    | +                | /             | /                     | /                     | BLSE                    |
| D35    | +                | /             | /                     | /                     | BLSE                    |
| D36    | +                | /             | /                     | /                     | BLSE                    |
| D37    | +                | /             | /                     | /                     | BLSE                    |
| D38    | +                | /             | /                     | /                     | BLSE                    |
| D39    | +                | /             | /                     | /                     | BLSE                    |
| D40    | +                | /             | /                     | /                     | BLSE                    |
| D41    | +                | /             | /                     | /                     | BLSE                    |
| C15    | +                | /             | /                     | /                     | BLSE                    |
| C16    | +                | /             | /                     | /                     | BLSE                    |
| C29    | +                | /             | /                     | /                     | BLSE                    |
| C41    | +                | /             | /                     | /                     | BLSE                    |
| C44    | +                | /             | /                     | /                     | BLSE                    |
| C45    | +                | /             | /                     | /                     | BLSE                    |
| C51    | -                | /             | /                     | /                     | /                       |
| C53    | +                | /             | /                     | /                     | BLSE                    |
| C55    | +                | /             | /                     | /                     | BLSE                    |
| C56    | +                | /             | /                     | /                     | BLSE                    |

#### 4.1 Identification phénotypique de BLSE

Lors de la lecture des résultats du test de synergie nous avons assisté à une augmentation de la zone d'inhibition autour des disques contenant les antibiotiques utilisés (CTX et/ou CAZ et/ou ATM et/ou FEP), en direction du disque porteur d'acide clavulanique, qui donne une

image de « bouchon de champagne » ou en « entonnoir », la figure 30 présente l'image de synergie chez deux souches de *E. coli*.



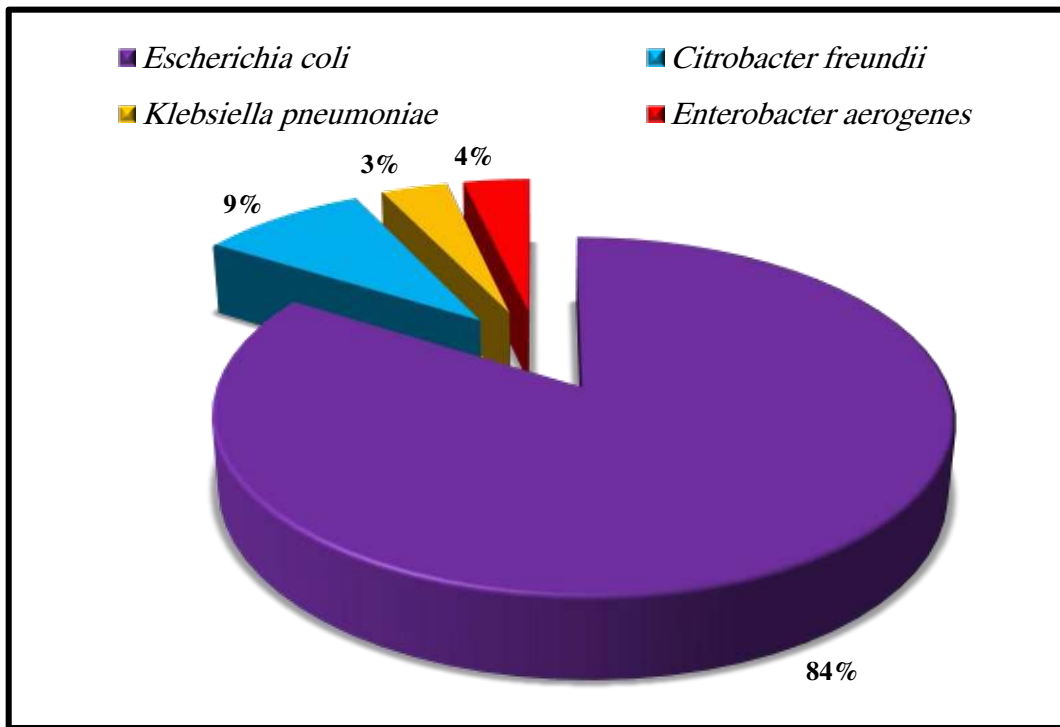
**Figure 30.** Illustration de l'image de synergie entre les disques d'antibiotiques (CAZ, CTX, FEP et AMC) chez deux souches de *E. coli* (a : D9, b : D11).

Au total, nous avons relevé la présence de 56 souches d'entérobactéries présentant un phénotype résultant de la production de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu, provenant de 43 échantillons, réparties comme suit : 47 *Escherichia coli*, et 5 *Citrobacter freundii*, 2 *Klebsiella pneumoniae* et 2 *Enterobacter aerogenes*. Les fréquences de l'ensemble des entérobactéries productrices de BLSEs sont présentées dans la figure 31.

Conformément aux recommandations du **CA-SFM (2016)**, la détection des BLSEs a été effectuée en routine à partir de l'antibiogramme par diffusion en gélose, puis confirmée par une image de synergie en « bouchon de champagne » entre les céphalosporines à spectre étendu (ceftazidime, cefotaxime et céfépime), l'aztréonam et les disques d'antibiotiques contenant un inhibiteur de  $\beta$ -lactamases (acide clavulanique).

Dans notre étude nous avons détecté 47 souches de *E. coli* présentent un phénotype de BLSE parmi les 49 souches CTX<sup>R</sup>, l'équivalent d'un pourcentage de 95,91%. Les deux souches de *E. coli* A2 et D6 résistent au moins à un C3G mais ne présentent pas un phénotype de BLSE. Ce résultat pourrait être dû surtout d'une  $\beta$ -lactamase additionnelle (céphalosporinase hyperproduite) vu leur résistance à la céfoxitine qui peut masquer l'image de synergie. Une co-existence d'une  $\beta$ -lactamase de type AmpC peut donner des résultats faux négatifs pour la détection de BLSE, car l'acide clavulanique utilisé dans le test de synergie agit comme un

inducteur de l'hyperproduction de la céphalosporinase et conduit à une résistance vis-à-vis de certaines C3G mais aussi aux inhibiteurs enzymatiques (Kaur et al., 2013).



**Figure 31.** Fréquences des entérobactéries productrices de BLSEs.

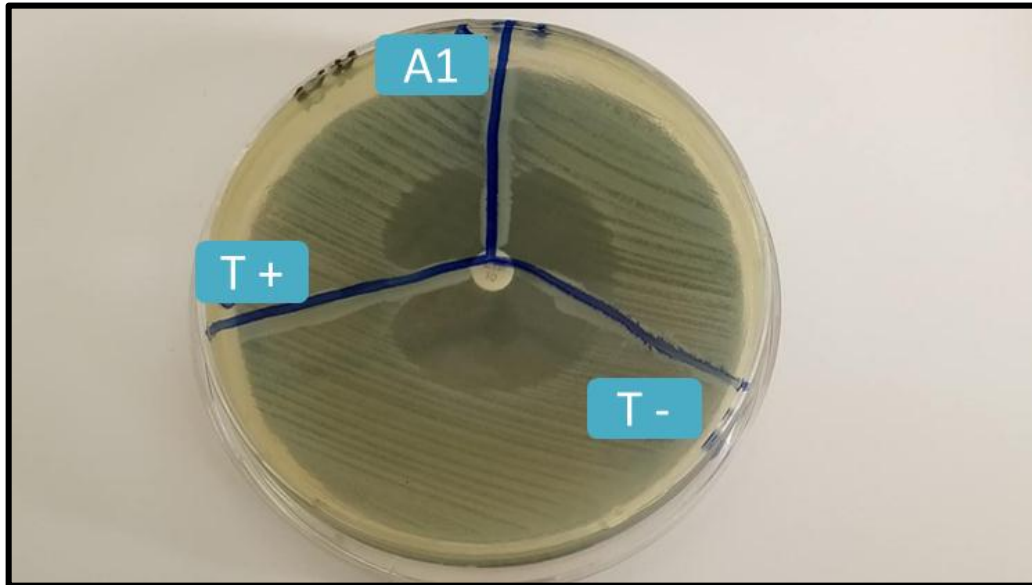
Parmi les entérobactéries qui appartiennent à l'espèce *Citrobacter freundii*, la souche C51 n'a pas démontré un phénotype de BLSE. Sur la base du phénotype de résistance naturelle aux  $\beta$ -lactamines, *C. freundii* appartient au groupe 3 possédant une céphalosporinase de classe C résistante aux inhibiteurs et inductible par les  $\beta$ -lactamines (Robin et al., 2012). La présence d'une céphalosporinase peut conduire à l'absence de l'image de synergie.

Les autres espèces de *K. pneumoniae* et *E. aerogenes* présentent toutes l'image de synergie qui indique la production de BLSEs avec un pourcentage de 100%.

## 4.2 Identification phénotypique des carbapénémases

### 4.2.1 Test de Hodge modifié

Parmi les 49 souches de *E. coli* isolées, 3 souches présentent une résistance à l'ertapénème et positives au test de Hodge modifié ce qui suggère une production de carbapénémase. La déformation du diamètre à l'intersection entre une strie et la culture de *E. coli* signe la présence d'une hydrolyse des carbapénèmes par la souche testée. Le test de Hodge modifié de la souche A1 est présenté dans la figure 32.



**Figure 32.** Test de Hodge modifié positif pour une souche de *E. coli* (A1) productrice d'une carbapénèmase (T+ : témoin positif, T- : témoin négatif).

Pour valider ce test de détection des carbapénèmases, deux souches de référence ont été utilisées comme témoins : *Escherichia coli* ATCC 25922 comme témoin négatif et *Klebsiella pneumoniae* H 5500 comme témoin positif.

Il existe des méthodes phénotypiques simples et peu coûteuses (test de Hodge modifié), pour détecter la production de carbapénèmases. Ces méthodes pourraient être facilement mises en oeuvre dans les laboratoires de microbiologie pour la surveillance de la résistance. Cette méthode, bien que facile à réaliser, ne préjuge en rien de l'identification de la  $\beta$ -lactamase en cause. En outre, le test est parfois difficile à interpréter.

#### 4.2.2 Carba NP test modifié

Dans cette étude, trois souches de *E. coli* étaient résistantes à l'ertapénème. Ces souches ont fait l'objet du Carba NP test modifié afin de détecter l'éventuelle production de carbapénèmase. Le MCNP a révélé un résultat positif pour les trois souches de *E. coli* dont deux (A2, A3) sont productrices de carbapénèmases seules et une (A1) présente une association phénotypique de carbapénèmase et une BLSE.

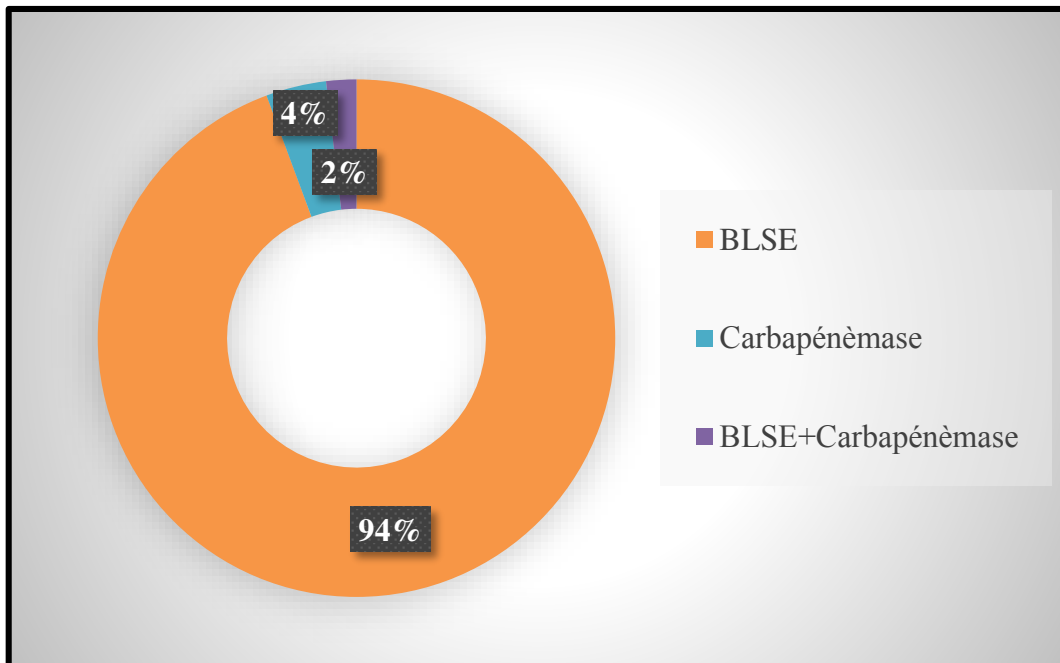
#### 4.2.3 Test à l'EDTA

Les trois souches résistantes à l'ertapénème révèlent un Carba NP test modifié positif, et un test à l'EDTA négatif ce qui montre que le type de carbapénèmase n'appartient pas à la

classe B d'Ambler (métallo- $\beta$ -lactamases).

#### 4.3 Fréquences des phénotypes de résistance enzymatique chez les entérobactéries isolées

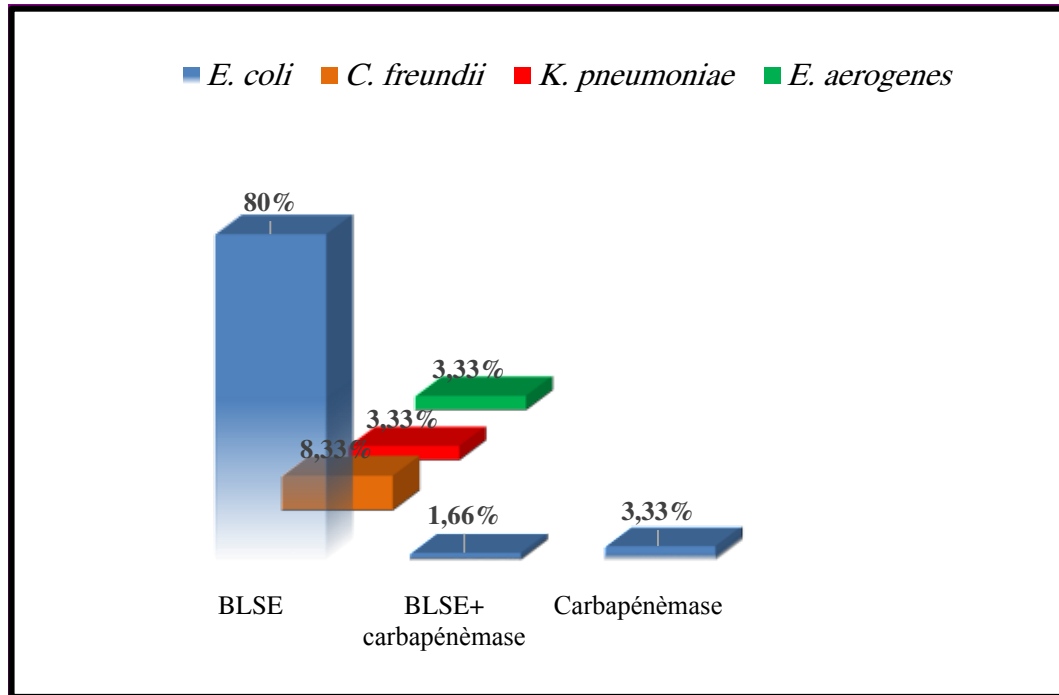
La recherche phénotypique des différents mécanismes de résistance enzymatiques aux C3G et/ou carbapénèmes, qui sont illustrés dans la figure 33, a montré des phénotypes différents, présents seuls ou en association. Le phénotype de résistance résultant de la production de BLSEs est le prédominant avec un pourcentage élevé de 94% (55 souches), suivi par la production de carbapénèmases puis l'association phénotypique BLSE/carbapénèmase avec des pourcentages de 4% (2 souches) et 2% (1 souche) respectivement.



**Figure 33.** Fréquences des phénotypes de résistance enzymatique chez les entérobactéries isolées.

#### 4.4 Répartition des phénotypes de résistance enzymatique par espèce bactérienne

Les phénotypes de résistance enzymatique résultant de la production de BLSEs ou de carbapénèmases sont répartis chez les quatre espèces d'entérobactéries avec des niveaux variables. Les fréquences des phénotypes de résistance enzymatique par espèce bactérienne sont présentées dans la figure 34.



**Figure 34.** Fréquences des phénotypes de résistance enzymatique aux C3G et/ou carbapénèmes par espèce bactérienne.

Au cours de la dernière décennie, la résistance aux antibiotiques, en particulier celle conférée par les  $\beta$ -lactamases à spectre étendu, a été largement étudiée chez les *Enterobacteriaceae* des humains et des animaux (Veldman et al., 2013). À ce jour, au moins 80 espèces d'animaux sauvages ont été considérées comme des porteurs de *Enterobacteriaceae* productrices de BLSEs, la plupart étant des oiseaux sauvages (Wang et al., 2017).

Pour but d'isoler des BLSEs, une étude sur différents pays en Europe a été faite sur le goéland argenté (*Larus argentatus*), le goéland brun (*Larus fuscus*) et le goéland leucopnée (*Larus michaelis*) au niveau de neuf pays européens, a conduit à la détection de nombreuses espèces productrices de BLSEs y compris : *E. coli* (902 isolats), 41 *K. pneumoniae*, 2 *Citrobacter* spp. et 2 *Enterobacter* spp. Les résultats ont montré une grande différence dans la prévalence des BLSEs, où ils ont signalé l'absence de BLSEs au Danemark (0%), une prévalence de BLSEs très faible en Pologne (0,7%) et en Irlande (4,5%), un niveau intermédiaire au Portugal (12,7%), en Lettonie (17,4%) et en Suède (20,7%) et de plus en plus élevé en Angleterre (27,1%), aux Pays-Bas (37,8%), et en Espagne (74,8%) (Stedt et al., 2015). Les auteurs ont remarqué des niveaux de BLSEs plus élevés chez les goélands sauvages dans certaines régions d'Europe. Certes, le régime alimentaire des goélands les expose à diverses bactéries de différentes sources. Les goélands sont grégaires, en particulier pendant la

reproduction, ce qui pourrait contribuer à la propagation rapide de BLSEs entre les individus d'une population locale. La propagation entre les goélands pourrait également être assurée par l'environnement. Étant donné que de nombreuses espèces de goélands migrent, parfois même entre les continents, il existe un risque que ces oiseaux contribuent à la propagation mondiale des gènes de résistance aux antibiotiques (Stedt et al., 2015).

Une étude comparative sur une espèce de mouettes migratrices (*Leucophaeus pipixcan*), entre les lieux de reproduction au Canada et les lieux d'hivernage au Chili, a montré la détection de 55 isolats de *E. coli* et 7 *K. pneumoniae* productrices de BLSEs, représentant un ensemble de 17% du total des échantillons (Bonnedaahl et al., 2015). D'après les auteurs ces résultats ont renforcé la notion selon laquelle les goélands peuvent porter des niveaux élevés de BLSEs et d'autres phénotypes de résistance et qu'ils pourraient donc agir comme des vecteurs de la résistance à l'environnement. Les goélands canadiens de l'étude effectuée avaient reçu une grande partie de leurs isolats bactériens de la décharge où ils se nourrissaient, ce qui illustre l'importance de la possibilité que la faune sauvage soit contaminée par des déchets humains. Dans cette étude, les goélands jouent un rôle d'un réservoir environnemental possible de souches bactériennes résistantes (Bonnedaahl et al., 2015).

Une autre étude en Espagne effectuée entre 2015 et 2016 sur un nombre de 668 des prélèvements cloacaux d'oiseaux sauvages. Les résultats ont démontré la production de BLSEs par 61 souches de différentes espèces des entérobactéries, y compris 39 *E. coli*, 10 *K. pneumoniae*, 1 *Enterobacter* spp. et 1 *C. freundii*. En outre, une carbapénèmase a été détectée chez les souches *K. pneumoniae*, *E. coli* et *Enterobacter* spp. Parmi les espèces d'oiseaux inclus dans cette étude la cigogne blanche qui a été colonisée par une souche de *E. coli* qui produit une BLSE. Les auteurs ont supporté la notion de la diversité des habitudes alimentaires et le caractère migratoire de multiples espèces aviaires, capables de transporter des bactéries multirésistantes, qui peuvent contribuer à leur répartition mondiale à partir de sources humaines. De plus, la présence de différentes espèces d'oiseaux, avec des communautés écologiques différentes, colonisées par des bactéries multirésistantes d'origine humaine, suggère que ces bactéries sont plus répandues dans l'environnement qu'on ne le pensait auparavant (Oteo et al., 2018).

Dans notre étude on a remarqué la prévalence la plus élevée des BLSEs chez l'espèce de *E. coli* avec un pourcentage de 80%. Lors de l'examen de la littérature actuelle, il semble que les oiseaux sauvages pourraient être les principaux hôtes de la faune pour l'espèce *E. coli*

productrice de BLSEs (Guenther et al., 2011). Il existe différentes possibilités pour que les oiseaux aient acquis les souches de *E. coli* résistantes. Cependant, à notre avis, l'explication la plus probable est que les cigognes blanches ont été infectées ou colonisées par ces souches à partir d'environnement pollué par des bactéries résistantes, ce qui pourrait influencer la flore intestinale des oiseaux. De nombreux facteurs contribuent à la prévalence de la résistance aux antibiotiques chez les oiseaux sauvages dans une certaine région géographique. Probablement, plusieurs caractéristiques d'une zone sont plus importantes comme le bétail et les densités humaines (Bonnedahl et al., 2009). Les facteurs qui peuvent contribuer à la colonisation des fientes par ces bactéries dépendant des comportements d'alimentation et le caractère migratoire de cette espèce qui permet de les acquérir et les transmettre de ses zones d'hivernage vers les zones de reproduction ou l'inverse.

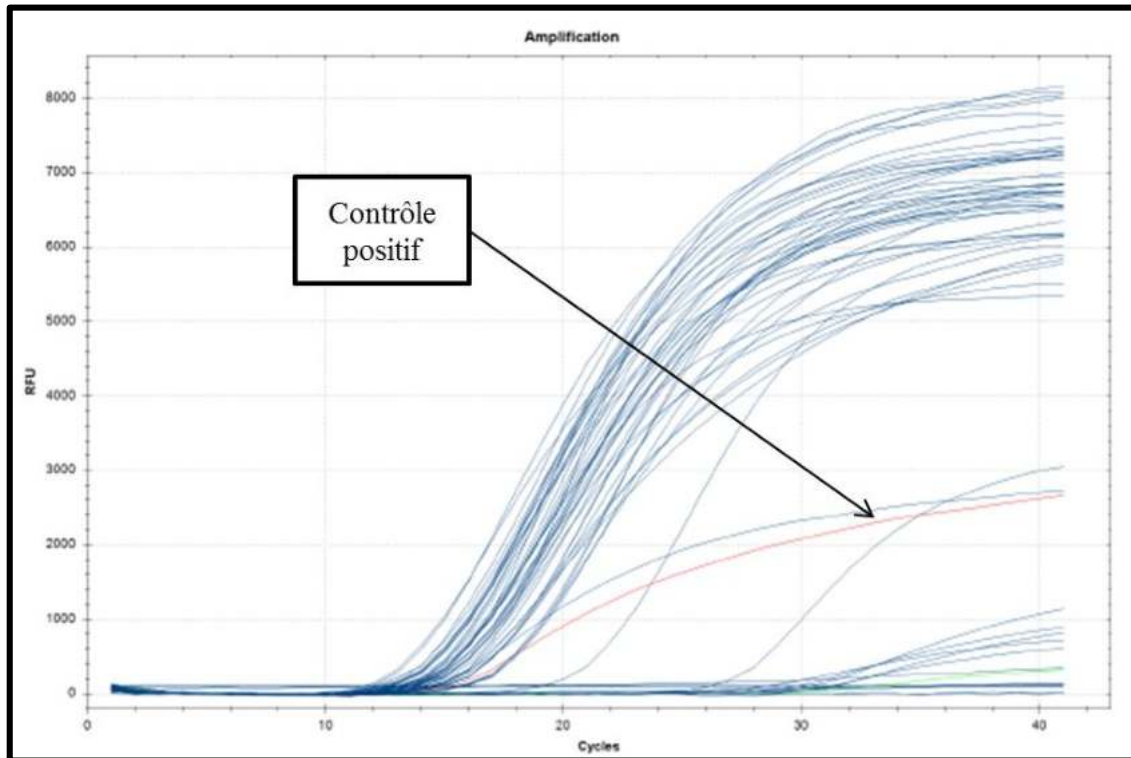
## 5 Détermination des supports génétiques de la résistance

### 5.1 Détection moléculaire des gènes codant pour les $\beta$ -lactamases

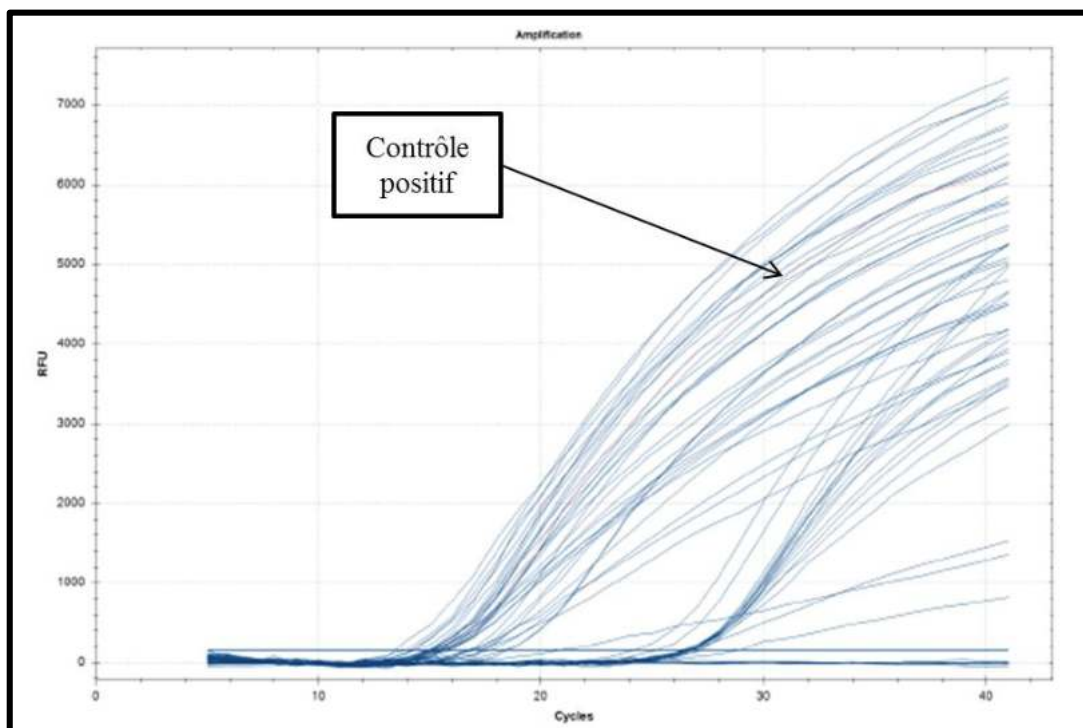
La détection moléculaire des gènes codant pour les  $\beta$ -lactamases a été effectuée pour toutes les souches de *E. coli* qui présentent un phénotype de production de BLSE ou une carbapénémase.

#### 5.1.1 PCR en temps réel

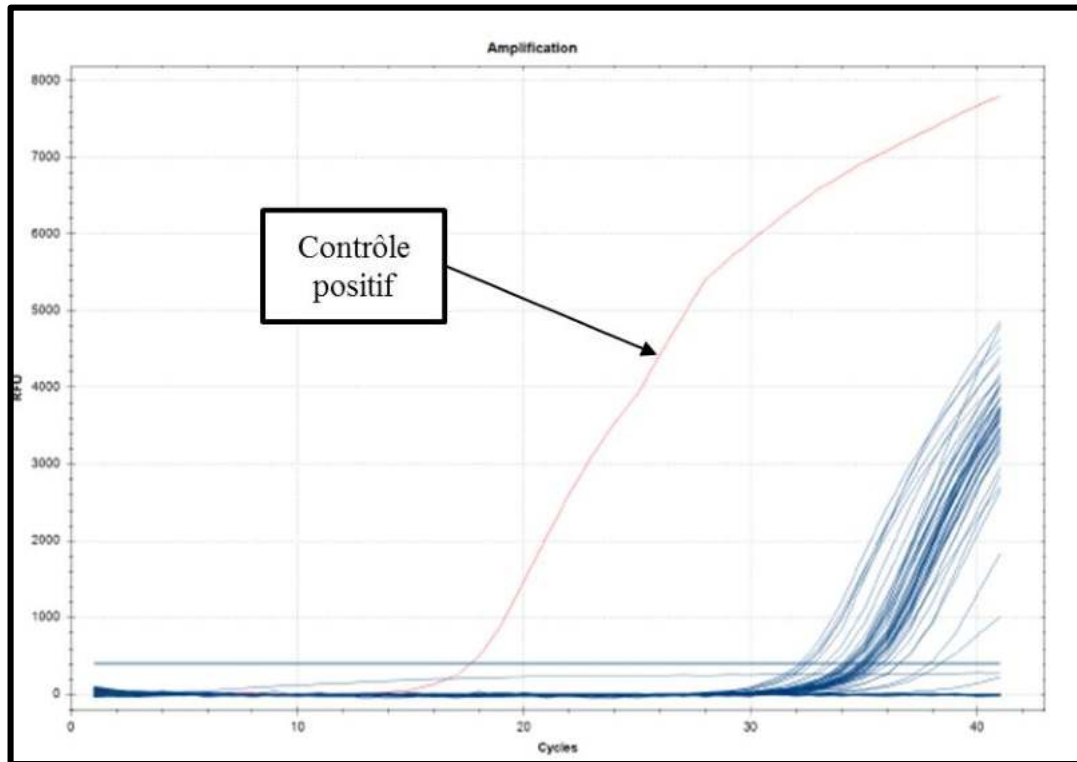
La PCR en temps réel est une technique rapide et efficace qui nous permet de détecter des gènes codant pour les  $\beta$ -lactamases. Le résultat de la PCR en temps réel nous montre que toutes les souches testées et qui présentent un phénotype de résistance aux C3G et/ou carbapénèmes sont confirmées par la présence des gènes codants pour des  $\beta$ -lactamases recherchées. La présence des gènes *bla*<sub>CTX-M</sub> et *bla*<sub>TEM</sub> codants pour des BLSEs a été observé chez 47 souches de *E. coli*. Les 3 souches de *E. coli* résistantes à l'ertapénème possèdent le gène *bla*<sub>OXA-48</sub> codant pour une carbapénémase. Aucune souche ne possède les gènes : *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> et *bla*<sub>KPC</sub>. Les images de l'amplification des gènes *bla*<sub>CTX</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> par PCR en temps réel sont présentées dans les figures 35, 36 et 37 respectivement.



**Figure 35.** Amplification du gène *bla*<sub>CTX-M</sub> par Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel.



**Figure 36.** Amplification du gène *bla*<sub>TEM</sub> par Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel.



**Figure 37.** Amplification du gène *bla<sub>SHV</sub>* par Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel.

### 5.1.2 PCR standard

Après une électrophorèse sur gel d'agarose, les résultats de la PCR standard des gènes codants pour des  $\beta$ -lactamases, confirme les résultats obtenus par PCR en temps réel. L'observation des bandes correspondantes nous a permis de confirmer la présence des gènes de *bla<sub>CTX-M</sub>* et *bla<sub>TEM</sub>* codants pour des BLSEs chez les 47 souches de *E. coli* testées. Aucune souche n'a pas été portée les gènes *bla<sub>GES</sub>*, *bla<sub>VEB</sub>* et *bla<sub>PER</sub>*. Nous avons remarqué un pourcentage de 72.34% des souches de *E. coli* possédant les deux gènes *bla<sub>CTX-M</sub>* et *bla<sub>TEM</sub>* dont 13 (27,65 %) souches possédant seulement le gène *bla<sub>CTX-M</sub>*. En outre, trois souches de *E. coli* ont été caractérisées par la présence du gène *bla<sub>OXA-48</sub>*. L'image des gels d'agarose après électrophorèse des produits d'amplification de PCR des gènes *bla<sub>CTX-M</sub>* et *bla<sub>TEM</sub>* est présentée dans la figure 38. La présence ou absence des bandes correspond à la présence ou l'absence des gènes.



**Figure 38.** Gel d'agarose après électrophorèse des produits de PCR des gènes *bla*<sub>CTX-M</sub> et *bla*<sub>TEM</sub> des souches de *E. coli* testées

(M : Marqueur du poids moléculaire, T+ : Témoin positif. T- : Témoin négatif).

## 5.2 Séquençage

Tous les produits de PCR indiquant des résultats positifs de la présence des gènes de résistance ont été purifiés, séquencés, et blastés contre la base de données NCBI aussi bien qu'ARG-ANNOT. Les résultats sont présentés dans le tableau 16.

Tableau 16. Profil moléculaire des souches de *E. coli* productrices de  $\beta$ -lactamases.

| Référence de la souche | Gènes codant pour des BLSEs |       | Gènes codant pour des carbapénèmases |
|------------------------|-----------------------------|-------|--------------------------------------|
|                        | TEM                         | CTX-M | OXA-48                               |
| A1                     | 1                           | 15    | OXA-48                               |
| A2                     | PCR -                       | PCR - | OXA-48                               |
| A3                     | PCR -                       | PCR - | OXA-48                               |
| C1                     | PCR -                       | 15    | PCR -                                |
| C2                     | 1                           | 15    | PCR -                                |
| C3                     | PCR -                       | 15    | PCR -                                |
| C4                     | PCR -                       | 15    | PCR -                                |
| C5                     | PCR -                       | 15    | PCR -                                |
| C6                     | PCR -                       | 15    | PCR -                                |
| D1                     | 198                         | 1     | PCR -                                |
| D2                     | 1D                          | 1     | PCR -                                |
| D3                     | 1D                          | 15    | PCR -                                |
| D4                     | 1D                          | 15    | PCR -                                |
| D5                     | 1D                          | 15    | PCR -                                |
| D6                     | 1D                          | PCR-  | PCR -                                |
| D7                     | 209                         | 15    | PCR -                                |
| D8                     | 1D                          | 15    | PCR -                                |
| D9                     | 1D                          | 15    | PCR -                                |
| D10                    | 1D                          | 139   | PCR -                                |
| D11                    | 1D                          | 1     | PCR -                                |
| D12                    | 1D                          | 15    | PCR -                                |
| D13                    | PCR -                       | 15    | PCR -                                |
| D14                    | 1D                          | 15    | PCR -                                |
| D15                    | 164                         | 1     | PCR -                                |
| D16                    | 1D                          | 15    | PCR -                                |
| D17                    | PCR-                        | 15    | PCR -                                |
| D18                    | PCR-                        | 15    | PCR -                                |
| D19                    | 1D                          | 15    | PCR -                                |
| D20                    | PCR -                       | 15    | PCR -                                |
| D21                    | 1D                          | 15    | PCR -                                |
| D22                    | 1D                          | 1     | PCR -                                |
| D23                    | PCR -                       | 15    | PCR -                                |
| D24                    | 1                           | 15    | PCR -                                |
| D25                    | 1                           | 15    | PCR -                                |
| D26                    | PCR -                       | 15    | PCR -                                |
| D27                    | 1D                          | 15    | PCR -                                |

Tableau 16. (Suite)

| Référence de la souche | Gènes codant pour les BLSEs |       | Gènes codant pour des carbapénèmes |
|------------------------|-----------------------------|-------|------------------------------------|
|                        | TEM                         | CTX-M | OXA-48                             |
| D28                    | 1                           | 15    | PCR -                              |
| D29                    | 1                           | 1     | PCR -                              |
| D30                    | 1                           | 15    | PCR -                              |
| D31                    | 1D                          | 15    | PCR -                              |
| D32                    | 1D                          | 15    | PCR -                              |
| D33                    | PCR -                       | 15    | PCR -                              |
| D34                    | PCR -                       | 15    | PCR -                              |
| D35                    | 1D                          | 1     | PCR -                              |
| D36                    | 1D                          | 1     | PCR -                              |
| D37                    | 1D                          | 15    | PCR -                              |
| D38                    | 1D                          | 15    | PCR -                              |
| D39                    | 1                           | 1     | PCR -                              |
| D40                    | 1                           | 15    | PCR -                              |

Une diversité de variants des  $\beta$ -lactamases est observée chez les souches de *E. coli* testées, la figure 39 présente les fréquences des  $\beta$ -lactamases et différents variants obtenus.

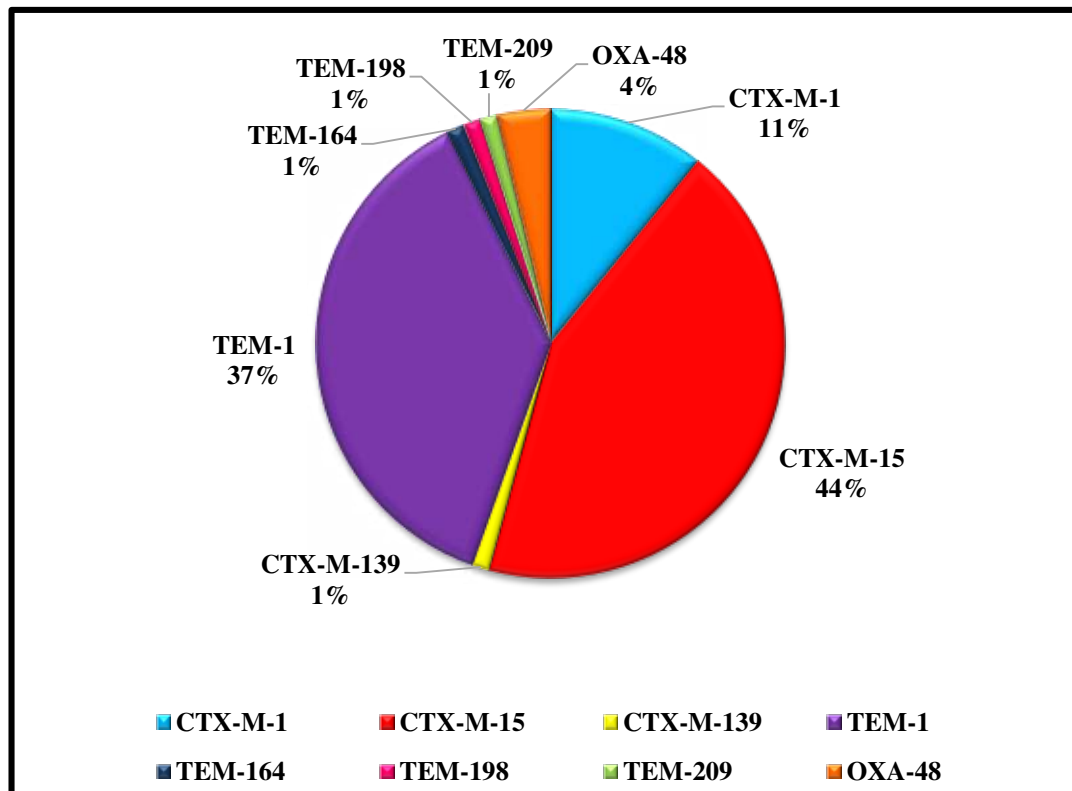


Figure 39. Fréquences des  $\beta$ -lactamases et différents variants obtenus chez l'espèce *E. coli*.

### 5.2.1 BLSE de type CTX-M

Le profil moléculaire des BLSEs a révélé que le type CTX-M a été détecté chez 47 souches de *E. coli* testées. Les enzymes CTX-M sont actuellement les BLSEs les plus répandues dans le monde et elles sont identifiées principalement chez l'espèce *E. coli* (Tausova et al., 2012).

Chez l'espèce *E. coli* l'analyse des séquences des gènes de BLSEs a montré que le variant CTX-M-15 représente 76,59% (36 isolats) ce qui confirme l'émergence et l'augmentation de la fréquence de CTX-M-15 à l'échelle nationale et à l'échelle mondiale. En Algérie, ce gène a été déjà rapporté chez toutes les souches productrices de BLSEs isolées à partir des excréments de macaques berbères et des sangliers à Bejaia et à Jijel (Bachiri et al., 2017). Une autre étude à Bejaia effectuée sur des animaux de compagnie sains a montré l'isolement des 20 souches de *E. coli* productrices de BLSEs dont 16 hébergent le CTX-M-15 (Yousfi et al., 2016).

Au niveau mondial ce gène était déjà décrit par des études précédentes en France chez des mouettes et chez une large population d'oiseaux sauvages au Pays-Bas (Bonnedahl et al., 2009 ; Veldman et al., 2013). Au Canada, Parker et al. (2016) ont démontré l'isolement d'une souche productrice du CTX-M-15 chez des oiseaux sauvages.

Un pourcentage de 61,3% a été signalé chez la mouette de Franklin (*Leucophaeus pipixcan*), une espèce migratrice au Chili (Baez et al., 2015). Une autre étude en Suède a mentionné l'isolement de ce variant chez des oiseaux sauvages en Russie et en France (Sütterlin et al., 2014). Au centre de l'Europe, le variant CTX-M-15 a été retrouvé chez des oiseaux d'eau, les grands cormorans et les canards colverts (Tausova et al., 2012).

Cette étude souligne, d'une part l'augmentation de la fréquence de la production de BLSEs par la souche de *E. coli* isolée chez les oiseaux, et d'autre part confirme la propagation mondiale du gène CTX-M-15. Le *bla*<sub>CTX-M-15</sub> est le génotype le plus répandu dans le monde entier chez les humains, les animaux et l'environnement, y compris certains pays en voie de développement de différents continents (Hasan et al., 2015).

Le type CTX-M-1 a été trouvé chez 9 souches (20%), ce gène a été déjà isolé chez différentes espèces de mouettes (*Larus ridibundus*, *Larus canus*, *Larus argentatus* et *Larus fuscus*) en Suède et en France (Wallensten et al., 2011 ; Bonnedahl et al., 2009), et chez les canards colverts (*Anas platyrhynchos*) en Pologne (Literak et al., 2010). Lors d'un isolement

des *E. coli* résistantes au céfotaxime chez des oiseaux sauvages au Pays-Bas, le variant CTX-M-1 était le plus abondant avec 14 isolats. L'isolement de *E. coli* produisant des  $\beta$ -lactamases à partir des fientes de cigognes blanches a déjà été signalé en Espagne, mais seulement *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub> et *bla*<sub>TEM-1b</sub> ont été détectés (Alcala et al., 2015). En outre, Oteo et al. (2018) ont étudié la colonisation cloacale par des entérobactéries résistantes au céfotaxime chez 668 oiseaux sauvages. Différents gènes responsables de la production de  $\beta$ -lactamases ont été détectés chez la cigogne blanche, le variant CTX-M-1 a été trouvé chez une souche de *E. coli*. En absence d'une pression d'antibiotique directe, la détection de résistance aux  $\beta$ -lactamines pourrait être dû à la contamination par des déchets humains ou à des zones agricoles riches en élevage (Alcala et al., 2015). Ainsi, les oiseaux sauvages peuvent facilement être infectés par leurs habitudes alimentaires liées aux décharges et aux eaux usées, fréquemment colonisées par des bactéries résistantes (Shobrak et Abo-amer, 2014).

Dans notre étude, nous avons isolé pour la première fois chez les oiseaux migrateurs une souche de *E. coli* productrice de *bla*<sub>CTX-M-139</sub> qui est un dérivé de CTX-M-15 par la substitution Y27F, retrouvé récemment chez une souche clinique isolée en France (Robin et al., 2017). En Algérie, six souches de *E. coli* hébergeaient le CTX-M-139 ont été isolées à partir des urines d'un patient hospitalisé dans la wilaya de Skikda (Mellouk et al., 2017).

La répartition des souches de *E. coli* productrices de *bla*<sub>CTX-M-15</sub> et *bla*<sub>CTX-M-1</sub> chez les oiseaux sauvages et les oiseaux migrateurs dans le monde est illustrée dans la figure 40 (Costa et al., 2006 ; Poeta et al., 2008 ; Bonnedahl et al., 2009 ; Literak et al., 2010 ; Wallensten et al., 2011 ; Veldman et al., 2013 ; Hasan et Jarhult, 2015 ; Rashid et al., 2015 ; Atterby et al., 2016 ; Wang et al., 2017).

### 5.2.2 $\beta$ -lactamases de type TEM

Dans cette étude, on a noté la production de  $\beta$ -lactamase de type TEM-1 et TEM-1D par 31 isolats, ces  $\beta$ -lactamases sont des enzymes non BLSEs.

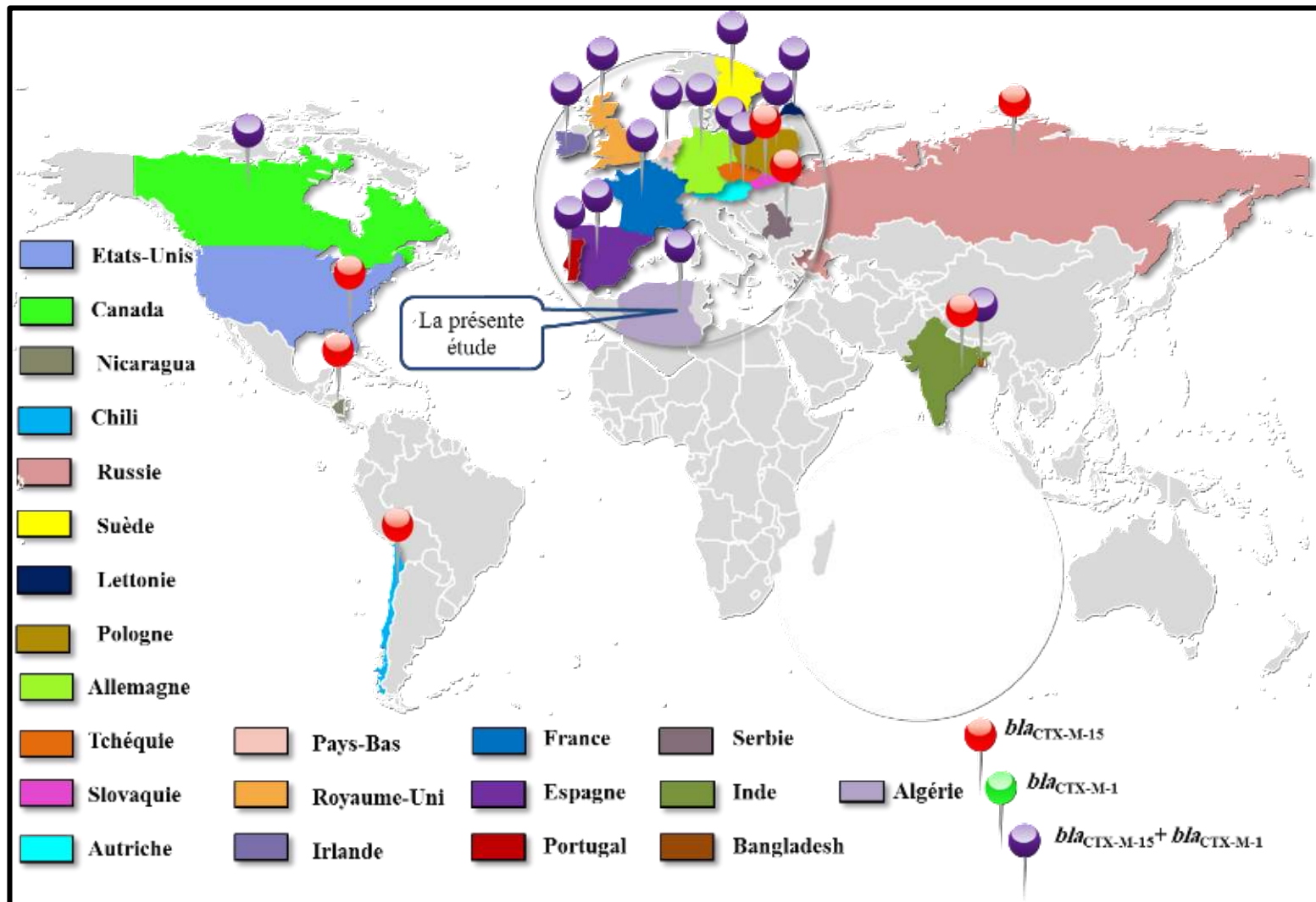


Figure 40. Répartition des souches de *E. coli* productrices de *bla*<sub>CTX-M-15</sub> et *bla*<sub>CTX-M-1</sub> chez les oiseaux sauvages dans le monde.

Le variant TEM-164 est une BLSE dérivée de TEM-1 avec des substitutions d'acides aminés aux positions 40 et 279, une leucine pour une valine et une isoleucine pour une thréonine, respectivement. Cette BLSE a été décrite pour la première fois chez une souche clinique de *K. pneumoniae* en Tunisie (**Ben Achour et al., 2009**), et chez l'espèce *E. coli* isolée d'abattoirs de poulet en Corée du Sud (**Lim et al., 2015**).

Le TEM-198 a été détecté chez une mouette migratrice au Chili Tandis que le TEM-209 qui est un dérivé du *bla*<sub>TEM</sub> été défini chez une souche de *K. pneumoniae* (**Baez et al., 2015**).

Les associations des gènes de CTX-M-15/TEM-1 et CTX-M-1/TEM-1 ont été signalées dans différentes études, en Alaska chez le Goéland à ailes grises (*Larus glaucescens*) et en Pologne lors d'une étude effectuée sur des animaux et des oiseaux sauvages (**Atterby et al., 2016 ; Costa et al., 2006**). Une autre étude a été effectuée à Barcelone a montré la présence de ces associations chez des goélands aux pattes jaunes (*Larus michahellis*). En Algérie, **Belmahdi et al. (2016)** ont démontré l'isolement d'une souche de *E. coli* héberge l'association CTX-M-1 et TEM-1 chez les poulets de chair.

L'isolement des souches de *E. coli* productrices de BLSEs à partir des fientes de la cigogne blanche fournit la preuve que ces isolats qui sont importants de point de vue de la santé publique peuvent se propager dans l'environnement via les oiseaux migrateurs (**Literak et al., 2010**).

### 5.2.3 $\beta$ -lactamase de type OXA-48

L'analyse des séquences des gènes de résistance aux carbapénèmes a révélé que les gènes détectés chez les souches A1, A2 et A3 de *E. coli* qui présentent une résistance à l'ertapénème appartenaient aux carbapénémases de type OXA-48.

Au cours de la dernière décennie, l'émergence et la dissémination d'entérobactéries, productrices de carbapénémases dans différentes régions du monde, représentent une menace importante notamment dans le cadre des infections nosocomiales (**Cuzon et al., 2010**).

La migration des oiseaux à longue distance joue un rôle dans la répartition géographique de plusieurs agents pathogènes. De nombreuses études précédentes à l'échelle mondiale ont montré que les oiseaux migrateurs jouent un rôle important dans la dissémination des bactéries à Gram négatif, plus spécifiquement des entérobactéries résistantes aux  $\beta$ -lactamines. La plupart des recherches effectuées au niveau de la résistance aux antibiotiques de la microflore

des oiseaux sauvages ont été basées sur la détection des BLSEs (**Hernandez et al., 2013 ; Bonnedahl et al., 2015 ; Rashid et al., 2015**).

Notre étude présente la première initiative en Algérie sur l'isolement des souches de *E. coli* productrices des carbapénèmases dans des fientes de cigognes blanches. Ce travail nous a permis pour la première fois de décrire la présence du gène OXA-48 codant pour une carbapénémase dans des isolats de *E. coli* dans des fientes de cigognes blanches. L'un des isolats de *E. coli* producteur de OXA-48 obtenu dans cette étude co-exprime les gènes *bla*<sub>CTX-M-15</sub> et *bla*<sub>TEM</sub> (A1), cette association n'a jamais été signalée chez les oiseaux. Cependant, la coproduction des BLSEs et des carbapénèmases à partir des entérobactéries avait déjà été décrite chez des animaux de compagnie (**Yousfi et al., 2016**). **Potron et al. (2013)** ont signalé l'association génétique du *bla*<sub>CTX-M-15</sub> et des gènes *bla*<sub>OXA-48</sub> sur le même transposon, ce qui indique que cette combinaison de gènes multirésistants peut se propager dans l'avenir (**Nordmann et al., 2013**).

La première détection des entérobactéries productrices de carbapénèmases chez les oiseaux migrateurs était en Allemagne par **Fischer et al. (2013)**, où ils ont décrit une souche de *Salmonella enterica* sérovar *corvallis* résistante à l'ertapénème chez un oiseau appartenant à l'espèce 'cerf-volant' (*Milvus migrans*). Le cerf-volant noir, un oiseau migrateur qui passe l'été en Europe et l'hiver en Afrique du Nord (au sud du Sahara) (**Fischer et al., 2013**). Le principal passage migratoire de cet oiseau à travers la Méditerranée se produit au détroit de Gibraltar ou le long de la côte de la mer Noire, traversant ainsi les pays de Balkans, connus par la prévalence élevée des bactéries qui portent le *bla*<sub>NDM-1</sub>, (**Fischer et al., 2013**) qui peuvent expliquer le transport de ces organismes. En outre, des entérobactéries productrices de l'IMP-4 ont été décrites chez une espèce migratrice, la mouette argentée (*Chroicocephalus novaehollandiae*) sur la côte australienne, où il peut s'agir d'un vecteur potentiel de souches qui hébergent le *bla*<sub>IMP</sub> (**Dolejska et al., 2016**).

Récemment une étude effectuée en Espagne sur différentes espèces aviaires sauvages a montré l'isolement d'une souche de *E. coli* et une souche du genre *Enterobacter* qui hébergent le gène *bla*<sub>OXA-48</sub> chez les espèces d'oiseaux, la buse variable (*Buteo buteo*) et le héron garde-bœufs (*Bubulcus ibis*) respectivement. Selon les auteurs, la diversité des habitudes alimentaires et des caractères migratoires des multiples espèces aviaires capables de transporter des bactéries multirésistantes peut contribuer à leur diffusion mondiale à partir de sources humaines (**Oteo et al., 2018**).

Une autre étude sur les mouettes dans le sud de France a révélé la présence de 22 souches de *E. coli* productrices d'une carbapénèmase de type VIM-1. Selon les auteurs, les résultats sont inquiétants vu que les mouettes vivent en contact étroit avec les populations humaines car elles se nourrissent de déchets, notamment dans les villes, et représentent donc le lien des agents pathogènes entre la faune et l'homme. De plus, les jeunes goélands aux pattes jaunes peuvent parcourir de grandes distances entre leur colonie natale et leurs lieux d'hivernage qui englobent l'ensemble de la vallée du Rhône et la côte atlantique. Ainsi, cette espèce pourrait favoriser la propagation de bactéries résistantes aux carbapénèmes, au moins en France (**Vittecoq et al., 2017**). L'étude réalisée à Barcelone en Espagne par **Vergara et al. (2017)** a signalé la présence de deux *E. coli* qui hébergent les deux gènes *bla<sub>KPC-2</sub>* et *bla<sub>VIM</sub>* en même temps, responsables de la résistance aux carbapénèmes. Le fait que les isolats résistants aux carbapénèmes présentent dans les échantillons fécaux de goélands partagent les mêmes séquences types et le profil de résistance que ceux prélevés des échantillons humains dans différentes parties du monde, souligne le rôle potentiel des oiseaux migrateurs dans la dissémination et la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques.

## 6 Conjugaison bactérienne

La technique de conjugaison et de transformation ont été réalisées afin d'étudier la possibilité du transfert d'information génétique entre deux bactéries, ainsi qu'une probable dissémination de plasmide porteur d'une association de plusieurs gènes de résistance.

Dans notre étude, les souches de *E. coli* présentant une résistance à l'ertapénème ne peuvent pas être transférées par conjugaison, par électroporation ou par transformation. Les mêmes résultats sont rapportés dans une étude précédente au Royaume-Uni où les plasmides ne peuvent être transférés par transformation ou conjugaison d'aucun des quatre isolats cliniques de *E. coli* portant le gène *bla<sub>OXA-48</sub>* (**Dimou et al., 2012**). Une autre étude au Liban de différentes espèces d'entérobactéries isolées des échantillons cliniques n'ont pas été transférables par la conjugaison ce qui indique une probabilité d'intégration chromosomique du gène *bla<sub>OXA-48</sub>* (**Hammoudi et al., 2014**). **Gülmez et al. (2008)** ont rapporté aussi qu'une souche clinique de *E. coli* isolée en Turquie et qui exprime une carbapénèmase de type OXA-48 n'a pas été transférée par électroporation suggérant une intégration chromosomique. Récemment, **Turton et al. (2016)** ont signalé aussi l'expansion clonale de *E. coli* ST38 portant un gène de carbapénèmase OXA-48 chromosomiquement intégré.

Par contre cela est en contraste avec un rapport précédent dans lequel le gène *bla<sub>OXA-48</sub>* a été transféré en association avec un plasmide de 62 kb chez une souche *E. coli* ST38 (Nordmann *et al.*, 2013).

## 7 Typage des souches

L'enquête sur la clonalité des 6 souches de *E. coli* provenant de la première série de prélèvement et les trois souches productrices de carbapénèmases de la deuxième série de prélèvement, a été faite par une amplification par PCR standard et un séquençage des sept gènes de ménage (*adh*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, and *recA*) précédemment rapportés.

Les séquences obtenues après le séquençage ont été soumises à une base de données PubMLST (<http://mLst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>). Les résultats sont exprimés dans le tableau 17.

**Tableau 17.** Séquences types des souches de *E. coli* testées des deux prélèvements.

| Souche    | Gènes codant pour des BLSEs   | Gènes codant pour des carbapénèmases | Séquence type |
|-----------|-------------------------------|--------------------------------------|---------------|
| <b>C1</b> | <i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i> | -                                    | ST10          |
| <b>C2</b> | <i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i> | -                                    | ST10          |
| <b>C3</b> | <i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i> | -                                    | ST10          |
| <b>C4</b> | <i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i> | -                                    | ST10          |
| <b>C5</b> | <i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i> | -                                    | ST10          |
| <b>C6</b> | <i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i> | -                                    | ST10          |
| <b>A1</b> | <i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i> | <i>bla<sub>OXA-48</sub></i>          | /             |
| <b>A2</b> | -                             | <i>bla<sub>OXA-48</sub></i>          | ST38          |
| <b>A3</b> | -                             | <i>bla<sub>OXA-48</sub></i>          | ST38          |

L'analyse MLST a révélé que les souches C1-C6 appartenait à ST10 qui était déjà trouvée en Europe, chez des corbeaux en République tchèque, Allemagne et Pologne où les souches de *E. coli* isolées hébergeaient le CTX-M-1 (Jamborova *et al.*, 2015). Simões *et al.* (2010) ont rapporté l'appartenance d'une souche de *E. coli* isolée au Portugal à partir d'une large population des goélands, goéland brun (*Larus fuscus*) et goéland pontique (*Larus cachinnans*) à ST10 hébergeant différents déterminants de BLSE de type CTX-M. Une étude en Espagne sur les oiseaux sauvages inclut la cigogne blanche a signalé la détection de ce clone

chez le goéland leucophée (*Larus michahellis*) où la souche hébergeait le CMY-2 et le TEM-1b.

La séquence type 10 a été décrite parmi les complexes ST les plus communs observés chez les souches cliniques de *E. coli* productrices de BLSEs en Espagne. Ce fait suggère l'existence d'une voie de transmission des souches productrices de BLSEs liées phylogénétiquement entre les humains et les populations d'animaux sauvages (Alcala et al., 2015). Lors d'une étude comparative des gènes de résistance codant des BLSEs de l'espèce *E. coli* isolées des mouettes de Franklin (*Leucophaeus pipixcan*) et des êtres humains au Chili, les données MLST confirment que les humains et les oiseaux partagent les mêmes clones parmi lesquelles ST10, indiquant l'échange de *E. coli* entre les oiseaux et l'humain (Hernandez et al., 2013). Au Liban Mohamad et al. (2016) ont démontré l'isolement à partir des bovins des souches de *E. coli* productrices de CTX-M-15 appartenant à ST10.

L'analyse MLST des souches productrices de OXA-48 a révélé que les souches A2 et A3 appartenaient à ST38 qui est largement diffusée dans la région européenne et méditerranéenne, comme les Pays-Bas (Van der Bij et al., 2011), l'Espagne (Oteo et al., 2009) et la France (l'histoire du voyage des patients comprenait la Turquie et l'Égypte) (Poirel et al., 2011) alors que la séquence type de la souche A1 présente une combinaison allélique qui n'est pas disponible dans la base de données MLST de l'espèce *E. coli*, indiquant son appartenance à une nouvelle ST qui est au cours de description. La séquence type 38 est également détectée chez les isolats d'oiseaux sauvages au Canada (producteurs de CTX-M-15 et TEM-1) (Bonedahl et al., 2015) et en Floride (producteur CMY-2) (Poirel et al., 2012). Plus récemment, Alcalá et al. (2015) ont identifié une *E. coli* appartenant à ST38 productrice de CTX-M-1 dans un échantillon de fiente d'oiseaux migrateurs de cigognes blanches en Espagne. Ce clone a été associé à la production d'OXA-48 dans des isolats cliniques identifiés en Allemagne (Kaase et al., 2016) et en France (Poirel et al., 2011). Jusqu'à nos jours la première et la seule détection de l'espèce *E. coli* productrice de l'enzyme OXA-48 et appartenant à ST38 chez les animaux était chez les poulets au Liban (Al Bayssari et al., 2015).

Les séquences types 10 et 38 ont été signalées dans différentes études chez la même espèce migratrice de mouette de Franklin (*Leucophaeus pipixcan*), au Chili par Bonnedahl et al. (2014) et Baez et al. (2015). Les mêmes résultats sont marqués par Bonnedahl et al. (2015) lors d'une étude comparative du génotype CTX-M chez les mouettes de Franklin entre les lieux de reproduction au Canada et les lieux d'hivernage au Chili. Aux Etats-Unis et exactement en

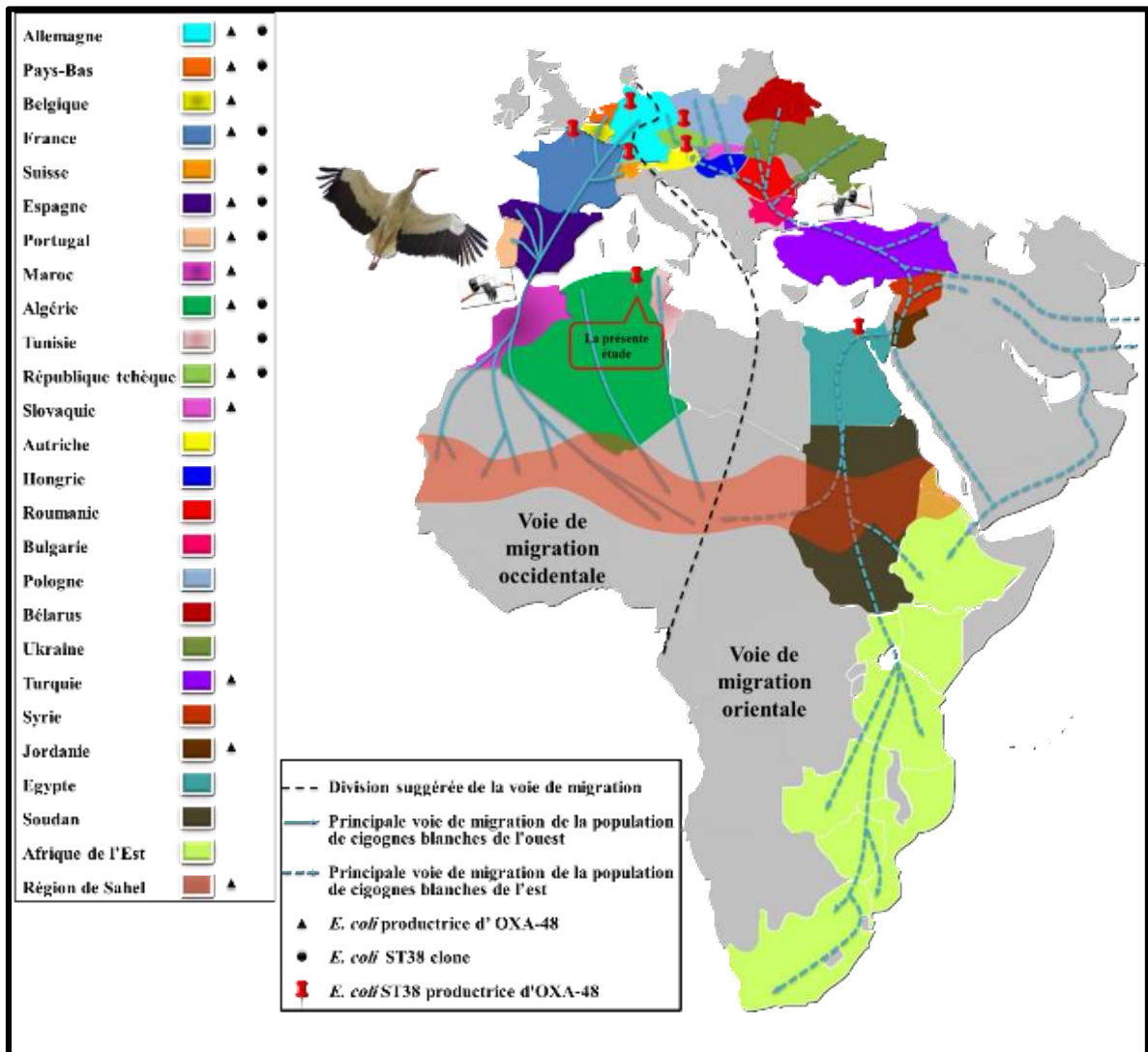
Floride. **Poirel et al. (2012)** ont démontré l'isolement des souches de *E. coli* productrices de CTX-M-15 et CMY-2 et qui appartenaient à ST10 et ST38 respectivement à partir des échantillons fécaux de mouettes sauvages (*Larus delawarensis*) et de pélicans.

Nous rapportons pour la première fois la détection de ST38 chez une souche de *E. coli* qui exprime le gène *bla<sub>OXA-48</sub>* en Algérie, ainsi que sa première description chez les espèces d'oiseaux migrateurs de *Ciconia ciconia*. Il est intéressant de noter que les cigognes blanches disposent d'une vaste distribution des lieux de reproduction couvrant la majeure partie de l'Europe ainsi qu'au sud de la méditerranée où ils se reproduisent au Nord de l'Algérie et le Maroc. La population européenne se partage en deux voies de migrations différentes. La voie occidentale suit un trajet Sud-ouest, en passant par le détroit de Gibraltar pour hiverner dans l'Ouest Sahélien ou l'Afrique de l'Ouest. La population de l'Est passant par le Bosphore, la Turquie, le Proche Orient et le Sinaï pour rejoindre ses quartiers d'hivernage en Afrique de l'Est et l'Afrique du Sud. La distribution de *E. coli* ST38 productrice de carbapénèmase de type OXA-48 dans la plupart des pays inclus dans les principales voies de migration de la population de cigognes blanches est montrée dans la figure 41. (**Berthold, 2001 ; Poirel et al., 2004 ; Oteo et al., 2009 ; Lahlaoui et al., 2011 ; Moquet et al., 2011 ; Potron et al., 2011 ; van der Bij et al., 2011 ; Glupczynski et al., 2012 ; Guenther et al., 2012 ; Barguigua et al., 2013 ; Dobiasova et al., 2013 ; Galler et al., 2013 ; Grisold et al., 2013 ; Paltansing et al., 2013 ; Poirel et al., 2013 ; Stolle et al., 2013 ; Shephard et al., 2013 ; Blanc et al., 2014 ; Manageiro et al., 2014 ; Agabou et al., 2014 ; Arana et al., 2015 ; Zahedi Bialvaei et al., 2015 ; Zurfluh et al., 2015 ; Baran et al., 2016 ; Belmahdi et al., 2016 ; Jones-Dias et al., 2016 ; Kaas et al., 2016 ; Muller et al., 2016 ; Skalova et al., 2016**).

Cependant, notamment certains individus peuvent migrer le long des deux voies (**Shephard et al., 2013**).

Nous supposons que la région d'hivernage du Sahel pourrait être une zone potentielle de dynamique des gènes de résistance aux agents antimicrobiens et de transmission des pathogènes entre les cigognes blanches. Cela rend les oiseaux migrateurs tels que *Ciconia ciconia* des vecteurs potentiels de bactéries multirésistantes. Les populations de cigognes blanches de l'Est et l'Ouest traversent la Méditerranée à travers la Turquie et l'Espagne, où le gène OXA-48 a été initialement détecté et largement rapporté (**Djahmi et al., 2014**). **Berthold et al. (2002)** ont montré que l'Algérie pourrait représenter une zone d'hivernage pour les cigognes blanches d'Europe de l'Ouest à travers le suivi par satellite d'une cigogne blanche de

Suisse. Cette dernière a hiverné au Maroc et en Algérie jusqu'à Avril 2000 et est restée au centre de l'Espagne de Mai à Août, puis elle est revenue en Algérie pour hiverner. Le rôle des cigognes blanches dans la dissémination intercontinentale de pathogènes a déjà été signalé par **Malkinson et al. (2002)** qui a démontré que cet oiseau migrateur est responsable de la transmission du virus West Nil de l'Europe au Moyen-Orient.



**Figure 41.** Distribution de *E. coli* ST38 productrice de carabapénèmase de type OXA-48 dans la plupart des pays inclus dans les principales voies de migration de la population de cigognes blanches.

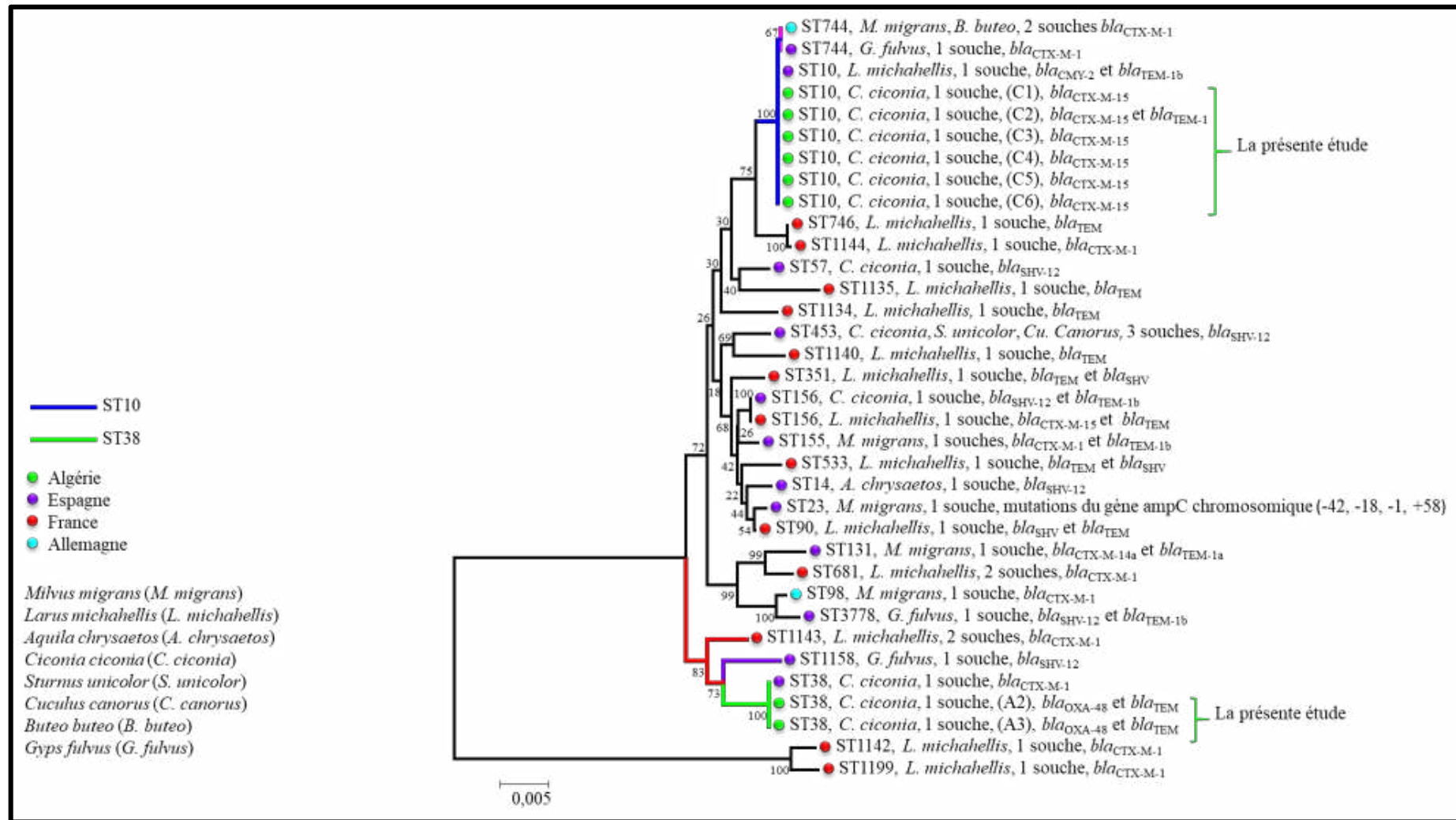
Actuellement, nous ne pouvons pas exclure la contribution des voyages internationaux des humains et de l'immigration à l'émergence et à la diffusion du gène *bla*<sub>OXA-48</sub> dans divers pays. Néanmoins, la cigogne blanche, en tant que réservoir de *E. coli* produisant OXA-48, pourrait jouer un rôle important dans la propagation et participer à la diffusion du gène OXA-48 à travers leurs différentes directions de voie de migration.

L'Arbre phylogénétique est déduit de la concaténation des séquences partielles des sept gènes de ménage. Les séquences obtenues ont été alignées par le logiciel ClustalX, ensuite analysées par le logiciel Mega version 6, en utilisant la méthode Neighbour joining avec le modèle de distance paramètre Kimura. Les valeurs de bootstrap sont exprimées en pourcentage de 1000 répétitions et présentées à un point de branchement.

La construction de l'arbre phylogénétique, à partir des séquences des gènes de ménage concaténées et alignées de nos souches de *E. coli* isolées de la première série de prélèvement ainsi que les souches qui expriment le gène *bla<sub>OXA-48</sub>* avec celles des clones les plus isolés des oiseaux migrateurs dans la région méditerranéenne, afin d'illustrer leur position phylogénétique et leur regroupement. L'arbre phylogénétique à base de MLST de la plupart des clones de *E. coli* productrices de  $\beta$ -lactamases isolés chez les oiseaux migrateurs de la région méditerranéenne est présentée dans la figure 42.

Les séquences types trouvées chez la cigogne blanche sont des clones pathogènes importants des humains et des animaux. La séquence type 10 comprend des espèces pathogènes de *E. coli* telles que *E. coli* entéroagrégate et *E. coli* entérotoxigène ainsi que des souches commensales trouvées chez l'homme et les animaux destinés à la production d'aliments (**Jamborova et al., 2015**). En outre, plusieurs clones de *E. coli* pathogènes extra-intestinaux produisant des BLSEs, sont largement distribués au niveau mondial, y compris ST38 (**Chattaway et al., 2014**). Leur présence commune dans l'environnement, y compris les oiseaux migrateurs, est inquiétante et devrait être considérée comme un grave risque pour l'environnement. La cigogne blanche qui habite les zones urbaines, suburbaines et agricoles peut contribuer à la dissémination de clones de *E. coli* résistantes aux carbapénèmes (**Jamborova et al., 2015**).

Les animaux sauvages ne sont pas directement exposés aux antibiotiques cliniquement pertinents. Cependant, la résistance aux antibactériens chez les animaux sauvages a été de plus en plus signalée dans le monde, parallèlement à la situation en médecine humaine et vétérinaire. Cela sous-tend la complexité de la résistance bactérienne chez les animaux sauvages et la transmission possible entre les humains, les animaux domestiques, l'environnement et la faune (**Wang et al., 2017**).



**Figure 42.** Arbre phylogénétique à base de MLST de la plupart des clones de *E. coli* productrices de β-lactamases isolés chez les oiseaux migrants de la région méditerranéenne.

Après une augmentation alarmante du taux des bactéries à Gram négatif et particulièrement des entérobactéries résistantes aux  $\beta$ -lactamines au niveau des milieux hospitaliers, leur propagation dans l'environnement, chez la faune, suscite un intérêt croissant de la part de la communauté scientifique. Le potentiel des oiseaux en tant que vecteurs de zoonoses a été démontré dans le contexte du virus du West Nil aux États-Unis. De plus les preuves suggèrent une transmission bidirectionnelle des bactéries résistantes entre les oiseaux sauvages et les humains. Plusieurs études ont été menées sur la présence de bactéries résistantes chez les oiseaux migrateurs, au point d'être considérées comme un indicateur de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement, étant donné qu'ils sont distribués partout dans le monde (**Vergara et al., 2017**).

La principale cause des taux croissants de résistance peut être trouvée dans l'abus et le mauvais usage d'agents antibactériens, qu'ils soient utilisés chez les patients et le bétail ou libérés dans l'environnement. Une fois que des bactéries résistantes aux antimicrobiens apparaissent, elles peuvent se propager bien localement qu'à l'échelle mondiale. Les principaux facteurs contribuant à leur propagation au niveau mondial comprennent les oiseaux migrateurs, la mondialisation de l'approvisionnement alimentaire et les voyages internationaux (**Vergara et al., 2017**). Bien que l'augmentation de la résistance aux antibiotiques chez le bétail est principalement due à l'utilisation directe d'antibiotiques, l'émergence de bactéries résistantes chez les animaux sauvages pourrait être liée au passage de gènes résistants aux antibiotiques dans l'environnement (**Robinson et al., 2016**).

Les entérobactéries productrices de BLSEs sont largement diffusées à la fois chez l'homme et chez les animaux dans le monde entier. A ce titre, en raison de leur fréquence élevée, de leur potentiel pathogène, du caractère aisément transférable des mécanismes de résistance impliqués, ces bactéries multirésistantes font l'objet de différentes études dans plusieurs pays. Notre étude a montré une explosion de l'incidence des BLSEs chez les entérobactéries isolées de la cigogne blanche, en particulier chez *E. coli*.

Bien que des BLSEs aient été trouvées chez diverses entérobactéries, la plupart des bactéries pathogènes productrices de BLSEs chez les animaux sauvages sont des *E. coli* ce qui est rapporté par notre étude où nous signalons la production de BLSEs par des espèces d'entérobactéries isolées chez la cigogne blanche, avec un pourcentage élevé de l'espèce *E. coli*. En outre, semblable à celle des études de la médecine humaine et vétérinaire, la famille CTX-M est le type le plus répandu d'entérobactéries productrices de BLSEs chez les animaux

sauvages ce qui est confirmé par nos résultats décrivant un taux élevé du gène *bla<sub>CTX-M</sub>* en le comparant avec celui de *bla<sub>TEM</sub>* (Wang et al., 2017).

Les carbapénèmases acquises constituent actuellement l'une des menaces de santé publique les plus préoccupantes liées à la résistance aux antibiotiques. Notre capacité à limiter l'augmentation et la propagation des producteurs de carbapénèmases, qui ne se produisent actuellement qu'à des niveaux bas dans de nombreux pays, devrait constituer la clé du succès ou de l'échec des efforts des organisations internationales et des gouvernements afin de réduire l'impact de la résistance aux antibiotiques. Pour relever ce défi, nous devons étudier le rôle de tout réservoir non humain de bactéries résistantes aux carbapénèmes, qui pourrait favoriser leur propagation dans les populations humaines (Vergara et al., 2017).

Des bactéries productrices de carbapénèmases ont été détectées dans certaines rivières, stations d'épuration, animaux de compagnie et animaux d'élevage. Cependant, il existe très peu d'informations disponibles sur les entérobactéries productrices de carbapénèmases isolées chez les oiseaux sauvages (Oteo et al., 2018). L'isolement des souches de *E. coli* produisant une carbapénémase de type OXA-48 dans la présente étude, chez la cigogne blanche, a soulevé des questions sur le risque potentiel de propagation de la résistance associé à ce réservoir sauvage. Plus généralement, notre travail met en évidence le besoin urgent de développer davantage de liens entre les études focalisant sur la faune et l'homme afin d'améliorer nos connaissances sur la dynamique des espèces résistantes.

La détection des séquences types 10 et 38 qui ont été déjà rapportées chez les oiseaux sauvages en particulier la séquence type 38 qui a été détectée chez la cigogne blanche en Espagne, suggère la dissémination de ce clone via ce réservoir sauvage vu son caractère migratoire (Alcalá et al., 2015 ; Oteo et al., 2018). Cependant l'isolement des souches de *E. coli* ST38 productrices de OXA-48 est signalé pour la première fois en Algérie et dans le monde chez la cigogne blanche. Nos résultats témoignent la propagation de la résistance aux  $\beta$ -lactamines à grande échelle.

*CONCLUSION*

*ET*

*PERSPECTIVES*

Le développement de l'antibiorésistance constitue un enjeu de santé publique au niveau mondial qui justifie une prise de conscience accrue et nécessite une action urgente. Au cours de ces dernières années, l'apparition et le développement des bactéries résistantes aux antibiotiques chez la faune ont été mis en évidence dans de nombreuses publications scientifiques.

Deux séries de prélèvement ont été effectuées pour but d'évaluer les niveaux de résistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries isolées des fientes de la cigogne blanche (*Ciconia ciconia*) de la Commune d'El Madher de la wilaya de Batna. Un protocole de screening sélectif a été suivi. Les résultats d'identification ont indiqué que les 65 souches d'entérobactéries isolées sont réparties comme suit: 85% *Escherichia coli*, 9% *Citrobacter freundii*, 3% *Klebsiella pneumoniae* et 3% *Enterobacter aerogenes*. La recherche des différents mécanismes enzymatiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines a montré un pourcentage élevé des BLSE avec 94%, suivi par la production de carbapénèmases puis l'association phénotypique BLSEs/carbapénèmases avec des pourcentages de 4% et 2% respectivement. Un autre point à souligner est la prédominance de l'espèce *E. coli* présentant un phénotype de BLSE avec 80% suivi par *C. freundii*, *K. pneumoniae* et *E. aerogenes* avec des pourcentages de 8, 33%, 3,33% et 3,33% respectivement.

L'utilisation des outils de biologie moléculaire et des logiciels de bio-informatique nous a permis de caractériser les gènes de résistance aux  $\beta$ -lactamines des souches d'*E. coli*. Des  $\beta$ -lactamases de type CTX-M-15, CTX-M-1, CTX-M-139, TEM-1, TEM-164, TEM-198, TEM-209 et OXA-48 ont été détecté. Le typage moléculaire par *Multi-Locus Sequence Typing* chez *E. coli* a permis d'identifier les séquences types 38 et 10. Dans la présente étude, nous avons révélé pour la première fois dans le monde chez la cigogne blanche (*Ciconia ciconia*) des souches de *E. coli* ST38 productrices de carbapénémase de type OXA-48.

Dans notre étude, les essais de transfert du gène codant pour la carbapénémase de type OXA-48 par conjugaison, électroporation et par choc thermique ont échoué d'où un séquençage du génome est nécessaire pour identifier la possibilité d'intégration chromosomique du *bla*<sub>OXA-48</sub>.

Au terme de ce travail, nos résultats témoignent que la cigogne blanche joue un rôle potentiel comme réservoir et vecteur des entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases conduisant à un haut niveau de résistance aux  $\beta$ -lactamines, la classe d'antibiotiques la plus importante et la plus utilisée en antibiothérapie courante. Avec ce rythme de résistance aux antibiotiques, il n'y aura bientôt plus d'antibiotiques efficaces pour traiter les infections bactériennes, d'où la nécessité de la mise en œuvre d'une stratégie pluridisciplinaire qui permette d'améliorer les pratiques de prescription des antibiotiques et de diminuer la résistance bactérienne. Les données actuelles révèlent que le portage de ces souches multirésistantes est répandu dans au moins certaines populations sauvages telles que les oiseaux migrateurs même si celles-ci sembleraient qu'ils n'ont jamais été exposés de manière directe et continue à des antibiotiques. De nombreuses espèces d'oiseaux affichent une mobilité considérable, impliquant souvent la traversée des continents qui pourrait donc contribuer à la dissémination de la résistance sur le globe.

Les origines de la résistance et les mécanismes de sélection responsables du maintien d'une prévalence élevée de la résistance sont en grande partie inconnus et doivent donc être mieux pris en compte. La migration aviaire pourrait également avoir des conséquences imprévisibles en raison des interactions possibles de ces oiseaux avec les écosystèmes bactériens environnementaux dans les régions isolées, touchées principalement par les oiseaux migrateurs. Dans cette optique, il reste nécessaire d'améliorer notre compréhension des facteurs qui contribuent à la dissémination de bactéries résistantes et d'évaluer le rôle des oiseaux migrateurs dans la diffusion de la résistance aux agents antimicrobiens dans les environnements naturels. Comme suggéré précédemment, des études spatiales et temporelles approfondies sont nécessaires pour bien comprendre l'importance de la faune comme source de résistance aux agents antimicrobiens.

Des propositions devront être formulées, afin de recommander des schémas thérapeutiques permettant de réduire ou supprimer les pratiques à risque en médecine humaine de même qu'en médecine vétérinaire, lorsque cela s'avère possible, ou de proposer des solutions alternatives aux antibiotiques. Acquérir, en plus, des connaissances scientifiques et techniques relatives à la présence, au devenir et aux effets de ces médicaments sur la santé humaine, animale et sur l'environnement.

La surveillance des profils de résistance est très étroitement associée à une surveillance moléculaire en laboratoire, qui permet d'évaluer plus finement la portée des enjeux de santé publique lorsque des mécanismes de résistance ou des clones bactériens identiques sont retrouvés chez l'homme et l'animal. Cette caractérisation à partir des gènes fournit également des clés de compréhension sur l'épidémiologie de la résistance.

Les résultats obtenus dans ce travail méritent d'être poursuivis en développant les actions suivantes:

- La caractérisation au niveau moléculaire des gènes responsables de la production des  $\beta$ -lactamases chez les souches non étudiées.
- L'étude de la transférabilité des gènes de résistance.
- Le typage moléculaire par MLST pour identifier les différents séquence types.
- L'identification des groupes clonaux par électrophorèse en champ pulsé et les comparer avec ceux isolés de l'être humain.
- L'étude de la résistance aux antibiotiques dans les fientes d'autres espèces d'oiseaux migrateurs pour évaluer leur rôle dans la dissémination des bactéries résistantes.

L'une des limites de notre étude est la taille réduite des échantillons, par conséquent une augmentation du nombre de prélèvement est nécessaire. D'autres études du parcours migratoire sont importantes, par la pose de bagues et le suivi par satellite qui sont des mesures riches d'enseignements, puisqu'elles permettent le suivi des cigognes, baguées ou portant des émetteurs satellites sur leurs aires de reproduction, jusqu'à leurs aires d'hivernage. Des recherches sur l'écologie et le comportement alimentaire des oiseaux migrateurs, porteurs de bactéries productrices de  $\beta$ -lactamases connues pour être associées aux régions urbaines, sont nécessaires pour mieux comprendre le rôle de la faune dans la dissémination de certaines bactéries résistantes aux antibiotiques.

*RÉFÉRENCES*

*BIBLIOGRAPHIQUES*

1. **Abass, A. M., M. E. Ahmed, I. G. Ibrahim, and S. A. Yahia.** 2017. Bacterial Resistance to Antibiotics: Current Situation in Sudan. *Journal of Advances in Microbiology*. **6**: 1-7.
2. **Abdallah, H.M., E.A. Reuland, B.B. Wintermans, N. Al-Naiemi, A. Koek, A.M. Abdelwahab, et al.** 2015. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases and/or Carbapenemases-Producing *Enterobacteriaceae* Isolated from Retail Chicken Meat in Zagazig, Egypt. *PLoS One*. **10**: e0136052.
3. **Agabou, A., A. Pantel, Z. Ouchenane, N. Lezzar, S. Khemissi, D. Satta, et al.** 2014. First description of OXA-48-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone ST131 from patients hospitalised at a military hospital in Algeria. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. **33**: 1641-1646.
4. **Agabou, A., N. Lezzar, Z. Ouchenane, S. Khemissi, and D. Satta.** 2016. Clonal relationship between human and avian ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* isolates in North-Eastern Algeria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **35**: 227-234.
5. **Agero, Y., F.M. Aarestrup, K. Pedersen, A.M. Seyfarth, T. Struve, and H. Hasman.** 2012. Prevalence of extended-spectrum cephalosporinase (ESC)-producing *Escherichia coli* in Danish usage. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. **67** : 582-588.
6. **Al Bayssari, C., A.O. Olaitan, F. Dabboussi, M. Hamze, and J.M. Rolain.** 2015. Emergence of OXA-48-producing *Escherichia coli* clone ST38 in fowl. *Antimicrob. Agents Chemother*. **59**: 745-746.
7. **Alanis, A.J.** 2005. Resistance to Antibiotics : Are We in the Post-Antibiotic Era ? *Archives of Medical Research*. **36**: 697-705.
8. **Alcalá, L., C.A. Alonso, C. Simón, C. González-Esteban, J.Orós, A. Rezusta, et al.** 2015. Wild Birds, Frequent Carriers of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL) Producing *Escherichia coli* of CTX-M and SHV-12 Types. *Microb. Ecol*. **72**: 861-869.
9. **Allocati, N., M. Masulli, M.F. Alexeyev, and C. Dillio.** 2013. *Escherichia coli* in Europe : An Overview. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. **10**: 6235-6254.
10. **Alonso, C. A., M. Zarazaga, R. Ben Sallem, A. Jouini, K. Ben Slama, and C. Torres.** 2017. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* in husbandry animals. *Lett Appl Microbiol*. **64**: 318-334.
11. **Ambler, R.P.** 1980. The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond [Biol]*. **289**: 321-331.

12. **Aminov, R.I., and R.I. Mackie.** 2007. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol Lett.* **271**: 147-61.
13. **Anonyme.** 2015. UK Standards for Microbiology Investigations Identification of *Enterobacteriaceae*. *Public Health England.* **4**: 1-34.
14. **Aqel, A. A., D. Meunier, H. M. Alzoubi, I. M. Masalha, and N. Woodford.** 2014. Detection of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases among Jordanian clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Scandinavian journal of infectious diseases.* **46** :155-157.
15. **Arana, D.M., D. Saez, P. Garcia-Hierro, V. Bautista, S. Fernandez-Romero, M. Angel de la Cal, et al.** 2015. Concurrent interspecies and clonal dissemination of OXA-48 carbapenemase. *Clin. Microbiol. Infect.* **21**: 148.e1-4.
16. **Ardiles-Villegas, K., D. Gonzalez-Acuna, J. Waldenstrom, B. Olsen, and J. Hernandez.** 2011. Antibiotic resistance patterns in fecal bacteria isolated from Christmas shearwater (*Puffinus nativitatis*) and masked booby (*Sula dactylatra*) at remote Easter Island. *Avian Dis.* **55**: 486-489.
17. **Aslantaş, Ö., and E. Ş. Yilmaz.** 2017. Prevalence and molecular characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) and plasmidic AmpC  $\beta$ -lactamase (pAmpC) producing *Escherichia coli* in dogs. *Journal of Veterinary Medical Science.* **79**: 1024-1030.
18. **Atterby, C., A.M. Ramey, G.G. Hall, J. Jarhult, S. Borjesson, and J. Bonnedahl.** 2016. Increased prevalence of antibiotic-resistant *E. coli* in gulls sampled in Southcentral Alaska is associated with urban environments. *Infect. Ecol. Epidemiol.* **6**: 32334.
19. **Aubert, G. et A. Carricajo.** 2004. Place du laboratoire dans le choix et le suivi pharmacodynamique de l'antibiothérapie des infections sévères. In : Annales françaises d'anesthésie et de réanimation. *Elsevier Masson.* **23**: 704-713.
20. **Avril, J.L., H. Dabernat, F. Denis., and H. Monteil.** 2000. Bactériologie clinique. Ellipses Edition Marketing SA.
21. **Azefzef, H.** 2002. Statut actuel de la population de la cigogne blanche *Ciconia ciconia* en Tunisie. *Alauda.* **70**: 387-392.
22. **Azimi, L., G. Eracijiyan, M. Talebi, and P. Owlia.** 2015. Phenotypic and molecular characterization of plasmid mediated AmpC among clinical csolates of *Klebsiella pneumoniae* csolated from different hospitals in Tehran. **9**: 3-5.

23. **Bachiri, T., S. Bakour, R. Ladjouzi, L. Thongpan, J-M. Rolain, and A. Touati.** 2017. High rates of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in wild boars and Barbary macaques in Algeria. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **8**: 35-40.
24. **Bachiri, T., S. Bakour, R. Lalaoui, N. Belkebla, M. Allouache, J-M. Rolain, et al.** 2017. Occurrence of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* Isolates in the Wildlife. Algeria. *Microbial drug resistance.***21**: 470-476.
25. **Baez, J., M. Hernandez-Garcia, C. Guamparito, S. Diaz, A. Olave, K. Guerrero, et al.** 2015. Molecular characterization and genetic diversity of ESBL-producing *Escherichia coli* colonizing the migratory Franklin's gulls (*Leucophaeus pipixcan*) in Antofagasta, North of Chile. *Microb. Drug Resist.* **21**: 111-116.
26. **Bakour, S., V. Garcia, L. Loucif, J.M. Brunel, A. Gharout-Sait, A. Touati, et al.** 2015. Rapid identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* using a modified Carba NP test. *New Microbes New Infect.* **7**: 89-93.
27. **Baran, I., and N. Aksu.** 2016. Phenotypic and genotypic characteristics of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in a tertiary-level reference hospital in Turkey. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **15**: 20.
28. **Barguigua, A., F. El Otmani, M. Talmi, K. Zerouali, and M. Timinouni.** 2013. Prevalence and types of extended spectrum beta-lactamases among urinary *Escherichia coli* isolates in Moroccan community. *Microb. Pathog.* **61**: 16-22.
29. **Batah, R., L. Loucif, A. O, Olaitan, N. Boutefnouchet, H. Hamoudi and J-M. Rolain.** 2015. Outbreak *Serratia marcescens* Coproducing ArmA and CTX-M-15 Mediated High Levels of Resistance to Aminoglycoside and Extended-Spectrum Beta-Lactamases. **21**: 516-526.
30. **Bathoorn, E., A.W. Friedrich, K. Zhou, J.P. Arends, D.M. Borst, H. Grundmann, et al.** 2013. Latent introduction to the Netherlands of multiple antibiotic resistance including NDM-1 after hospitalisation in Egypt, August 2013. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin.* **18**.
31. **Bauemfeind, A., H. Grimm, and S. Schweighart.** 1990. A New Plasmidic Cefotaximase in a Clinical Isolate of *Escherichia coli*. *Infection.* **18**: 2-6.
32. **Belmahdi, M., S. Bakour, C. Al Bayssari, A. Touati, and J-M. Rolain.** 2016. Molecular characterisation of extended-spectrum beta-lactamase- and plasmid AmpC-

- producing *Escherichia coli* strains isolated from broilers in Bejaia, Algeria. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **6**:108–112.
33. **Ben Achour, N., P.S. Mercuri, M. Ben Moussa, M. Galleni, and O. Belhadj.** 2009. Characterization of a Novel Extended-Spectrum TEM-Type  $\beta$ -Lactamase, TEM-164, in a Clinical Strain of *Klebsiella pneumoniae* in Tunisia. *Microbial Drug Resistance.* **15**: 195-199.
34. **Ben Sallem, R., K. Ben Slama, Y. Sáenz, B. Rojo-Bezares, V. Estepa, A. Jouini, et al.** 2012. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and CMY-2 producing *Escherichia coli* isolates from healthy food-producing animals in Tunisia. *Foodborne Pathogens and Disease.* **9**: 1137-1142.
35. **Benharzallah, N.** 2016. Contribution à l'étude de la bio-écologie de la Cigogne blanche (*Ciconia ciconia*, Aves, *Ciconiidea*) dans le Constantinois. Thèse Doctorat, Uni. Batna 2.
36. **Benharzallah, N. A. Si Bachir, F. Taleb, and C. Barbraud.** 2015. Factors affecting growth parameters of White Stork nestlings in eastern Algeria. *J Ornithol.* **156**:601-612.
37. **Benharzallah, N. and A. Si-Bachir.** 2011. Effectifs et caractérisation des colonies et des sites du nid de la population de Cigognes blanches (*Ciconia ciconia*) lors de la saison de nidification 2010 dans la wilaya de constantine. In: *Actes du Séminaire International sur la Protection des végétaux*, 18-21 Avril 2011, Algiers, Algeria.
38. **Benskin, C.M.H., K. Wilson, K. Jones, and I.R. Hartley.** 2009. Bacterial pathogens in wild birds : a review of the frequency and effects of infection. *Biol Rev Camb Philos Soc.* **84**: 349-373.
39. **Berthold, P.** 2001. Bird migration: a general survey. Oxford University Press on Demand.
40. **Berthold, P., A. Aebischer, M. Kaatz, and U. Querner.** 2002. Erstnachweis der Wanderungen und Aufenthaltsgebiete eines Weißstorchs *Ciconia ciconia* vom Ausfliegen bis zum ersten Brüten mit Hilfe der Satelliten-Telemetrie. *Ornithol. Beob* **99**: 227-229. (En Allemand).
41. **Biber, O. P. Engigist, C. Marti, and T. Salathé (eds).** 1995. Proceeding of the International Symposium on the White Storck (Western population) Basel 1994.
42. **Blanc, V., V. Leflon-Guibout, J. Blanco, M. Haenni, J-Y. Madec, G. Raignon, et al.** 2014. Prevalence of day-care centre children (France) with faecal CTX-M-producing

- Escherichia coli* comprising O25b:H4 and O16:H5 ST131 strains. *J Antimicrob Chemother.* **69**: 1231-1237.
43. **Blanco, G., J.A. Lemus, J. Grande, L. Gangoso, J.M. Grande, J.A. Donazar, et al.** 2007. Geographical variation in cloacal microflora and bacterial antibiotic resistance in a threatened avian scavenger in relation to diet and livestock farming practices. *Environ. Microbiol.* **9**: 1738-1749.
44. **Boeckel, T.P. Van, C. Brower, M. Gilbert, B.T. Grenfell, S.A. Levin, T.P. Robinson, et al.** 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **112**: 5649–5654.
45. **Bogaerts, P., W. Bouchahrouf, R. Rezende, A. Deplano, C. Berhin, D. Piérard, et al.** 2011. Emergence of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in Belgium. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* **55**: 3036-8.
46. **Boman, H.G., K. Nordstrom, and S. Normark.** 1940. Penicillin resistance in *Escherichia coli* K12: Synergism between penicillinases and a barrier in the outer part of the envelope. *Annals of the New York Academy of Sciences.* **235**:569-586
47. **Bonacorsi, S., P. Mariani-kurkdjian, M. Desmarest, and C. Doit.** 2014. Les entérobactéries productrices de bêta- lactamase à spectre étendu en pédiatrie. *Arch. Pédiatrie.* **21**: 181-182.
48. **Bonnedahl, J., J. Hernandez, J. Stedt, J. Waldenstrom, B. Olsen, and M. Drobni.** 2014. Extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Gulls, Alaska, USA. *Emerg. Infect. Dis.* **20**: 897-899.
49. **Bonnedahl, J., J. Stedt, J. Waldenstrom, L. Svensson, M. Drobni, and B. Olsen.** 2015. Comparison of Extended-Spectrum beta-Lactamase (ESBL) CTX-M Genotypes in Franklin Gulls from Canada and Chile. *PLoS One.* **10**: e0141315.
50. **Bonnedahl, J., M. Drobni, M. Gauthier-clerc, J. Hernandez, S. Granholm, G. Kahlmeter, et al.** 2009. Dissemination of *Escherichia coli* with CTX-M Type ESBL between Humans and Yellow-Legged Gulls in the South of France. *PLoS One.* **4**: e5958.
51. **Bonnet, R.** 2004. Growing Group of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 1-14
52. **Borges, C.A., R.P. Maluta, L.G. Beraldo, M. V Cardozo, E.A.L. Guastalli, S. Kariyawasam, et al.** 2017. Captive and free-living urban pigeons (*Columba livia*) from Brazil as carriers of multidrug-resistant pathogenic *Escherichia coli*. *Vet. J.* **219**: 65-67.

53. **Boukhemza M., N. Boukhemza-Zemmouri, and J.F. Voisin.** 2007. Biologie et écologie de la reproduction de la Cigogne blanche *Ciconia ciconia* dans la vallée du Sébaou (Kabylie, Algérie). *Aves.* **44**: 213-222.
54. **Boukhtache, N., and A. Si Bachir.** 2010. Variation du régime alimentaire de la cigogne blanche *Ciconia ciconia* L. 1758 (*Aves, Ciconiidae*) dans deux localités de la région de Batna. In: *Actes du Séminaire International sur la Biodiversité Faunistique en Zones Arides et Semi-arides*, 22–24 November 2010, Ouargla, Algeria.
55. **Bouriach, M.** 2016. Ecologie de reproduction de la cigogne blanche (*Ciconia ciconia*) dans un milieu anthropisé, Dréan, nord-est d'Algérie. Thèse Doctorat, Univ 8 Mai 1945-Guelma.
56. **Bradford, P.A.** 2001. Extended-Spectrum  $\beta$  -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**: 933-951.
57. **Bradford, P.A., and C.R. Dean.** 2008. Resistance of Gram-Negative Bacilli to Antimicrobials. In *Antimicrobial Resistance and Implications for the 21st Century*. Springer Science and Business Media, New York, pp. 97-159.
58. **Bremer, H., and P.P. Dennis.** 1996. Modulation of Chemical Composition and Other Parameters of the Cell by Growth Rate. *Eco Sal Plus.* **2**: 1553-69.
59. **Bush, K., G.A. Jacoby, and A.A. Medeiros.** 1995. A Functional Classification Scheme for  $\beta$  -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. *Antimicrob Agents Chemother.* **39**: 1211-1233.
60. **Carattoli, A.** 2009. Resistance Plasmid Families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 2227-2238.
61. **CA-SFM.** 2013. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2013, v.1.0 Juin. Société Française de Microbiologie, Paris, France.
62. **CA-SFM.** 2016. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2016, v.1.0 Février. Société Française de Microbiologie, Paris, France.
63. **Cattoir, V.** 2008. Les nouvelles  $\beta$ - lactamases à spectre étendu (BLSE). *Pathologie infectieuse en réanimation.* 204-209
64. **Cattoir, V.** 2012. Quinolones : de l'antibiogramme aux phénotypes de résistance. *Revue Francophone Des Laboratoires.* **445**: 79-87.

65. Cavallo, J.D., R. Faber, F. Jehl, C. Rapp, and E. Grabbé. 2004. Bêtalactamines Beta-lactam antibiotics. *EMC-Maladies infectieuses*. **1**: 129-202.
66. Chattaway, M. A., C. Jenkins, H. Ciesielczuk, M. Day, V. DoNascimento, M. Day, et al. 2014. Evidence of evolving extraintestinal enteroaggregative *Escherichia coli* ST38 clone. *Emerging infectious diseases*. **20**:1935-1936.
67. Chenchouni, H., A. Si Bachir, and M. Alrashidi. 2015. Trophic niche and feeding strategy of the White Stork (*Ciconia ciconia*) during different phases of the breeding season. *Avian Biol Res*. **8**: 1-13.
68. Chernetsov, N. 2004. Migratory orientation of first-year white storks *Ciconia ciconia* : inherited information and social interactions. *Journal of Experimental Biology*. **207**: 937-943.
69. Chong, Y., Y. Ito, and T. Kamimura. 2011. Infection, genetics and evolution genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum b -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Genet. Evol.* **11**: 1499-1504.
70. Clatworthy, A.E., E. Pierson, and D.T. Hung. 2007. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature Chemical Biology*. **3**: 541-549.
71. Cojocel, C. 2008. Beta-lactam antibiotics. In *Clinical Nephrotoxins* (pp. 293-321). Springer, Boston, MA.
72. Cole, M.D. 2006. *The Analysis Of Drugs Of Abuse: An Instruction Manual: An Instruction Manual*. CRC Press.
73. Coque, T. M., F. Baquero and R. Canton. 2008. Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Eurosurveillance*. **13** :19044.
74. Costa, D., P. Poeta, Y. Saenz, L. Vinue, B. Rojo-Bezares, A. Jouini, et al. 2006. Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**: 1311-1312.
75. Costa, V.D., and G.D. Wright. 2009. Biochemical Logic of Antibiotic Inactivation and Modification. In *Antimicrobial Drug Resistance: Mechanisms of Drug Resistance*. In *Antimicrobial drug resistance* (pp. 81-95). Humana Press.
76. Courcol, R. 2009. Quelles utilisations de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF en microbiologie médicale?. *Revue Francophone Des Laboratoires*. **2009**: 61-64.
77. Courvalin, P., and P. Trieu-cuot. 2001. Minimizing Potential Resistance: The Molecular View. *Clinical Infectious Diseases*. **33**: S138-46

78. **Cuisin, M.** 2005. Les cigognes. 1<sup>st</sup> ed. Artemis.
79. **Cuzon, G., T. Naas, and P. Nordmann.** 2010. Carbapénèmases de type KPC : quel enjeu en microbiologie clinique ?. *Pathol. Biol.* **58**: 39-45.
80. **Dahab, R. A., A.M. Ibrahim, and H. N. Altayb.** 2017. Phenotypic and genotypic detection of carbapenemase enzymes producing gram-negative bacilli isolated from patients in Khartoum State. *F1000Research.* **6**.
81. **Davies, J. and Davies, D.** 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and molecular biology reviews.* **74**: 417-433.
82. **Davin-regli, A., and J. Pagès.** 2015. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* ; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Front Microbiol.* **6**: 392.
83. **Dedet, J.** 2007. La microbiologie, de ses origines aux maladies émergentes. Dunod.
84. **Delgado-valverde, M.** 2013. Clinical management of infections caused by multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Therapeutic Advances in Infectious Disease.* **1**: 49-69.
85. **Dellaras, C.** 2010. Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux.
86. **Denis, F.** 2007. Bactériologie médicale: Techniques usuelles. Edition Masson.
87. **Diab, M., M. Hamze, J.Y. Madec and M. Haenni.** 2017. High prevalence of non-ST131 CTX-M-15-producing *Escherichia coli* in healthy cattle in Lebanon. *Microbial Drug Resistance.* **23**: 261-266.
88. **Dierikx, C. M., J. A. van der Goot, H. E. Smith, A. Kant and D. J Mevius.** 2013. Presence of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in the broiler production pyramid: a descriptive study. *PloS one.* **8**: e79005.
89. **Dimou, V., H. Dhanji, R. Pike, D.M. Livermore, and N. Woodford.** 2012. Characterization of *Enterobacteriaceae* producing OXA-48-like carbapenemases in the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**:1660-1665.
90. **Djahmi, N., C. Dunyach-Remy, A. Pantel, M. Dekhil, A. Sotto, and J.-P. Lavigne.** 2014. Epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean countries. *Biomed Res. Int.* **2014**: 305784.
91. **Djamdjian, L. T. Naas, D. Cuzon, G., Hanrotel-Saliou, and P. Nordmann.** 2011. CTX-M93, a CTX-M-variant lacking penicillin hydrolytic activity. *Antimicrobial agents and Chemotherapy.*
92. **Djeddou, N., N. Bada, H. Chenchouni, and A. Si Bachir.** 2007. Données sur la biologie de la reproduction et les besoins alimentaires de la Cigogne blanche *Ciconia*

- ciconia* en période de nidification dans la colonie d'El Madher (Batna, Algérie). *Acte des Journées Internationales sur la Zoologie Agricole et Forestière Institut National Agronomique, El Harrach, Alger.* 266-274.
93. **Djerdali, S.** 2013. Effet de la taille du nid sur la reproduction chez la Cigogne blanche (*Ciconia ciconia*) à Setif (Algérie). *Travaux de l'Institut Scientifique, Rabat. Série Zoologie.* **49**: 87-91.
94. **Dobiasova, H., M. Dolejska, I. Jamborova, E. Brhelova, L. Blazkova, I. Papousek, et al.** 2013. Extended spectrum beta-lactamase and fluoroquinolone resistance genes and plasmids among *Escherichia coli* isolates from zoo animals, Czech Republic. *FEMS Microbiol. Ecol.* **85**: 604-611.
95. **Dobrindt, U.** 2005. (Patho-) Genomics of *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol.* **295**:357-371.
96. **Dolejska, M., B. Bierosova, L. Kohoutova, I. Literak, and A. Cizek.** 2009. Antibiotic-resistant *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates with integrons and extended-spectrum beta-lactamases in surface water and sympatric black-headed gulls. *J. Appl. Microbiol.* **106**: 1941-1950.
97. **Dolejska, M., M. Masarikova, H. Dobiasova, I. Jamborova, R. Karpiskova, M. Havlicek, et al.** 2016. High prevalence of *Salmonella* and IMP-4-producing *Enterobacteriaceae* in the silver gull on Five Islands, Australia. *J. Antimicrob. Chemother.* **71**:63-70.
98. **Ebrahimi, F., J. Mózes, J. Mészáros, Á. Juhász, L. Majoros, K. Szarka et al.** 2016. Asymptomatic faecal carriage of ESBL producing *Enterobacteriaceae* in Hungarian healthy individuals and in long-term care applicants: A shift towards CTX-M producers in the community. *Infectious Diseases.* **48**: 557-559.
99. **Edelstein, M., M. Pimkin, I. Palagin, I. Edelstein, and L. Stratchounski.** 2003. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* **47**: 3724-3732.
100. **Eisner, A., E.J. Fagan, G. Feierl, H. H. Kessler, E. Marth, D. M. Livermore, et al.** 2006. Emergence of *Enterobacteriaceae* isolates producing CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in Austria. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* **50**: 785-787.

101. **El-Aziz, N. A., and A. A. Gharib.** 2015. Coexistence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and AmpC-Beta-Lactamases in *Escherichia coli* strains in Egypt. *Cellular and Molecular Biology.* **61**: 29-35.
102. **El-gamal, M.I., I. Brahim, N. Hisham, R. Aladdin, H. Mohammed, and A. Bahaaeldin.** 2017. European Journal of Medicinal Chemistry Recent updates of carbapenem antibiotics. *Eur. J. Med. Chem.* **131**: 185-195.
103. **Erb, A., T. Stürmer, R. Marre, and H. Brenner.** 2007. Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: overview of geographical, temporal, and methodological variations. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.* **26**: 83-90.
104. **Escherich, T.** 1985. Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. *Fortschritte der Medicin.* **16**: 515-522
105. **Ewers, C., A. Bethe, T. Semmler, S. Guenther and L. H. Wieler.** 2012. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clinical Microbiology and Infection.* **18**:646-655.
106. **Ferjani, S., M. Saidani, Z. Hamzaoui, C. A. Alonso, C. Torres, E. Maamar, et al.** 2017. Community fecal carriage of broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in Tunisian children. *Diagnostic microbiology and infectious disease.* **87**: 188-192.
107. **Finche R.G., D. Greenwood, R. J. Whitley., and S. R. Norrby.** 2010. Antibiotic Chemotherapy *e-book.* Elsevier Health Sciences.
108. **Fischer, J., S. Schmoger, S. Jahn, R. Helmuth, and B. Guerra.** 2013. NDM-1 carbapenemase-producing *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *corvallis* isolated from a wild bird in Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**: 2954-2956.
109. **Foti, M., D. Rinaldo, A. Guercio, C. Giacobello, A. Aleo, F. De Leo, et al.** 2011. Pathogenic microorganisms carried by migratory birds passing through the territory of the island of Ustica, Sicily (Italy). *Avian pathology : journal of the W.V.P.A.* **40**:405-409.
110. **Freire Martin, I., M. AbuOun, R. Reichel, R.M. La Ragione, and M.J. Woodward.** 2014. Sequence analysis of a CTX-M-1 IncII plasmid found in *Salmonella* 4,5,12:i:-, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* on a UK pig farm. *J. Antimicrob. Chemother.* **69**: 2098-2101.
111. **Friedmann, H. C.** 2006. Escherich and Escherichia. *Advances in applied microbiology.* **60**: 133-196.

112. **Gallagher, J.C., and C. MacDougall.** 2011. *Antibiotics Simplified*. Jones and Bartlett Learning.
113. **Galler, H., G. Feierl, C. Petternel, F.F. Reinthaler, D. Haas, A.J. Grisold, et al.** 2014. KPC-2 and OXA-48 carbapenemase-harboured *Enterobacteriaceae* detected in an Austrian wastewater treatment plant. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**: O132-4.
114. **Girlich, D., N. Bouihat, L. Poirel, A. Benouda, and P. Nordmann.** 2014. High rate of faecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and OXA-48 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* at a University hospital in Morocco. *Clinical Microbiology and Infection.* **20**: 350-354.
115. **Glupczynski, Y., T.-D. Huang, W. Bouchahrouf, R. Rezende de Castro, C. Bauraing, et al.** 2012. Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates in Belgian hospitals. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **39**: 168-172.
116. **Gregova, G., M. Kmetova, V. Kmet, J. Venglovsky, and A. Feher.** 2012. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from a poultry slaughterhouse. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine.* **19**: 75-77.
117. **Grisold, A.J., M. Hoenigl, I. Ovcina, T. Valentin, and S. Fruhwald.** 2013. Ventilator-associated pneumonia caused by OXA-48-producing *Escherichia coli* complicated by ciprofloxacin-associated rhabdomyolysis. *Journal of Infection and Chemotherapy.* **19**: 1214-1217.
118. **Gualerzi, C.O., L. Brandi, A. Fabbretti, and C., L. Pon.** 2013. *Targets, mechanisms and resistance*. John Wiley and Sons,
119. **Guardabassi, L., and P. Courvalin.** 2006. Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. In *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin* (pp. 1-18). American Society of Microbiology.
120. **Guardabassi, L., S. Schwarz, and D.H. Lloyd.** 2004. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* **54**: 321-332.
121. **Guenther, S., A. Bethe, A. Fruth, T. Semmler, R.G. Ulrich, L.H. Wieler, et al.** 2012. Frequent combination of antimicrobial multiresistance and extraintestinal pathogenicity in *Escherichia coli* isolates from urban rats (*Rattus norvegicus*) in Berlin, Germany. *PLoS One* **7**: e50331.
122. **Guenther, S., C. Ewers, and L.H. Wieler.** 2011. Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution? **2**: 1-13.

123. **Guenther, S., T. Semmler, A. Stubbe, M. Stubbe, L.H. Wieler, and K. Schaufler.** 2017. Chromosomally encoded ESBL genes in *Escherichia coli* of ST38 from Mongolian wild birds. *J. Antimicrob. Chemother.* **72**: 1310-1313.
124. **Guerra, B., J. Fischer, and R. Helmuth.** 2014. An emerging public health problem: acquired carbapenemase-producing microorganisms are present in food-producing animals, their environment, companion animals and wild birds. *Vet. Microbiol.* **171**: 290-297.
125. **Gülmez, D., N. Woodford, M.I. Palepou, S. Mushtaq, G. Metan, Y. Yakupogullari, et al.** 2008. Isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. *International journal of antimicrobial agents.* **31**: 523-526.
126. **Gupta, S.K., B.R. Padmanabhan, S.M. Diene, R. Lopez-Rojas, M. Kempf, L. Landraud, and J-M. Rolain.** 2014. ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**: 212-220.
127. **Hammoudi, D., C. A. Moubareck, J. Aires, A. Adaime, A. Barakat and N. Fayad.** 2014. International Journal of Infectious Diseases Countrywide spread of OXA-48 carbapenemase in Lebanon : surveillance and genetic characterization of carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in 10 hospitals over a one-year period. *International Journal of Infectious Diseases.* **29**: 139-144.
128. **Harris, P.N.A.** 2015. Clinical Management of Infections Caused by *Enterobacteriaceae* that Express Extended- Spectrum  $\beta$  -Lactamase and AmpC Enzymes. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine.* **36**: 56-73.
129. **Hasan, B., and J.D. Jarhult.** 2015. Absence of vancomycin-resistant enterococci among highly ESBL-positive crows (*Corvus splendens*) foraging on hospital waste in Bangladesh. *Infect. Ecol. Epidemiol.* **5**: 29761.
130. **Hasan, B., B. Olsen, A. Alam, L. Akter, and A. Melhus.** 2015. Dissemination of the multidrug-resistant extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* O25b-ST131 clone and the role of house crow (*Corvus splendens*) foraging on hospital waste in Bangladesh. *Clin. Microbiol. Infect.* **21**: 1000.e1-4.
131. **Hassan, S.A., and M.Y. Shobrak.** 2015. Detection of genes mediating beta-lactamase production in isolates of enterobacteria recovered from wild pets in Saudi Arabia. *Vet. World* **8**: 1400-1404.

132. **Heinzel H., R. Fitter, and J. Parslow.** 1995. Guide Heinzel des oiseaux d'Europe, d'Afrique du Nord et du Moyen-Orient. Delachaux et Niestlé.
133. **Hernandez, J., A. Johansson, J. Stedt, S. Bengtsson, A. Porczak, S. Granholm, et al.** 2013. Characterization and Comparison of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL) Resistance Genotypes and Population Structure of *Escherichia coli* Isolated from Franklin's Gulls (*Leucophaeus pipixcan*) and Humans in Chile. *PLoS One*. **8**: 1-9.
134. **Hessman, J., C. Atterby, B. Olsen, J.D. Jarhult.** 2018. High Prevalence and Temporal Variation of Extended Spectrum beta-Lactamase-Producing Bacteria in Urban Swedish Mallards. *Microbial drug resistance*. **24**: 822-829.
135. **Horton, R.A., L.P. Randall, E.L. Snary, H. Cockrem, S. Lotz, H. Wearing, et al.** 2011. Fecal carriage and shedding density of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in cattle, chickens, and pigs: implications for environmental contamination and food production. *Applied and environmental microbiology*. **77**: 3715-3719.
136. **Huemer, H.P., A. Eigentler, R. Aschbacher, and C. Larcher.** 2011. Dominance of CTX-M group 1 beta-lactamase enzymes in ESBL producing *E. coli* from outpatient urines in neighboring regions of Austria and Italy. *Wiener Klinische Wochenschrift*. **123**: 41-44.
137. **Hunter, J.E. B., J.E. Corkill, J.N. Fitcher, and C.A. Hart.** 1993. Plasmid encoded  $\beta$ -lactamases resistant to inhibition by clavulanic acid produced by calf faecal coliforms. *Research in Veterinary Science*. **55**: 367-370
138. **Hupkova, M., J. Blahova, M. Babalova, V. Krčméry, and K. Kralikova.** 1995. Transferable resistance to cefotaxime in nosocomial *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains due to their production of extended-spectrum beta-lactamase in Slovakia. *Journal of chemotherapy*. **7**: 16-20.
139. **Husickova, V., L. Cekanova, M. Chroma, M. Htoutou-Sedlakova, K. Hricova, and M. Kolar.** 2012. Carriage of ESBL-and AmpC-positive *Enterobacteriaceae* in the gastrointestinal tract of community subjects and hospitalized patients in the Czech Republic. *Biomedical Papers*. **156**: 348-353.
140. **Iabadene, H., Y. Messai, H. Ammari, S. Alouache, C. Verdet, R. Bakour, et al.** 2009. International Journal of Antimicrobial Agents Prevalence of plasmid-mediated AmpC  $\beta$  -lactamases among *Enterobacteriaceae* in Algiers hospitals. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **34**:340-342.

141. **Ibrahim, A.S. and N. Youssef.** 2015. Prevalence of CTX-M, TEM and SHV beta-lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Aleppo University Hospitals, Aleppo, Syria. *Archives of Clinical Infectious Diseases.* **10**.
142. **Jacoby, G.A.** 2009. AmpC  $\beta$ -Lactamases. *Clinical microbiology reviews.* **22**: 161-182.
143. **Jamborova, I., M. Dolejska, J. Vojtech, S. Guenther, R. Uricariu, J. Drozdowska, et al.** 2015. Plasmid-mediated resistance to cephalosporins and fluoroquinolones in various *Escherichia coli* sequence types isolated from rooks wintering in Europe. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**: 648-657.
144. **Jamborova, I., M. Dolejska, J. Vojtech, S. Guenther, R. Uricariu, J. Drozdowska, et al.** 2015. Plasmid-mediated resistance to cephalosporins and fluoroquinolones in various *Escherichia coli* sequence types isolated from rooks wintering in Europe. *Applied and environmental microbiology.* **81**: 648-657.
145. **Jones, C.H., M. Tuckman, D. Keeney, A. Ruzin and P.A. Bradford.** 2009. Characterization and sequence analysis of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-encoding genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates collected during tigecycline phase 3 clinical trials. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* **53**: 465-475.
146. **Jones-Dias, D., V. Manageiro, A.P. Martins, E. Ferreira, and M. Canica.** 2016. New Class 2 Integron In2-4 Among IncI1-Positive *Escherichia coli* Isolates Carrying ESBL and PMA $\beta$  genes from food animals in Portugal. *Foodborne Pathog. Dis.* **13**: 36-39.
147. **Kaase, M., S. Schimanski, R. Schiller, B. Beyreiss, A. Thurmer, J. Steinmann, et al.** 2016. Multicentre investigation of carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in German hospitals. *Int. J. Med. Microbiol.* **306**: 415-420.
148. **Kahl M. P.** 1972. Comparative Ethology of the Ciconiidae. Part 4. The "Typical" Storks (Genera *Ciconia*, *Sphenorhynchus*, *Dissoura*, and *Euxenura*). *Zeitschrift für Tierpsychologie*, **30**: 225-252.
149. **Katzung, B., S. Masters and A. Trevor.** 2009. *Basic and Clinical Pharmacology* (pp. 753-756). New York, NY: McGraw-Hill.
150. **Kaur, J., S. Sheevani Chopra, and G. Mahajan.** 2013. Modified double disc synergy test to detect ESBL production in urinary isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* **7**: 229-233.

151. **Kaur, J., G. Mahajan, K. Chand, S. Sheevani Chopra.** 2016. Enhancing Phenotypic Detection of ESBL in AmpC co-producers by using Cefepime and Tazobactam. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR.* **10:** DC05-8.
152. **Kestenholtz M., O. Biber, P. Enggist and T. Salathé.** 2010: Plan d'action Cigogne blanche Suisse. Programme de conservation des oiseaux en Suisse. Office fédéral de l'environnement (OFEV), Station ornithologique suisse, Association suisse pour la protection des oiseaux ASPO/BirdLife Suisse, Cigogne Suisse, Berne, Sempach, Zurich, Kleindietwil. Kleindietwil. L'environnement pratique n° **1029:** 62 p.
153. **Kimura, M.** 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16:** 111-120.
154. **Kirby, W. M.** 1944. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science.* **99:** 452-453.
155. **Kohanski, M.A., D.J. Dwyer, and J.J. Collins.** 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat. Publ. Gr.* **8:**423-435.
156. **Kumar, A., and H. P. Schweizer.** 2005. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews.* **57:**1486-1513.
157. **Kuziemski, A., K. Frankowska, E.Gonia, B. Czerniak, O. Bakhuryńska and Z. Sobociński.** 2015. In bydgoszcz in 2009-2013. *Przegląd Epidemiologiczny.* **69:** 523-528.
158. **Lahlaoui, H., and M. Ben Moussa.** 2011. CTX-M-14 type beta-Lactamase producing *Escherichia coli* isolated from hospitalized patients in Tunisia. *APMIS.* **119:** 759-761.
159. **Lambert, P.A.** 2005. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews.* **57:** 1471-1485.
160. **Laube, H., A. Friese, C. Von Salviati, B. Guerra, A. Käsbohrer, L. Kreienbrock, et al.** 2013. Longitudinal monitoring of extended-spectrum-beta-lactamase/AmpC-producing *Escherichia coli* at German broiler chicken fattening farms. *Applied and environmental microbiology.* **79:** 4815-4820.
161. **Lavigne, J., A. Sotto, C. Merle, J. Jourdan, C. Soussy, and D. Sirot.** 2002. Résistance enzymatique d'*Escherichia coli* aux bêtalactamines et prévalence en clinique. *Pathol Biol.* **50:** 388-393.
162. **Lee, K., C.K. Kim, D. Yong, S.H. Jeong, J. H. Yum, Y. H. Seo, et al.** 2010. Improved performance of the modified Hodge test with MacConkey agar for screening

- carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. *Journal of microbiological methods*. *Journal of microbiological methods*. **83**: 149-152.
163. **Li, S., M. Zhao, J. Liu, and Y. Zhou.** 2016. Prevalence and Antibiotic Resistance Profiles of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase – Producing *Escherichia coli* Isolated from Healthy Broilers in Shandong Province, China. **79**: 1169-1173.
164. **Li, X., M. Mehrotra, S. Ghimire, and L. Adewoye.** 2007.  $\beta$ -Lactam resistance and  $\beta$ -lactamases in bacteria of animal origin. *Veterinary Microbiology*. **121**: 197-214.
165. **Liakopoulos, A., D. Mevius, and D. Ceccarelli.** 2016. A Review of SHV Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases : Neglected Yet Ubiquitous. *Frontiers in Microbiology*. **7**: 1-27
166. **Liakopoulos, A., D.J. Mevius, and J. Bonnedahl.** The colistin resistance *mcr-1* gene is going wild. *J Antimicrob Chemother*. **71**:2335-2336.
167. **Lim, J.S., D.S. Choi, Y.J. Kim, J.W. Chon, H.S. Kim, H.J. Park, et al.** 2015. Characterization of *Escherichia coli*–Producing Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL) Isolated from Chicken Slaughterhouses in South Korea. *Foodborne pathogens and disease*. **12**: 741-748.
168. **Literak, I., M. Dolejska, D. Janoszowska, J. Hrusakova, W. Meissner, H. Rzycka, et al.** 2010. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria, including strains with genes encoding the extended-spectrum beta-lactamase and QnrS, in waterbirds on the Baltic Sea Coast of Poland. *Appl Env. Microbiol*. **76**: 8126-8134.
169. **Loncaric, I., G.L. Stalder, K. Mehinagic, R. Rosengarten, F. Hoelzl, F. Knauer, et al.** 2013. Comparison of ESBL--and AmpC producing *Enterobacteriaceae* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from migratory and resident population of rooks (*Corvus frugilegus*) in Austria. *PLoS One*. **8**: e84048.
170. **Loucif, L., D. Gacemi-Kirane, Z. Cherak, N. Chamlal, N. Grainat, and J-M. Rolain.** 2016. First report of German cockroaches (*Blattella germanica*) as reservoirs of CTX-M-15 extended-spectrum-beta-lactamase- and OXA-48 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Batna University Hospital, Algeria. *Antimicrob. Agents Chemother*. **60**: 6377-6380.
171. **Lupo, A., K.M. Papp-wallace, P. Sendi, R.A. Bonomo, and A. Endimiani.** 2013. Non-phenotypic tests to detect and characterize antibiotic resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. **77**: 179-194.
172. **Maciuca, I.E., N.J. Williams, C. Tuchilus, O. Dorneanu, E. Guguianu, C. Carp-Carare, et al.** 2015. High prevalence of *Escherichia coli*-producing CTX-M-15

- extended-spectrum beta-lactamases in poultry and human clinical isolates in Romania. *Microbial Drug Resistance*. **21**: 651-662.
173. **Mairi, A., A. Pantel, A. Sotto, J. P. Lavigne and A. Touati**. 2017. OXA-48-like carbapenemases producing *Enterobacteriaceae* in different niches. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 1-18.
174. **Malkinson, M., C. Banet, Y. Weisman, S. Pokamunski, R. King, M-T. Drouet, et al.** 2002. Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 392-397.
175. **Manageiro, V., E. Ferreira, M. Pinto, and M. Canica**. 2014. First description of OXA-48 carbapenemase harbored by *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* from a single patient in Portugal. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**: 7613-7614.
176. **Marquez, B.** 2005. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. *Biochimie*. **87**: 1137-1147.
177. **Martinez, J-L.** 2012. Antibiotics and Antibiotic Resistance Ecological Role for Antibiotics. *Science*. **321**: 365-367
178. **Mathlouthi, N., C. Al-Bayssari, S. Bakour, J. M. Rolain and C. Chouchani**. 2017. RETRACTED ARTICLE: Prevalence and emergence of carbapenemases-producing Gram-negative bacteria in Mediterranean basin. *Critical reviews in microbiology*. **43**: 43-61.
179. **Mathys, D.A., B.A. Mathys, D.F. Mollenkopf, J.B. Daniels, and T.E. Wittum**. 2017. *Enterobacteriaceae* Harboring AmpC (*bla<sub>CMY</sub>*) and ESBL (*bla<sub>CTX-M</sub>*) in Migratory and Nonmigratory Wild Songbird Populations on Ohio Dairies. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. **17**: 254-259.
180. **Matias, C.A.R., I.A. Pereira, E.M.F. Dos Reis, D.D.P. Rodrigues, and S. Siciliano**. 2016. Frequency of zoonotic bacteria among illegally traded wild birds in Rio de Janeiro. *Braz. J. Microbiol.* **47**: 882-888.
181. **Matsumoto, Y. O. S. H. I. M. I., F. U. M. I. A. K. I. Ikeda, T. O. S. H. I. A. K. I. Kamimura, Y. O. S. H. I. K. O. Yokota, and Y. A. S. U. H. I. R. O Mine**. 1988. Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **32**: 1243-1246.
182. **Meguenni, N., L. Le Devendec, E. Jouy, S. Bounar-Kechih, R. Bakour, and I. Kempf**. 2012. Caractérisation moléculaire de souches d'*Escherichia coli* aviaires

- productrices de BLSE isolées de la région Centre d'Algérie. In: 32<sup>e</sup>me Réunion Interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse.
183. **Mellouk, F. Z., S. Bakour, S. Meradji, C. Al-Bayssari, M. C . Bentakouk, F. Zouyed, et al.** 2017. First detection of VIM-4-producing *Pseudomonas aeruginosa* and OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in Northeastern (Annaba, Skikda) Algeria. *Microbial Drug Resistance*. **23**: 335-344.
184. **Mellouk, F.Z., S. Bakour, S. Meradji, C. Al-Bayssari, M.C. Bentakouk, F. Zouyed, et al.** 2017. First Detection of VIM-4-Producing *Pseudomonas aeruginosa* and OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* in North eastern (Annaba, Skikda) Algeria. *Microb. Drug Resist.* **23**: 335-344.
185. **Melo, L.C., M. N. Boisson, E. Saras, C. Médaille, H. J. Boulouis, J. Y. Madec, et al.** 2017. OXA-48-producing ST372 *Escherichia coli* in a French dog. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **72**: 1256-1258.
186. **Meredith, H.R.** 2015. Dynamics and intervention. *Nature Chemical Biology*. **11**: 182-189.
187. **Mesaros, N.F. Van. Bambeke, L. Avrain, Y. Glupczynski, R. Vanhoof, P. Plesiat, et al.** 2005. L'efflux actif des antibiotiques et la résistance bactérienne: état de la question et implications. La lettre de l'infectiologue-Tome XX-n° 4:117-126
188. **Messai, Y., T. Benhassine, M. Naim, G. Paul, and R. Bakour.** 2006. Original Prevalence of  $\beta$  -lactams resistance among *Escherichia coli* clinical isolates from a hospital in Algiers. *Rev Esp Quimioterap.* **19**: 144-151.
189. **Micenková, L., P. Šišková, J. Bosák, I. Jamborová, L. Černožorská, and D. Šmajš.** 2014. Characterization of human uropathogenic ESBL-producing *Escherichia coli* in the Czech Republic: spread of CTX-M-27-producing strains in a university hospital. *Microbial Drug Resistance*. **20**: 610-617.
190. **Michalopoulos, A., D. Fotakis, S. Vartzili, C. Vletsas, S. Raftopoulou, Z. Mastora, et al.** 2008. Aerosolized colistin as adjunctive treatment of ventilator-associated pneumonia due to multidrug-resistant Gram-negative bacteria : A prospective study. *Respiratory Medicine*. **102**: 407-412.
191. **Mischnik, A., P. Baumert, A. Hamprecht, A. Rohde, S. Peter, Feihl, S, et al.** 2017. Susceptibility to cephalosporin combinations and aztreonam/avibactam among third-generation cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* recovered on hospital admission. *International journal of antimicrobial agents*. **49**:239-242.

192. **Moali-Grine, N. L. Moali, and A. Moali.** 2013. Distribution et écologie de la reproduction de la Cigogne blanche *Ciconia ciconia* en Algérie. *Revue d'écologie*. **68**: 59-69.
193. **Moquet, O., C. Bouchiat, A. Kinana, A. Seck, O. Arouna, R. Bercion, et al.** 2011. Class D OXA-48 carbapenemase in multidrug-resistant enterobacteria, Senegal. *Emerg. Infect. Dis.* **17**: 143-144.
194. **Moulin, G., and J-P. Orand.** 2013. Antibiorésistance : quelle stratégie pour l'ANMV à trois ans ? *Les cahiers de la Recherche. Santé, Environnement, Travail, ANSES. Les multirésistances.*
195. **Muller, A., R. Stephan, and M. Nuesch-Inderbinen.** 2016. Distribution of virulence factors in ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from the environment, livestock, food and humans. *Sci. Total Environ.* **541**: 667-672.
196. **Münch, J., R. M. Hagen, M. Müller, V. Kellert, D. F. Wiemer, R. Hinz, et al.** 2017. Colonization with multidrug-resistant bacteria on the efficiency of local decolonization procedures. *European Journal of Microbiology and Immunology.* **7**: 99-111.
197. **Muthupandian, S., R. Balajee, and H. Barabadi.** 2017. The prevalence and drug resistance pattern of extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) producing *Enterobacteriaceae* in Africa. *Microbial pathogenesis.*
198. **Muylaert, A., and J.G. Mainil.** 2012. Résistances bactériennes aux antibiotiques : les mécanismes et leur « contagiosité ». *Ann. Méd. Vét.* **156**: 109-123.
199. **Narver, H.L.** 2017. Antimicrobial Stewardship in Laboratory Animal Facilities. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS.* **56**: 6-10.
200. **Nauceil C., and J.L Vildé.** 2005. Bactériologie médicale. Elsevier Masson.
201. **Negro, J. J., and J. Garrido-Fernandez.** 2000. Astaxanthin is the major carotenoid in tissues of white storks (*Ciconia ciconia*) feeding on introduced cray fish (*Procambarus clarkii*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology.* **126** :347-352.
202. **Nevoux, M. J.C. Barbraud, and C. Barbraud.** 2008. Nonlinear impact of climate on survival in a migratory white stork population. *Journal of Animal Ecology.* **77**: 1143-1152.
203. **Niumsup, P.R., U. Tansawai, A. Na-Udom, D. Jantapalaboon, K. Assawatheptawee, A. Kiddee, et al.** 2017. Prevalence and risk factors for intestinal

- carriage of CTX-M-type ESBLs in *Enterobacteriaceae* from a Thai community. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. **37**: 69-75.
204. **Nordmann, P.** 1998. Trends in b-Lactam Resistance Among *Enterobacteriaceae*. *Clinical Infectious Diseases*. **27**: 100-106.
205. **Nordmann, P., and A. Carrer.** 2010. Les carbapénèmases des entérobactéries Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Arch. Pédiatrie*. **17**: S154–S162.
206. **Nordmann, P., E. Rondinaud, and L. Poirel.** 2013. A mosaic transposon encoding OXA-48 and CTX-M-15: towards pan-resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **68**: 476-477.
207. **Nordmann, P., L. Dortet, and L. Poirel.** 2012. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! *Trends Mol. Med.* **18**: 263-272.
208. **Nordmann, P., L. Dortet, and L. Poirel.** 2013. Multirésistance aux antibiotiques : l'émergence des entérobactéries productrices de carbapénèmases. *Revue Francophone des Laboratoires*. **449**: 35-37.
209. **Nordmann, P., T. Naas, and L. Poirel.** 2011. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg. Infect. Dis.* **17**: 1791-1798.
210. **Ojo, O.E., S. Schwarz, and G.B. Michael.** 2016. Detection and characterization of extended-spectrum b-lactamase-producing *Escherichia coli* from chicken production chains in Nigeria. *Veterinary Microbiology*. **194**: 62-68.
211. **Oteo, J., A. Mencía, V. Bautista, N. Pastor, N. Lara, F. González-González, et al.** 2018. Colonization with *Enterobacteriaceae*-Producing ESBLs, AmpCs, and OXA-48 in Wild Avian Species, Spain 2015–2016. *Microbial Drug Resistance*.
212. **Oteo, J., K. Diestra, C. Juan, V. Bautista, A. Novais, M. Perez-Vazquez, et al.** 2009. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Spain belong to a large variety of multilocus sequence typing types, including ST10 complex/A, ST23 complex/A and ST131/B2. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **34**: 173-176.
213. **Padmini, N., A.A.K. Ajilda, N. Sivakumar, and G. Selvakumar.** 2017. Extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: critical tools for antibiotic resistance pattern. *J. Basic Microbiol.* **57**: 460-470.
214. **Paitan, Y.** 2018. Current Trends in Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli*.
215. **Paltansing, S., J.A. Vlot, M.E.M. Kraakman, R. Mesman, M.L. Bruijning, A.T. Bernards, et al.** 2013. Extended-spectrum beta-lactamase-producing

- Enterobacteriaceae* among travelers from the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* **19**:1206-1213.
216. **Parker, D., M.K. Sniatynski, D. Mandrusiak, and J.E. Rubin.** 2016. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* isolated from wild birds in Saskatoon, Canada. *Applied Microbiology.* **63**: 11-15.
217. **Paterson, D.L., and R.A. Bonomo.** 2005. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases : a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews.* **18**: 657-686.
218. **Patridge, S. R., and R. M. Hall.** 2005. Evolution of Transposons Containing *bla*<sub>TEM</sub> Genes Over. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 1267-1268
219. **Payne, D.J., N. Woodford, and S.G.B. Amyes.** 1992. Characterization of the plasmid mediated  $\beta$ -lactamase BIL-1. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* **30**: 119-127.
220. **Pfeifer, Y. A. Trifonova, M. Pietsch, M. Brunner, I. Todorova, I. Gergova, et al.** 2017. Clonal Transmission of Gram-Negative Bacteria with Carbapenemases NDM-1, VIM-1, and OXA-23/72 in a Bulgarian Hospital. *Microbial Drug Resistance.* **23**: 301-307.
221. **Philippon, A.** 2013. Les beta-lactamases à spectre élargi ou étendu (BLSE). *Immuno-Analyse Biol. Spec.* **28**: 287-296.
222. **Philippon, A., and G. Arlet.** 2006.  $\beta$ -Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel !. *Ann Biol Clin.* **64**: 37-51.
223. **Philippon, A., G. Arlet, and G.A. Jacoby.** 2002. Plasmid-Determined AmpC-Type  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**: 1-11.
224. **Pitou, J.D.** 2012. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: an update on antimicrobial resistance, laboratory diagnosis and treatment. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **10**: 1165-1176.
225. **Pittsburgh, P.** 2003. What Is an Antibiotic? Revisited. *Advances In Applied Microbiology.* **52**:303-331.
226. **Ploy, M., A. Gassama, D. Chainier, and F. Denis.** 2005. Les intégrons en tant que support génétique de résistance aux antibiotiques Intégrons : an antibiotic resistance gene capture system. *Immuno-analyse et Biologie spécialisée.* **20**: 343-352.
227. **Poeta, P., H. Radhouani, G. Igrejas, A. Goncalves, C. Carvalho, J. Rodrigues, et al.** 2008. Seagulls of the Berlengas natural reserve of Portugal as carriers of fecal *Escherichia coli* harboring CTX-M and TEM extended-spectrum beta-lactamases. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 7439-7441.

228. **Poirel, L., A. Potron, C. De La Cuesta, T. Cleary, P. Nordmann, and L.S. Munoz-Price.** 2012a. Wild coastline birds as reservoirs of broad-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Miami Beach, Florida. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**: 2756-2758.
229. **Poirel, L., C. Heritier, V. Tolun, and P. Nordmann.** 2004. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 15-22.
230. **Poirel, L., M.O. Abdelaziz, S. Bernabeu, and P. Nordmann.** 2013. Occurrence of OXA-48 and VIM-1 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Egypt. *Int. J. Antimicrob. Agents* **41**: 90-91.
231. **Poirel, L., R.A. Bonnin, and P. Nordmann.** 2012b. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* **56**: 559-562.
232. **Poirel, L., S. Bernabeu, N. Fortineau, I. Podglajen, C. Lawrence, and P. Nordmann.** 2011. Emergence of OXA-48-producing *Escherichia coli* clone ST38 in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**: 4937-4938.
233. **Potron, A., L. Poirel, E. Rondinaud, and P. Nordmann.** 2013. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing Genetic Features of the Widespread Plasmid Coding for the Carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Enterobacteriaceae* over a 11-year period, 2001 to 2011. *Eurosurveillance.* **18**: 20549.
234. **Potron, A., P. Nordmann, E. Rondinaud, F. Jaureguy, and L. Poirel.** 2013. A mosaic transposon encoding OXA-48 and CTX-M-15: towards pan-resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**: 476-477.
235. **Potter, R.F., A.W.D. Souza, and G. Dantas.** 2016. The rapid spread of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Drug Resistance Updates.* **29**: 30-46.
236. **Prescott, L.M., J. Harley and D-A. Klein.** 2003. Microbiologie 5eme édn. Bruxelles, Belgium: De Boeck Université.
237. **Rashid, M., M.M. Rakib, and B. Hasan.** 2015. Antimicrobial-resistant and ESBL-producing *Escherichia coli* in different ecological niches in Bangladesh. *Infection ecology and epidemiology.* **5**: 26712.
238. **Raza, S., M. Mohsin, W.A. Madni, F. Sarwar, M. Saqib, and B. Aslam.** 2017. First Report of *bla*CTX-M-15-Type ESBL-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Wild Migratory Birds in Pakistan. *Eco health.* **14**: 182-186.

239. **Reuland, E. A., T. Halaby, J. P. Hays, D. M. de Jongh, H. D. Snetselaar, M. Van Keulen, et al.** 2015. Plasmid-mediated AmpC: prevalence in community-acquired isolates in Amsterdam, the Netherlands, and risk factors for carriage. *PLoS One*. **10**:e0113033.
240. **Robin, F., L. Gibold, and R. Bonnet.** 2012. Résistances naturelles et acquises aux  $\beta$ -lactamines chez les entérobactéries : comment les identifier en pratique quotidienne ? *Revue Francophone Des Laboratoires*. **2012**:47-58.
241. **Robin, F., R. Beyrouthy, S. Bonacorsi, N. Aissa, L. Bret, N. Brieu, et al.** 2017. Inventory of Extended-Spectrum-beta-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in France as Assessed by a Multicenter Study. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**: e01911-16
242. **Robinson, T. P., D. P. Bu, J. Carrique-Mas, E. Fèvre, M. Gilbert, D. Grace, et al.** 2016. Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **110**: 377-380.
243. **Rodriguez-Villalobos, H, and M-J. Struelens.** 2006. Résistance bactérienne par  $\beta$ -lactamases à spectre étendu: implications pour le réanimateur. *Réanimation*. 205-213
244. **Rossolini, G.M., M.M.D. Andrea, and C. Mugnaioli.** 2008. The spread of CTX-M-type extended-spectrum b-lactamases. *Clinical Microbiology and Infection*. **14**: 33-41.
245. **Roy, P.H.** 1997. Dissémination de la résistance aux antibiotiques : le génie génétique à l'œuvre chez les bactéries. *Medecine, sciences*. **13**: 927-933.
246. **Rubin, J.E., and J.D.D. Pitout.** 2014. producing *Enterobacteriaceae* in companion animals. *Vet Microbiol*. **170**: 10-18.
247. **Sallem, R. B., K. B. Slama, V. Estepa, E. O. Cheikhna, A. M. Mohamed, S. Chairat et al.** 2015. Detection of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* isolates of lineages ST410-A, ST617-A and ST354-D in faecal samples of hospitalized patients in a Mauritanian hospital. *Journal of Chemotherapy*. **27**: 114-116.
248. **Sanchez, S., M.A.M. Stevenson, C.R. Hudson, M. Maier, T. Buffington, Q. Dam, et al.** 2002. Characterization of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolates Associated with Nosocomial Infections in Dogs. *Journal of clinical microbiology*. **40**: 3586-3595.
249. **Sangare, S. A., E. Rondinaud, N. Maataoui, A. I. Maiga, I. Guindo, A. Maiga, et al.** 2017. Very high prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in bacteriemic patients hospitalized in teaching hospitals in Bamako, Mali. *PloS one*. **12**: e0172652.

250. **Sanger, F.** 1992. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology*. **24**: 104-108.
251. **Sanjit Singh, A., M. Lekshmi, S. Prakasan, B.B. Nayak, and S. Kumar.** 2017. Multiple Antibiotic Resistant, Extended Spectrum-beta-Lactamase (ESBL)-Producing *Enterobacteriaceae* in Fresh Seafood. *Microorganisms*. **5**: 53.
252. **Sbiki, M.** 2016. Contribution à l'étude du régime alimentaire et de la biologie de reproduction de la Cigogne blanche (*Ciconia ciconia*, Aves, *Ciconiidae*) et du Héron garde bœufs (*Ardea ibis*, Aves, *Ardeidae*) dans la région de Tébessa. Thèse Doctorat, Uni. Batna 2.
253. **Scheper, S.E.T., B.M.J. Nielsen, H.S.K. Schügerl, U.V.S.G.T. Tsao, and C.W.J. Zhong.** 2004. Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology. Springer Science and Business Media.
254. **Seng, P., M. Drancourt, F. Gouriet, B. La Scola, P-E. Fournier, J-M. Rolain, et al.** 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical infectious Dis*. **49**: 543-551.
255. **Seni, J., N. Moremi, M. Matee, F. Meer, R. DeVinney, S.E. Mshana, et al.** 2017. Preliminary insights into the occurrence of similar clones of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in humans, animals and the environment in Tanzania: A systematic review and meta-analysis between 2005 and 2016. *Zoonoses and public health*. **65**:1-10.
256. **Shah, P. M., et Stille, W.** 1983. *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains more susceptible to cefoxitin than to third generation cephalosporins. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **11**: 597-598.
257. **Shamoun-Baranes J. A. Baharad, P. Alpert, P. Berthold, Y. Yom-Tov, Y. Dvir, et al.** 2003. The effect of wind, season and latitude on the migration speed of white storks *Ciconia ciconia*, along the eastern migration route. *Journal of Avian Biology*. **34**: 97-104.
258. **Shephard, J.M., R. Ogden, P. Tryjanowski, O. Olsson, and P. Galbusera.** 2013. Is population structure in the European white stork determined by flyway permeability rather than translocation history? *Ecol. Evol.* **3**: 4881-4895.
259. **Shobrak, M.Y., and A.E. Abo-amer.** 2014. Role of wild birds as carriers of multi-drug resistant *Escherichia coli* and *Escherichia vulneris*. *Braz J Microbiol*. **45**: 1199-1209.

260. **Si Bachir, A., H. Chenchouni, N., Djeddou, C. Barbraud, R. Céréghino, and F. Santoul.** 2013. Using self-organizing maps to investigate environmental factors regulating colony size and breeding success of the White Stork (*Ciconia ciconia*). *Journal Ornithol.* **154**: 481-489.
261. **Silva, N., G. Igrejas, P. Rodrigues, T. Rodrigues, A.C. Felgar, R. Pacheco, et al.** 2011. Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-containing *Escherichia coli* isolates in wild birds from the Azores Archipelago. *Avian Pathol.* **40**: 473-479.
262. **Simões, R.R., L. Poirel, P. Martins, D. Costa, and P. Nordmann.** 2010. Seagulls and Beaches as Reservoirs for *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis.* **16**: 16-18.
263. **Singh, S.B., and J.F. Barrett.** 2006. Empirical antibacterial drug discovery foundation in natural products. *Biochemical Pharmacology.* **71**: 1006-1015.
264. **Sirot, J.** 1996. Detection of extended-spectrum plasmid-mediated beta-lactamases by disk diffusion. *Clin. Microbiol. Infect.* **2 Suppl 1**: S35-S39.
265. **Skalova, A., K. Chudejova, V. Rotova, M. Medvecky, V. Studentova, E. Chudackova, et al.** 2017. Molecular characterization of OXA-48-like-producing *Enterobacteriaceae* in the Czech Republic and evidence for horizontal transfer of pOXA-48-like plasmids. *Antimicrob Agents Chemother.* **61**: e01889-16.
266. **Sköld, O.** 2006. Antibiotics and antibiotic resistance. John Wiley and Sons.
267. **Smet, A., A. Martel, D. Persoons, J. Dewulf, M. Heyndrickx, L. Herman, et al.** 2018. Broad-spectrum  $\beta$ -lactamases among *Enterobacteriaceae* of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health. *FEMS microbiology reviews.* **34**: 295-316.
268. **Spaleniak, S., K. Romejko-Ciepielewska, A. Lubas, R. Ryczek and S. Niemczyk.** 2015. Infective endocarditis in the course of urosepsis *E. coli* ESBL (+) in a patient with Goodpasture's syndrome. *Kardiologia Polska (Polish Heart Journal).* **73**: 670-670.
269. **Stedt, J.** 2013. Zero prevalence of extended spectrum beta-lactamase-producing bacteria in 300 breeding Collared Flycatchers in Sweden. *Infect Ecol Epidemiol.* **3**: 10-12.
270. **Stedt, J., J. Bonnedahl, J. Hernandez, J. Waldenstrom, B.J. McMahon, C. Tolf, et al.** 2015. Carriage of CTX-M type extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) in gulls across Europe. *Acta Vet. Scand.* **2**: 57-74.

271. **Steele, C.M., R.N. Brown, and R.G. Botzler.** 2005. Prevalences of zoonotic bacteria among seabirds in rehabilitation centers along the Pacific Coast of California and Washington, USA. *J. Wildl. Dis.* **41**: 735-744.
272. **Stolle, I., E. Prenger-Berninghoff, I. Stamm, S. Scheufen, E. Hassdenteufel, S. Guenther, et al.** 2013. Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in dogs. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**: 2802-2808.
273. **Struelens, M.** 2006. Résistance bactérienne par  $\beta$ -lactamases à spectre étendu : implications pour le réanimateur Extended spectrum  $\beta$ -lactamases mediated bacterial resistance : Implications for the intensivist. *Réanimation.* **15**: 205-213.
274. **Studentova, V., C.C. Papagiannitsis, R. Izdebski, Y. Pfeifer, E. Chudackova, T. Bergerova, et al.** 2015. Detection of OXA-48-type carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in diagnostic laboratories can be enhanced by addition of bicarbonates to cultivation media or reaction buffers. *Folia Microbiol. (Praha).* **60**: 119-129.
275. **Surmacki A., and J. Kosicki.** 2009. Short communication : Condition-dependent leg colour of nestling White Storks *Ciconia ciconia*. *Ibis.* **151**: 762-765.
276. **Sütterlin, S., P. Edquist, L. Sandegren, M. Adler, T. Tängdén, M. Drobni, et al.** 2014. Silver Resistance Genes Are Overrepresented among *Escherichia coli* Isolates with CTX-M Production. *Appl Environ Microbiol.* **80**: 6863-6869.
277. **Székely, E., I. Damjanova, L. Jánvári, K. E. Vas, S. Molnár, D. V. Bilca, et al.** 2013. First description of *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>OXA-181</sub> producing *Enterobacteriaceae* strains in Romania. *International Journal of Medical Microbiology.* **303**: 697-700.
278. **Szmolka, A., and B. Nagy.** 2013. Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. *Front Microbiol.* **4**: 258.
279. **Tadesse, B.T., E.A. Ashley, S. Ongarello, J. Havumaki, M. Wijegoonewardena, I.J. Gonzalez, et al.** 2017. Antimicrobial resistance in Africa: a systematic review. *BMC Infect. Dis.* **17**: 616.
280. **Tadesse, D.A., S. Zhao, E. Tong, S. Ayers, A. Singh, M. J. Bartholomew et al.** 2012. Antimicrobial Drug Resistance in *Escherichia coli* from Humans. *Emerging Infectious Diseases.* **18**: 741-749.
281. **Tagu, D., and C. Moussard.** 2003. Principes des techniques de biologie moléculaire: 2e édition, revue et augmentée. Editions Quae.

282. **Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar.** 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**: 2725-2729.
283. **Tan, T.Y., L.S.Y., NG, J. He, T. H. Koh, and L.Y. Hsu.** 2009. Evaluation of screening methods to detect plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* **53**: 146-149.
284. **Tani, Z.B.A., and G. Arlet.** 2014. Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie. *Pathologie Biologie.* **62**: 169-178.
285. **Tartof, S. Y. O. D. Solberg, A. R. Manges, and L. W Riley.** 2005. Analysis of a uropathogenic *Escherichia coli* clonal group by multilocus sequence typing. *Journal of clinical microbiology.* **43**:5860-5864.
286. **Tausova, D., M. Dolejska, A. Cizek, L. Hanusova, J. Hrusakova, O. Svoboda, et al.** 2012. *Escherichia coli* with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in great cormorants and mallards in Central Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* **67**: 1103-1107.
287. **Touati, A., S. Benallaoua, D. Forte, J. Madoux, L. Brasme, and C. De Champs.** 2006. First report of CTX-M-15 and CTX-M-3  $\beta$ -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Béjaia, Algeria. *International Journal of Antimicrobial Agents.* **27**: 397-402.
288. **Tricot, J.** 1973. Dynamique de population de la cigogne blanche (*Ciconia c. Ciconia*) En Europe Occidentale Et Centrale. *Aves.* **10**: 122-151.
289. **Turton, J. F., M. Doumith, K.L. Hopkins, C. Perry, D. Meunier, and N. Woodford.** 2016. Clonal expansion of *Escherichia coli* ST38 carrying a chromosomally integrated OXA-48 carbapenemase gene. *Journal of medical microbiology.* **38**: 538-546.
290. **Van den Bossche, W., P. Berthold, M. Kaatz, E. Nowak, and U. Querner.** 2002. Eastern European White Stork Populations : Migration Studies and Elaboration of Conservation Measures. *German Federal Agency for Nature Conservation.*
291. **Van der Bij, A.K., G. Peirano, W.H.F. Goessens, E.R. van der Vorm, M. van Westreenen, and J.D.D. Pitout.** 2011. Clinical and molecular characteristics of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* causing bacteremia in the Rotterdam Area, Netherlands. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**: 3576-3578.
292. **Van Duin, D., and Y. Doi.** 2017. The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Virulence.* **8**: 460-469.

293. **Vaz, F.F., P.P. Serafini, R. Locatelli-Dittrich, R. Meurer, E.L. Durigon, J. de Araujo, et al.** 2017. Survey of pathogens in threatened wild red-tailed Amazon parrot (*Amazona brasiliensis*) nestlings in Rasa Island, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* **48**: 747-753.
294. **Veldman, K., P. van Tulden, A. Kant, J. Testerink, and D. Mevius.** 2013. Characteristics of cefotaxime-resistant *Escherichia coli* from wild birds in the Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**: 7556-7561.
295. **Vergara, A., C. Pitart, T. Montalvo, I. Roca, S. Sabaté, S. Hurtado, et al.** 2017. Prevalence of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-and/or carbapenemase-producing *Escherichia coli* isolated from yellow-legged gulls from Barcelona, Spain. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* **61**: e02071-16.
296. **Vittecoq, M., C. Laurens, L. Brazier, P. Durand, E. Elguero, A. Arnal, et al.** 2017. VIM-1 carbapenemase-producing *Escherichia coli* in gulls from southern France. *Ecology and evolution.* **7**: 1224-1232.
297. **Wallensten, A., J. Hernandez, K. Ardiles, D. Gonzalez-Acuna, M. Drobni, and B. Olsen.** 2011. Extended spectrum beta-lactamases detected in *Escherichia coli* from gulls in Stockholm, Sweden. *Infect. Ecol. Epidemiol.* **1**: 7030.
298. **Walsh, C.** 2000. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *NATURE.* **406**:775-781.
299. **Wang, J., Z-B. Ma, Z-L. Zeng, X-W. Yang, Y. Huang, and J-H. Liu.** 2017. The role of wildlife (wild birds) in the global transmission of antimicrobial resistance genes. *Zool. Res.* **38**: 55-80.
300. **Wood, D.** 1984. Concordance between classifications of the *Ciconiidae* based on behavioral and morphological data. *J Ornithol.* **125**: 25-37.
301. **Yahiaoui, M., F. Robin, R. Bakour, M. Hamidi, R. Bonnet and Y. Messai.** 2015. Antibiotic Resistance, Virulence, and Genetic Background of Community-Acquired Uropathogenic *Escherichia coli* from Algeria. *Microbial drug resistance.* **21**: 516-526.
302. **Yandaï, F. H., C. Zongo, A. M. Moussa, N. Bessimbaye, F. Tapsoba, A. Savadogo, et al.** 2014. Prevalence and antimicrobial susceptibility of faecal carriage of Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* at the “Hôpital de la Mère et de l’Enfant” in N’Djamena, Chad. *Scientific Journal of Microbiology.* **3**: 25-31.
303. **Yang, F., D. Mao, H. Zhou, and Y. Luo.** 2016. Prevalence and Fate of Carbapenemase Genes in a Wastewater Treatment Plant in Northern China. *Plos One.* **11**: e0156383.

304. Yao, Y., C. Imirzalioglu, T. Hain, M. Kaase, S. Gatermann, M. Exner, et al. 2014. Complete Nucleotide Sequence of a *Citrobacter freundii* Plasmid Carrying KPC-2 in a Unique Genetic Environment. *Genome Announc.* **2** : pii: e01157-14
305. Yilmaz, N. O., N. Agus, E. Bozcal, O. Oner, and A. Uzel. 2013. Detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Indian journal of medical microbiology.* **31**: 53-59.
306. Yousfi, M., A. Touati, A. Mairi, L. Brasme, A. Gharout-Sait, T. Guillard, et al. 2016. Emergence of Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Companion Animals in Algeria. *Microb. Drug Resist.* **22**: 342-6.
307. Youssef, A. I. and D. H. Mansour. 2014. Potential role of migratory Quail in spreading of some zoonotic pathogens in Egypt. *Am. J. Anim. Vet. Sci.* **9**: 203-210.
308. Zahedi Bialvaei, A., H. Samadi Kafil, H. Ebrahimzadeh Leylabadlo, M. Asgharzadeh, and M. Aghazadeh. 2015. Dissemination of carbapenemases producing Gram negative bacteria in the Middle East. *Iran. J. Microbiol.* **7**: 226-246.
309. Zurfluh, K., M.T. Nuesch-Inderbinen, L. Poirel, P. Nordmann, H. Hachler, and R. Stephan. 2015. Emergence of *Escherichia coli* producing OXA-48 beta-lactamase in the community in Switzerland. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* **4**: 9.

# *RÉSUMÉS*

La dissémination de l'antibiorésistance chez les bactéries à Gram négatif, particulièrement chez les *Enterobacteriaceae*, représente un problème majeur de santé humaine et animale au niveau mondial. Les animaux sauvages dont les oiseaux migrateurs jouent un rôle important dans la propagation de l'antibiorésistance comme des réservoirs et des vecteurs potentiels. A ce titre nous nous sommes intéressés par l'étude phénotypique et moléculaire de la résistance aux céphalosporines de troisième génération (C3G) et/ou aux carbapénèmes des entérobactéries isolées à partir des fientes de la cigogne blanche (*Ciconia ciconia*) de la Commune d'El Madher de la wilaya de Batna.

Dans ce travail, 43 échantillons ont été récoltés sur deux séries de prélèvements, la première au mois de Juin 2014 suivie de celle du mois de Mars 2015. Ces derniers ont fait l'objet d'un protocole de screening sélectif. L'identification des souches isolées a été réalisée par Api 20E puis confirmée par MALDI-TOF MS. La sensibilité aux antibiotiques a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé et par E-test. Les mécanismes moléculaires de résistances aux  $\beta$ -lactamines ont été recherchés par PCR et séquençage. L'étude de la clonalité de certaines souches a été réalisée en déterminant les séquences types des souches en question par la méthode de *Multi-locus sequence typing*.

Ce travail a permis l'isolement de 65 souches d'entérobactéries appartenant à quatre espèces différentes; *E. coli* avec un pourcentage de 85% suivie de *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* et *Enterobacter aerogenes* avec des pourcentages de 9%, 3% et 3% respectivement. Le phénotype résultant de la production de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSEs) est le prédominant avec un pourcentage élevé de 94% (55 souches), suivi par la production de carbapénémases puis l'association phénotypique BLSEs/carbapénémases avec des pourcentages de 4% (2 souches) et 2% (1 souche) respectivement. Le séquençage des produits d'amplification des gènes responsables de la résistance aux  $\beta$ -lactamines, chez les souches de *E. coli*, a montré une diversité des gènes où CTX-M-15 présente 44%, CTX-M-1 (11 %), CTX-M-139 (1 %), TEM-1 (37%), TEM-164 (1%), TEM-198 (1%), TEM-209 (1%) et OXA-48 (4%) ce qui explique le taux élevé de résistance aux  $\beta$ -lactamines. Dans la présente étude, nous avons détecté pour la première fois dans le monde des souches de *E. coli* ST38 productrices de carbapénémases de type OXA-48 chez la cigogne blanche.

En conclusion, nous soulignons un haut niveau de résistance aux  $\beta$ -lactamines allant des BLSE jusqu'aux carbapénémases chez des souches isolées de la cigogne blanche (*Ciconia ciconia*) de la Commune d'El Madher de la Wilaya de Batna. Nos résultats indiquent que les

oiseaux migrateurs jouent un rôle important dans la dissémination des bactéries résistantes comme des potentiels réservoirs et vecteurs.

**Mots clés** : Antibiorésistance, entérobactéries, carbapénémase, OXA-48, BLSE, séquence type ST38, cigogne blanche (*Ciconia ciconia*), oiseaux migrateurs.

*Abstract*

Dissemination of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria, particularly in *Enterobacteriaceae*, represents a major problem of human and animal health worldwide. Wild animals whose migratory birds play an important role in spreading antimicrobial resistance as potential reservoirs and vectors. In this regard, we were interested in the phenotypic and molecular screening of resistance to third-generation cephalosporins and/or to carbapenems of enterobacteria isolated from white stork (*Ciconia ciconia*) stools in the Commune of El Madher, wilaya of Batna.

In this study, 43 samples were collected in two sampling sets; June 2014 and March 2015. The identification of strains was carried out by Api 20E then confirmed by MALDI-TOF MS. Susceptibility testing was performed using agar diffusion method and E-test. Molecular mechanisms of  $\beta$ -lactam resistance were identified by PCR and sequencing. The identification of the sequence types of the strains was carried out by of *Multi-locus sequence typing* technique.

This work allowed the isolation of 65 enterobacteria belonging to four species; *E. coli* (85%) followed by *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes* with 9%, 3% et 3% respectively. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) producers were predominant with a high percentage of 94% (55 strains), followed by carbapenemase production then the phenotypic association ESBLs/carbapenemase with 4 % (2 strains) and 2% (1 strain) respectively. The amplification of  $\beta$ -lactam resistance genes showed a diversity of genes including CTX-M-15 (44%), CTX-M-1 (11%), CTX-M-139 (1%), TEM-1 (37%), TEM-164 (1%), TEM-198 (1%), TEM-209 (1%) and OXA-48 (4%) which were detected in *E. coli*, which explains the high level of to  $\beta$ -lactam resistance. In this study, we report for the first time in the world the detection of OXA-48-producing *E. coli* ST38 clone in white stork stools.

In conclusion, we highlight a high level of  $\beta$ -lactam resistance ranging from ESBLs to carbapenemases production in strains isolated from white stork (*Ciconia ciconia*) stools in the Commune of El Madher, Wilaya of Batna. Our results indicate that migratory birds can play an important role in the dissemination of antibiotic-resistant bacteria as a potential reservoir and vector.

**Keywords :** Antibioresistance, enterobacteria, carbapenemases, OXA-48, ESBL, sequence type ST38, white stork (*Ciconia ciconia*), migratory birds.

## الملخص

إن إنتشار المقاومة للمضادات الحيوية عند البكتيريا سالبة الغرام، خاصة عند البكتيريا المعوية، يمثل مشكلة رئيسية لصحة الإنسان والحيوان على المستوى العالمي. تلعب الحيوانات البرية ومنها الطيور المهاجرة دورا هاما في نشر المقاومة للمضادات الحيوية كمصادر ونواقل محتملة. على هذا النحو، نحن مهتمون بدراسة النمط الظاهري والوراثي لمقاومة السيفالوسبورين من الجيل الثالث و / أو الكاربابينيمات عند البكتيريا المعوية المعزولة من براز اللقلق الأبيض (*Ciconia ciconia*) في بلدية المعذر ولاية باتنة.

في هذا العمل، تم جمع 43 عينة مأخوذة على دفعتين، الأولى في شهر جوان 2014 متبوعة بأخرى في شهر مارس 2015. عزل السلالات تم باستخدام نموذج فرز انتقائي. تم تحديد نوعية السلالات المعزولة بواسطة Api 20E و تم تأكيدها بواسطة MALDI-TOF MS. حساسية السلالات المعزولة للمضادات الحيوية تمت بواسطة طريقة الانتشار في وسط الأجار وعن طريق E-test. تم تحديد الآليات الوراثية لمقاومة البيتاكتمينات بواسطة ال PCR و Séquençage. وقد تم تحديد مجموعات النسيلا لسلالات معينة من خلال تقنية *Multi-locus sequence typing*.

أدى هذا العمل إلى عزل 65 سلالة معوية تنتمي إلى أربع أنواع وهي *Escherichia coli* بنسبة 85% متبوعة بسلالة *Citrobacter freundii*، *Klebsiella pneumoniae* و *Entrobacter aerogene* بنسب 9%، 3% و 3% على التوالي. النمط الظاهري للبيتاكتماز واسعة الطيف (BLSE) كان الأغلب بنسبة 94% (55 سلالة) يليها إنتاج الكاربابينيماز والنمط الظاهري المزدوج BLSE والكاربابينيماز بنسب 4% (سلالتين) و 2% (سلالة واحدة) على التوالي. أظهر تسلسل منتجات التضخيم تنوع للجينات المسؤولة عن المقاومة للبيتاكتمينات لدى سلالات *E. coli* حيث تم الكشف عن CTX-M-15 بنسبة 44%، CTX-M-1 (11%)، CTX-M-139 (1%)، TEM-1 (37%)، TEM-164 (1%)، TEM-198 (1%)، TEM-209 (2%) و OXA-48 بنسبة 4% الذي يفسر إرتفاع مستوى المقاومة للبيتاكتمينات. في هذه الدراسة، إكتشفنا لأول مرة في العالم عند طيور اللقلق البيضاء إنتاج الكاربابينيماز من نوع OXA-48 لدى بكتيريا *E. coli* ذات النسيلة 38.

وفي الختام، نسلط الضوء على المستوى العالي لمقاومة البيتاكتمينات بدءا من BLSE إلى الكاربابينيماز لدى السلالات المعزولة من اللقلق الأبيض لبلدية المعذر ولاية باتنة. تشير نتائجنا إلى أن الطيور المهاجرة تمثل مصدرا للبكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية مع إمكانية إنتشارها على نطاق واسع.

**الكلمات المفتاحية:** مقاومة المضادات الحيوية، البكتيريا المعوية، الكاربابينيماز، OXA-48، BLSE، النسيلة 38، اللقلق الأبيض (*Ciconia ciconia*)، الطيور المهاجرة.

**ANNEXES**

## **Annexe N°1. Technique de la coloration de Gram**

La coloration de Gram est une étape préliminaire utilisée pour différencier les bactéries à Gram positif des bactéries à Gram négatif. Cette coloration est toujours réalisée en routine lors des premiers examens, elle permet en général d'apprécier la pureté des souches bactériennes avant toute identification.

### **1. Principe**

Sur le frottis bactérien préparé, le premier colorant, le cristal violet va colorer en violet les bactéries, puis le lugol (solution iode-iodurée) libère de l'iode qui va fixer le colorant précédent. Un complexe iode-cristal violet se forme, il sera solubilisé par l'alcool à 95° C lors de la phase de décoloration, uniquement pour les bactéries à Gram positif. Le deuxième colorant, dit de contraste, la safranine, va colorer en rose les bactéries à Gram négatif, les bactéries à Gram positif non décolorées par l'alcool ont conservé leur couleur violette.

### **2. Méthode de réalisation**

La lame contenant le frottis, préparé à partir d'une culture jeune est recouverte de cristal violet et laissée en contact une minute, puis lavée doucement à l'eau. Ensuite des gouttes de Lugol sont ajoutées et après une minute la lame sera rincée à l'eau. Une décoloration en utilisant l'alcool est effectuée puis un rinçage à l'eau est nécessaire. Par la suite la lame sera recouverte de la safranine puis rincée à l'eau après une minute de contact. A la fin la lame sera séchée et le frottis est prêt à observer à immersion (**Delarras, 2010**).

## Annexe N°2. Test de fermentation du glucose

La gélose TSI ou Triple Sugar Iron Bio-Rad est un milieu de culture, proposé par Hjana (1945), principalement utilisé pour la caractérisation biochimique des entérobactéries et des *Salmonella*. Il permet de mettre en évidence en 24h l'attaque du glucose, du lactose et/ ou saccharose ainsi que la production d'hydrogène sulfuré et de gaz.

### 1. Composition chimique du milieu de culture

La composition chimique de ce milieu de culture en g/l d'eau distillée est :

|                                    |       |
|------------------------------------|-------|
| Extrait de viande.....             | 3     |
| Extrait de levure.....             | 3     |
| Peptone.....                       | 20    |
| Chlorure de sodium.....            | 5     |
| Lactose.....                       | 10    |
| Saccharose.....                    | 10    |
| Glucose.....                       | 1     |
| Sulfate ferreux ammoniacal.....    | 300mg |
| Rouge de phénol.....               | 24mg  |
| Thiosulfate de sodium anhydre..... | 300mg |
| Agar.....                          | 11    |

pH final  $7,4 \pm 0,2$  à  $25^{\circ} \text{C}$ .

Le glucose, le lactose et le saccharose sont les sources de sucre de ce milieu. La fermentation d'un sucre par des entérobactéries produit des acides qui font virer le rouge de phénol (indicateur de pH) au jaune, dans le cas contraire, il a une couleur rouge.

Le thiosulfate de sodium et éventuellement la peptone constituent des sources de soufre pour certaines entérobactéries qui produisent du sulfure de fer en présence du sulfate ferreux ammoniacal : le test H<sub>2</sub>S et alors positif.

La peptone peut également être dégradée par certaines entérobactéries avec libération de métabolites qui font virer l'indicateur au rouge en milieu basique.

## **2. Méthode de réalisation**

A partir de cultures pures sur gélose nutritive, on effectue un ensemencement de la pente du milieu par des stries et le culot par pique à l'aide d'une pipette Pasteur ou d'une anse bouclée préalablement stérilisée à la flamme. L'incubation est faite à  $37\pm 1^\circ\text{C}$  pendant 24 h.

## **3. Lecture et interprétation**

La lecture de ce milieu se fait au niveau du culot pour glucose et au niveau de la pente pour le lactose et/ou le saccharose. Le culot est obligatoirement jaune (sauf dans le cas où le dégagement d' $\text{H}_2\text{S}$  provoquerait un noircissement intense) puisque les entérobactéries fermentent en général le glucose. Au niveau de la pente, la fermentation du lactose et/ ou du saccharose présents en forte concentration dans le milieu, entraîne une acidification et un virage au jaune du rouge de phénol (**Delarras, 2010**).

### **Annexe N° 3. Galerie biochimique**

Le système API 20E est un système standardisé consiste à identifier des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux. Il se compose de 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation, et une base de données. La suspension bactérienne qui reconstitue les tests est inoculée dans des microtubes. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés en ajoutant des réactifs.

#### **1. Préparation de l'inoculum**

Après avoir réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation, environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée (ou toute eau sans additif ou dérivés susceptibles de libérer des gaz) sont répartis dans chaque alvéole pour générer une atmosphère humide. Ensuite en utilisant une pipette, on effectue le prélèvement d'une seule colonie d'une culture jeune (18-24 h) bien isolée. Le milieu est homogénéisé soigneusement pour l'obtention d'une suspension bactérienne prête à utiliser.

#### **2. Inoculation de la galerie**

A l'aide de la même pipette, on introduit la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie. En revanche pour les tests CIT, VP et GEL, on remplit seulement le tube et la cupule. Concernant les autres tests, on remplit uniquement les tubes (et non les cupules). Pour les tests : ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine pour créer une anaérobiose. Après la fermeture de la boîte, l'incubation se fait à  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 18-24 h. Après 24 h, une goutte de réactif TDA doit être ajouté dans la cupule du test TDA, une goutte de réactif JAMES est ajoutée sur le test IND et une goutte des réactifs VP 1 et VP 2 sur le test VP (attendre au minimum 10 minutes).

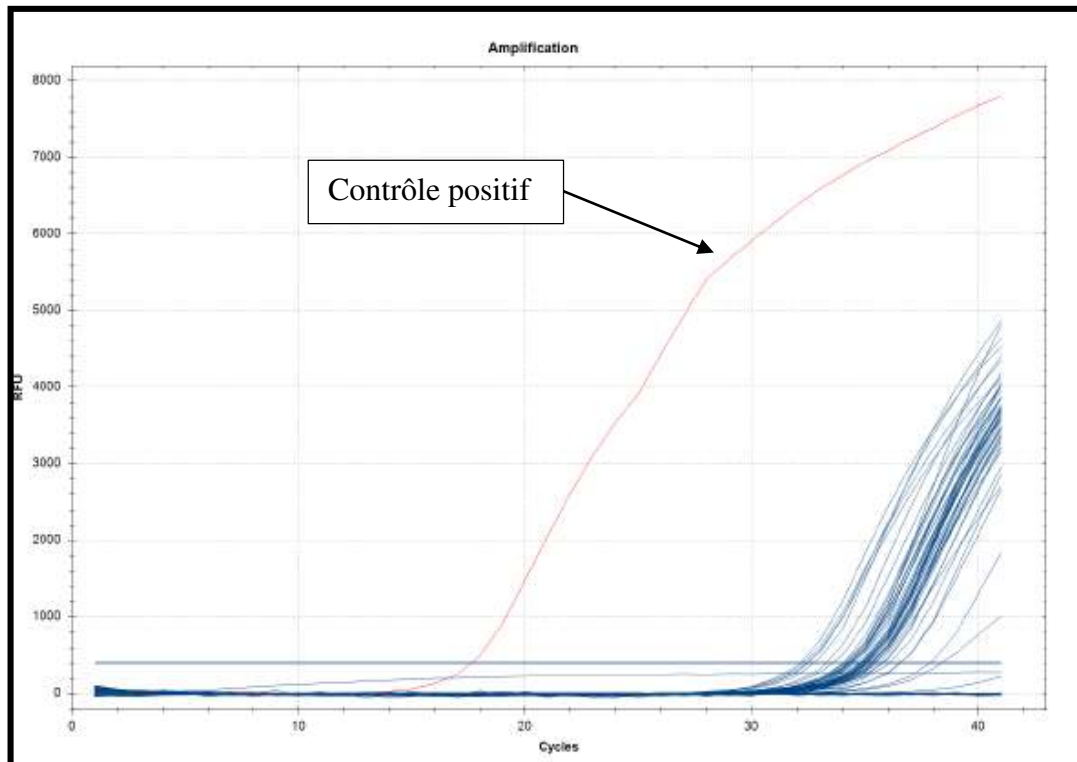
#### **3. Lecture et interprétation**

Après incubation, la lecture de la galerie doit s'effectuer en se référant au tableau de lecture. L'interprétation s'établit à l'aide d'une feuille de calcul en format excel.

Tableau. Lecture de l'API 20 E.

| Tests       | Substrat                        | Caractère recherché           | Résultats            |                           |
|-------------|---------------------------------|-------------------------------|----------------------|---------------------------|
|             |                                 |                               | Négatif              | Positif                   |
| <b>ONPG</b> | Ortho-nitro-phenyl- galactoside | Beta-galactosidase            | Incolore             | Jaune                     |
| <b>ADH</b>  | Arginine                        | Arginine dihydrolase          | Jaune                | Rouge/orange              |
| <b>LDC</b>  | Lysine                          | Lysine décarboxylase          | Jaune                | Orangé                    |
| <b>ODC</b>  | Ornithine                       | Ornithine décarboxylase       | Jaune                | Rouge/orange              |
| <b>CIT</b>  | Citrate de sodium               | Utilisation du citrate        | Vert                 | Bleu-vert/vert            |
| <b>H2S</b>  | Thiosulfate de sodium           | Production d'H <sub>2</sub> S | Incolore/gris        | Dépôt noir/ fin           |
| <b>URE</b>  | Urée                            | Uréase                        | Jaune                | Rouge/orangé              |
| <b>TDA</b>  | Tryptophane                     | Tryptophane désaminase        | TDA / Immédiat       |                           |
|             |                                 |                               | Jaune                | Marron foncé              |
| <b>IND</b>  | Tryptophane                     | Production d'indole           | IND / 2 min, maximum |                           |
|             |                                 |                               | Jaune                | Anneau rouge              |
| <b>VP</b>   | Pyruvate de sodium              | Production d'acétoïne         | VP 1 + VP 2 / 10 min |                           |
|             |                                 |                               | incolore             | incolore                  |
| <b>GEL</b>  | Gélatine de Kohn                | Gélatinase                    | Non diffusion        | Diffusion du pigment noir |
| <b>GLU</b>  | Glucose                         | Fermentation/oxydation        | Bleu/bleu-vert       | Jaune                     |
| <b>MAN</b>  | Mannitol                        | Fermentation/oxydation        | Bleu/bleu-vert       | Jaune                     |
| <b>INO</b>  | Inositol                        | Fermentation/oxydation        | Bleu/bleu-vert       | Jaune                     |
| <b>SOR</b>  | Sorbitol                        | Fermentation/oxydation        | Bleu/bleu-vert       | Jaune                     |
| <b>RHA</b>  | Rhamnose                        | Fermentation/oxydation        | Bleu/bleu-vert       | Jaune                     |
| <b>SAC</b>  | Saccharose                      | Fermentation/oxydation        | Bleu/bleu-vert       | Jaune                     |
| <b>MEL</b>  | Melibiose                       | Fermentation/oxydation        | Bleu/bleu-vert       | Jaune                     |
| <b>AMY</b>  | Amygdaline                      | Fermentation/oxydation        | Bleu/bleu-vert       | Jaune                     |
| <b>ARA</b>  | Arabinose                       | Fermentation/oxydation        | Bleu/bleu-vert       | Jaune                     |
| <b>Ox</b>   | Sur papier filtre               | Cytochrome-oxydase            | Ox / 5-10 min        |                           |
|             |                                 |                               | Incolore             | Anneau violet             |

**Annexe N°4.** Amplification du gène *blas<sub>HV</sub>* par Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel.



**Annexe N°5. Article**

**Article publié**

Migratory white stork (*Ciconia ciconia*) : a potential vector of the OXA-48-producing *Escherichia coli* ST38 clone in Algeria.

**Amira Bouaziz**, Lotfi Loucif, Ammar Ayachi, Karima Guehaz, Esma Bendjama and Jean-Marc Rolain.

**Nom du journal:** Microbial Drug Resistance

**Pays de journal:** États-Unis

**Impact factor:** **2.344** (2017)

**Editor-in-Chief:** Alexander Tomasz, PhD

**ISSN:** 1076-6294

**Online ISSN:** 1931-8448

# Migratory White Stork (*Ciconia ciconia*): A Potential Vector of the OXA-48-Producing *Escherichia coli* ST38 Clone in Algeria

Amira Bouaziz,<sup>1</sup> Lotfi Loucif,<sup>1,2</sup> Ammar Ayachi,<sup>1</sup> Karima Guehaz,<sup>1</sup>  
Esma Bendjama,<sup>1,2</sup> and Jean-Marc Rolain<sup>2</sup>

The emergence of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae is of great concern to public health worldwide. The aim of this study was to screen for the presence of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in white stork (*Ciconia ciconia*) migratory bird stools, and to investigate their molecular support on  $\beta$ -lactamase production. In March 2015, 32 fecal samples of white stork were collected in the Commune of El Madher Wilaya de Batna, in eastern Algeria. Samples were subjected to selective isolation of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. Representative colonies were screened phenotypically for carbapenemase production. Carbapenemase-producing isolates were subjected to antibiotic susceptibility testing and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) coproduction.  $\beta$ -Lactamase determinants were searched for by PCR and sequencing. Three carbapenemase-producing *Escherichia coli* were obtained. Only one strain was positive for ESBL production. The OXA-48-type carbapenemase-encoding gene was detected in all isolates. Screening for other  $\beta$ -lactamase-encoding genes showed that all isolates coexpress the *bla*<sub>TEM</sub> gene, whereas one of them additionally harbored the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> ESBL gene. Multilocus sequence typing results showed that two strains belonged to the sequence type 38. This work demonstrated for the first time that the migratory white stork can play an important role in the dissemination of OXA-48-producing *E. coli* as a potential reservoir and vector.

**Keywords:** *Escherichia coli*, sequence type ST38, OXA-48 carbapenemase, migratory birds, *Ciconia ciconia*

## Introduction

CARBAPENEMS ARE  $\beta$ -LACTAM ANTIBIOTICS that possess exceptional broad-spectrum activity.<sup>1</sup> They are regarded as last-line therapeutics to treat infections with multidrug-resistant (MDR) Gram-negative bacteria (GNB).<sup>2</sup> Their use has increased in clinical practice as a result of the expanding of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing GNB.<sup>3</sup> Nevertheless, during the last few years, the prevalence of resistance to carbapenems has increased worldwide,<sup>4</sup> which is becoming a major public health issue.<sup>5</sup>

Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae is mainly due to carbapenemase production.<sup>1</sup> These enzymes are diverse, belonging to three classes: A, B, or D in the Ambler  $\beta$ -lactamase classification.<sup>6</sup> Class D  $\beta$ -lactamases, in which OXA-48 represents the main enzyme isolated around the world, hydrolyze penicillins at a high level and carbapenems at a low level, but have a very weak activity against expanded-spectrum cephalosporins.<sup>7</sup>

OXA-48-type carbapenemase was initially identified in Turkey,<sup>8</sup> and since then, it has been extensively reported as a source of nosocomial outbreaks in many parts of the world, although principally in Mediterranean countries.<sup>6,9</sup> Its first report in Algeria was in 2012 by Agabou *et al.* from an *Escherichia coli* clinical isolate.<sup>10</sup>

Dissemination of the OXA-48 carbapenemase producers is often due to imports from endemic regions.<sup>11</sup> Additionally, the occurrence of these resistant Enterobacteriaceae in community, food chain, and animal sources increase their very broad spread.<sup>2</sup> Wild and migratory birds could play an important role in the dissemination of MDR Enterobacteriaceae in the environment through their fecal residues.<sup>12</sup>

The white stork (*Ciconia ciconia*) is one of the migratory birds that has a large breeding distribution in Europe, covering the most of the continent, as well as South of the Mediterranean, where it breeds in northern Algeria and Morocco.<sup>13</sup> In this breeding area, OXA-48 represents the most common carbapenemase type, notably in Spain and France.<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Biotechnologie des Molécules Bioactives et de la Physiopathologie Cellulaire (LMBBPC), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Batna 2, Batna, Algérie.

<sup>2</sup>Unité de Recherche Sur Les Maladies Infectieuses et Tropicales Émergentes (URMITE), UM 63, CNRS 7278, IRD 198, INSERM 1095, IHU Méditerranée Infection, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Aix-Marseille-Université, Marseille, France.

The main aim of this work was to screen for the presence of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in white stork (*C. ciconia*) stools in the El Madher region in Batna, Algeria, and then to investigate their  $\beta$ -lactamase determinants.

## Materials and Methods

### Sampling

In March 2015, a total of 32 fresh fecal samples of white stork (*C. ciconia*) were collected in sterile bottles (20 ml) from different nests located in the El Madher region of Batna, Algeria. Samples were immediately transferred to the laboratory for analysis at 4°C.

### Screening for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae strains

Collected fresh feces were subjected first to the pooling step, where each pooled sample contained one to three samples, then 1 g of each pooled sample were pre-enriched for 4 hr at 37°C in 10 ml of the brain–heart infusion (BHI) broth (Becton, Dickinson and company, France).<sup>12,14</sup> The screening for carbapenemase-resistant Enterobacteriaceae began with a selective enrichment step, where 1 ml of each sample was transferred to selective BHI broth supplemented with ertapenem (1  $\mu$ g/ml) and vancomycin (64  $\mu$ g/ml); after 18 hr of incubation, 0.1 ml from positive tubes was streaked on selective MacConkey Agar (Becton, Dickinson and company, France) supplemented with ertapenem (1  $\mu$ g/ml) and vancomycin (64  $\mu$ g/ml).<sup>15</sup>

Representative colonies were screened for carbapenemase production by the modified Hodge test (MHT) and the modified Carba NP test (MCNP test) as previously described.<sup>16,17</sup> Positive MHT and MCNP test isolates were identified using API20E system (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) and confirmed by matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) as previously described.<sup>18</sup>

### Antibacterial susceptibility testing

The antibiotic susceptibility testing was performed according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines as previously described.<sup>19</sup> Carbapenemase-producing strains were analyzed by the disk diffusion method against a panel of 13 antibiotics, including amoxicillin (25  $\mu$ g), amoxicillin/clavulanic acid (30  $\mu$ g), cefoxitin (30  $\mu$ g), cefotaxime (30  $\mu$ g), ceftazidime (30  $\mu$ g), cefepime (30  $\mu$ g), aztreonam (30  $\mu$ g), ertapenem (10  $\mu$ g) imipenem (10  $\mu$ g), amikacin (30  $\mu$ g), gentamicin (10  $\mu$ g), ciprofloxacin (5  $\mu$ g), and sulfamethoxazole/trimethoprim (1.25/23.75  $\mu$ g) (ia2, Montpellier, France). *E. coli* ATCC 25922 was used as the quality control strain.

Minimum inhibitory concentrations (MICs) of imipenem, colistin, and tigecycline were determined using Etest strips (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). The MICs results were interpreted according to the breakpoints recommended by EUCAST.<sup>20</sup>

### Phenotypic and molecular detection of $\beta$ -lactamase production

Carbapenemase-producing isolates were tested phenotypically for ESBL coproduction by the double-disk synergy

TABLE 1. RESULTS OF ANTIBACTERIAL SUSCEPTIBILITY TESTING, PHENOTYPIC TESTS, AND  $\beta$ -LACTAMASE DETERMINANTS

| Strains | Antibiotic susceptibility testing |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | MICs (mg/L) |       |       | Phenotypic tests |     |           |   | $\beta$ -lactamases encoding genes |   |
|---------|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------------|-------|-------|------------------|-----|-----------|---|------------------------------------|---|
|         | AMX                               | AMC | FOX | CTX | CAZ | FEP | ATM | ERT | IPM | GEN | AMK | CIP | SXT | IPM         | CST   | TGC   | DDST             | MHT | MCNP test |   |                                    |   |
| A1      | R                                 | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | S   | R   | S   | R   | R   | R           | 0.094 | 0.064 | 0.094            | +   | +         | + | +                                  | <i>bla</i> <sub>CTX-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub> , and <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> |
| A2      | R                                 | R   | R   | R   | S   | S   | R   | R   | S   | R   | S   | R   | R   | R           | 0.25  | 0.094 | 0.064            | -   | +         | + | +                                  | <i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>                                    |
| A3      | R                                 | R   | R   | R   | S   | S   | R   | R   | S   | R   | S   | R   | R   | R           | 0.25  | 0.016 | 0.047            | -   | +         | + | +                                  | <i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>                                    |

AMC, amoxicillin/clavulanic acid; AMK, amikacin; AMX, amoxicillin; ATM, aztreonam; CAZ, ceftazidime; CIP, ciprofloxacin; CST, colistin; CTX, cefotaxime; DDST, double-disk synergy test; ETP, ertapenem; FEP, cefepime; FOX, cefoxitin; GEN, gentamicin; I, intermediate; IPM, imipenem; MCNP test, modified Carba NP test; MHT, modified Hodge test; MICs, minimum inhibitory concentrations; R, resistant; S, susceptible; SXT, trimethoprim–sulfamethoxazole; TGC, tigecycline.

test<sup>21</sup> and then were subjected to the molecular detection of  $\beta$ -lactamase-encoding genes of *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, and *bla*<sub>SHV</sub> by real-time PCR and standard PCR as previously described.<sup>22–25</sup> The sequencing of positive standard PCR products was performed by using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). The analysis was carried out using an ABI 3130XL automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). The obtained sequences were analyzed using CodonCode Aligner Software, and then aligned with those from the National Center for Biotechnology Information and ARG-ANNOT sequence database using the BLAST program.<sup>26</sup>

#### Multilocus sequence typing

Multilocus sequence typing (MLST) was performed for carbapenemase-producing *E. coli* using seven housekeeping genes (*adhA*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, and *recA*). The obtained sequences were analyzed through *E. coli* MLST Database website (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>). The MLST concatenated gene sequence-based phylogenetic tree of our *E. coli* strains, with those of the most clones isolated from migratory birds in the Mediterranean area, was constructed to illustrate their phylogenetic position and clusterization. The phylogenetic tree was built using Mega 6 software, with the Neighbor-Joining method,<sup>27</sup> and the evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter method.<sup>28</sup>

## Results

### Bacterial isolates and antibacterial susceptibility

Three carbapenemase-producing strains (A1, A2, and A3) were isolated and identified as *E. coli* by API20E and confirmed by MALDI-TOF MS. The isolates showed multiple resistance to antibiotics. The antibiotic resistance percentages were as follows: 100% for amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cefoxitin, ertapenem, gentamicin, and trimethoprim-sulfamethoxazole, 66.66% for cefotaxime, and 33.33% for ceftazidime, cefepime, aztreonam, and ciprofloxacin (Table 1). All isolates were 100% susceptible to imipenem and amikacin. The isolates displayed MIC values within the susceptible range for imipenem (0.094–0.25 mg/L), colistin (0.016–0.094 mg/L), and tigecycline (0.047–0.094 mg/L) (Table 1).

### Phenotypic and molecular detection of $\beta$ -lactamase activity

The strain A1 revealed a positive synergy test that suggests ESBL coproduction. All the tested strains harbored the *bla*<sub>OXA-48</sub> gene. However, the presence of other carbapenemase determinants (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, and *bla*<sub>IMP</sub>) was negative. Screening for the other  $\beta$ -lactamase determinants demonstrated that all isolates coexpress the *bla*<sub>TEM</sub> gene, whereas only one of them (strain A1) additionally harbored the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> ESBL gene (Table 1).



**FIG. 1.** MLST-based phylogenetic tree of the most  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* clones isolated from migratory birds in the Mediterranean area. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method.<sup>27</sup> The evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter method.<sup>28</sup> The number above the nodes is the level of bootstrap from 1,000 replicates. MLST, multilocus sequence typing.

Multilocus sequence typing

MLST identified that the strains A2 and A3 belonged to the sequence type (ST) 38. However, the A1 strain presented an allelic combination not available in the *E. coli* MLST Database, most likely belonging to a new ST. The MLST-based phylogenetic tree showed that the two obtained *E. coli* isolates (A2 and A3) clustered together with that found in white stork from Spain (ST38) (Fig. 1).<sup>29-31</sup>

Discussion

Long-distance bird migration has been examined in the geographic spread of several pathogens.<sup>32</sup> Many previous studies worldwide have shown that migratory birds play an important role in the dissemination of resistant GNB, more specifically  $\beta$ -lactam-resistant Enterobacteriaceae.<sup>29,32</sup> Most of the investigations performed on the antibiotic resistance

level of wild birds' microflora were focused on the detection of ESBL producers.<sup>32,33</sup> Recently, the mobile colistin resistance gene *mcr-1* has been identified in ESBL-producing *E. coli* isolates from infected migratory Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*).<sup>34</sup> Very recently, Guenther *et al.* have found a similarity between European clinical isolates and a Mongolian wildlife isolate, which underlines the zoonotic character and global environmental dimension of ESBL-producing *E. coli*.<sup>35</sup> However, the isolation of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae has rarely been reported.<sup>36,37</sup>

Our study presents the first initiative in Algeria on the screening of carbapenemase-producing *E. coli* in white stork stools. This work allowed us for the first time to describe OXA-48-producing *E. coli* isolates in white stork stools. One of the OXA-48-producing *E. coli* isolates obtained in this study coexpressed *bla*<sub>CTX-M-15</sub> ESBL and *bla*<sub>TEM</sub> genes (A1); this association of  $\beta$ -lactamase genes has never been

Downloaded by University of Wollongong from www.liebertpub.com at 05/07/18. For personal use only.

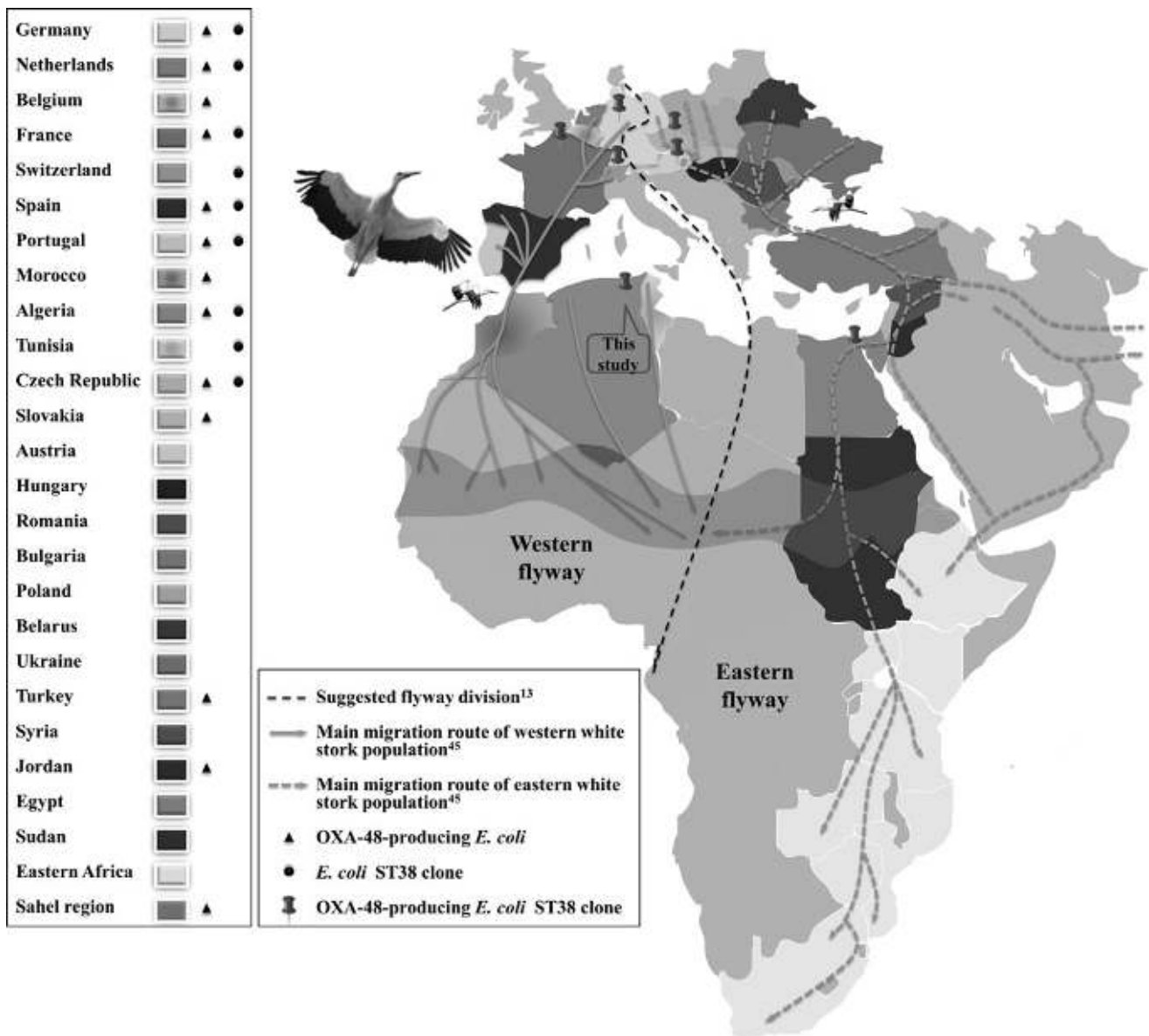


FIG. 2. Distribution of OXA-48-producing *Escherichia coli* and *E. coli* sequence type 38 clone in most of the countries included in the main migration routes of white stork population.<sup>10,13,38-41,43,45-66</sup>

reported in birds. However, the coproduction of ESBL and carbapenemase in Enterobacteriaceae had already been described in companion animals.<sup>38</sup> The isolation of  $\beta$ -lactamase-producing *E. coli* from white stork feces has already been reported in Spain; however, only *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub>, and *bla*<sub>TEM-1b</sub> genes were detected.<sup>29</sup>

In the absence of direct antibiotic pressure, the carriage of  $\beta$ -lactamase producers could be due to contamination by human waste products, or agricultural areas rich in livestock.<sup>29</sup> Thus, migratory birds can easily be infected through their feeding habits related to garbage dumps and sewage, which are frequently colonized by resistant bacteria,<sup>12</sup> making these birds a potential reservoir of these bugs.<sup>29</sup>

The first report on carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from migratory birds was in Germany by Fischer *et al.*, where they described a New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1)-producing *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Corvallis in black kite (*Milvus migrans*). The black kite migratory bird spends the summer in Europe and winters in North Africa (south of the Sahara).<sup>36</sup> The main migratory passage of this bird across the Mediterranean Sea occurs at the Strait of Gibraltar, or along the East coast of the Black Sea, thereby crossing the Balkan countries, known for the high prevalence of bacteria carrying *bla*<sub>NDM-1</sub>,<sup>36</sup> which may explain the carriage of such organisms. Recently, IMP-4-producing Enterobacteriaceae have been described in silver gull migratory bird (*Chroicocephalus novaehollandiae*) on the coast of Australia, where it may be a potential vector of IMP-producing strains.<sup>37</sup>

MLST analysis revealed that the A2 and A3 strains belonged to the ST38 which is widely disseminated in the European and Mediterranean area, such as the Netherlands,<sup>39</sup> Spain,<sup>40</sup> and France (the patient travel history included Turkey and Egypt).<sup>41</sup> ST38 is also detected among wild bird isolates in Canada (CTX-M-15 and TEM-1 producers)<sup>32</sup> and Florida (CMY-2 producer).<sup>42</sup> More recently, Alcalá *et al.* identified the CTX-M-1-producing *E. coli* ST38 clone in a stool sample of white stork migratory bird in Spain.<sup>29</sup> This ST was associated with OXA-48 production in clinical isolates from Germany<sup>43</sup> and France.<sup>41</sup>

The first and up to date, the unique detection of OXA-48-producing *E. coli* clone ST38 from animals was in fowl from Lebanon.<sup>44</sup> In this study, we report for the first time, the detection of OXA-48-positive *E. coli* clone ST38 in Algeria, as well as its first description in the migratory bird species of *C. ciconia*. Interestingly, white storks have long been considered to diverge into eastern and western migration pools as a result of independent overwintering flyways.<sup>13</sup> Western individuals, including the northern Africa population target the Sahel region in Africa as their overwintering area.<sup>13</sup> The eastern migration pool follows a path through Istanbul to the eastern Sahelian region and South Africa (overwintering areas)<sup>13</sup> (Fig. 2).<sup>10,13,38–41,43,45–66</sup> We believe that the overwintering region of Sahel could be a potential area for the dynamic transmission of antimicrobial resistance genes and pathogens between white storks. This makes *C. ciconia* migratory birds potential vectors of MDR bacteria. Both eastern and western white stork populations cross the Mediterranean through Turkey and Spain, where OXA-48 was initially detected and then extensively reported.<sup>6</sup> Berthold *et al.* showed that Algeria could represent an overwintering area for western European white storks

through the satellite tracking of a female white stork from Switzerland. This white stork overwintered in Morocco and Algeria until April 2000, and stayed in central Spain from May to August, then overwintered in Algeria.<sup>67</sup>

The role of white storks in the intercontinental dissemination of pathogens has already been reported by Malkinson *et al.*, who demonstrated that this migratory bird is responsible of the transmission of West Nile virus to the Middle East from Europe.<sup>68</sup> Currently, we cannot exclude the contribution of international human travel and immigration to the emergence and dissemination of *bla*<sub>OXA-48</sub> gene in various countries. Nevertheless, the white stork, as a reservoir of OXA-48-producing *E. coli*, could play an important role in their spread, and may participate in the diffusion of OXA-48 through their different flyway directions.

In conclusion, the present results, and those reported in similar works, clearly confirm that migratory birds could play a significant role in the dynamic diffusion of antimicrobial resistance genes. Further studies are needed to survey the dissemination of multidrug-resistant bacteria through migratory birds.

### Acknowledgments

The authors thank TradOnline for English language corrections. This work was partly funded by the Centre national de la recherche scientifique (CNRS) 7278 and IHU Médi-terranée Infection.

### Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

### References

1. Nordmann, P., L. Dortet, and L. Poirel. 2012. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! Trends Mol. Med. 18:263–272.
2. Guerra, B., J. Fischer, and R. Helmuth. 2014. An emerging public health problem: acquired carbapenemase-producing microorganisms are present in food-producing animals, their environment, companion animals and wild birds. Vet. Microbiol. 171:290–297.
3. Hawkey, P.M., and D.M. Livermore. 2012. Carbapenem antibiotics for serious infections. BMJ 344:e3236–e3236.
4. Poirel, L., A. Potron, and P. Nordmann. 2012. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. J. Antimicrob. Chemother. 67:1597–1606.
5. Nordmann, P., and L. Poirel. 2013. Strategies for identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. J. Antimicrob. Chemother. 68:487–489.
6. Djahmi, N., C. Dunyach-Remy, A. Pantel, M. Dekhil, A. Sotto, and J.-P. Lavigne. 2014. Epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean countries. Biomed Res. Int. 2014:305784.
7. Poirel, L., R.A. Bonnin, and P. Nordmann. 2012. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. Antimicrob. Agents Chemother. 56:559–562.
8. Poirel, L., S. Bernabeu, N. Fortineau, I. Podglajen, C. Lawrence, and P. Nordmann. 2011. Emergence of OXA-48-producing *Escherichia coli* clone ST38 in France. Antimicrob. Agents Chemother. 55:4937–4938.

9. Loucif, L., A. Kassah Laouar, M. Saidi, A. Messala, W. Chelaghma, and J.-M. Rolain. 2016. Outbreak of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* involving an ST 101 clone in Batna University Hospital, Algeria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60:7494–7497.
10. Agabou, A., A. Pantel, Z. Ouchenane, N. Lezzar, S. Khemissi, D. Satta, A. Sotto, and J.-P. Lavigne. 2014. First description of OXA-48-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone ST131 from patients hospitalised at a military hospital in Algeria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33:1641–1646.
11. Studentova, V., C.C. Papagiannitsis, R. Izdebski, Y. Pfeifer, E. Chudackova, T. Bergerova, M. Gniadkowski, and J. Hrabak. 2015. Detection of OXA-48-type carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in diagnostic laboratories can be enhanced by addition of bicarbonates to cultivation media or reaction buffers. *Folia Microbiol. (Praha)*. 60:119–129.
12. Shobrak, M.Y., and A.E. Abo-Amer. 2014. Role of wild birds as carriers of multi-drug resistant *Escherichia coli* and *Escherichia vulneris*. *Braz. J. Microbiol.* 45:1199–1209.
13. Shephard, J.M., R. Ogdan, P. Tryjanowski, O. Olsson, and P. Galbusera. 2013. Is population structure in the European white stork determined by flyway permeability rather than translocation history? *Ecol. Evol.* 3:4881–4895.
14. Foti, M., D. Rinaldo, A. Guercio, C. Giacobello, A. Aleo, F. De Leo, V. Fisichella, and C. Mammina. 2011. Pathogenic microorganisms carried by migratory birds passing through the territory of the island of Ustica, Sicily (Italy). *Avian Pathol.* 40:405–409.
15. Loucif, L., D. Gacemi-Kirane, Z. Cherak, N. Chamlal, N. Grainat, and J.-M. Rolain. 2016. First report of German cockroaches (*Blattella germanica*) as reservoirs of CTX-M-15 extended-spectrum-beta-lactamase- and OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Batna University Hospital, Algeria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60:6377–6380.
16. Lee, K., C.K. Kim, D. Yong, S.H. Jeong, J.H. Yum, Y.H. Seo, J.-D. Docquier, and Y. Chong. 2010. Improved performance of the modified Hodge test with MacConkey agar for screening carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. *J. Microbiol. Methods* 83:149–152.
17. Bakour, S., V. Garcia, L. Loucif, J.M. Brunel, A. Gharout-Sait, A. Touati, and J.-M. Rolain. 2015. Rapid identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* using a modified Carba NP test. *New Microbes New Infect.* 7:89–93.
18. Seng, P., M. Drancourt, F. Gouriet, B. La Scola, P.-E. Fournier, J.-M. Rolain, and D. Raoult. 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* 49:543–551.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI]. 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 24th Informational Supplement, M100-S24, CLSI document. CLSI, Wayne, PA.
20. EUCAST. 2016. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2016, v.1.0 Février. Société Française de Microbiologie, Paris, France. Available at [www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFM2016\\_V1\\_0\\_FEVRIER.pdf](http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFM2016_V1_0_FEVRIER.pdf).
21. Sirot, J. 1996. Detection of extended-spectrum plasmid-mediated beta-lactamases by disk diffusion. *Clin. Microbiol. Infect.* 2 Suppl 1:S35–S39.
22. Mesli, E., M. Berrazeg, M. Drissi, and J.-M. Rolain. 2013. Prevalence of carbapenemase-encoding genes including New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase in *Acinetobacter* species, Algeria. *Int. J. Infect. Dis.* 17:739–743.
23. Jarlier, V., M.H. Nicolas, G. Fournier, and A. Philippon. 1988. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.* 10:867–878.
24. Roschanski, N., J. Fischer, B. Guerra, and U. Roesler. 2014. Development of a multiplex real-time PCR for the rapid detection of the predominant beta-lactamase genes CTX-M, SHV, TEM and CIT-type AmpCs in Enterobacteriaceae. *PLoS One* 9:e100956.
25. Aubert, D., T. Naas, C. Heritier, L. Poirel, and P. Nordmann. 2006. Functional characterization of IS1999, an IS4 family element involved in mobilization and expression of beta-lactam resistance genes. *J. Bacteriol.* 188:6506–6514.
26. Gupta, S.K., B.R. Padmanabhan, S.M. Diene, R. Lopez-Rojas, M. Kempf, L. Landraud, and J.-M. Rolain. 2014. ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58:212–220.
27. Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725–2729.
28. Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16:111–120.
29. Alcalá, L., C.A. Alonso, C. Simon, C. Gonzalez-Esteban, J. Oros, A. Rezusta, C. Ortega, and C. Torres. 2015. Wild birds, frequent carriers of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of CTX-M and SHV-12 types. *Microb. Ecol.* 72:861–869.
30. Guenther, S., K. Aschenbrenner, I. Stamm, A. Bethe, T. Semmler, A. Stubbe, M. Stubbe, N. Batsajkhan, Y. Glupczynski, L.-H. Wieler, and C. Ewers. 2012. Comparable high rates of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in birds of prey from Germany and Mongolia. *PLoS One* 7:e53039.
31. Bonnedahl, J., M. Drobni, M. Gauthier-clerc, J. Hernandez, S. Granholm, G. Kahlmeter, J. Waldenstrom, A. Johansson, and B. Olsen. 2009. Dissemination of *Escherichia coli* with CTX-M Type ESBL between Humans and Yellow-Legged Gulls in the South of France. *PLoS One* 4:2–7.
32. Bonnedahl, J., J. Stedt, J. Waldenstrom, L. Svensson, M. Drobni, and B. Olsen. 2015. Comparison of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) CTX-M genotypes in Franklin gulls from Canada and Chile. *PLoS One* 10: e0141315.
33. Hernandez, J., A. Johansson, J. Stedt, S. Bengtsson, A. Porczak, S. Granholm, D. Gonzalez Acuna, B. Olsen, J. Bonnedahl, and M. Drobni. 2013. Characterization and comparison of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) resistance genotypes and population structure of *Escherichia coli* isolated from Franklin's gulls (*Leucophaeus pipixcan*) and humans in Chile. *PLoS One* 8:e76150.
34. Sellera, F.P., M.R. Fernandes, L. Sartori, M.P.N. Carvalho, F. Esposito, C.L. Nascimento, G.H. Dutra, E.M. Mamizuka, P.J. Pérez-Chaparro, and J.A. McCulloch. 2016. *Escherichia coli* carrying IncX4 plasmid-mediated mcr-1 and blaCTX-M genes in infected migratory Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). *J. Antimicrob. Chemother.* 72: 1255–1256.

35. Guenther, S., T. Semmler, A. Stubbe, M. Stubbe, L.H. Wieler, and K. Schaefer. 2017. Chromosomally encoded ESBL genes in *Escherichia coli* of ST38 from Mongolian wild birds. *J. Antimicrob. Chemother.* 72:1310–1313.
36. Fischer, J., S. Schmoger, S. Jahn, R. Helmuth, and B. Guerra. 2013. NDM-1 carbapenemase-producing *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Corvallis isolated from a wild bird in Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* 68:2954–2956.
37. Dolejska, M., M. Masarikova, H. Dobiasova, I. Jamborova, R. Karpiskova, M. Havlicek, N. Carlile, D. Priddel, A. Cizek, and I. Literak. 2016. High prevalence of *Salmonella* and IMP-4-producing Enterobacteriaceae in the silver gull on Five Islands, Australia. *J. Antimicrob. Chemother.* 71: 63–70.
38. Stolle, I., E. Prenger-Berninghoff, I. Stamm, S. Scheufen, E. Hassdenteufel, S. Guenther, A. Bethe, Y. Pfeifer, and C. Ewers. 2013. Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in dogs. *J. Antimicrob. Chemother.* 68:2802–2808.
39. van der Bij, A.K., G. Peirano, W.H.F. Goessens, E.R. van der Vorm, M. van Westreenen, and J.D.D. Pitout. 2011. Clinical and molecular characteristics of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* causing bacteremia in the Rotterdam Area, Netherlands. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:3576–3578.
40. Oteo, J., K. Diestra, C. Juan, V. Bautista, A. Novais, M. Perez-Vazquez, B. Moyá, E. Miró, T.M. Coque, A. Oliver, R. Cantón, F. Navarro, and J. Campos. 2009. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Spain belong to a large variety of multilocus sequence typing types, including ST10 complex/A, ST23 complex/A and ST131/B2. *Int. J. Antimicrob. Agents* 34:173–176.
41. Poirel, L., C. Heritier, V. Tolun, and P. Nordmann. 2004. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:15–22.
42. Poirel, L., A. Potron, C. De La Cuesta, T. Cleary, P. Nordmann, and L.S. Munoz-Price. 2012. Wild coastline birds as reservoirs of broad-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Miami Beach, Florida. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:2756–2758.
43. Kaase, M., S. Schimanski, R. Schiller, B. Beyreiss, A. Thurmer, J. Steinmann, V.-A. Kempfg, C. Hesch, I. Sobotkai, I. Fennerj, S. Ziesing, I. Burckhardt, L.-V. Müllem, A. Hamprecht, I. Tammero, N. Wantiap, K. Beckerq, T. Holzmann, M. Furitschs, G. Volmert, and S.-G. Gatermann. 2016. Multicentre investigation of carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in German hospitals. *Int. J. Med. Microbiol.* 306:415–420.
44. Al Bayssari, C., A.O. Olaitan, F. Dabboussi, M. Hamze, and J.-M. Rolain. 2015. Emergence of OXA-48-producing *Escherichia coli* clone ST38 in fowl. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59:745–746.
45. Berthold, P. 2001. *Bird Migration: A General Survey*. 2nd ed. Oxford University Press, England, DC.
46. Paltansing, S., J.A. Vlot, M.E.M. Kraakman, R. Mesman, M.L. Bruijning, A.T. Bernards, L.-G. Visser, and K. Ellen Veldkamp. 2013. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae among travelers from the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 19:1206–1213.
47. Glupczynski, Y., T.-D. Huang, W. Bouchahrouf, R. Rezende de Castro, C. Bauraing, M. Gerard, A.M. Verbruggen, A. Deplano, O. Denis, and P. Bogaerts. 2012. Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates in Belgian hospitals. *Int. J. Antimicrob. Agents* 39:168–172.
48. Potron, A., L. Poirel, E. Rondinaud, and P. Nordmann. 2013. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae over a 11-year period, 2001 to 2011. *Euro Surveill.* 18:20549.
49. Blanc, V., V. Leflon-Guibout, J. Blanco, M. Haenni, J.-Y. Madec, G. Rafteron, P. Bruno, A. Mora, C. Lopez, G. Dahbi, B. Dunais, M. Anastay, C. Branger, R. Moreau, C. Pradier, and M.-H. Nicolas-Chanoine. 2014. Prevalence of day-care centre children (France) with faecal CTX-M-producing *Escherichia coli* comprising O25b:H4 and O16:H5 ST131 strains. *J. Antimicrob. Chemother.* 69: 1231–1237.
50. Arana, D.M., D. Saez, P. Garcia-Hierro, V. Bautista, S. Fernandez-Romero, M. Angel de la Cal, J. I. Alós, and J. Oteo. 2015. Concurrent interspecies and clonal dissemination of OXA-48 carbapenemase. *Clin. Microbiol. Infect.* 21:148.e1–e4.
51. Manageiro, V., E. Ferreira, M. Pinto, and M. Canica. 2014. First description of OXA-48 carbapenemase harbored by *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* from a single patient in Portugal. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58: 7613–7614.
52. Jones-Dias, D., V. Manageiro, A.P. Martins, E. Ferreira, and M. Canica. 2016. New class 2 integron In2-4 among IncII-positive *Escherichia coli* isolates carrying ESBL and PMAbeta genes from food animals in Portugal. *Foodborne Pathog. Dis.* 13:36–39.
53. Barguigua, A., F. El Otmani, M. Talmi, K. Zerouali, and M. Timinouni. 2013. Prevalence and types of extended spectrum beta-lactamases among urinary *Escherichia coli* isolates in Moroccan community. *Microb. Pathog.* 61–62: 16–22.
54. Belmahdi, M., S. Bakour, C. Al Bayssari, A. Touati, and J.-M. Rolain. 2016. Molecular characterisation of extended-spectrum beta-lactamase- and plasmid AmpC-producing *Escherichia coli* strains isolated from broilers in Bejaia, Algeria. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 6:108–112.
55. Guenther, S., A. Bethe, A. Fruth, T. Semmler, R.G. Ulrich, L.H. Wieler, and C. Ewers. 2012. Frequent combination of antimicrobial multiresistance and extraintestinal pathogenicity in *Escherichia coli* isolates from urban rats (*Rattus norvegicus*) in Berlin, Germany. *PLoS One* 7:e50331.
56. Grisold, A.J., M. Hoenigl, I. Ovcina, T. Valentin, and S. Fruhwald. 2013. Ventilator-associated pneumonia caused by OXA-48-producing *Escherichia coli* complicated by ciprofloxacin-associated rhabdomyolysis. *J. Infect. Chemother.* 19:1214–1217.
57. Galler, H., G. Feierl, C. Peternel, F.F. Reinthaler, D. Haas, A.J. Grisold, J. Luxner, and G. Zarfel. 2014. KPC-2 and OXA-48 carbapenemase-harboring Enterobacteriaceae detected in an Austrian wastewater treatment plant. *Clin. Microbiol. Infect.* 20:O132–O134.
58. Dobiasova, H., M. Dolejska, I. Jamborova, E. Brhelova, L. Blazkova, I. Papousek, M. Kozlova, J. Klimes, A. Cizek, and I. Literak. 2013. Extended spectrum beta-lactamase and fluoroquinolone resistance genes and plasmids among *Escherichia coli* isolates from zoo animals, Czech Republic. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85:604–611.
59. Skalova, A., K. Chudejova, V. Rotova, M. Medvecký, V. Studentova, E. Chudackova, P. Lavicka, T. Bergerova,

- V. Jakubu, H. Zemlickova, C.C. Papagiannitsis, and J. Hrabak. 2016. Molecular characterization of OXA-48-like-producing Enterobacteriaceae in the Czech Republic: evidence for horizontal transfer of pOXA-48-like plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61 pii: e01889–16.
60. Baran, I., and N. Aksu. 2016. Phenotypic and genotypic characteristics of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a tertiary-level reference hospital in Turkey. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 15:20.
61. Zahedi Bialvaei, A., H. Samadi Kafil, H. Ebrahimzadeh Leylabadlo, M. Asgharzadeh, and M. Aghazadeh. 2015. Dissemination of carbapenemases producing Gram negative bacteria in the Middle East. *Iran. J. Microbiol.* 7:226–246.
62. Poirel, L., M.O. Abdelaziz, S. Bernabeu, and P. Nordmann. 2013. Occurrence of OXA-48 and VIM-1 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Egypt. *Int. J. Antimicrob. Agents* 41:90–91.
63. Muller, A., R. Stephan, and M. Nuesch-Inderbinen. 2016. Distribution of virulence factors in ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from the environment, livestock, food and humans. *Sci. Total Environ.* 541:667–672.
64. Lahlaoui, H., and M. Ben Moussa. 2011. CTX-M-14 type beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolated from hospitalized patients in Tunisia. *APMIS* 119: 759–761.
65. Zurfluh, K., M.T. Nuesch-Inderbinen, L. Poirel, P. Nordmann, H. Hachler, and R. Stephan. 2015. Emergence of *Escherichia coli* producing OXA-48 beta-lactamase in the community in Switzerland. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 4:9.
66. Moquet, O., C. Bouchiat, A. Kinana, A. Seck, O. Arouna, R. Bercion, S. Breurec, and B. Garin. 2011. Class D OXA-48 carbapenemase in multidrug-resistant enterobacteria, Senegal. *Emerg. Infect. Dis.* 17:143–144.
67. Berthold, P., A. Aebischer, M. Kaatz, and U. Querner. 2002. Erstnachweis der Wanderungen und Aufenthaltsgebiete eines Weißstorchs *Ciconia ciconia* vom Ausfliegen bis zum ersten Brüten mit Hilfe der Satelliten-Telemetrie. *Ornithol. Beob* 99:227–229. (In German).
68. Malkinson, M., C. Banet, Y. Weisman, S. Pokamunski, R. King, M.-T. Drouet, and V. Deubel. 2002. Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerg. Infect. Dis.* 8:392–397.

Address correspondence to:

Jean-Marc Rolain, PharmD, PhD  
 Unité de Recherche Sur Les Maladies Infectieuses  
 et Tropicales Émergentes (URMITE)  
 UM 63, CNRS 7278, IRD 198, INSERM 1095  
 IHU Méditerranée Infection  
 Faculté de Médecine et de Pharmacie  
 Aix-Marseille-Université  
 Marseille 13005  
 France

E-mail: jean-marc.rolain@univ-amu.fr