

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mohamed Chérif Messaadia – Souk Ahras

Institut des sciences agronomiques et vétérinaires

Thèse

Présentée pour obtenir le diplôme de

Doctorat En Sciences

Filière : Sciences vétérinaires

Spécialité : Microbiologie vétérinaire et épidémiologie des
pathologies animales

Titre

**Gènes de résistance aux antibiotiques
de la microflore intestinale chez les bovins**

Présentée par

BAROUR Djanette

Devant le jury suivant

1	Pr CHEFROUR A	Pr	U . Souk Ahras	Président du Jury
2	Dr BOUZID R	MCA	U El Tarf	Examineur
3	Dr MERDACI L	MCA	U El Tarf	Examinatrice
4	Dr AYARI A	MCA	U. Souk-Ahras	Examineur
5	Dr BOULEBDA N	MCA	U. Souk-Ahras	Directeur de thèse

Remerciements

Je remercie Allah le clément et miséricordieux, qui m'a guidé vers le droit chemin, celui du savoir et m'a aidé pour tout accomplissement.

Mes remerciements vont tout d'abord à mon directeur de thèse , Docteur Nadji Boulebda, qui m'a encadré avec un grand enthousiasme et m'a soutenu et encouragé pour la réalisation de cette thèse, avec beaucoup de bonté et de générosité.

A monsieur le professeur Abdelghani Djahoudi, pour son aide technique et de m'avoir initié à l'antibiorésistance.

A Monsieur le Professeur Azzedine Chefrou, qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider le jury de ma thèse. Qu'il trouve ici le témoignage de ma profonde gratitude.

A Madame et Messieurs les docteurs Latifa Merdaci, Bouzid Riad et Adel Ayari, qui m'ont honoré en acceptant de juger mes travaux de thèse et d'avoir consacré leur temps pour la lecture et l'analyse de ce travail.

A Monsieur le docteur Mohamed Salah Abbassi, qui a accepté de m'accueillir dans son laboratoire de recherche bactériologique au sein de Institut de la recherche vétérinaire de Tunisie, je le remercie pour ses qualités scientifiques et humaines, notamment son dévouement, ses orientations, sa générosité, et sa patience durant et même après ma période de stage.

A Monsieur le docteur Yahia Atia , directeur du Laboratoire d'analyses médicales « Ezahra, », pour son aide , ses conseils et précieuses orientations, qui m'ont été d'une très grande utilité.

A l'équipe des ingénieurs de laboratoire de l'ISAV de Taoura et à leur tête, l'ingénieur de laboratoire Monsieur Laadjailia Yacine, pour son aide et sa gentillesse.



Dédicace

Je dédie cette thèse à :

*La mémoire de ma chère mère, Que Dieu lui apporte paix et
miséricorde et l'accueille dans son vaste paradis.*

Mon cher père, que Dieu le préserve et lui procure santé et longue vie.

Mes chers frères et sœurs.

RESUME

En Algérie, le manque d'informations sur l'antibiorésistance chez les *Escherichia coli* commensales du microbiote intestinal bovin, nous a incité à mener cette étude pour caractériser les souches *E coli* productrices de bêta-lactamases à spectre étendu.

Un total de 300 souches d'*E coli* a été isolé à partir de fèces de bovins, élevés dans des fermes des wilaya de l'Est Algérien : Souk Ahras, Tébessa, Oum el Bouaghi et Constantine.

La sensibilité aux antibiotiques est testée par la méthode de diffusion sur gélose, en utilisant un panel de 13 antibiotiques, la sensibilité à la colistine (CMI) est effectuée par microdilution sur milieu liquide. Des fréquences élevées de résistance sont enregistrées pour l'ampicilline (63.67%), tétracycline (44.67%), céphalotine (26.33%) et triméthoprime / sulfaméthoxazole (18.67%) par contre (1%) des isolats sont résistants à la colistine. L'analyse de corésistance révèle que (65/21.67%) des isolats sont résistants à plus de trois antibiotiques et (89/29.67%) des isolats présentant une multirésistance (MDR). On a isolé 77 phénotypes de résistance différents, Les deux phénotypes les plus fréquents sont AMP(13.33%) et AMP-TE (11%).

Douze phénotypes différents sont producteurs de β -lactamases à spectre étendu, tous sont des MDR allant de la résistance à 5 antibiotiques jusqu'à la combinaison de 11.

L'analyse génotypique par PCR des 12 isolats d'*E coli* productrices de bêta-lactamases à spectre étendu, révèle leur appartenance aux groupes phylogéniques A₁(83.33%) et B1(16.66%), 03 souches hébergent le gène *blaCTX-M* du groupe1 et 12 hébergent le gène *blaTEM*,

Nous rapportons pour la première fois, la détection d'intégrons de classe 1 et de la séquence *qacE-sulI* chez 7 isolats, ainsi que la première mise en évidence du gène *mcr-1* chez trois isolats et les gènes *qnrB* et *qnrS*, respectivement chez trois et deux isolats et ceci a partir de fèces de bovins dans l'Est de l'Algérie.

Six isolats portent le gène *tetA* et 2 portent le gène *tetB*, le gène *sulI* est détecté chez 9 isolats.

Douze pulsotypes différents sont identifiés par PFGE. 10 gènes de facteurs de virulence ont été identifiés, avec une prédominance des gènes *fimH* et *iutA*, et un seul isolat porte le gène *stx1*. Trois pathovars sont mis en évidence :STEC(1 isolat), MNEC(2 isolats), et EAggEC(3 isolats).

Ces taux élevés de résistance aux antibiotiques, ainsi que la multitude de gènes de résistance et de facteurs de virulence détectés, démontrent que les souches *E coli* isolées du microbiote intestinal bovin sont une source potentielle de résistance aux antibiotiques, ce qui souligne l'urgence de mettre en œuvre des mesures pour lutter contre le phénomène d'antibiorésistance afin de contrôler la propagation des bactéries multirésistantes de l'animal à l'homme et à l'environnement.

Mots-clés: résistance aux antibiotiques, BLSE, gènes, facteurs de virulence, PCR, PFGE, bovins, Est algérien, *Escherichia coli*.

ABSTRACT

In Algeria, the lack of information about antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* of bovine intestinal microbiota, prompted us to conduct this study to characterize the *E coli* strains producing extended spectrum beta-lactamases.

A total of 300 strains of *E coli* are isolated from cattle faeces, the study was carried out in several localities of the governorates of Souk Ahras, Tébessa, Oum el Bouaghi and Constantine , all located in the East of Algeria

Antibiotic sensitivity is carried out by using disk diffusion method , with a panel of 13 antibiotics, colistin MIC is tested by broth microdilution method . High frequencies of resistance are recorded for ampicillin (63.67%), tetracycline (44.67%), cephalotin (26.33%) and trimethoprim / sulfamethoxazole (18.67%), however (1%) isolates are resistant to colistin. Co-resistance analysis reveals that (65 / 21.67%) isolates are resistant to more than three antibiotics and (89 / 29.67%) isolates are multidrug resistant (MDR). 77 different resistance phenotypes were isolated, more common are AMP (13.33%) and AMP-TE (11%).

Twelve different phenotypes produce extended spectrum β -lactamases, all of which are MDR ranging from resistance to 5 antibiotics to the combination of 11.

Genotypic analysis by PCR of the 12 *E coli* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases, reveals their belonging to the phylogenic groups A1 (83.33%) and B1 (16.66%), 03 strains harbor the group1 *blaCTX-M* gene and 12 harbor the *blaTEM* gene,

We report here the first detection of class 1 integrons and the *qacE-sulI* sequence in 7 isolates, as well as the detection of the *mcr-1* gene in 3 isolates and the *qnrB* and *qnrS* genes respectively in 3 and 2 isolates and this from cattle faeces in eastern Algeria.

Six isolates carry the *tetA* gene and 2 carry the *tetB* gene, the *sulI* gene is detected in 9 isolates.

Twelve different pulsotypes are identified by PFGE. 10 virulence genes have been identified, with a predominance of the *fimH* and *iutA* genes, and a single isolate carries the *stxI* gene. Three Virulotypes are classified as STEC(1 isolate), MNEC(2 isolates) and EA_gEC(3 isolates).

These high rates of antimicrobial resistance, as well as the multitude of antibiotic resistance genes and virulotypes detected, demonstrate that *E. coli* strains isolated from the bovine intestinal microbiota are a potential source of antibiotic resistance, emphasizes the urgent requirement to adopt measures to combat the phenomenon of antimicrobial resistance in order to control the spread of MDR bacteria from animals to humans and the environment.

Keywords: antimicrobial resistance, ESBL, genes, virulence factors, PCR, PFGE, cattle, eastern Algeria, *Escherichia coli*.

ملخص

دفعنا نقص المعلومات حول مقاومة المضادات الحيوية عند اشيريشيا كولي المتواجدة في الميكروبات المعوية البقرية ، إلى إجراء هذه الدراسة لتحديد خصائص سلالات اشيريشيا كولي المنتجة للبيتاالاكتاماز واسع المدى.

تم تنفيذ حساسية المضادات الحيوية باستخدام طريقة نشر القرص ، بأستعمال 13 من المضادات الحيوية ، يتم اختبار التركيز الأصغر المثبط للكولستين عن طريق طريقة التخفيف في وسط سائل. تم تسجيل نسب عالية للمقاومة للأمبيسلين (63.67٪) ، التتراسيكلين (44.67٪) ، السيفالوتين (26.33٪) وتريميثوبريم / سلفاميثوكسازول (18.67٪) و (1) مقاومة للكوليستين. يكشف تحليل المقاومة المشتركة أن (21.67٪ / 65) بكتيريا معزولة مقاومة لأكثر من ثلاثة مضادات حيوية و (29.67٪ / 89) بكتيريا معزولة تملك مقاومة متعددة.

تم عزل 77 من الأنماط المختلفة المقاومة ، وأكثرها شيوعاً هي الأمبيسلين 13.33 بالمئة و الأمبيسلين+تيتراسيكلين 11 بالمئة.

سجلنا 12 نمطاً ظاهرياً مختلفاً منتجاً للبيتاالاكتاماز واسع المدى و كلها متعددة المقاومة و تتراوح من 5 مضادات حيوية إلى مجموعة 11 مضاد حيوي.

. التحليل الوراثي بواسطة تفاعل البوليميراز المتسلسل ل 12 اشيريشيا كولي المنتجة للبيتااماكتاز واسع المدى ،

يكشف عن انتمائهم إلى ، المجموعات الفيلوجينية. B1 (16.66٪) و A1(83.33٪).

تم الكشف لأول مرة في براز الأبقار في الجزائر:

Class1 integrons (7), qacE-sul1 sequence(7), *mcr-1*(3), *qnrB*(3), *qnrS*(2)

كما تم الكشف عن الجينات:

Bla TEM(12), *CTX-M-1*(3), *tet A*(6), *tet B*(2), *sul 1*(9) ,

12 pulsotypes (PFGE)

كما تم الكشف عن عوامل الخطورة و الأنواع الممرضة الأتية:

fimH , *iutA* , *stx1*. Virulotypes STEC(1), MNEC(2),EAggEC(3).

هذه المعدلات المرتفعة لمقاومة المضادة الحيوية ، فضلاً عن تعدد جينات المقاومة للمضادات الحيوية ، عوامل الخطورة و الأنواع الممرضة المكتشفة ، تثبت أن سلالات اشيريشيا كولي المعزولة من الكائنات الحية الدقيقة المعوية للأبقار تشكل مصدراً محتملاً لمقاومة المضادات الحيوية و تشدد على الحاجة الملحة إلى اعتماد تدابير لمكافحة ظاهرة مقاومة المضادات الحيوية من أجل السيطرة على انتشار البكتيريا متعددة المقاومة من الحيوانات إلى البشر والبيئة.

الكلمات المفتاحية: مقاومة المضادات الحيوية ، البيتاالاكتاماز واسع المدى، الجينات، عوامل الخطورة،

تفاعل البوليميراز المتسلسل، اشيريشيا كولي، الماشية ، شرق الجزائر ، PFGE

TABLE DES MATIERES	
LISTE DES ABREVIATIONS	I
LISTE DES TABLEAUX	II
LISTE DES FIGURES	IV
INTRODUCTION	
SYNTHE BIBLIOGRAPHIQUE	
CHAPITRE I : LA MICROFLORE INTESTINALE	3
1.1 Notion de microbiote intestinal	3
1.2 Composition de la flore commensale digestive des ruminants	3
1.2.1 La méthode classique	3
1.2.2 La méthode récente	4
1.3 Intérêt de l'étude de la flore commensale par rapport à la flore pathogène	5
1.3.1 Effet des traitements antibiotiques sur la flore commensale	5
1.3.2 Interactions flore commensale/flore pathogène	5
CHAPITRE II : GENERALITES SUR <i>ESCHERICHIA COLI</i>	6
2.1 Taxonomie et définition	6
2.2 Caractères bactériologiques	6
2.2.1 Souches typiques d' <i>Escherichia coli</i>	6
2.2.2 Souches atypiques d' <i>Escherichia coli</i>	7
2.3 Propriétés antigéniques	8
2.3.1 Les antigènes somatiques ou de paroi O	8
2.3.2 Les antigènes flagellaires H	9
2.3.3 Les antigènes d'enveloppe ou de surface	9
2.3.4 Les antigènes fimbriaires ou piliars F ou antigènes protéiques	10
2.4 Les pathovars d' <i>Escherichia coli</i>	10
2.4.1 Les pathogènes intestinaux	10
2.4.2 <i>E. coli</i> pathogènes extra-intestinaux	12
2.5 Les groupes phylogénétiques	13
2.6 Organisation et dynamique du génome	14
2.6.1 Le core-génome ou squelette génomique	15
2.6.2 Le génome unique	15
2.6.3 Le génome périphérique	15
CHAPITRE III : ANTIBIORESISTANCE: ORIGINE, MECANISMES ET EVOLUTION	17
3.1 Définition de l'antibiorésistance	17
3.2 Les types de résistance bactérienne	18
3.2.1 La résistance naturelle	18
3.2.2 La résistance acquise	18
3.3 Transmission de la résistance bactérienne	19
3.3.1 Transmission par mutation	19

3.3.2 Transmission par transfert de matériel génétique	17
3.4 Supports génétiques impliqués dans le transfert de gènes	22
3.4.1 Les plasmides	22
3.4.2 Les transposons	22
3.4.3 Les éléments intégratifs conjugatifs ou mobilisables	24
3.4.4 Les intégrons	24
3.5 Sélection et évolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques	25
3.5.1 Sélection et diffusion des bactéries résistantes	25
3.5.2 Evolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques	26
3.6 Mécanismes biochimiques de résistance aux antibiotiques	30
3.6.1 L’Inhibition enzymatique	30
3.6.2 Modification ou remplacement de la cible de l’antibiotique	32
3.6.3 Perméabilité réduite	33
3.6.4 Le système d’efflux	34
ETUDE EXPERIMENTALE	
1 CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L’ETUDE	36
2 MATERIEL ET METHODES	37
2.1 Zone d’étude	37
2.2 Echantillonnage	37
2.3 Etude phénotypique	38
2.3.1 Isolement et identification des souches d’ <i>Escherichia coli</i>	38
2.3.2 Etude de la sensibilité aux antibiotiques	38
2.3.3 L’étude de la sensibilité à la colistine	40
2.4 Etude génotypique	42
2.4.1 Extraction de l’ADN bactérien	42
2.4.2 PCR des gènes codant les Béta Lactamase à Spectre Etendu	43
2.4.3 Séquençage des gènes de bêta-lactamases	44
2.4.4 Détermination de la présence des intégrons par PCR	45
2.4.5 Détection des gènes <i>mcr1</i> et <i>mcr 2</i> codant la résistance à la colistine	47
2.4.6 Détermination des gènes des résistances plasmidiques aux quinolones (<i>qnr</i>) chez <i>Escherichia. coli</i>	47
2.4.7 Détection des gènes de résistances à la tétracycline et aux sulfamides	48
2.4.8 Détermination des gènes codant pour les facteurs de virulence par PCR	50
2.4.9 Détermination des Groupes phylogénétiques par PCR	53
2.4.10 Etude de la clonalité des isolats d’ <i>Escherichia Coli</i> électrophorèse en champ pulsé (PFGE: : Pulsed Pulsed Field Gel Electrophoesis)	55
2.5 Analyses statistiques	58
3. RÉSULTATS	59
3.1 Identification des isolats	59
3.2 Étude phénotypique de la sensibilité aux antibiotiques	59

3.2.1 Taux de résistances aux antibiotiques dans les différentes régions de l'étude chez <i>Escherichia coli</i>	59
3.2.2 Taux global de résistance aux antibiotiques	60
3.2.3 Corésistances et taux de Multirésistances(MDR)	63
3.2.4 Variété de profils de phénotypes de résistance aux antibiotiques	64
3.3 Étude génotypique de la sensibilité aux antibiotiques	68
3.3.1 Détection des gènes de résistance aux bêta-lactamines	68
3.3.2 Détection de l'intégron de classe 1 et de la séquence <i>qacE-sulI</i>	71
3.3.3 Détection des gènes de résistance à la colistine	71
3.3.4 Détection des gènes de résistance aux quinolones	71
3.3.5 Détection des gènes de résistance aux tétracyclines	74
3.3.6 Détection des gènes de résistance aux sulfamides et au triméthoprim	75
3.4 Détection des gènes de virulence	76
3.5 Détermination des groupes phylogénétiques	83
3.6 Typage des souches par électrophorèse en champs pulsés (PFGE).	84
4. DISCUSSION	86
5 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	98
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	101

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AEEC	<i>E. coli</i> attachant et effaçant
AFSSA	Agence française de sécurité sanitaire des aliments
APEC	<i>E. coli</i> pathogènes aviaires
BGN	Bacille à Gram négatif
BHI	Brain heart infusion
BLSE	Bêta-lactamase à Spectre Etendu
C3G	Céphalosporines de troisième génération
CLSI	« Clinical and Laboratory Standards Institute »
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CTX-M	Bêta-lactamase, « active on cefotaxime, first isolated at Munich »
DAEC	<i>E. coli</i> à adhésion diffuse
dNTP	Deoxynucleotide
EAEC	<i>E. coli</i> entéro agrégatifs
EAggEC	<i>E. coli</i> entéro agrégatifs
EDTA	Ethylène diamine tétraacétique
EHEC	<i>E. coli</i> entérohémostatiques
EIEC	<i>E. coli</i> entéro-invasifs
ExPEC	<i>E. coli</i> extra-intestinaux
IS	Séquence d'insertion
kpb	kilopaire de bases
LB	Milieu Luria Bertani
MDR	Multidrug -resistant
MLS	Macrolides, Lincosamides, Streptogramines
NMEC	<i>E. coli</i> des méningites néonatales
pb	Paire de bases
PCR	Polymérase chaîne réaction
PDR	Pan drug –resistant
PFGE	Pulse Field Gel Electrophoresis
SePEC	<i>E. coli</i> septicémiques
SHV	Bêta-lactamase, « <i>sulfhydryl reagent variable</i> »
STEC	<i>E. coli</i> shigatoxinogènes
TBE	Tris, Borate, EDTA
TEM	Bêta-lactamase, d'après le nom du patient Temoneira chez qui elle a été identifiée pour la première fois
Tn	Transposon
UPEC	<i>E. coli</i> uropathogènes
VTEC	<i>E. coli</i> vérotoxinogènes
WHO	World Health Organization
XDR	Extensively drug-resistant

LISTE DES TABLEAUX

Numéro	Titre	Page
	Syntèse Bibliographique	
	Chapitre I : La microflore intestinale	
	Chapitre 02-Généralités sur <i>Escherichia coli</i>	
01	Caractères biochimiques différentiels du genre <i>Escherichia</i> et des genres d' <i>Enterobacteriaceae</i> proches (Farmer et al., 1985)	08
	Chapitre 03- Antibiorésistance: origine, mécanismes et évolution.	
02	Entérobactéries; catégories d'antimicrobiens et agents(antibiotiques) utilisés pour définir les MDR, XDR et PDR (feuille de travail pour catégoriser les isolats) (Magiorakos et al., 2012).	28-29
03	Famille de β -lactamases (Pitout et al., 2004; Sanders & Sanders, 1992)	31
	Partie Expérimentale	
04	Localisation et nombre de prélèvements	38
05	Concentrations des disques d'antibiotiques et valeurs critiques des zones d'inhibition pour la sensibilité antimicrobienne et la concentration minimale inhibitrice pour la sensibilité à la Colistine (CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute)., 2018)	41
06	Les amorces et les tailles des fragments de gènes de bêta-lactamases(Jouini et al., 2007; Yolanda Sáenz et al., 2004)	44
07	Les amorces utilisées pour la détermination de la présence des intégrons de classe 1 et 2, des régions variables et de la région 3' conservé de l'intégron classe 1(<i>Y. Sáenz et al., 2010</i>)	46
08	Les amorces utilisées pour la détermination des gènes (<i>mcr1</i> et <i>mcr2</i>) et les conditions d'amplification chez <i>Escherichia. coli</i> (Wang et al., 2018)	47
09	Les amorces utilisées pour la détermination de trois gènes (<i>qnr</i>) chez <i>Escherichia. coli</i> (Cattoir et al., 2007)	48
10	Amorces et conditions d'amplification des gènes codant pour la résistance aux tétracyclines(Guardabassi et al., 2000)	49
11	Amorces et conditions d'amplification des gènes codant pour la résistance aux sulfamides (Mazel et al., 2000) Yolanda Sáenz et al., 2004)	49
12	Amorces utilisées pour la recherche des gènes de virulences (Nazek Al-Gallas et al., 2007; Beaudry et al., 1996; Chapman et al., 2006; Tornieporth et al., 1995; Wu et al., 2007)	50-52
13	Conditions d'amplification des gènes de virulence (Chapman et al., 2006; Wu et al., 2007)	53
14	Liste des amorces utilisées pour la détermination des groupes phylogénétiques d' <i>Escherichia. coli</i> (Clermont et al., 2000)	54
15	Interprétation des résultats de PCR des groupes phylogéniques (Clermont et al., 2000).	55

Numéro	Titre	Page
16	Taux de résistance aux antibiotiques chez les isolats d' <i>Escherichia coli</i> dans les quatre régions de l'étude	61
17	Fréquences de résistance aux antibiotiques chez les 300 isolats d' <i>Escherichia coli</i> .	62
18	Co-résistances des 300 isolats d' <i>Escherichia coli</i> .	64
19	Résultats du test de Kruskal-Wallis	64
20	les phénotypes de résistance aux antibiotiques pour les souches d' <i>Escherichia. Coli</i> isolées dans l'étude, avec les codes des différents phénotypes.	66-68
21	Les gènes β -lactamases détectés	69
22	Les associations de gènes β -lactamases détectées	69
23	Phénotypes de virulences des souches <i>Escherichia coli</i> productrices de Béta lactamase à spectre étendu	77
24	Tableau récapitulatifs des phénotypes de résistances et des différents gènes de résistance et de virulence ainsi que les groupes phylogéniques des souches <i>Escherichia coli</i> productrices de Béta lactamase à spectre étendu	85

LISTE DES FIGURES

Numéro	Titre	Page
	Synthèse bibliographique	
	Chapitre 01 : La microflore intestinale	
	Chapitre 02-Généralités sur <i>Escherichia coli</i>	
01	Diversité phylogénétique des souches de <i>Escherichia coli</i> (Cuevas Ramos, 2010; Diallo, 2013; Miquel, 2010)	14
02	Représentation de la composition du génome moyen d' <i>Escherichia. coli</i> (Van Elsas et al., 2011)	16
	chapitre 03- Antibiorésistance: origine, mécanismes et évolution.	
03	Mécanismes de transfert de gènes de résistance (AFSSA, 2006)	22
04	Diagramme montrant la relation entre MDR, XDR et PDR (Magiorakos et al., 2012)	27
05	Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques chez une bactérie Gram négative, adapté de Guardabassi et Courvalin (2006)	32
	Partie Expérimentale	
06	Carte de l'Algérie montrant les sites d'échantillonnage de l'étude (La carte a été générée avec (Adobe Illustrator v19) (Barour.,2020)	37
07	Observation microscopique d'une coloration de Gram d' <i>Escherichia coli</i> (Barour.,2019)	38
08	Test de synergie positif entre les disques de Céfotaxime (CTX) d'une part et le disque d'Amoxicilline/ Acide –clavulanique (AMC) d'autre part, indiquant la production de Béta lactamase à spectre étendu (Barour., 2019).	39
09	Une plaque de micro-dilution (Barour.,2020)	42
10	Schéma illustrant la technique de PFGE (Barour.,2020)	57
11	Fréquences de résistance aux antibiotiques des 300 isolats d' <i>Escherichia coli</i> .	63
12	Dendrogramme montrant les phénotypes d'antibiorésistance des 300 souches d' <i>Escherichia coli</i> isolées dans l'étude.	65
13	Distribution des gènes de β -lactamases détectés	69
14	Gel représentatif d'électrophorèse de PCR du gène <i>bla</i> _{TEM} (1150 pb) des souches étudiées.	70
15	Gel représentatif d'électrophorèse de PCR de gène <i>bla</i> _{CTX-M} de groupe 1(1041pb).	70
16	Gel représentatif de l'électrophorèse de PCR du gène <i>int1</i> (codant l'intégrase de l'intégron de classe 1).	71
17	Distribution des gènes de résistance à la colistine <i>mcr1</i> et <i>mcr2</i>	71
18	Gel d'électrophorèse de PCR des gènes <i>mcr-1</i> et <i>mcr-2</i> .	72
19	Distribution des gènes de résistance aux fluoroquinolones	73
20	Gel représentatif de PCR des gènes <i>qnr</i> .	73
21	Distribution des gènes de résistance aux tétracyclines : <i>tetA</i> et <i>tetB</i>	74
22	Gel représentatif d'électrophorèse de PCR du gène <i>tetA</i>	74

Numéro	Titre	Page
23	Gel représentatif d'électrophorèse de PCR du gène <i>tet B</i> .	75
24	Distribution des gènes de résistance aux sulfamides et au triméthoprim	75
25	Gel représentatif d'électrophorèse de PCR du gène <i>sul1</i>	76
26	Distribution des phénotypes de virulences des souches <i>Escherichia coli</i> productrices de BLSE	77
27	Électrophorèse des produits d'amplification par PCR du gène <i>fimH</i> .	78
28	Gel représentatif d'électrophorèse des produits de PCR du gènes <i>traT</i> (290pb).	78
29	Gel représentatif d'électrophorèse des produits de PCR du gènes <i>eastI</i> (111pb), des souches <i>Escherichia coli</i> .	79
30	Gel représentatif de la PCR du gène <i>iutA</i> , des souches <i>Escherichia coli</i> .	79
31	Gel représentatif de l'amplification par PCR du gène <i>Ast 1</i> , des souches <i>Escherichia coli</i> .	80
32	Amplification du gène <i>stx 1</i> des souches d' <i>Escherichia. coli</i>	80
33	Amplification du gène <i>ehxA</i> , des souches <i>Escherichia coli</i> .	81
34	Amplification du gène <i>eaeA</i> des souches de <i>Escherichia. coli</i> .	81
35	Électrophorèse des produits d'amplification par PCR du gène <i>iss</i> .	82
36	Électrophorèse des produits d'amplification par PCR du gène <i>ibeA</i>	82
37	Distribution des groupes phylogéniques chez <i>Escherichia coli</i> productrices de BLSE.	83
38	Gel représentatif de l'amplification des gènes <i>ChuA</i> , <i>YjaA</i> , <i>TspE4C2</i> des Isolats d' <i>E. coli</i> pour la détermination des groupes phylogénétiques.	83
39	Électrophorèse en champ pulsé de l'ADN génomique digéré par <i>XbaI</i> des isolats d' <i>Escherichia. coli</i> ..	84

INTRODUCTION

L'utilisation thérapeutique des antibiotiques chez l'Homme et l'animal est relativement récente dans l'histoire contemporaine et est considérée comme un des progrès majeurs de la médecine car elle a permis de réduire de manière spectaculaire la morbidité et la mortalité de nombreuses maladies infectieuses d'étiologie bactérienne. Les antibiotiques sont également incorporés dans les aliments de bétail et la volaille à des doses sous-thérapeutiques pour favoriser la croissance. Les antibiotiques sont cependant des médicaments très particuliers du fait de la diversité de leurs cibles (les bactéries) et de la capacité évolutive de ces dernières vers la résistance, avec pour conséquence une perte d'efficacité thérapeutique (Sanders et al., 2011; van den Bogaard et al., 2001)

Alors que les antimicrobiens sont utilisés pour cibler les organismes pathogènes, une pression de sélection simultanée est exercée sur les entérobactéries commensales, encourageant le développement et le maintien d'une résistance aux antimicrobiens chez ces bactéries (Barbosa & Levy, 2000). Les agents pathogènes résistants aux antimicrobiens et les organismes commensaux peuvent se propager à l'homme par contact direct avec les animaux (Price et al., 2007) ou par le biais de la chaîne alimentaire (Silbergeld et al., 2008; van den Bogaard & Stobberingh, 2000).

L'histoire de l'antibiorésistance a été interprétée comme un événement moderne lié à l'usage des antibiotiques; mais une étude récente de métagénomique démontre la présence dans le permafrost (30000 ans) d'un ensemble de gènes codant les résistances vis-à-vis des bêta-lactamines, tétracyclines et glycopeptides, ce qui prouve que l'antibiorésistance est un processus naturel bien antérieur à l'usage moderne des antibiotiques et les bactéries sont exposées aux antibiotiques depuis des centaines de millions d'années (D'Costa et al., 2011).

Malgré l'abondance des phénotypes de résistance aux antibiotiques observée au sein des bactéries, seuls quatre mécanismes par lesquels ces résistances sont acquises ont été décrits, qui sont tous contrôlés par l'action de gènes spécifiques: inactivation enzymatique ou modification des agents antimicrobiens, imperméabilité de la paroi ou de la membrane bactérienne, expulsion active du médicament par la pompe d'efflux cellulaire et altération des récepteurs cibles (Harbottle et al., 2006; Hariharan, 2007). Ainsi, les gènes codant pour les déterminants de la résistance antibactérienne sont situés soit sur le chromosome

bactérien, soit sur des éléments génétiques mobiles et peuvent être transmis verticalement et horizontalement (Harbottle et al., 2006; Rubens et al., 1979).

Escherichia coli constitue la majeure partie de la flore microbienne commensale aéro-anaérobie du tube digestif de l'homme et des animaux, certaines souches étant pathogènes et provoquent des troubles tels que la gastro-entérite, la cystite, la méningite, la péritonite et la septicémie. Le changement dans la résistance aux antibiotiques de cette espèce peut servir d'alerte précoce au développement d'une résistance par des bactéries pathogènes apparentées (Aarestrup et al., 2008; Heymann, 2014; Kahn, C N. et al., 2010; van den Bogaard & Stobberingh, 2000). Le traitement des infections causées par *E. coli* est essentiellement basé sur l'utilisation des bêta-lactamines, des aminosides et des quinolones. Ainsi, *E. coli* se caractérise par son aptitude particulière à acquérir des mécanismes de résistance à des antibiotiques habituellement actifs (Aleksun & Levy, 2000),

Plusieurs études dans le monde ont rapporté le portage fécal d'*E. Coli* résistantes chez les bovins (Abbassi et al., 2017; Brennan et al., 2016; Haenni et al., 2014; Mainda et al., 2015; Wittum et al., 2010); mais en Algérie, la majorité des articles publiés se concentrent uniquement sur les souches pathogènes humaines d'*E. coli* (Messai et al., 2006; Ramdani-Bouguessa et al., 2006; Touati et al., 2006; Zaket et al., 2013)], tandis que certains travaux se sont intéressés aux souches d'*E. coli* résistantes chez les volailles (Belmahdi et al., 2016; Meguenni et al., 2014), les données actuelles sur la résistance aux antibiotiques des souches commensales d'*E. coli* chez les bovins sont très limitées, ce manque d'information nous a incité à mener cette étude expérimentale au sein des isolats d'*E. Coli* provenant de bovins en bonne santé et dont les objectifs visent à effectuer une étude phénotypique de la sensibilité aux antibiotiques de l'ensemble de souches D' *E coli* isolées et d'établir une caractérisation génétique des souches d'*Escherichia coli* productrices de bêta-lactamases à spectre étendu, afin de connaître en Algérie, l'épidémiologie de la sensibilité aux antibiotiques des *E coli* et de contribuer à une meilleure utilisation des antibiotiques chez l'espèce bovine, dont les denrées sont destinées à la consommation humaine.

Le manuscrit de cette thèse est articulé sur deux parties différentes : La première partie traite une synthèse bibliographique du sujet abordé tandis que la deuxième partie présente l'étude expérimentale, qui comporte le contexte et les objectifs de l'étude, le matériel et les méthodes utilisés dans cette recherche, les résultats obtenus ainsi que leur discussion et se termine par une conclusion générale et des recommandations.

Synthèse Bibliographique

CHAPITRE I

LA MICROFLORE INTESTINALE

CHAPITRE 1 : LA MICROFLORE INTESTINALE

1.1 Notion de microbiote intestinal

La grande majorité de microorganismes réside dans notre intestin et prend le nom de microbiote intestinal anciennement appelé flore digestive.

Il est constitué principalement de bactéries, mais aussi minoritairement d'archées, de levures et de virus. Les micro-organismes sont dix fois plus nombreux que nos cellules (10^{14} bactéries contre 10^{13} cellules).

Véritable forme de commensalisme, les bactéries présentes dans notre tractus digestif perdurent par la consommation de produits alimentaires ou issus de la desquamation de nos tissus et par cela même, nous permettent d'exercer les mécanismes physiologiques nécessaires pour assurer notre bonne santé. C'est pourquoi le microbiote est aujourd'hui considéré comme un organe à part entière (Louis and Marteau, 2010; Marteau, 2013).

1.2 Composition de la flore commensale digestive des ruminants

La flore commensale intestinale des ruminants est la flore bactérienne résidant en permanence dans l'intestin des ruminants, chez les animaux sains. Selon (Madec et Calavas ..2010), elle peut être constituée à la fois de germes non pathogènes et de germes pathogènes/zoonotiques qui ne provoquent de maladies que dans certaines situations (rupture de barrière, modification de l'équilibre dans la flore...). Elle intervient dans la fin du processus de digestion des aliments. Elle interagit avec les cellules de l'hôte et les modifications de cette flore entraînent l'apparition de pathologies qui peuvent être graves (Salmonelloses etc.). Malgré cela, les informations concernant la composition même de cette flore sont très rares (Dowd et al., 2008). Deux types de méthodes différentes ont donné des résultats différents.

1.2.1 La méthode classique

La méthode la plus conventionnelle consiste à récupérer des matières fécales de vaches et réaliser des analyses après ensemencement sur des milieux liquides ou des géloses de différents types pour mettre en évidence différents types bactériens . Cette méthode est développée par (Wilssens et Buttiaux.,1958).

Selon cette méthode, les bactéries les plus fréquentes dans les fèces sont essentiellement des *E. coli*, des *Bacillus sp.*, des *Clostridium butyricum*, des *Micrococci* et quelques Streptocoques, avec une prépondérance des *E. coli* . Des résultats similaires ont aussi été présentés par (Sorum et Sunde (2001) avec l'abondance d'*E. coli*, d'*Enterococci*, de *Clostridium perfringens* et de *Lactobacilli*.

On peut également remarquer que la flore varie entre l'hiver et l'été. Ces variations tiennent à la différence d'alimentation des bovins entre ces deux saisons.

1.2.2 La méthode récente

Aujourd'hui, les études de métagénomiques ont permis l'identification d'un grand nombre de micro-organismes dans le tractus intestinal (De Preter et Verbeke, 2013; Lagier et al., 2012).

Les différentes approches dites « omiques » sont utilisées pour identifier de nouveaux marqueurs spécifiques. Génomique, transcriptomique et protéomique délivrent des informations intéressantes sur le génotype mais des données limitées sur le phénotype. L'une des plus utilisée dans l'identification des bactéries du microbiote est l'étude de l'ARN ribosomal 16S et l'ADN ribosomal 16S. Ces structures sont étudiées car elles présentent de nombreux avantages : l'ARNr 16S est présent dans toutes les bactéries et sa fonction ne varie pas. L'ADNr 16S se compose d'une région constante qui définit le *phylum* et d'une région variable qui caractérise le genre et l'espèce de la bactérie.

La composition de la flore fécale des ruminants a été récemment étudiée avec de nouvelles méthodes. Une technique appelée bTEFAP (pour bacterial Tag-Encoded FLX Amplicon Pyrosequencing) utilisant l'ADN ribosomal a été utilisée dans cette approche. Cette étude a été menée sur vingt vaches laitières (Holstein) en bonne santé nourries en ration complète, aux Etats-Unis.

Les deux phénomènes les plus marquants sont l'importance des Clostridies qui représentent aux alentours de 20% de la population bactérienne fécale totale et surtout la très faible représentation des *E. coli* qui représentent seulement 0,7% de la population totale. Cette différence semble s'expliquer par la présence d'un biais dans la méthode « classique » de mise en culture de la flore fécale : en effet, il semblerait qu'*E. coli* soit une bactérie se développant particulièrement bien dans un milieu de culture sur gélose, mieux que les autres bactéries commensales fécales. Ce qui induit une surreprésentation d'*E. coli* lors de l'utilisation de cette méthode (Dowd *et al.*, 2008).

1.3 Intérêt de l'étude de la flore commensale par rapport à la flore pathogène

1.3.1. Effet des traitements antibiotiques sur la flore commensale

Alors que les antibiotiques administrés en médecine vétérinaire ont pour cible les bactéries pathogènes, une pression de sélection s'exerce en même temps sur la flore commensale, en particulier digestive.

Les conséquences sont multiples, notamment : élimination des bactéries sensibles à l'antibiotique utilisé, sélection des bactéries résistantes à celui-ci, colonisation possible du compartiment digestif par une flore exogène inhabituelle... (Guillemot *et al.*, 2006).

La composition de la flore commensale se trouve donc modifiée. Celle-ci joue le rôle de barrière et évite la colonisation du tube digestif par des agents pathogènes. L'utilisation de l'antibiotique peut donc fragiliser cette barrière (Millemann et Poirel, 2010). L'utilisation d'un antibiotique a un deuxième inconvénient majeur : par l'élimination des bactéries sensibles, elle a pour conséquence la sélection de l'antibiorésistance à la molécule utilisée chez les bactéries commensales et l'augmentation de sa prévalence. (Andremont, 2006 et Sorum et Sunde, 2001) et ceci a été vérifié chez *E. coli* chez les veaux à diarrhée.

1.3.2 Interactions flore commensale/flore pathogène

Plusieurs études s'intéressent aux échanges génétiques pouvant exister entre bactéries de la flore commensale d'une part, et entre bactéries pathogènes et bactéries commensales d'autre part. En effet, la forte concentration de bactéries présentes dans le tube digestif et la cohabitation des bactéries commensales et pathogènes dans un même milieu favorise les interactions (Madec et Meunier, 2006).

L'existence de transferts de plasmides portant des gènes de résistance au sein de la flore commensale a déjà été prouvée (Salyers *et al.*, 2004).

Les échanges entre bactéries (commensales ou pathogènes) sont des événements relativement fréquents, les éléments transférés sont généralement des plasmides porteurs des gènes de résistance ou des transposons entiers.

Une nouvelle théorie sur l'apparition des antibiorésistances dans la flore pathogène est née, cette théorie suggère un mécanisme en deux temps : d'abord, apparition/sélection de résistances dans la flore commensale puis transfert à la flore pathogène (Andremont, 2006).

La découverte de ces mécanismes justifie notre intérêt pour l'étude d'*Escherichia coli*, qui est l'une des espèces dominantes de la flore commensale chez les bovins.

CHAPITRE II

GENERALITES SUR ESCHERICHIA COLI

CHAPITRE II : GENERALITES SUR *ESCHERICHIA COLI*

2.1 Taxonomie et définition

Escherichia coli appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Ce sont des bacilles à coloration de Gram négative, non sporulés, anaérobies facultatifs et qui ne possèdent pas d'oxydase. Le genre *Escherichia* compte 5 espèces : *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermanii*, *E. vulneris* et *E. blattae*. L'espèce *E. coli* est commensale de la microflore digestive de l'homme et de la plupart des animaux à sang chaud.

La niche écologique de cette bactérie se trouve dans la couche de mucus sécrétée par l'épithélium du côlon. Etant donné qu'elle est hautement compétitive dans cet environnement, *E. coli* reste la bactérie anaérobie facultative la plus abondante dans le côlon humain, dans celui d'autres mammifères et des oiseaux (Freter et al., 1983; Kaper et al., 2004; Russo & Johnson, 2000)

En 1885, l'allemand Theodor Escherich décrit pour la première fois *Escherichia coli*, une bactérie isolée à partir de selles de nourrissons, il l'a nommée tout d'abord *Bacterium coli commune*. Ce n'est que 70 ans plus tard que le nom de *Escherichia coli* (*E. coli*) est réellement retenu en hommage aux travaux de T. Escherich (Cowan, 1954)

Durant les années 1920 - 1930, plusieurs chercheurs essayèrent d'identifier les types spécifiques de *E. coli* responsables des entéropathies, mais aucun progrès significatif ne fut réalisé jusqu'à la mise au point par Kauffmann, dans les années 1940, d'un schéma de sérotypage précis (WHO, 1980). A partir des années 1950 plusieurs souches d'*E. coli* appartenant à des sérotypes variés ont été répertoriées et incriminées dans des pathologies variées chez l'Homme et chez l'animal ; allant des diarrhées simples aux infections systémiques sévères voire même mortelles (Penit, 2014)

2.2 Caractères bactériologiques

2.2.1 Souches typiques d'*Escherichia coli*

Escherichia coli possède les caractères classiques des entérobactéries c'est un bacille à Gram négatif, non sporulé, parfois capsulé, assez grand (1-1.5µm×2-6 µm), non exigeant, catalase positif, oxydase négatif, généralement mobile grâce à une ciliature péritriche, réduit les nitrates en nitrites et fermente le glucose avec production de gaz en général. Les principaux caractères biochimiques permettant de distinguer *E. coli* des autres

espèces voisines sont dans le (tableau1). Notant que *E coli* fermente le lactose (95% des souches), produit l'indole à partir de tryptophane et n'utilise pas le citrate de Simmons comme seule source d'énergie et de carbone, présente une réaction de Voges –Proskauer négative. Possède une Lysine décarboxylase (LDH positive chez plus de 90% des souches) et parfois une Ornithine décarboxylase (ODC positif chez environ 50% des souches) et ne possède pas d'arginine déshydrogénase (ADH)

La plupart des souches se multiplient rapidement. Sur les géloses ordinaires ou sélectives, elles donnent en 18 à 24 heures des colonies d'environ 2 mm de diamètre, qui ont un aspect caractéristique mais non spécifique(rondes , plates en dos de scarabée et à bord régulier).(Freney et al., 2007; Richard, 1989).

2.2.2 Souches atypiques d'*Escherichia coli*

Les souches atypiques d'*E coli* ne possèdent tous les caractères habituels susmentionnés, ces souches peuvent revêtir quatre aspects principaux :

- *E coli* formant des colonies naines (2 à 3 % des souches) : la formation de ce type de colonies naines résulte de déficiences métaboliques due à des mutations (déficiences en thymidine en thiamine en cystéine...) (Borderon & Horodniceanu, 1978) ces colonies ne se multiplient pas sur milieu Muller-Hinton (qui n'est pas assez riche en thymidine) , des colonies presque normales peuvent être obtenues sur gélose au sang ou milieu le Muller-Hinton additionné de 5% de sang .
- *E coli* ayant perdues des caractères : Il n'est pas rare d'isoler des souches d'*E coli* ne possédant pas certains caractères fondamentaux, tel que l'absence de production d'indole, ne fermentant pas le lactose , immobiles, agazogènes. Certaines constituent actuellement une sous espèce de *E coli* : *E coli subsp.alkalescens-dispar* (ad). Elles ne doivent pas être confondues avec *Shigella*
- Variétés muqueuses d'*E coli* : Ces colonies sont muqueuses, entourées d'une importante capsule polysidique, sont bombées, immobiles, plus grande que la normale (supérieur à 2mm) et tendent à confluer.
- *E coli* ayant acquis des caractères métaboliques : il s'agit de souches hébergeant un ou plusieurs plasmides, dont les gènes peuvent coder des caractères métaboliques additionnels, les phénotypes les plus courants sont le caractère« H₂S positif » associé ou non à d'autres caractères(fermentation du raffinose, résistance à des antibiotiques tel que la tétracycline...) ou le caractère « uréase positive »(dans ce cas les souches peuvent être confondues avec les souches de *Yersinia enterocolitica* produisant de l'indole)(Freney et al., 2007).

Tableau 1: Caractères biochimiques différentiels du genre *Escherichia* et des genres d'Enterobacteriaceae proches (Farmer et al., 1985)

	ESCHERICHIA	SHIGELLA	CITROBACTER	SALMONELLA*	ENTEROBACTE	SERRATIA	HAFNIA	KLEBSIELLA	BUTTIAUXELLA	CEDECEA	KLUYVERA	MOELLERELLA
β-galactosidase	+**	d	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+
Uréase	-	-	d	-	-	-	-	d	-	-	-	-
Mobilité à 36°	d	-	+	+	+	+	d	-	+	+	+	-
Gaz en glucose	+	-	+	+	+	d	d	d	+	+	+	-
Indole	+	d	d	-	-	-	-	d	-	-	+	-
LDC	d	-	-	+	d	+	+	+	-	-	d	-
Citrate de Simmons	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	+	d	d	d	-	d	-	-
ADH	-	-	d	+	d	-	-	-	-	+	-	-
ODC	d	d	+	+	d	d	+	-	+	d	+	-

* SALMONELLA y compris SGIII (arizona).

Résultats obtenus après 18-24h d'incubation à 36-37°C.

** Symboles

+ = positif pour 90% à 100% des souches ; - = négatif pour 90% à 100% des souches.

d = variable selon les souches.

LDC : Lysine décarboxylase, VP : réaction de Voges-Proskauer, ADH : arginine dihydrolase, ODC : Ornithine décarboxylase.

2.3 Propriétés antigéniques

Chez l'espèce *E coli*, on définit les antigènes suivants

2.3.1 Les antigènes somatiques ou de paroi O

Sont des composés lipopolysaccharidiques complexes qui contiennent une fraction protéique qui rend l'ensemble antigénique. Plus de 176 antigènes somatiques différents ont été identifiés, la fraction polysaccharidique contient un grand nombre d'unités répétées d'oligosaccharides de 10 à 25 sucres dont la combinaison est responsable de la diversité et de la spécificité des antigènes O (Stenutz et al., 2006) Ces antigènes sont agglutinants en présence d'un immun sérum complémentaire et permettent le sérogroupage définissant un sérotype. La synthèse de l'antigène peut être interrompue en culture avec le passage des colonies du type S (smooth, lisse) au type R (rough, rugueux) n'exprimant plus l'antigène O.

L'absence de cet antigène empêche donc le sérotypage par les méthodes classiques mais un typage génétique reste cependant possible ; les gènes codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse de l'antigène O sont regroupés dans le « cluster de gène *rfb* » (Coimbra et al., 2000; Stevenson et al., 1995; Sugiyama et al., 1997).

Les antigènes O, très toxiques jouent un rôle dans le pouvoir pathogène du germe, ils représentent l'endotoxine. Cette toxine n'est libérée dans le milieu extérieur que lors de la lyse bactérienne (Le minor et al., 1989; Lezzar, 2006; Pilet et al., 1979).

2.3.2 Les antigènes flagellaires H

De nature protéique et il entre dans la construction du flagelle permettant la mobilité de la bactérie. Il est généralement codé par le gène *fliC*. Cependant, certaines souches perdent leur mobilité et sont classées comme non mobiles (NM ou H-). (Nataro & Kaper, 1998).

La diversité des antigènes H tient à la variabilité des sous-unités de flagellines constituant le flagelle par polymérisation. Ces antigènes sont variables entre espèces mais aussi parfois au sein d'une même espèce et contribuent à définir le sérovar. Le typage s'effectue par séro-agglutination effectuée par de rares laboratoires spécialisés. L'antigène H est utilisé pour l'identification des *E.coli* pathogènes, pour la caractérisation précise des souches d'un même séro groupe. Un sérotypage moléculaire est possible pour les souches H-. Le traitement par amplification et restriction du gène « *fliC* » codant pour l'antigène H permet le typage de la souche et sera noté par exemple F7 correspondant au type H7 obtenu par agglutination (Machado et al., 1998).

2.3.3 Les antigènes d'enveloppe ou de surface

De nature polysaccharidiques appelés *antigènes K* : constituent soit une enveloppe d'importance variable, soit une véritable capsule. Dans ce cas il s'agit des antigènes K de type A de Kaufman : les colonies dans ce cas sont mucoides et l'antigène O est masqué et ne peut être révélé qu'après chauffage. Pour la majorité des souches l'antigène K est de type B, il s'agit d'une simple enveloppe difficile à mettre en évidence, la raison pour laquelle cet antigène n'apparaît pas dans les formules antigéniques. (Freney et al., 2007)

2.3.4 Les antigènes fimbriaires ou piliaires F ou antigènes protéiques

De structure filiforme, non impliqués dans la mobilité et appelés « **Pili** » ou « **Fimbriae** ». Les fimbriae peuvent avoir deux aspects. Ce sont soit des bâtonnets rigides de

5 à 7 nm de diamètre, soit des filaments flexibles de 2 à 3 nm de diamètre. Présents chez les *E. coli*, ils interviennent dans la virulence comme facteurs d'adhésion aux cellules épithéliales, Les pili ou fimbriae permettent à la bactérie :

- D'adhérer aux cellules épithéliales « **adhésine** » .
- De se fixer à la surface des hématies et de les agglutiner « **hémagglutinine** »(Freney et al., 2007; Le minor et al., 1989).

Nous avons au total, 17 antigènes F décrits en 1990, mais de nouveaux sont constamment découverts (Lymberopoulos, 2004).

La méthode généralement utilisée pour la classification des *E. coli* par sérotypage est basée sur le schéma décrit par Kauffmann (1947), qui associe ces différents antigènes transmis verticalement par les *E. coli* à la génération suivante (Nataro & Kaper, 1998)

La méthode immunologique de typage par agglutination sur lame à l' aide d' immunsérums spécifiques est un moyen rapide mais non exhaustif pour typer les souches (Guinée et al., 1981). La détection par biologie moléculaire des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'Ag O et du gène *fliC* pour l' AgH est un autre moyen d' identifier le sérotype des souches. Selon ce schéma de classification il existerait plus de 174 sérogroupes O, 80 sérogroupes K et 56 sérogroupes H différents avec plus de 9 000 combinaisons possibles (Karmali et al., 2010).

2.4 Les pathovars d'*Escherichia coli*

2.4.1 Les pathogènes intestinaux

Les pathogènes intestinaux de *E.coli* sont reconnus comme des agents responsables de syndrome diarrhéique d'origine alimentaire ou hydrique. Six principaux pathovars classés en fonction des signes cliniques et des facteurs de pathogénicité exprimés sont inclus dans ce groupe.

Les souches d'*E coli* pathogènes intestinales (InPEC) peuvent être regroupées en six catégories :

- Les *E. coli* entérotoxinogènes (ETEC)
- Les *E. coli* entéro-invasives (EIEC)
- Les *E. coli* adhérentes invasives (AIEC)
- Les *E. coli* entéropathogènes (EPEC)
- Les *E. coli* enteroaggrégatives (EAEC)
- Les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC)

2.4.1.1 *E. coli* entérotoxigène (ETEC)

Les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), fréquemment associées à la "diarrhée du voyageur", sont des souches produisant des entérotoxines : thermosensible (toxines LT), et/ou thermostable (toxines ST). Lors de la colonisation de l'intestin, les entérotoxines provoquent la diarrhée. Les infections aux ETECs sont principalement trouvées chez les voyageurs, les nourrissons et les enfants dans les pays en voie de développement. Elles peuvent aussi être trouvées chez les animaux d'élevage (Kaper et al., 2004).

2.4.1.2 *E coli* enteroinvasives (EIEC)

Les EIEC sont responsables de syndrome dysentérique caractérisé par une forte fièvre, des crampes abdominales et des nausées, accompagnés d'une diarrhée aqueuse évoluant rapidement vers une dysenterie (diarrhée contenant du sang et du mucus). Les EIECs sont similaires à la bactérie *Shigella* (Kaper et al., 2004).

2.4.1.3 *E. coli* adhérentes invasives (AIEC)

Ce pathovar est majoritairement associé à la maladie de Crohn. Les AIECs sont capables d'adhérer fortement aux cellules épithéliales de l'intestin et de les envahir. Le mécanisme impliqué dans ces actions consiste en la polymérisation de microtubules et le recrutement d'actine. Les AIECs sont aussi capables de survivre et de se répliquer dans des macrophages : ce qui provoque une importante sécrétion de TNF- α (Agus et al., 2014)

2.4.1.4 *E. coli* entéropathogène (EPEC)

Les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) provoquent des diarrhées persistantes, mais elles ne produisent pas d'entérotoxine. Ces souches sont capables de s'attacher aux cellules intestinales et de réarranger le cytosquelette. Les EPECs provoquent principalement des gastro-entérites infantiles dans les pays développés (Kaper et al., 2004).

2.4.1.5 *E coli* entero-agregatives (*EaggEC*, ou *EAEC*)

Considérés comme des pathogènes émergents, les EAEC sont la deuxième cause de diarrhée des voyageurs après ETEC dans les pays développés et en voie de développement. Elles sont reconnues comme une cause de diarrhée endémique et épidémique dans le monde

entier. Provoquent souvent une diarrhée aqueuse, mais elle peut être accompagnée de mucus ou de sang (Mora et al., 2011; Stenutz et al., 2006).

2.4.1.6 *E. coli* entérohémorragique (EHEC)

Les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) sont associées aux colites hémorragiques et au syndrome urémique hémolytique (HUS) provoqués par la production de Shigatoxines (Stx). Et peuvent aussi provoquer une défaillance rénale. Les toxines inhibent la synthèse des protéines et provoquent la mort cellulaire. Les EHECs sont surtout trouvées chez les enfants, mais aussi dans la flore normale bovine. Les EHECs provoquent ce qu'on appelle la "maladie du hamburger" (Kaper et al., 2004).

2.4.2 *E. coli* pathogènes extra-intestinaux

Les *E. coli* pathogènes extra-intestinaux (ExPEC), colonisent des tissus hors de l'intestin, et peuvent causer des infections importantes (Johnson & Russo, 2002) et peuvent être classées en quatre catégories :

- Les *E. coli* uropathogènes (UPEC),
- Les *E. coli* associées à la septicémie (SEPEC),
- Les *E. coli* associées à la méningite néonatale (NMEC)
- Les *E. coli* pathogènes aviaires (APEC).

Les ExPECs possèdent une grande diversité de facteurs de virulence. Les ExPECs semblent avoir été créées par l'accumulation de certains facteurs de virulence dans des souches *E. coli* appartenant aux groupes phylogénétiques B2 et D (Johnson & Russo, 2002).

2.4.2.1 *E. coli* uropathogènes (UPEC)

Les UPEC sont les bactéries les plus impliquées dans les infections du tractus urinaire (ITU), (cystites, pyélonéphrites) (70% des cas). Les infections urinaires sont très fréquentes, environ 150 millions de cas par an dans le monde (Stamm & Norrby, 2001).

2.4.2.2 *E. coli* associées à la septicémie (SEPEC),

Les *E. coli* associées à la septicémie (SEPEC) provoquent des septicémies.

2.4.2.3 *E. coli* associées à la méningite néonatale (NMEC)

provoquent des méningites chez les nouveau-nés, 15 à 40 % des nouveau-nés atteints décèdent L'invasion des macrophages conduit à une niche de réplication pour les bactéries qui pourront par la suite traverser la barrière hémato-méningée afin d'atteindre le système nerveux central (Kaper et al., 2004).

2.4.2.4 *E. coli* pathogènes aviaires (APEC)

Ce pathovar affecte les voies respiratoires de la volaille. Pouvant aussi causer des péricardites et des septicémies. Ces pathogènes sont responsables d'importantes pertes économiques (Kaper et al., 2004).

2.5 Les groupes phylogénétiques

Des études basées sur l'analyse du polymorphisme électrophorétique d'enzymes métaboliques (multilocus enzyme electrophoresis ou MLEE) ont permis de classer les souches d' *E. coli* faisant partie de la collection de référence "ECOR-collection". Ces souches sont collectées de par le monde et représentent une tranche de la diversité d'*E. coli*. Cette classification regroupant initialement les souches en quatre groupes, A, B1, B2 et D, a ensuite été améliorée, notamment grâce à l'utilisation de PCR multiplex.

La technique du MLST permet d'affilier les souches à l'un des 7 groupes phylogénétiques existants, ainsi que la dernière méthode Clermont basée sur l'amplification ou non des gènes (*arpA*, *chuA*, *yjaA*) et du fragment d'ADN (TspE4.C2) (Clermont et al., 2013; Smati, 2014).

Plus récemment le groupe C correspond à un groupe étroitement lié au groupe B1 (par MLST). Les groupes phylogénétiques B2 et F sont ceux ayant émergé en premier. Les groupes A, B1 et C ont, quant à eux, divergé plus récemment (Clermont et al., 2011)

La classification des souches d'*E. coli* est d'une grande aide pour prédire la pathogénicité d'une souche. En effet, on note que les souches B2 possèdent un grand nombre de facteurs de virulence impliqués dans les infections extra-intestinales et font donc majoritairement partie des ExPECs ainsi que les souches appartenant au groupe D, mais de façon moindre, tandis que les souches des groupes A et B1 sont majoritairement commensales. Les InPECs font quant à eux majoritairement partie des groupes phylogénétiques A, B1 et D (Johnson & Russo, 2002).

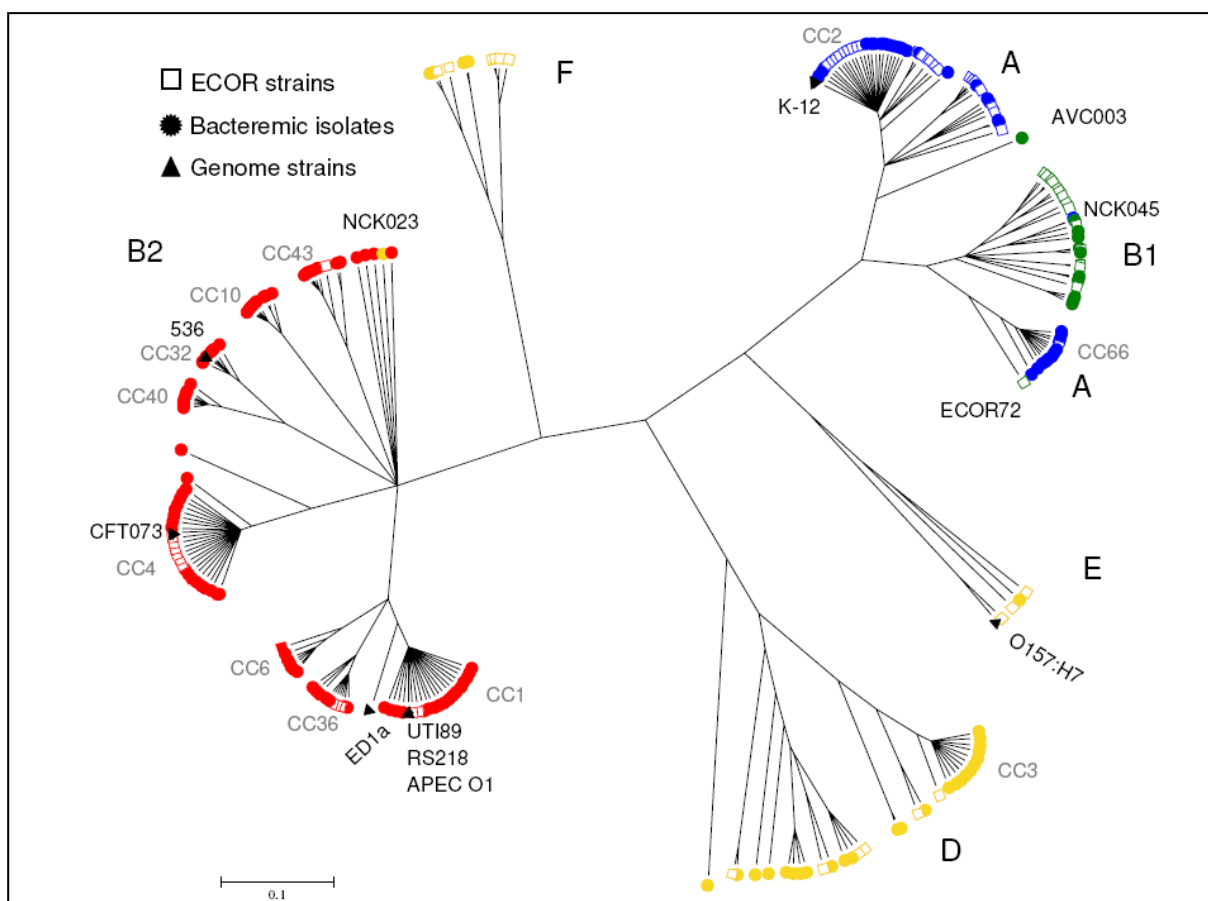


Figure 01 : Diversité phylogénétique des souches de *Escherichia coli* (Cuevas Ramos, 2010; Diallo, 2013; Miquel, 2010)

Les cercles représentent l'analyse de 161 souches isolées d'une bactériémie ; les carrés représentent 67 souches ECOR ; et les triangles représentent 7 génomes de référence. En rouge le groupe B2, en vert le B1, en jaune le D, et en bleu le groupe A.

2.6 Organisation et dynamique du génome

A ce jour *E. coli* est l'espèce bactérienne la plus étudiée, environ 3 690 génomes d'*E. coli* étaient disponibles dans GenBank, en Novembre 2015. *E. coli* K12 MG1655, dont le génome a été totalement séquencé en 1997 (Blattner et al., 1997) est la souche la plus étudiée.

E. coli est un véritable saprophyte de l'eau et des boues, retrouvée comme commensal de l'homme et des animaux à sang chaud, et comme pathogène intestinal et extra-intestinal. Cette ubiquité peut s'expliquer par la diversité de l'espèce. Ainsi, une *E. coli* comporte de 4200 à 5500 gènes dans son génome et il existe dans l'espèce *E. coli* un total d'environ 20.000 gènes (Smati, 2014).

L'organisation chromosomique entre les bactéries proches est globalement conservée mais il existe une grande variabilité génomique entre des bactéries d'une même espèce ou d'un même genre. Toutes les bactéries sont capables d'évoluer par modification (gain ou perte) de matériel génétique, causée par des recombinaisons génétiques ou des mutations, et de transmettre ces modifications verticalement aux générations suivantes.

Quelques bactéries peuvent également acquérir des informations génétiques par trois mécanismes distincts : la transformation, la transduction, et la conjugaison. Cette acquisition de gènes, provenant d'une autre bactérie ou de l'environnement, est appelée transfert horizontal de gènes (Miquel, 2010), ainsi le pan-géome de *E. coli* se compose de trois parties (Figure 02).

2.6.1 Le core-géome ou squelette génomique

« backbone » ou le géome universel qui regroupe les gènes communs à toutes les souches, c'est la partie stable du géome. Le core-géome code les fonctions vitales de la cellule et il est considéré comme étant la colonne vertébrale de l'information génétique nécessaire pour l'accomplissement des fonctions vitales de la cellule (Dobrindt, 2005). Cette partie regroupe environ 2 000 gènes et représente environ 11 % du pan-géome d' *E. coli*.

2.6.2 Le géome unique

Regroupe les gènes spécifiques à une souche. C'est une partie variable, non commune à toutes les souches, qui code des protéines impliquées dans l'amélioration de la « fitness » de la bactérie (capacité d'ajuster son métabolisme en fonction des conditions environnementales, afin de survivre et de croître), dans des mécanismes de colonisation et d'adaptation de la bactérie aux différentes conditions environnementales rencontrées. Cette partie variable est considérée comme l'information génétique propre à chaque souche. Elle est composée pour une grande majorité de régions ORFs (*Open Reading Frame*) sans fonction évidente et est conditionnée par la présence d'éléments génétiques mobiles tels que les plasmides, les bactériophages ou les îlots de pathogénicité. Ces éléments sont intégrés dans le chromosome bactérien ou bien répliqués de manière indépendante grâce à la machinerie cellulaire (Dobrindt et al., 2010). Cette partie regroupe environ 63 % du pan-géome.

2.6.3 Le géome périphérique

Ou volatil regroupe l'ensemble des gènes présents uniquement dans un sous-ensemble de souches. Cette partie est utilisée pour distinguer les souches entre elles et elle est notamment porteuse de l'information concernant les sérotypes. La fonction de la plupart

des gènes dans cette catégorie est mal connue. Cette partie représente environ 26 % du pan-géome.

Le génome moyen d'*E. coli* varie entre 4 500 et 5 900 kilopaires de base (Kpb) selon qu'il s'agisse d'une souche commensale ou d'une souche pathogène. Plus précisément, la comparaison de 61 génomes d' *E. coli* a montré que le nombre de gènes d'une souche pouvait varier de 4 087 pour le plus petit génome, correspondant à une souche commensale, à 5 429, correspondant à une souche pathogène de sérotype O157 :H7 (Lukjancenko et al., 2010).

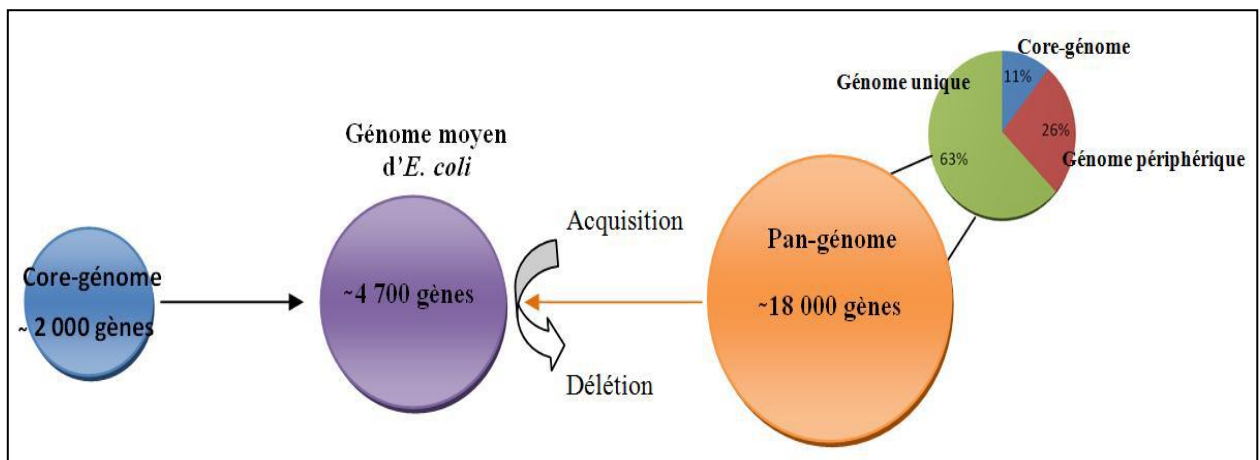


Figure 02 : Représentation de la composition du génome moyen d' *E. coli* (Van Elsas et al., 2011)

CHAPITRE III
ANTIBIORESISTANCE :
ORIGINE, MECANISMES ET EVOLUTION

CHAPITRE III : ANTIBIORESISTANCE: ORIGINE, MECANISMES ET EVOLUTION

3.1 Définition de l'antibiorésistance

La définition de la résistance aux antibiotiques est fonction de différents points de vue (clinicien, pharmacologue, bactériologiste et épidémiologiste). Ainsi l'analyse des conséquences de l'exposition aux antibiotiques des populations humaines ou animales sur la résistance bactérienne à ces molécules, nécessite de faire une distinction entre les conséquences portant sur :

- L'émergence d'un nouveau mécanisme de résistance dans une espèce bactérienne (qui en était dépourvue auparavant).
- L'émergence d'une bactérie résistante dans une population humaine ou animale (qui en était dépourvue auparavant).
- La diffusion d'une bactérie résistante dans ces populations humaines ou animales (AFSSA, 2006).

La résistance aux antibiotiques peut être définie selon plusieurs points de vue.

Pour le clinicien : Une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si le traitement n'est pas efficace.

Pour le pharmacologue : Une souche bactérienne est résistante à un antibiotique, si les concentrations atteintes au site d'action sont inférieures à la concentration minimale inhibitrice.

Pour le microbiologiste : Une souche bactérienne est résistante à un antibiotique, si elle dispose d'un mécanisme de résistance augmentant la valeur de la CMI.

Pour l'épidémiologiste : Une souche bactérienne est résistante à un antibiotique, si elle a une CMI significativement différente de celle de la population normale (AFSSA, 2006).

En règle générale on considère qu'une bactérie est résistante, lorsqu'elle peut se multiplier au contact d'une teneur en antibiotique 8 à 10 fois supérieure à la concentration minimale inhibitrice moyenne de son espèce (Enriquez, 2002).

Chabbert définit une souche comme étant résistante à un antibiotique, lorsqu'une modification de son capital génétique, lui permet de tolérer des concentrations

d'antibiotique nettement plus élevées que celles qui inhibent la croissance *in vitro* de la majorité des autres souches de la même espèce, dites sensibles (Mainil, 2010).

3.2 Les types de résistance bactérienne

Il existe deux types de résistances : naturelle et acquise

3.2.1 La résistance naturelle

Certaines bactéries sont naturellement résistantes à des antibiotiques, on parle dans ce cas de résistance innée, leur patrimoine génétique leur permet de se défendre grâce à plusieurs techniques. La résistance peut être due à la structure de la bactérie (par exemple les mycoplasmes, dépourvues de paroi sont insensibles aux bêta-lactamines) ou à l'impossibilité pour l'antibiotique de pénétrer dans la cellule (les bactéries Gram négatives, grâce à leur membrane externe sont insensibles à la vancomycine)(Mainil, 2010; Scott, 2009). Ces résistances n'impliquent pas l'acquisition de gènes de résistance ou de mutations et sont retrouvées dans l'ensemble des souches d'une même espèce et représentent donc le spectre d'activité naturel des familles et sous familles d'antibiotiques (Mainil, 2010; Prescott et al., 2000; Scott, 2009).

3.2.2 La résistance acquise

La résistance acquise entraîne la résistance à un ou plusieurs antibiotiques auxquels la bactérie était sensible auparavant (Mainil, 2010; Scott, 2009). Cette acquisition peut être liée à une ou plusieurs mutations modifiant la cible de l'antibiotique ou un schéma métabolique (Chopra et al., 2003), le transfert de ce gène de résistance est qualifié de vertical et se fait de la cellule mère à la cellule fille (Prescott et al., 2000). Cette acquisition peut être la conséquence d'un transfert horizontal y compris entre espèces éloignées phylogéniquement par acquisition de matériel génétique mobile (plasmides, transposons et intégrons)(Rowe-Magnus et al., 2001) ou encore transmise par des phages. Les mécanismes de résistance peuvent alors diffuser très rapidement dans une population (Licht et al., 1999).

A partir d'un plasmide, les bactéries peuvent acquérir simultanément une résistance pour plusieurs antibiotiques ou plusieurs familles d'antibiotiques.

Dans toute population bactérienne, il existe une faible fraction de gènes (1%) ayant une tolérance phénotypique aux antibiotiques, cette résistance adaptative est due à un phénomène épigénétique, ces gènes sont appelés « persiters » ou « dormants », il a été démontré que ces gènes jouent un rôle dans les difficultés de traiter certaines maladies chroniques tel que la tuberculose (Keren et al., 2004; Lewis, 2001)

3.2.2.1 La résistance croisée

Correspond à l'acquisition de résistance à d'autre membre d'une classe d'antibiotique présentant des mécanismes d'action similaires à l'antibiotique de cette même classe contre laquelle la bactérie était déjà résistante., cela explique que n'importe quel antibiotique de la classe peut sélectionner dans le milieu des bactéries résistantes à tous les autres antibiotiques de cette classe, alors qu'elles n'ont jamais été exposées à ces molécules (Neely & Holder, 1999). Par exemple la résistance à la méthicilline des staphylocoques due à la production d'une nouvelle protéine liant les pénicillines(PLP2a) est une résistance croisée envers toutes les molécules appartenant à la famille des bêta-lactamines.

Un autre exemple est la résistance due à un système d'efflux, qui va conférer une résistance croisée entre des molécules antibiotiques de différentes familles, toutes substrat pour la pompe d'efflux (AFSSA, 2006).

3.2.2.2 La co-résistance

Est conférée par plusieurs gènes de résistance à différentes molécules ou familles d'antibiotique associés chez la même bactérie au sein d'une structure génétique, tel que les transposons, les plasmides ou les intégrons.

Quand ces résistances sont transférables, elles sont généralement transférées en bloc, c'est le cas de la co-résistance d'*E coli* aux céphalosporines, pénicillines, chloramphénicol, tétracyclines et aux fluoroquinolones, l'utilisation d'un des antibiotiques pour lequel la bactérie est résistante, sélectionnera en même temps, les autres gènes de résistance, c'est le phénomène de co-sélection (AFSSA, 2006; Soussy, 2007).

3.3 Transmission de la résistance bactérienne

Plusieurs mécanismes d'acquisition et de transfert de résistance existent.

3.3.1 Transmission par mutation

Les mutations chromosomiques au niveau du génome bactérien sont rares et spontanées, si une de ces mutations permet l'acquisition d'une résistance à un antibiotique, celui-ci révèle cette résistance en créant une pression antibactérienne. La transmission est exclusivement héréditaire et ne concerne généralement qu'un seul antibiotique, c'est le cas des *E coli* dont la mutation des gènes codant la protéine SR du ribosome, leur confère une résistance à la streptomycine (AFSSA, 2006; Perrot, 1998; Scott, 2009). Un autre exemple est celui des β -lactamases à spectre élargi, qui sont capables d'hydrolyser les céphalosporines de troisième génération, telles que la ceftazidime, la céfotaxime et le

ceftriaxone. Ces enzymes résultent de mutations ponctuelles de gènes de β -lactamases de type TEM-1 et SHV-1, mutations qui altèrent la structure du site actif de l'enzyme, permettant ainsi l'hydrolyse de nouveaux substrats. Contrairement à l'évolution des gènes complets, les mutations ponctuelles sont récentes. Avec l'acquisition de leur capacité d'hydrolyser les C3G, les β -lactamases à spectre élargi perdent un peu de leur efficacité vis-à-vis des pénicillines (Jacoby, 1994).

Un autre exemple de cette résistance par mutation, est celui de la rifampicine chez *E. coli*, elle est due à des mutations ponctuelles dans l'un des six domaines conservés du gène *rpoB*, codant pour la sous-unité B de l'ARN polymérase (Jin & Gross, 1988). Ces mutations résultent en des substitutions en acides aminés responsables d'une diminution de l'activité de la rifampicine, sans altération de la fonction physiologique de l'enzyme. Au cours du traitement de la tuberculose, la rifampicine doit être utilisée en association avec d'autres antibiotiques comme l'isoniazide qui présente une activité bactéricide sur les souches de *Mycobacterium tuberculosis* résistantes à la rifampicine, ce qui permet d'éviter l'émergence de résistances à la rifampicine (Courvalain & Leclercq, 2012).

Les mutants sont souvent plus fragiles et perdent de leur virulence, c'est le « cout biologique », qui serait du à une synthèse supplémentaire de protéines a priori non essentielles en absence d'antimicrobien. (Collectif, 2008; Giguere et al., 2007; Perrot, 1998)

3.3.2 Transmission par transfert de matériel génétique

Cette transmission s'effectue grâce à du matériel génétique mobile et implique trois types de transfert : La transformation, la transduction et la conjugaison (figure 03).

3.3.2.1 La transformation

C'est la capacité qu'ont certaines bactéries (dites compétentes) à capter et intégrer de l'ADN nu, son intégration dans le génome s'effectue par recombinaison entre régions homologues. L'ADN des bactéries lysées est dégradé et détruit rapidement dans le milieu extérieur, seulement quelques espèces bactériennes pathogènes peuvent naturellement l'intégrer, ce qui rend ce mécanisme d'échange génétique peu fréquent (Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001; Spratt, 1994). Retenons l'exemple de *Neisseria gonorrhoeae* qui a acquis des « gènes mosaïques » par transformation concernant les PLP et aussi une résistance aux fluoroquinolones par formation de gènes mosaïques de topoisomérase (Varon & Gutmann, 2000).

3.3.2.2 La transduction

Les gènes de résistance peuvent être transférés par transduction, dont le vecteur est un bactériophage. Les phages existent sous la forme virulente ou tempérée.

- a- Lorsque les gènes transférés (pas plus de 1 à 2 % du génome de la bactérie lysogène) s'intègrent dans le chromosome de la bactérie réceptrice et que celle-ci les transmet à la descendance, on parle de *transduction complète ou généralisée*.
- b- Lorsque les gènes transférés ne sont pas intégrés dans le chromosome, ce qui est fréquent, on parle dans ce cas de *transduction abortive*, dans ce cas les gènes passent de la cellule mère à une seule cellule fille et il n'y a pas de généralisation du caractère transféré à l'ensemble des descendants ((Faculté de médecine. Pierre et Marie Curie, 2003).

La transduction utile pour les plasmides non conjugatifs voit son intérêt limité en raison de la spécificité d'hôte des bactériophages et des possibilités de recombinaison entre l'ADN plasmidique et l'ADN phagique, ou entre plusieurs ADN plasmidique (Iida et al., 1981). Même sans recombinaison la co-transduction de différents plasmides semble possible (Coetzee Jn, 1977).

La petite taille du génome des bactériophages (approximativement 40Kb) limite la taille et le type de plasmides qui peuvent être incorporés.

Le mécanisme de diffusion rapide de β -lactamases chez *Staphylococcus aureus* dans les années 40 et 50 serait dû aux transductions généralisées médiées par de nombreux bactériophages portés par cette espèce, étant donné que les plasmides portant les gènes de ces β -lactamases ne sont pas autotransférables (Courvalain & Leclercq, 2012).

3.3.2.3 La conjugaison

C'est le mécanisme majeur de transmission de résistance entre bactéries de genres différents (Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001). C'est le transfert d'un plasmide de grande taille ou d'un transposon entre deux cellules en contact, par l'intermédiaire d'un pont cytoplasmique ouvert qui relie les deux bactéries impliquées dans l'échange (Helmuth, 2000; Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001).

Les plasmides de petite taille qui coexistent dans une même cellule peuvent bénéficier de ce transfert de gènes par le phénomène de mobilisation (Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001). La conjugaison peut s'établir entre bactéries de la même espèce, au sein d'un même genre ou parfois entre bactéries de genres différents, l'importance de ce

mécanisme dans la dispersion des gènes de résistance est bien établie chez les entérobactéries (Helmuth, 2000; Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001).

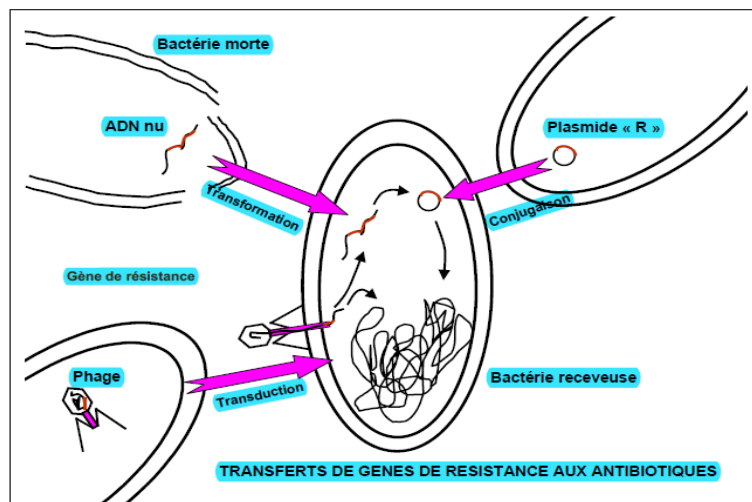


Figure 03 : Mécanismes de transfert de gènes de résistance (AFSSA, 2006)

3.4 Supports génétiques impliqués dans le transfert de gènes

3.4.1 Les plasmides

Les plasmides sont des molécules d'ADN extra-chromosomique, généralement circulaires, doués de répllication autonome, leur taille varie environnement de 2 Kb à plus de 200Kb. Les plasmides peuvent être échangés entre bactéries par le biais de trois mécanismes : Ils peuvent être auto-transférables, mobilisables par d'autres éléments génétiques, ou transférés par un bactériophage (Courvalain & Leclercq, 2012; Norman et al., 2009). Ils sont constitués de modules génétiques codant des facteurs non essentiels à la survie des bactéries en conditions physiologiques normales.

Leur structure inclue obligatoirement des gènes codant les fonctions réplificatives mais peuvent présenter des gènes « accessoires », codant des processus distincts de ceux codés par le chromosome bactérien. Ainsi les plasmides permettent aux bactéries qui les portent l'acquisition de nouveaux phénotypes tel que la résistance aux antibiotiques (Norman et al., 2009) . Un seul plasmide de résistance peut coder pour des résistances à 10 antibiotiques différents (Puyt, 2001).

3.4.2 Les transposons (Tn)

Les transposons sont des éléments génétiques mobiles, qui assurent leur propre transfert d'un réplicon à un autre, au sein d'une cellule ou à une autre cellule.

La plupart des transposons ont les gènes codant les enzymes assurant la transposition (une transposase avec une résolvasse) et des séquences terminales (souvent répétées inversées ou directes) (Courvalain & Leclercq, 2012).

La transposition est un mécanisme de recombinaison, qui s'effectue en l'absence d'homologie génétique entre l'élément transposable et l'ADN cible, ce qui permet d'aboutir à des réarrangements génétiques très aléatoires (Mahillon, 1998).

Les transposons n'ont pas de gènes de réplication et doivent s'intégrer au sein d'un plasmide ou chromosome pour survivre (Courvalain & Leclercq, 2012).

Il existe plusieurs types de transposons, classés selon leur particularité structurale en :

3.4.2.1 Les séquences d'insertion (IS)

Ce sont les plus petits éléments transposables, leur taille varie de 1-2 Kb (Courvalain 2012), elles codent uniquement les fonctions nécessaires à leur mobilité, elles présentent aussi à leur extrémité, de courtes séquences inversées répétées (IR-L ET IR-R), qui sont impliquées dans la fixation de la transposase et dans les phases de coupure, d'excision et de transposition.

Elles peuvent avoir un impact sur l'expression de gènes de résistance en apportant des promoteurs actifs lorsqu'elles s'intègrent en amont de ceux-ci. (Courvalain & Leclercq, 2012).

On a découvert récemment une nouvelle classe d'éléments génétiques mobiles ayant une grande similitude avec les séquences d'insertion, désignés ISCR_S, leur mode de transposition diffère de celui des séquences d'insertions en utilisant un mécanisme de « rolling circle replication » (Toleman et al., 2006).

3.4.2.2 Les transposons composites

Leur taille est inférieure à 10kb, sont constitués de deux IS qui encadrent une région centrale composée de différents gènes, les IS ont la capacité de mobiliser le segment d'ADN qu'elles encadrent. Chez les staphylocoques et les entérocoques, la résistance à la gentamycine par inactivation enzymatique, est souvent due au gène *aac-6'-aph2''*, encadré par deux copies inversées de l'IS256. Ce transposon est désigné Tn 4001 chez les staphylocoques et Tn 5281 chez les entérocoques (Courvalain & Leclercq, 2012; Mahillon, 1998).

De structure plus complexe, les transposons de type Tn3, fonctionnent par transposition répllicative médiée par une transposase et une résolvasse. Le transposon Tn3, confère la résistance à l'ampicilline chez les bactéries à Gram négatif, par la production d'une β -lactamase codée par le gène bla_{TEM-1} (Courvalain & Leclercq, 2012).

3.4.2.3 Les transposons non composites ou co-intégratifs

Peuvent atteindre 70 kb, composé d'un segment d'ADN contenant des gènes nécessaires à la mobilité et des gènes codant d'autres fonctions. Ce segment d'ADN n'est pas encadré par les IS, mais par des séquences inversées répétées de 35 à 48 pb (Mahillon, 1998).

3.4.3 Les éléments intégratifs conjugatifs ou mobilisables

3.4.3.1 Les ICE ou éléments intégratifs conjugatifs

Ce sont des éléments génétiques qui s'excisent du génome pour former un intermédiaire circulaire, non répliatif qui s'auto-transfert par conjugaison vers une autre cellule et s'intègre ensuite au chromosome par une recombinaison site spécifique (Burrus et al., 2002), ils codent les éléments nécessaires à la formation de l'appareil conjugatif.

Les éléments chromosomiques de grande taille R391 retrouvés chez *Proteus rettgeri* (99.5 Kb) et SXT chez *Vibrio cholerae* (89 Kb) sont des exemples d'ICE. Chez les bactéries à Gram négatif (Beaber et al., 2002).

3.4.3.2 Les IME ou éléments mobilisables intégratifs

Ils sont identiques aux ICEs, mais ne codent pas les éléments nécessaires à leur transfert et en présence d'un élément conjugatif, ils seront mobilisés vers une autre cellule.

3.4.3.3 Les transposons conjugatifs (CTn)

Sont identiques aux ICE, mais possèdent une spécificité du site de recombinaison (Burrus et al., 2002)

3.4.4 Les intégrons

A la différence des transposons, les intégrons sont des « éléments mobilisateurs » plutôt que des éléments transposables. Ils résident dans le chromosome, les plasmides ou les transposons et piègent des séquences d'ADN appelées cassettes (Hall & Collis, 1995). Les gènes cassettes sont exprimés à partir d'un seul et unique promoteur (Mazel, 2006). Les cassettes de gènes représentent des structures d'ADN circulaire, de moins de 2 Kb, les

cassettes sous forme libre, ne peuvent pas s'exprimer à défaut d'une région promotrice, elles sont mobiles, bien que ne possèdent pas les gènes qui codent leur mobilité (Hall & Collis, 1995).

Les intégrons sont constitués d'un gène codant pour une intégrase et d'un site d'action pour cette enzyme, *attI*. Un autre site d'action de l'intégrase appelé « élément de 59 paires de bases » situé sur la cassette, permet à l'enzyme de catalyser l'intégration par l'excision de cassettes mobiles dans l'intégron (Hall & Collis, 1995).

Les intégrons de résistance sont très fréquents au sein du génome bactérien et pourraient jouer un rôle très important dans l'évolution du génome bactérien (Rowe-Magnus et al., 2001).

Il existe plusieurs classes d'intégrons, définis selon la nature des gènes codant pour l'intégrase. Trois d'entre elles (1.2 et 3) ont été bien caractérisés et sont impliquées dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques (Denis et al., 2012; Médecine Sorbonne Université, s. d.). Notant l'exemple de l'association du gène *dhfrI-sul* trouvée chez les shigelles, isolées au Sri Lanka, qui rend inutile l'association efficace et peu coûteuse de Triméthoprim-sulfamide (Huovinen et al., 1995)

3.5 Sélection et évolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques

3.5.1 Sélection et diffusion des bactéries résistantes

Les antibiotiques n'induisent pas de résistance, mais grâce à leur pression de sélection, ils assurent l'émergence de souches résistantes, qui vont être favorisées par rapport aux souches sensibles au sein d'un biotope. Si la résistance est issue d'une mutation, le biotope sera colonisé par une souche souvent mono-résistante et généralement plus fragile que les souches sauvages (Lozniewski & Rabaut, 2010). Ceci n'est généralement pas le cas lorsque la résistance est d'origine extra-chromosomique (Lozniewski & Rabaut, 2010).

En effet, l'expression de la résistance à un coût, qui se manifeste par un ralentissement à croître *in vivo* en compétition avec les souches sensibles. Parmi ces coûts, il y'a le coût de la réplication du plasmide qui porte les gènes de résistance et le coût de l'expression des gènes de résistance. Ces derniers sont souvent atténués au sein de la bactérie par l'intégration dans le chromosome et par les limitations de l'expression de la résistance dans certaines circonstances (Courvalain & Leclercq, 2012). Notant dans ce contexte l'exemple de certaines souches mutantes d'entérocoques résistantes à la

vancomycine, dépendantes entièrement pour la synthèse de leurs paroi de l'opéron de résistance, qui ne s'exprime qu'en présence de la vancomycine, un phénomène dit de « dépendance à la vancomycine » (Van Bambeke et al., 1999).

Malgré le coût biologique, le plasmide peut transférer en même temps des gènes de virulence, ce qui rend les bactéries recombinées, en plus d'être multirésistantes, plus virulentes et donc plus « efficaces ». Vu que les plasmides peuvent être perdus spontanément par la bactéries et vu que le nombre des copies de ceux-ci est régulé par un phénomène bactérie –dépendant , une **réversibilité** est possible (Smith & Lewin, 1993)

3.5.2 Evolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques

De nombreux plasmides de résistance sont conjugatifs ou mobilisables et sont à l'origine de transfert horizontal et d'une dissémination importante de la résistance, ce qui qualifié la résistance plasmidique de « contagieuse » (Lozniewski & Rabaut, 2010). Les résistances extra-chromosomiques sont souvent des multirésistances et l'utilisation d'un seul antibiotique va sélectionner des bactéries multirésistantes (Lozniewski & Rabaut, 2010).

Plusieurs définitions de la multirésistance ont été proposées :

Andermond , proposa une définition favorisant l'aspect biochimique, il s'agit « de bactéries qui ne sont sensibles au maximum qu'à « un petit nombre » de familles ou de sous familles d'antibiotiques utilisables en clinique avec une probabilité forte d'efficacité thérapeutique » (Andremont, 1997).

Une classification récente des bactéries présentant plusieurs résistances, a été adoptée par (Magiorakos et al., 2012), définissant trois groupes.

- 1- La multi-résistance (MDR signifiant Multi drug resistance) : est définie comme la non-sensibilité à au moins un agent dans trois catégories d'antimicrobiens ou plus.
- 2- La résistance extrême (XDR signifiant Extreme drug resistance) : est définie comme la non-sensibilité à au moins un agent dans toutes les catégories d'antimicrobiens sauf deux ou moins (c.-à-d. Que les isolats bactériens restent sensibles à une ou deux catégories seulement).
- 3- La pan-résistance (PDR) : est définie comme une non-sensibilité à tous les agents de toutes les catégories d'antimicrobiens (c'est-à-dire qu'aucun agent n'a été testé comme sensible à cet organisme).

Les catégories d'antimicrobiens et les antibiotiques utilisés pour définir les MDR, les XDR et les PDR dans la famille des Enterobacteriaceae, sont dans le tableau 02, selon (Magiorakos et al., 2012). Ainsi, un isolat bactérien qui est caractérisé comme XDR sera également caractérisé comme MDR. De même, un isolat bactérien devrait être XDR pour pouvoir être davantage défini comme PDR. La figure 04 illustre que XDR est un sous-ensemble de MDR, et PDR est un sous-ensemble de XDR. Les bactéries qui sont PDR portent le type de résistance antimicrobienne le plus absolu possible, ce qui implique qu'il n'y a pas d'agents antimicrobiens approuvés qui ont une activité contre ces souches.

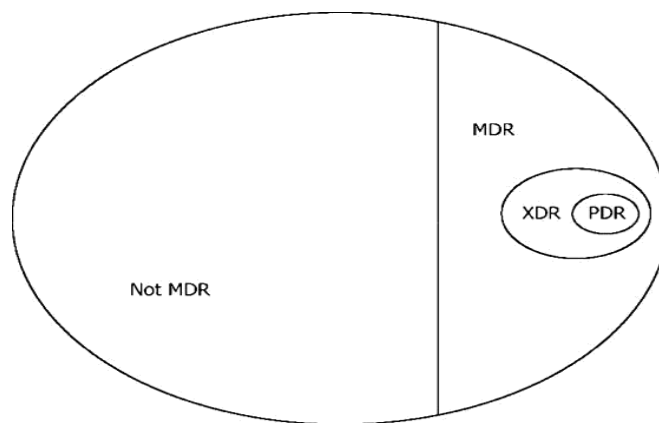


Figure 04 : Diagramme montrant la relation entre MDR, XDR et PDR (Magiorakos et al., 2012).

Tableau 02 : Entérobactéries; catégories d'antimicrobiens et agents(antibiotiques) utilisés pour définir les MDR, XDR et PDR(feuille de travail pour catégoriser les isolats) (Magiorakos et al., 2012).

Familles D'antibiotiques	Antibiotiques	Espèces ayant une résistance intrinsèque aux antibiotiques ou aux familles d'antibiotiques ^a
Aminoglycosides	Gentamicine	<i>Providencia rettgeri</i> (<i>P. rettgeri</i>), <i>Providencia stuartii</i> (<i>P. stuartii</i>)
	Tobramycine	<i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>
	Amikacine	
	Netilmicine	<i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>
Anti-MRSA céphalosporines	Ceftaroline (approuvé uniquement pour <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>)	
Anti Pseudomonas : pénicillines + inhibiteurs de B-lactamase	Ticarcilline- Acide clavulanique	<i>Escherichia hermannii</i> (<i>E. hermannii</i>).
	Piperacilline-tazobactam	<i>E. hermannii</i>
Carbapénèmes	Ertapénème	
	Imipénème	
	Méropénème	
	Doripénème	
Céphalosporines à spectre non étendu; 1^{ère} et 2^{ème} génération de céphalosporines	Cefazoline	<i>Citrobacter freundii</i> (<i>C. freundii</i>), <i>Enterobacter aerogenes</i> (<i>E. aerogenes</i>), <i>Enterobacter cloacae</i> (<i>E. cloacae</i>), <i>Hafnia alvei</i> (<i>H. alvei</i>), <i>Morganella morganii</i> (<i>M. morganii</i>), <i>Proteus penneri</i> (<i>P. penneri</i>), <i>Proteus vulgaris</i> (<i>P. vulgaris</i>), <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>Serratia marcescens</i> (<i>S. marcescens</i>)
	Cefuroxime	<i>M. morganii</i> , <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>S. marcescens</i>
Céphalosporines à spectre étendu; 3^{ème} et 4^{ème} génération de céphalosporines	Cefotaxime ou ceftriaxone	
	Ceftazidime	
	Cefepime	
Céphamycines	Cefoxitine	<i>C. freundii</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>H. alvei</i>
	Cefotetan	<i>C. freundii</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>H. alvei</i>

Suite du Tableau 02 : Entérobactéries; catégories d'antimicrobiens et agents(antibiotiques) utilisés pour définir les MDR, XDR et PDR

Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	
Inhibiteurs de la voie des folates	Triméthoprim-sulfaméthoxazole	
Glycylcyclines	Tigecycline	<i>M. morganii</i> , <i>Proteus mirabilis</i> (<i>P. mirabilis</i>), <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>
Monobactames	Aztreonam	
Pénicillines	Ampicilline	<i>Citrobacter koseri</i> (<i>C. koseri</i>), <i>C. freundii</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. hermannii</i> , <i>H. alvei</i> , <i>Klebsiellae spp.</i> , <i>M. morganii</i> , <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>S. marcescens</i>
Pénicillines + inhibiteurs de B-lactamase	Amoxicilline-acide clavulanique	<i>C. freundii</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>H. alvei</i> , <i>M. morganii</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>S. marcescens</i>
	Ampicilline-sulbactame	<i>C. freundii</i> , <i>C. koseri</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>H. alvei</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>S. marcescens</i>
Phénicolés	Chloramphénicol	
Acide phosphonique	Fosfomycine	
Polymyxines	Colistine	<i>M. morganii</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>S. marcescens</i>
Tétracyclines	Tétracycline	<i>M. morganii</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>
	Doxycycline	<i>M. morganii</i> , <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>
	Minocycline	<i>M. morganii</i> , <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>

Critères de définition des MDR, XDR et PDR chez les entérobactéries

MDR : non-sensibilité à au moins un agent dans trois catégories d'antimicrobiens ou plus.

XDR : non-sensibilité à au moins un agent dans toutes les catégories d'antimicrobiens sauf deux ou moins.

PDR : non-sensibilité à tous les agents de toutes les catégories d'antimicrobien répertoriés.

^a Lorsqu'une espèce a une résistance intrinsèque à un agent antimicrobien ou à l'ensemble de la catégorie, cet agent ou cette catégorie doit être supprimée de la liste de ce tableau avant d'appliquer les critères des définitions et ne doit pas être comptée lors du calcul du nombre d'agents ou de catégories auxquels l'isolat bactérien n'est pas sensible

Une fois qu'une résistance est acquise, il est difficile de s'en débarrasser malgré le coût biologique et la réversibilité de la résistance, citons l'exemple des β -lactamases, au début des années 1960, les B-lactamases ne conféraient de résistance qu'envers l'ampicilline, puis on a eu les B-lactamases résistantes en plus aux céphalosporines et après

avoir introduit l'acide clavulanique (inhibiteur des B-lactamases) , les bactéries ont aussitôt acquis une résistance envers cette molécule, aujourd'hui on dénombre 6 mutants de β -lactamases (Neely & Holder, 1999).

Au cours du temps l'évolution des bactéries, a conduit à l'apparition de multiples mécanismes de résistance, conduisant à des résistances variées. En médecine vétérinaire , les données du RESAPATH , ont estimé la proportion des souches d'*E coli* multirésistantes entre 21à 24%, chez les bovins (ANSES, 2014). 60% des agents pathogènes dangereux pour l'homme sont d'origine animale, les hommes et les animaux partagent les mêmes bactéries, qu'il convient impérativement de combattre et prévenir aux échelles nationales, régionales et mondiales. Et pour limiter l'apparition d'antibiorésistance , il faut une harmonisation intersectorielle visant à mieux coordonner les politiques de santé humaine , de santé animale et d'environnement (OIE, 2015).

3.6 Mécanismes biochimiques de résistance aux antibiotiques

3.6.1 L'Inhibition enzymatique

Certains gènes de résistance codent des enzymes capables de détruire ou d'inhiber les antibiotiques .La production enzymatique peut être induite par un facteur externe (un autre antibiotique) ou constante (non affectée par stimuli externes).(Bennett et al., 2014; Yamashita et al., 2000) .

Production de B-lactamases

Les β -lactamases sont des enzymes produites par les bactéries et transmises par des chromosomes ou des plasmides. Elles constituent un mécanisme de résistance très efficace. Les β -lactamases inactivent les β -lactamines en détruisant le lien amide sur le cycle lactame. Puisque ce sont les antibiotiques les plus prescrits au monde, il n'est pas étonnant que la résistance a cette importante classe de médicaments pose un problème inquiétant (Bennett et al., 2014; Yamashita et al., 2000)

Les entérobactéries, produisent une grande variété de β -lactamases, qui sont subdivisées en plusieurs sous-groupes. Il existe approximativement 350 à 400 β -lactamases spécifiques à différentes molécules de β -lactamines (Bennett et al., 2014; Targant, 2010; Yamashita et al., 2000)

Au début des années 1980, les céphalosporines de troisième génération (C3G) ont été commercialisées, mais à la suite de leur sur-utilisation pour le traitement de plusieurs infections, des changements relativement mineurs des séquences des gènes originaux ont

entraîné une modification significative de l'affinité des enzymes pour le substrat, et il s'est développé un groupe de β -lactamases à spectre étendu, les BLSE. La majorité de ces BLSE est dérivée des spectres TEM-1 et SHV-1 (Pitout et al., 2004; Sanders & Sanders, 1992).

Ensuite de nouvelles familles de BLSE ont été décrites (CTX-M, OXA, etc.). La résistance a évolué rapidement, et la substitution d'un petit nombre d'acides amines des β -lactamases a permis ensuite à un certain nombre de bactéries de devenir encore plus résistantes, les β -lactamases médiées par le gène AmpC ou céphalosporinase de haut niveau.

l'hyperproduction de céphalosporinase chromosomiques de très haut niveau a conféré également une nouvelle sorte de résistance aux C3G. Elles sont synthétisées chez des espèces naturellement productrices de céphalosporinase inductibles (entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa*) qui, à la suite d'une mutation, en produisent en très grandes quantités. Il s'agit d'un phénotype qualifié de « hyperproduction de céphalosporinase » ou de « céphalosporinases déréprimées ». La production de Carbapénèmes ou de métallob-lactamases par les BGN peut les rendre résistantes à toutes les β -lactamines, y compris les carbapénèmes. Le tableau 03 présente les différents types de β -lactamases (Pitout et al., 2004; Sanders & Sanders, 1992)

Tableau 03: Famille de β -lactamases (Pitout et al., 2004; Sanders & Sanders, 1992)

Types de β -lactamases	Antibiotiques inactivés	Ne sont pas inactivés
Pénicillines	Pénicilline, aminopénicillines, carboxypénicillines, ureidopénicillines.	G, Cloxacilline, céphalosporines.
Céphalosporinase de bas niveau.	Pénicillines, C1G et parfois C2G	C3G, cephamycines ¹ , carbapénèmes
BLSE	Pénicillines, C1G, C2G, C3G.	Cephamycines ¹ , Association avec un inhibiteur de B-lactamases ² , carbapénèmes.
Céphalosporinase de haut et très haut niveau (hyperproductive)	C1G, C2G, C3G, cephamycines ¹ et association avec inhibiteur de B-lactamases	Céfépime, Carbapénèmes.
Carbapénèmes	Toutes les B-lactamines y compris les carbapénèmes	Fluoroquinolones (parfois résistance associée).

BLSE: B-lactamases à spectre étendu ; CGI : Céphalosporines de 1^{ère} génération ; CG2 : Céphalosporines de 2^{ème} génération ; CG3 : Céphalosporines de 3^{ème} génération
 1- Céfoxitine, céfotétan ; 2- Acide clavulanique et tazobactam

A côté des bêta-lactames, l'inactivation enzymatique représente le principal mécanisme de résistance des aminoglycosides et des phénicolés. On décrit également ce type de résistance pour le groupe MLS (macrolides, lincosamides, streptogramines), pour les tétracyclines, pour la fosfomycine et plus récemment pour les fluoroquinolones, (Aleksun & Stuart B. Levy, 2007; Guardabassi & Courvalin, 2006; Nikaido, 2009)

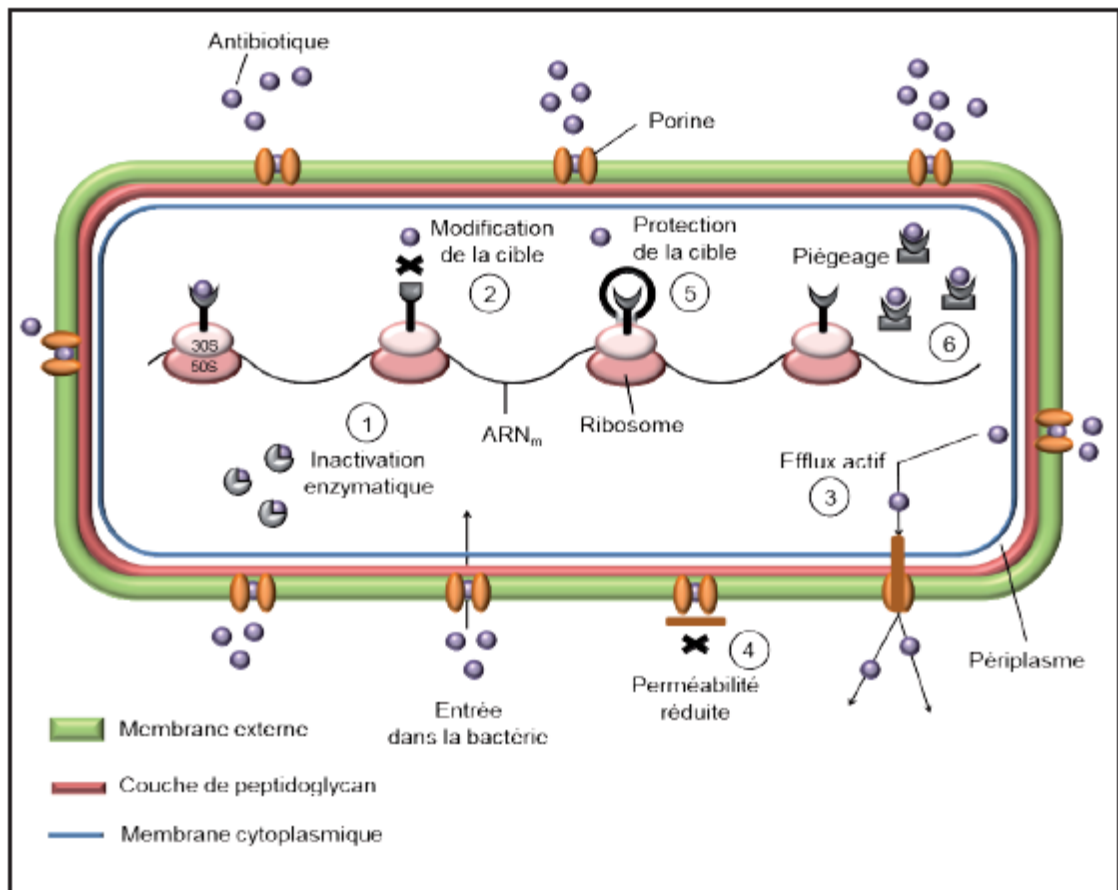


Figure 05 : Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques chez une bactérie

Gram négative, adapté de Guardabassi et Courvalin (2006)

1 : inactivation enzymatique de l'antibiotique, 2 : modification de la cible de l'antibiotique, 3 : efflux actif de l'antibiotique, 4 : perméabilité réduite, 5 : protection de la cible de l'antibiotique, 6 : piégeage de l'antibiotique. ARNm : acide ribonucléique messager

3.6.2 Modification ou remplacement de la cible de l'antibiotique

La cible de l'antibiotique peut être structurellement modifiée ou remplacée, de façon que le composé antibactérien ne puisse plus se lier et exercer son activité au niveau de la bactérie. La modification de la cible, décrite pour presque tous les antibiotiques, est particulièrement importante pour les résistances aux pénicillines, aux glycopeptides et aux

molécules du groupe MLS chez les bactéries Gram positives, et pour les résistances aux quinolones chez les bactéries Gram positives et Gram négatives.

Ce type de résistance peut être la conséquence de l'acquisition de matériel génétique mobile codant pour une enzyme modifiant la cible de l'antibiotique, ou peut résulter d'une mutation au niveau de la séquence nucléotidique de la cible.

Pour les aminosides par exemple : Le gène *armA* code pour une 16S ARNr méthylase qui modifie chimiquement la cible des aminosides. Il confère ainsi un haut niveau de résistance à tous les aminosides excepté la streptomycine.

Le remplacement de la cible de l'antibiotique est cependant décrit pour les sulfamides, les diaminopyrimidines (triméthoprime) et les bêta-lactames dont le cas des *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM) ainsi qu'à tous les bêta-lactames d'usage vétérinaire qui sont un exemple remarquable par la synthèse d'une nouvelle PBP (*Penicillin Binding Protein*), possédant une affinité moindre pour la méthicilline (Aleksun & Stuart B. Levy, 2007; Guardabassi & Courvalin, 2006; Michael et al., 2006; Nikaido, 2009).

3.6.3 Perméabilité réduite

Contrairement aux bactéries Gram positives, dont la paroi est composée de couches épaisses de peptidoglycanes que les antibiotiques traversent par simple diffusion, les bactéries Gram négatives jouissent quant à elles d'une enveloppe plus complexe et plus difficilement franchissable. Ainsi, au sein des bactéries Gram négatives, les antibiotiques hydrophiles pénètrent dans la bactérie via des protéines transmembranaires nommées porines, alors que les molécules hydrophobes diffusent simplement à travers la couche phospholipidique. La membrane externe de certaines bactéries telles que *P. aeruginosa* est moins perméable que celle d'autres espèces, ce qui lui confère un niveau moins élevé de sensibilité aux antimicrobiens. En outre, des mutations au niveau des gènes qui codent pour les porines et qui conduisent à leur perte, ou à la réduction de leur taille ou encore à une diminution de leur expression, se traduiront par l'acquisition de bas niveaux de résistance vis-à-vis de nombreux antibiotiques.

Citons l'exemple de la réduction de l'expression de la porine OmpF chez *E. coli* qui entraîne une réduction de sensibilité aux quinolones, aux bêta-lactames, aux tétracyclines et au chloramphénicol. La diminution de la perméabilité est donc un mécanisme de résistance cliniquement très important chez les bactéries Gram négatives et

plus précisément chez *P. aeruginosa* et les *Enterobacteriaceae*, étant donné le large spectre d'antibiotiques qu'elle cible.

Ce type de phénomène est décrit pour expliquer la résistance aux aminoglycosides parmi les germes anaérobies ainsi que la résistance intrinsèque à bas niveau observée vis-à-vis de cette famille de composés parmi les bactéries anaérobies facultatives telles que les entérocoques et les streptocoques (Aleksun & Levy, 2007; Bennett et al., 2014; Guardabassi & Courvalin, 2006; Nikaido, 2009).

La diminution de l'accumulation cellulaire des antibiotiques peut également résulter d'une baisse de la perméabilité de la membrane. Certaines mutations chromosomiques peuvent avoir pour conséquence une modification du LPS caractérisée par des changements au niveau de l'antigène O. Cette modification entraîne un changement de la charge globale de la surface bactérienne entraînant une diminution de l'efficacité de liaison de certains antibiotiques cationiques (Michael et al., 2006).

3.6.4 Le système d'efflux

Les bactéries possèdent intrinsèquement des systèmes d'efflux actif, dit « énergie-dépendant », qui leur permettent de diminuer l'accumulation cellulaire des antibiotiques. Les gènes codant les systèmes d'efflux sont portés par le chromosome ou par des éléments génétiques mobiles. Les mutations modulant la résistance aux antibiotiques induisent, soit une augmentation de l'expression des pompes membranaires, soit une augmentation de l'efficacité de ces pompes due à des substitutions d'acides aminés. (Michael et al., 2006).

Certains de ces transporteurs sont très spécifiques et on les appelle pompes SDR (pour *specific-drug-resistance*), alors que d'autres agissent sur une multitude de molécules et on les nomme pompes MDR (pour *multiple-drug-resistance*). Les pompes SDR, généralement responsables de hauts niveaux de résistance et dont les gènes sont portés par des éléments génétiques mobiles, représentent un important mécanisme de résistance aux tétracyclines essentiellement parmi les bactéries Gram négatives, aux composés du groupe MLS et aux phénicolés.

Les pompes MDR (dont notamment MexAB-OprM chez *P. aeruginosa*, AcrAB-TolC chez *Escherichia coli*, QacA chez *S. aureus*, VceAB chez *Vibrio cholerae*, MdrL chez *Listeria monocytogenes* et MreA chez *Streptococcus agalactiae*) (Kumar & Schweizer, 2005; Li & Nikaido, 2004; Poole, 2001), généralement responsables de bas niveaux de résistance et dont les gènes sont fréquemment chromosomiques, sont classées en deux groupes sur la base de la source d'énergie utilisée : les transporteurs ABC (pour ATP-

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

binding cassette) utilisant l'hydrolyse de l'ATP et spécifiques de certains composés comme le groupe MLS, et les transporteurs secondaires utilisant le gradient électrochimique transmembranaire de protons et d'ions sodium pour expulser la molécule à l'extérieur de la cellule et responsables de résistances multiples aux antibiotiques (Alekhun & Stuart B. Levy, 2007; Guardabassi & Courvalin, 2006; Nikaido, 2009).

Etude Expérimentale

1 CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

Les animaux dont les denrées sont destinées à l'alimentation humaine sont devenus un réservoir croissant de bactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE). Les bovins sont exposés à de fortes quantités d'antibiotiques, mais les données sur la prévalence des BLSE en filière bovine en Algérie et même ailleurs sont encore limitées par rapport à d'autres secteurs de l'alimentation, tels que la production de volaille. Ce manque d'information nous a incité à mener ce travail dans le but de mettre en évidence les souches d'*Escherichia coli* productrices de bêta lactamases à spectre étendu à partir d'élevages bovins, situés dans quatre Wilayas de l'Est Algérien et pour se faire on a effectué :

- Une étude phénotypique du profil de résistance aux antibiotiques de l'ensemble de souches d' *E coli* isolées.
- Mise en évidence des souches d'*Escherichia coli* productrices de bêta-lactamases à spectre étendu.
- Caractérisation des gènes de résistance aux antibiotiques chez les souches *E coli* productrices de BLSE, notamment les gènes codant pour des bêta-lactamases et d'autres gènes de résistance associés.
- Séquençage des gènes codant les β -lactamases
- Caractérisation des gènes de virulence chez *E coli*.
- Détection des principaux groupes phylogéniques d'*Escherichia coli*.
- Détermination de la clonalité chez *E coli* productrices de bêta-lactamases à spectre étendu.

L'étude phénotypique a été menée au niveau du laboratoire des sciences du vivant de l'institut des sciences agronomique et vétérinaire de Taoura , université Mohamed Chérif Messaadia de Souk-Ahras et l'étude Génotypique a été conduite au niveau de l'institut de la recherche vétérinaire de Tunisie .

Après une présentation des protocoles suivis par les différentes étapes des manipulations, les résultats sont exposés et une discussion à leur propos est menée.

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 Zone d'étude

Notre étude a été menée à travers quatre Wilayas de l'Est Algérien : Souk Ahras, Oum El Bouaghi, Tébessa et Constantine (figure 06).

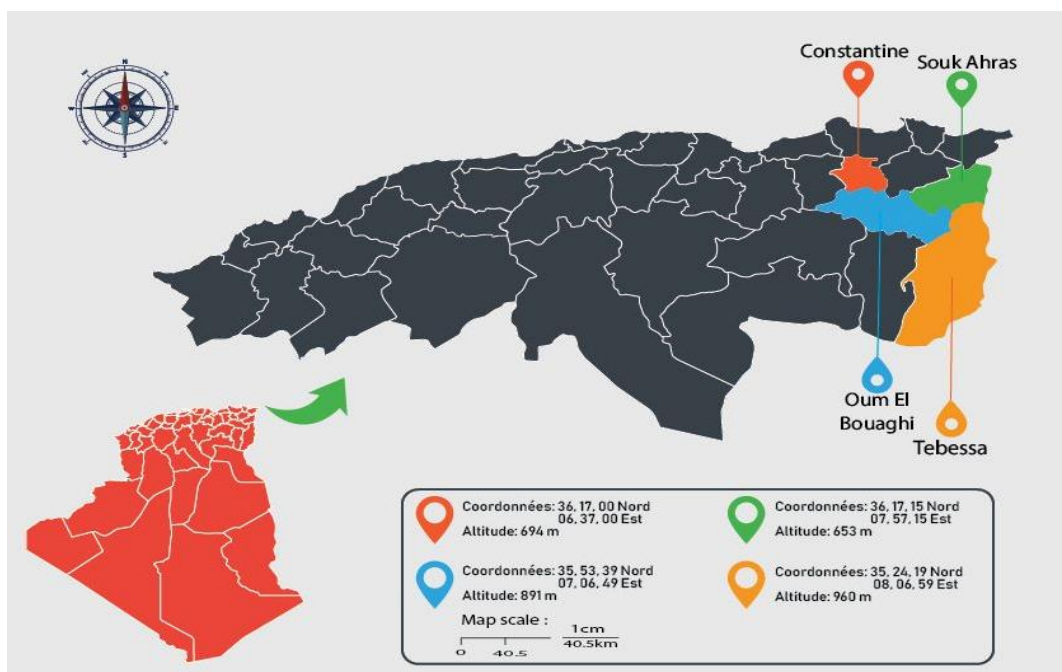


Figure 06 : Carte de l'Algérie montrant les sites d'échantillonnage de l'étude (La carte a été générée avec (Adobe Illustrator v19) (Barour.,2020)

2.2 Echantillonnage

A partir du mois de Mars 2016 jusqu'au mois de Mars 2018, un total de 310 bovins ont été échantillonnés (tableau 04), repartis sur plusieurs élevages de bovins laitiers des Wilayas de l'Est Algérien : Souk Ahras, Tébessa, Oum el Bouaghi et Constantine. Les prélèvements sont effectués par écouvillonnage du rectum, les écouvillons chargés de fèces, sont trempés instantanément dans des tubes à vis contenant 2 ml d'eau physiologique stérile et acheminés directement au laboratoire dans une glacière, pour subir les différents tests bactériologiques.

Tableau 04 : Localisation et nombre de prélèvements par site.

Lieu des prélèvements		Nombre de prélèvements réalisés	
Souk Ahras	Souk ahras	82	166
	Henancha	42	
	Ouled Driss	18	
	Tiffech	24	
Tébessa	El- Aouinet	12	67
	Hammamet	55	
Oum El Bouaghi	Meskiana	10	50
	Oued -Nini	40	
Constantine	Constantine	27	27

2.3 Étude phénotypique

2.3.1 Isolement et identification des souches d'*Escherichia coli*

Les prélèvements récoltés sont ensemencés sur gélose Mac Conkey et incubés 24 h à 37°C; les colonies lactose positif ont subi la coloration de Gram (figure 07) et le test d'oxydase. On a retenu les colonies Gram négative et oxydase négative. Les isolats sont ensuite identifiés à l'échelle de l'espèce en utilisant les galeries API 20 E (bioMérieux, France).



Figure 07: Observation microscopique d'une coloration de Gram d'*Escherichia coli*
(Grossissement 1000X, avec huile à immersion)

2.3.2 Etude de la sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques a été testée par la méthode de diffusion sur gélose, en utilisant la gélose Muller Hinton (Merck), suivant les recommandation de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute)., 2018) (tableau 05).

Pour mettre en évidence la production de beta-lactamases à spectre étendu on a employé le test de synergie entre une céphalosporine de 3^{ème} génération (la céfotaxime) et un inhibiteur de bêta lactamases (amoxicilline-Acide clavulanique).

E. coli ATCC 25922 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 ont été utilisées comme des souches de références BLSE négatives et positives respectivement.

La production de BLSE se manifeste sur l'antibiogramme par une image dite en « bouchon de champagne » ou de « synergie » illustrée en (figure 08). En effet, la résistance seule aux céphalosporines large spectre sur l'antibiogramme n'est pas suffisante pour parler de BLSE. Une bactérie résistante aux céphalosporines large spectre est soit une BLSE, soit une céphalosporinases non BLSE qui est insensibles aux inhibiteurs de β -lactamases (et donc, ne provoquera pas d'image de synergie).

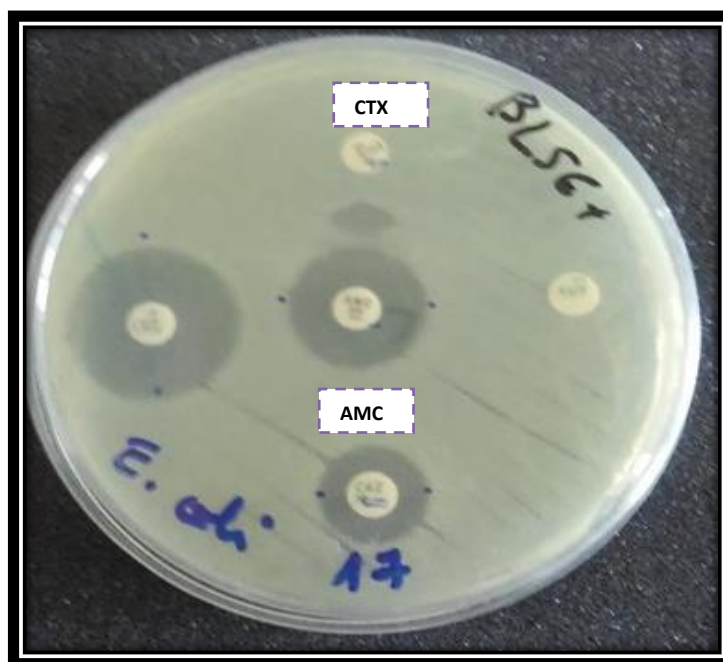


Figure 08 : Test de synergie positif entre les disques de Céfotaxime (CTX) d'une part et le disque d'Amoxicilline/ Acide Clavulanique(AMC) d'autre part, indiquant la production de BLSE (Barour., 2019).

Les antibiotiques testés (Oxoid), leurs concentrations ainsi que les valeurs critiques des zones d'inhibitions sont représentés dans le (tableau 05).

2.3.3 L'étude de la sensibilité à la colistine

L'étude de la sensibilité à la colistine a été investiguée par la recherche de la concentration minimale inhibitrice (CMI) selon les recommandations du (CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute), 2018).

Dans notre étude et pour déterminer la CMI de la colistine, on a utilisé la technique de la microdilution en milieu liquide. Elle consiste en l'utilisation d'une plaque à 96 puits permettant de tester une gamme de différentes concentrations de la colistine (0,5 ; 1 ; 2 ; 4 ; 8 ; 16 et 32 µg/ml), où un inoculum bactérien standardisé à $(1 \text{ à } 5 \cdot 10^8 \text{ UFC/ml})$ se met en culture. La lecture se fait après incubation de 18 heures à 24 heures par visualisation de la turbidité dans les puits.

La CMI de chaque isolat a été lue comme la plus faible dilution démontrant l'absence d'une croissance visible, sur la base des recommandations (CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute), 2018)

Tableau 05: Concentrations des disques d'antibiotiques et valeurs critiques des zones d'inhibition pour la sensibilité antimicrobienne et la concentration minimale inhibitrice pour la sensibilité à la Colistin (CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute), 2018)

Code de l'antibiotique	Concentration du disque (µg)	Valeurs critiques (mm)		
		Sensible	Intermédiaire	Resistant
Ampicilline (AMP)	10 µg	≥17	14-16	≤13
Amoxicillin - clavulanate (AMC)	20/10 µg	≥18	14-17	≤13
Céfaloine (KF)	30 µg	≥18	15-17	≤14
Céfotaxime (CTX)	30 µg	≥26	23-25	≤22
Céfoxitine (Fox)	30 µg	≥18	15-17	≤14
Kanamycine(k)	30 µg	≥18	14-17	≤13
Gentamycine(CN)	10 µg	≥15	13-14	≤12
Triméthoprim-Sulfaméthoxazole(SXT)	1.25/23.75µg	≥16	11-15	≤10
Tétracyclines(Te)	30 µg	≥15	12-14	≤11
Acide Nalidixique (Na)	30 µg	≥19	14-18	≤13
Ciprofloxacine (CIP)	5 µg	≥21	16-20	≤15
Nitrofurantoïne(F)	300 µg	≥17	15-16	≤14
Chloramphénicol (C)	30 µg	≥18	13-17	≤12
Colistine(CT)		CMI(µg/ml)		
		WT	NWT	
		≤2	≥4	

WT : Wild Type/ NWT :Non Wild Type.

CMI: Concentration Minimum Inhibitrice.

2.3.3.1 Protocole de réalisation de la concentration minimale inhibitrice

- Préparation de la solution mère : 2,56 mg de colistine ont été dissous dans 10 ml eau distillée stérile (concentration égale à 2,56 mg/ml).
- Dilution de la solution mère : 100 µl de la solution de la colistine ont été dissous dans 900 µl eau distillée stérile (concentration égale à 256 µg/ml).
- Le volume final dans chaque puits est égal à 100 µl :

ETUDE EXPERIMENTALE

1. 25 µl de milieu Muller-Hinton liquide dans tous les puits.
2. 25 µl de la solution mère diluée de la colistine dans les premiers puits.
3. Dilution de la colistine.
4. 10 µl de la suspension bactérienne
5. 65 µl de milieu Muller-Hinton liquide dans tous les puits (Figure 09).

La souche *E. coli* ATCC 25922 a été utilisée comme contrôle négatif (sensible à la colistine), et une souche d'*E. coli* résistante à la colistine (CMI ≥ 4 µg/ml) a été utilisée comme contrôle positif.

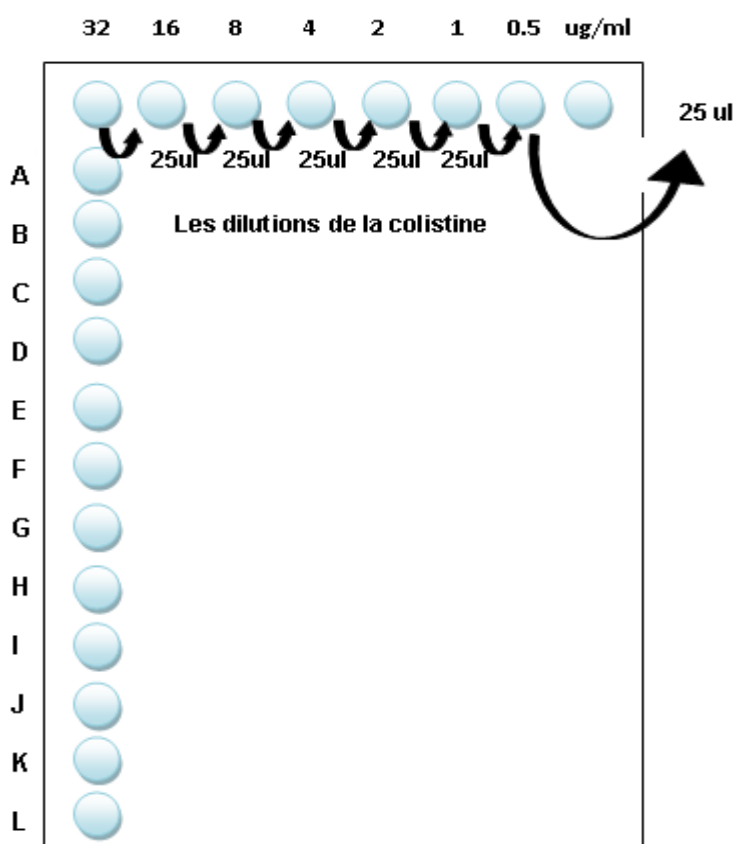


Figure 09 : Une plaque de micro-dilution (Barour., 2020)

2.4 Etude génotypique

Cette étude génotypique concerne uniquement les souches d'*E. coli* productrices de bêta-lactamases à spectre étendu.

2.4.1 Extraction de l'ADN bactérien

Avant d'effectuer les différentes PCR, on a procédé à l'extraction de l'ADN bactérien selon (Al-Gallas et al., 2002). L'ADN à amplifier, a été libéré des bactéries par ébullition. Les bactéries ont d'abord été récoltées à partir d'une culture d'une nuit dans 1 à 5 ml de bouillon Luria Bertani (LB) (Pacto), mises en suspension dans 200 µl d'eau stérile et incubées à 100 ° C pendant 15 min. Après centrifugation du lysat, un échantillon de 150 µl du surnageant a été stocké à - 20 ° C pour un usage ultérieur. La PCR ou Polymérase Chain Réaction sera utilisée dans le but d'amplifier in-vitro une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Pour la détection des produits de PCR, l'électrophorèse a été réalisée sur gel d'agarose à une concentration de 2% : 8 g d'agarose sont dissous dans 400 ml de TBE 0,5 X (45 mM Tris- acide borique et 1mM EDTA [pH 8,0]) puis porté à ébullition. Après refroidissement, 12 µl de Red Safe sont rajoutés à l'agarose puis coulés dans la cuve d'électrophorèse. Les suspensions à analyser sont additionnées à un volume de 5 µl de tampon de charge (Bleu de Bromophénol 25 mg + 5 ml de glycérol + 5 ml de H₂O). La cuve est remplie de tampon TBE 0,5 X, et la migration a été effectuée sous un voltage constant de 130 V pendant 30 minutes. Le résultat de l'électrophorèse est visualisé dans un Transilluminateur sous lumière UV puis la photo est prise par un Gel Doc.

2.4.2 PCR des gènes codant les Béta-Lactamase à Spectre Etendu

La présence des gènes codant les BLSE (CTX-M groupe 1, TEM, SHV) a été recherchée par PCR en utilisant les séquences et les conditions d'amplification représentées dans le (tableau 06) (Jouini et al., 2007; Yolanda Sáenz et al., 2004)

Tableau 06 : Les amorces et les tailles des fragments de gènes de bêta-lactamases.

(Jouini et al., 2007; Yolanda Sáenz et al., 2004)

Gènes	Amorces (5'→3')	Conditions d'amplification	Taille amplifié (pb)
TEM	F-ATTCTTGAAGACGAAAGGGC R-ACGCTCAGTGGAACGAAAAC	3min/94°C ; 30 cycles : 1 min/94°C, 1 min/ 60°C, 1 min/72°C ; 5 min/72°C	1150
SHV	F-CACTCAAGGATGTATTGTG R-TTAGCGTTGCCAGTGCTCG	5 min/96°C ; 30 cycles : 30s/96°C, 30s/60°C, 2 min/72°C ; 5 min/72°C	885
CTX-M- groupe 1	F-GTTACAATGTGTGAGAAGCAG R-CCGTTTCCGCTATTACAAAC	7 min/94°C ; 35 cycles : 50 s/94°C, 40 s/50°C, 1 min/72°C ; 5 min à 72°C	1041

2.4.3 Séquençage des gènes de bêta-lactamases

Cette technique est utilisée pour la caractérisation des gènes *bla* codant les bêta-lactamases (CTX-M et TEM) détectés chez les isolats d' *E .coli*.

2.4.3.1 Technique de séquençage

Dans la plupart des cas, on procède au séquençage à partir du produits direct de la PCR, cependant parfois on visualise des impuretés ou bien on observe des bandes non spécifiques autour de la bande d'intérêt on procède alors à la purification directe de la bande en utilisant le kit QIAquick PCR (Qiagen). Dans le cas où on observe dans le gel une bande de faible intensité ou plus d'une bande on coupe du gel la bande espérée, on purifie l'ADN en utilisant le kit de purification du gel (QIAquick Gel extraction, Qiagen).

Pour le séquençage de tous les amplicons obtenus au cours de ce travail on utilise les mêmes amorces que celle utilisées pour les réactions de PCR préalablement décrites, le séquençage se fait automatiquement dans un system ABI Prism 3730 Genetic Analyser (Applied Biosystems). On utilise la méthode de séquençage cyclique qui se réalise dans un thermocycleur, qui se base sur la méthode classique de Sanger de synthèse interrompue avec les dideoxyribonucléotides (Sanger et al., 1977).

2.4.3.2 Analyse des séquences

Les chromatogrammes obtenus se visualisent avec le programme Chromas Lite 2.01 (Technelysium ,DNA sequencing software, s. d.). Par la suite on procède à l'analyse des séquences en utilisant différents outils informatiques. En premier lieu on réalise un alignement des distinctes séquences en employant les pages web suivantes :

- Attotron Biosensor Corporation:(Attotron Biosensor Corporation, s. d.)
- EMBL-EBI (European Molecular Biology Laboratory from European Bioinformatics Institute (EBI)):(European bioinformatic institute, s. d.)

En second lieu, on compare les séquences globales avec la base de données du GenBank (NCBI .GenBank, s. d.).

2.4.4 Détermination de la présence des intégrons par PCR.

Les amorces utilisées pour la détermination de la présence des intégrons de classe 1 et 2 chez les isolats étudiés sont représentés dans le tableau 07.

Les gènes int1 et int2 ont été recherché ensemble, alors que les régions variables de l'intégron de classe 1 et de classe 2 ainsi que la région qacE-sul-1 ont été recherchées par des PCR simplex.

Les concentrations finales utilisées pour chaque réaction ont été : 10 µM pour chacune des amorces, 10 mM de chaque dNTP, 25 mM de MgCl₂ (Biogène), 5X du tampon d'enzyme (ne contenant pas du MgCl₂) et 5 U de laTaq polymérase.

Tableau 07 : Les amorces utilisées pour la détermination de la présence des intégrons de classe 1 et 2, des régions variables et de la région 3' conservé de l'intégron classe 1 (Y. Sáenz *et al.*, 2010).

Amorces	Séquence (5' → 3')	Gène ou région	Taille (pb)
IntI1-F	GGGTCAAGGATCTGGATTTTCG	<i>intI1</i>	483
IntI1-R	ACATGGGTGTAAATCATCGTC		
Int-F	GGCATCCAAGCAGCAAG	Classe 1 intégron variable région	Variable selon le contenu
Int-R	AAGCAGACTTGACCTGA		
IntI2-F	CACGGATATGCGACAAAAAGGT	<i>intI2</i>	788
IntI2-R	GTAGCAAACGAGTGACGAAATG		
Hep-F	CGGGATCCCGGACGGCATGCACGATTTGTA	Classe 2 intégron variable région	Variable selon le contenu
Hep-R	GATGCCATCGCAAGTACGAG		
<i>qac</i> -F	GGCTGGCTTTTTCTTGTTATCG	Région <i>qacEΔ1-sul1</i>	1125
<i>sul1</i> -R	GCGAGGGTTTCCGAGAAGGTG		

2.4.4.1 Conditions de d'amplification

2.4.4.1.1 Amplification des intégrons de classe 1 et 2 et de la région *qac-sul1*

Dénaturation initiale : 94°C pendant 5 mn ; 30 cycles de : dénaturation à 94°C pendant 1 mn ; hybridation à 62°C pendant 30 s, élongation à 72 °C pendant 1 mn ; et élongation finale : 72°C pendant 8mn.

2.4.4.1.2 Amplification des régions Variables

Dénaturation initiale : 94°C pendant 5 mn ; 30 cycles de : dénaturation à 94°C pendant 1 mn ; hybridation à 55°C pendant 1 mn, élongation à 72 °C pendant 5 mn ; et élongation finale : 72°C pendant 8mn. On ajoute à l'étape d'élongation 5 s à partir du deuxième cycle.

2.4.5 Détection des gènes *mcr1* et *mcr 2* codant la résistance à la colistine

Les gènes de type *mcr1* et *mcr2* ont été analysés par PCR multiplex. Les amorces utilisés et les conditions d'amplification sont représentées dans (tableau 08)

Tableau 08: Les amorces utilisées pour la détermination des gènes (*mcr1* et *mcr2*) et les conditions d'amplification chez *E. coli* (Wang et al., 2018).

Gène	Amorces (5'→3')	Condition d'amplification	Taille du fragment amplifié
<i>mcr-1</i>	MCR-1F : ATCAGCCAAACCTATCCCATCG	Dénaturation initiale: 94 °C pendant 5 min.30 cycles de 94 °C/1min, 55/30s, 72°C/1 min. Elongation finale :72 °C/10 min	1275 pb
	MCR-1R : GCAGACGCACAGCAATGCCTAT		
<i>mcr-2</i>	MCR-2F: GCGATGGCGGTCTATCCTGTAT		378 pb
	MCR-2R: TGCGATGACATGGGGTGTCAGC		

2.4.6 Détermination des gènes des résistances plasmidiques aux quinolones (*qnr*) chez *Escherichia. coli*

Les gènes de type *qnrA*, *qnrB* et *qnrS* (codant la résistance acquise aux quinolones) ont été analysés par PCR multiplex. Les amorces utilisées sont représenté dans le (tableau 09).

Tableau 09: Les amorces utilisées pour la détermination de trois gènes (*qnr*) chez *E. coli* (Cattoir et al., 2007)

Gènes	Amorces (5' – 3')	Taille (pb)
<i>qnrA1</i> à <i>qnrA6</i>	QnrAm-F: AGAGGATTTCTCACGCCAGG QnrAm-R: TGCCAGGCACAGATCTTGAC	528
<i>qnrB1</i> à <i>qnrB6</i>	QnrBm-F : GGMATHGAAATTCGCCACTG ^c QnrBm-R : TTTGCYGYTCGCCAGTCGAA ^c	264
<i>qnrS1</i> à <i>qnrS2</i>	QnrSm-F : GCAAGTTCATTGAACAGGGT QnrSm-R : TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	428

Les conditions d'amplification sont les suivantes:

95°C pendant 10 min ; 35 cycles : 95°C pendant 1 min, 54°C pendant 1 min, 72 °C pendant 1 min ; puis enfin une élongation finale de 10 min à 72 °C.

2.4.7 Détection des gènes de résistances à la tétracycline et aux sulfamides

La présence des gènes associés à la résistance à la tétracycline et au sulfamide a été recherchée par PCR en utilisant les amorces et les conditions d'amplification spécifiques (tableau10) et (tableau 11)

Tableau 10: Amorces et conditions d'amplification des gènes codant pour la résistance aux tétracyclines (Guardabassi et al., 2000)

Amorces (séquence 5'→3')	Conditions	Taille
<i>tet A</i> GTAATTCTGAGCACTGTCGC CTGCCTGGACAACATTGCTT	5 min à 95°C: 1 cycle 30 sec à 95°C, 30 sec 62°C 45sec à 72°C: 23cycles 7 min à 72°C: 1 cycle	937 pb
<i>tet B</i> CTCAGTATTCCAAGCCTTTG CTAAGCACTTGTCTCCTGTT	5 min à 95°C: 1 cycle 30 sec à 95°C, 57°C 30 sec 20 sec à 72°C : 25 cycles 7 min à 72°C: 1 cycle	416 pb
<i>tet C</i> TCTAACAATGCGCTCATCGT GGTTGAAGGCTCTCAAGGGC	5 min à 95°C: 1 cycle 30 sec à 95°C, 62°C 30 sec, 45 sec à 72°C: 23cycles 7 min à 72°C: 1 cycle	570 pb

Tableau 11: Amorces et conditions d'amplification des gènes codant pour la résistance aux sulfamides

Amorces (séquence 5'→3')	Conditions d'amplification	Taille (pb)
<i>sul1</i> TGGTGACGGTGTTCCGGCATTG GCGAGGGTTTCCGAGAAGGTG	5 min à 94°C: 1cycle 30 sec à 94°C, 30 sec à 63°C, 1min à 72°C : 23cycles 8 min à 72°C: 1 cycle	789 (Mazel et al., 2000)
<i>sul2</i> CGGCATCGTCAACATAACC GTGTGCGGATGAAGTCAG	5 min à 94°C: 1 cycle 30 sec à 94°C, 30 sec à 50°C, 15 sec à 72°C: 23cycles 8 min à 72°C: 1 cycle	722(Yolanda Sáenz et al., 2004)
<i>sul3</i> GAGCAAGATTTTTGGAATCG CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTT GG	5 min à 94°C: 1 cycle 1min à 94°C, 1min à 51°C, 1min à 72°C : 23cycles 5 min à 72°C: 1 cycle	792 (Yolanda Sáenz et al., 2004)

2.4.8 Détermination des gènes codant pour les facteurs de virulence par PCR

Les tableaux 12 et 13 montrent les amorces et les conditions d'amplifications utilisées (Chapman et al., 2006; Wu et al., 2007)

2.4.8.1 Gènes de la virulence

L'occurrence des gènes les plus significatifs, codant pour des facteurs de virulence spécifiques pour InPEC et ExPEC, a été étudiée en utilisant des PCRs –multiplex comme défini précédemment par(Chapman et al., 2006; Wu et al., 2007)). Les gènes ciblés étaient liés à (1) l'adhésion bactérienne (*fimH*, *fasA*, *bfpA*, *aggC*, *bmaE*, *iha*, *papC*, *papG* allele I, *papG* alleles II et III, *sfaS*, *tsh*, *nfaE*, *eaeA*); (2) acquisition de fer (*ireA*, *fyuA*, *iutA*); (3) la résistance au sérum (*iss*, *traT*); (4) toxines et hémolysines (*stx1*, *stx2*, *cnf1 / 2*, *hlyA*, *cvaC*, *cdt*, *cdtB*, *ehxB*, *ehxA*, *eltA*, *etll*, *east1*); (5) invasion (*ibeA*, *ipaH*); et (6) le système de sécrétion de type III (*escV*). Divers gènes (*PAI [malX]*) ont également été étudiés. Les pathovars ont été identifiés en fonction de la présence de gènes de virulence spécifiques: ExPEC (*fimH*, *fyuA*, *hlyA*, *papC* et *papG* allele III), UPEC (*iutA*), EHEC (*stx1* et / ou *stx2*, *eaeA*), EPEC typique / atypique (*eaeA* , *bfpA* / *eaeA*), EIEC (*ipaH*), EAEC (*east1*, *aggC*) et NMEC / APEC (*ibeA*) (Chapman et al., 2006; Coura et al., 2017; Kaper et al., 2004)..

Tableau 12 : Amorces utilisées pour la recherche des gènes de virulences (Al-Gallas et al., 2007; Beaudry et al., 1996; Chapman et al., 2006; Tornieporth et al., 1995; Wu et al., 2007)

PCR	Genès de virulence	séquence 5' → 3'	Taille du produit
1	<i>malX</i>	GGACATCCTGTTACAGCGCGCA TCGCCACCAATCACAGCCGAAC	930
	<i>fimH</i>	TGCAGAATGTGCGCCGCGTGG GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	508
	<i>IbeA</i>	AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC TGGTGCTCCGGCAAACCATGC	170
2	<i>FyuA</i>	TGATTAACCCCGCGACGGGAA CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	880
	<i>BmaE</i>	ATGGCGCTAACTTGCCATGCTG AGGGGGACATATAGCCCCCTTC	507
	<i>IutA</i>	GGCTGGACATCATGGGACTGG CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	300

Suite du Tableau 12			
	<i>PapG</i> allele III	GGCCTGCAATGGATTTACCTGG CCACCAAATGACCATGCCAGAC	258
3	<i>HlyA</i>	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	1177
	<i>NfaE</i>	GCTTACTGATTCTGGGATGGA CGGTGGCCGAGTCATATGCCA	559
	<i>PapG</i> allele I	TCGTCTCAGGTCCGGAATTT TGGCATCCCCCAACATTATCG	461
	<i>papC</i>	GTGGCAGTATGAGTTAATGACCGTTA ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	200
4	<i>CvaC</i>	CACACACAAACGGGAGCTGTT CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT	680
	<i>CdtB</i>	AAATCAACCAAGAATCATCCAGTTA AAATCTCCTGCAATCATCCAGTTTA	430
	<i>TraT</i>	GGTGTGGTGCGATGAGCACAG CAACGGTTCAGCCATCCCTGAG	290
	<i>papG</i> allele II	GGGATGAGCGGGCCTTTGAT CGGGCCCCCAAGTAACTCG	190
5	<i>cnf1</i>	AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG CATTCAGAGTCCTGCCCTCATTATT	498
	<i>sfaS</i>	GTGGATACGACGATTACTGTG CCGCCAGCATTCCCTGTATTC	240
6	<i>Iha</i>	CTGGCGGAGGCTCTGAGATCA TCCTTAAGCTCCCGCGGCTGA	827
	<i>Iss</i>	CAGCAACCCGAACCACTTGATG AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA	323
	<i>ireA</i>	GATGACTCAGCCACGGGTAA CCAGGACTCACCTCACGAA	254
7	<i>ehxA</i>	CACACGGAGCTTATAATATTCTGTCA AATGTTATCCCATTGACATCATTGACT	321

Suite du **tableau 12**

	<i>eaeA</i>	CATTATGGAACGGCAGAGGT ATCTTCTGCGTACTGCGTTCA	790
	<i>stx1</i>	GAACGAAATAATTTATATGT TTTGATTGTTACAGTCAT	900
	<i>Stx2</i>	ATAAATCGCCTATCGTTGACTAC AGAACGCCCACTGAGATCATC	180
8	<i>Elt</i>	GGCGACAGATTATACCGTGC CCGAATTCTGTTATATATGTC	696
	<i>fasA</i>	TCTGCTCTTAAAGCTACTGG AACTCCACCGTTTGTATCAG	333
	<i>est II</i>	ATCGCATTTCTTCTTGCATC GGGCGCCAAAGCATGCTCC	172
9	<i>aggC</i>	GCCAAGATCCGAGATTGA TATTAAACCGATGGTAGCG	528
	<i>easT1</i>	CCATCAACACAGTATATCCGA GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT	111
10	<i>Cdt</i>	GAGTTATTCCTCCCCAGGC CAAAGGCATCAACAGCAGAA	108
11	<i>IpaH</i>	GTTCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC GCCGTCAGCCACCCTCTGAGATAC	600
12	<i>bfpA</i>	AATGGTGCTTGCGCTTCGTGC GCCGCTTTATCAACCTGGTA	326

Tableau 13: Conditions d'amplification des gènes de virulence (Chapman et al., 2006; Wu et al., 2007)

Gène	Dénaturation initiale	Dénaturation	Hybridation	Elongation	Elongation finale	Nombre de cycles
PCR 1 à PCR 6	95°C 15mn	94°C : 30s	63°C : 30s	72°C : 3mn	72°C : 10mn	25
PCR 7	94°C : 3mn	94°C : 5s	59°C : 10s	72°C : 30s	72°C : 10mn	30
PCR 8 et PCR 10	94°C 5mn	94°C 1mn	58°C 1mn	72°C 1mn	72°C 7mn	30
PCR 9	94°C 5mn	94°C 1 mn	53°C 1mn	72°C 1mn	72°C 7mn	30
PCR11	94°C 2mn	94°C 1mn	63°C 1mn	72°C 30S	72°C 10mn	30
PCR12	94°C 3mn	94°C 5s	59°C 10s	72°C 30S	72°C 5mn	30

2.4.9 Détermination des Groupes phylogénétiques par PCR

Les amorces utilisées pour la détermination des groupes phylogénétiques d'*E. coli* sont représentés dans le (tableau 14).

2.4.9.1 Amplification des gènes ChuA, YjaA et TSPE4.C2

Les concentrations finales utilisées pour chaque réaction ont été:

- 25 pmol pour chacune des amorces,
- 0,2 mM de chaque dNTP (Amersham Biosciences),
- 2,5 mM de MgCl₂ (Promega, Amersham-pharmacia),
- 1,5U de Taq polymérase (Promega, Amersham-pharmacia) .
- 1X du Tampon d'enzyme (MgCl₂).

Tableau 14: Liste des amorces utilisées pour la détermination des groupes phylogénétiques d'*E. coli* (Clermont et al., 2000)

Locus	Amorces	Taille du fragment amplifié
<i>ChuA</i> <i>ChuA.1</i> <i>ChuA.2</i>	5'-GAC GAA CCA ACG GTC AGG AT-3' 5'-TGC CGC CAG TAC CAA AGA CA-3'	279 pb
<i>YjaA</i> <i>YjaA.1</i> <i>YjaA.2</i>	5'-TGA AGT GTC AGG AGA CGC TG-3' 5'-ATG GAG AAT GCG TTC CTC AAC-3'	211 pb
<i>TspE4C2</i> <i>TspE4C2.1</i> <i>TspE4C2.2</i>	5'-GAG TAA TGT CGG GGC ATT CA-3' 5'-CGC GCC AAC AAA GTA TTA CG-3'	152 pb

2.4.9.2 Condition de la PCR

- Dénaturation initiale: 94°C pendant 4 min,
- 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant 15s,
- Hybridation à 60°C pendant 30s,
- Elongation à 72°C pendant 45s .
- Etape d'élongation finale à 72°C pendant 5 min.

2.4.9.3 Interprétation des résultats de PCR

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

L'interprétation des résultats(tableau 15) a été effectuée selon (Clermont et al., 2000) et les sous-types selon (Escobar-Páramo et al., 2004)..

Tableau 15: Interprétation des résultats de PCR des groupes phylogéniques (Clermont et al., 2000)

PCR			Phylogroupes	Sous-types
<i>u A</i>	<i>Ch</i>	<i>Yj</i>		
	<i>aA</i>	<i>Tsp</i>		
		<i>E4C2</i>		
-	-	-	A	A0
-	+	-	A	A1
+	+	-	B2	B2₂
+	+	+	B2	B2₃
+	-	-	D	D1
+	-	+	D	D2
-	+/-	+	B1	B1

2.4.10 Etude de la clonalité des isolats d'E Coli par électrophorèse en champ pulsé (PFGE : Pulsed Field Gel Electrophoresis)

Le principe de cette électrophorèse (figure 10) consiste à changer l'orientation et/ou la polarité du champ électrique alternativement au cours du temps. A chaque modification du champ, la molécule d'ADN doit se réorienter parallèlement au nouveau champ. Le temps nécessaire à la réorientation est proportionnel à la longueur de la molécule. Lorsque le champ est rétabli dans son sens initial, la molécule doit une nouvelle fois se réorienter. Ces temps de réorientation provoquent un retardement de la migration nette qui est proportionnel à la taille de la molécule. Le support de migration est un gel d'agarose à 1% et la taille des fragments séparés est de l'ordre de 50 kb à quelques mégabases. Le protocole utilisé est celui de (Gautom, 1997) avec de légères modifications.

2.4.10.1 Préparation des inserts

A partir d'une culture pure de 24 h sur boîte de BHI agar (Brain heart infusion), on réalise une suspension en 3 ml de tampon SE (75 mM NaCl; 25 mM EDTA, pH 8) jusqu'à obtenir une absorbance de 1,35 à 610 nm.

On prépare l'agarose (Chromosomal Grade Agarose, BioRad) à 1,5% dans du tampon TBE(Tris, Borate, EDTA) et on le maintient à 55°C sous agitation. On mélange

0,5 ml de la suspension bactérienne avec 0,5 ml d'agarose et on le distribue dans les moules. On laisse solidifier pendant quelques minutes au réfrigérateur.

2.4.10.2 Lyse bactérienne

On ajoute 3 ml du tampon de lyse (50 mM Tris; 50 mM EDTA; 1% sarcosil; 0,1 mg/ml protéinase K, pH 8) à chaque insert et on laisse incuber durant 2 h dans un bain marie sous agitation à 56°C.

2.4.10.3 Lavage des inserts

Après avoir éliminé le tampon de lyse, on procède aux lavages suivants, dans le bain marie sous agitation et à 56°C:

- 10 ml d'eau distillée stérile chaque 10 min, trois fois.
- 10 ml de TE chaque 10 min, deux fois.
- Un troisième lavage avec 10 ml de TE à température ambiante.
- On peut garder les inserts à 4°C pour de futurs usages.

2.4.10.4 Digestion enzymatique

Pour la digestion on utilise la moitié d'un insert pour chaque souche étudiée. L'enzyme de restriction utilisée est le *XbaI* (New England, Biolabs). Le volume final du tube de digestion est de 100 µl pour chaque souche, auquel on a ajouté 40 U d'enzyme *XbaI*, BSA à 0,01%, un volume nécessaire du tampon à 10 X (10 µl) et on ajuste le volume avec de l'eau distillée stérile. On laisse incuber durant une nuit à 37°C.

2.4.10.5 Préparation du gel d'agarose

On prépare un gel d'agarose (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad) à 1% qu'on dissout dans du TBE 0,5 X. On place l'insert contenant l'ADN digéré de chaque souche sur une dent du peigne du moule ou on va par la suite couler l'agarose. Dans le dernier puits on met l'insert contenant l'ADN de *S. enterica* sérovar Braenderup H9812 digéré par *XbaI* utilisé comme taille standard. Après refroidissement de l'agarose (température = 60 °C), l'agarose est coulé dans le moule et on laisse se solidifier à température ambiante.

2.4.10.6 Electrophorèse

Se réalise dans une cuve d'électrophorèse en champ pulsé CHEF-DR III (BioRad Laboratories, Richmond) avec 2 L de TBE 0,5 X auquel on ajoute du Thiourea à 75 µM pour éviter la dégradation de l'ADN. Les conditions d'électrophorèse sont : une durée de l'électrophorèse 22h avec un temps initial de pulsation de 5s et un temps final de pulsation

de 50s ; un voltage de 6 V/cm, un angle de migration de 120°, une température égale à 14°C et on maintient la vitesse de la pompe de refroidissement à 70.

2.4.10.7 Coloration du gel et visualisation

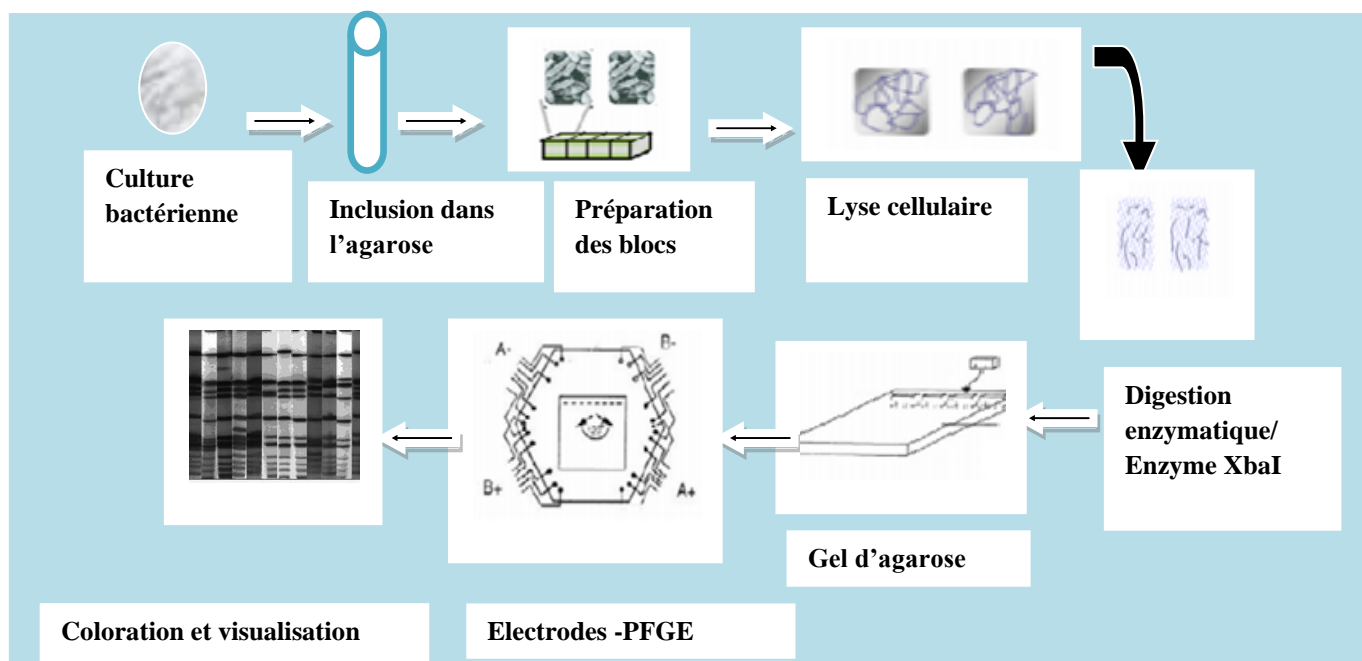


Figure 10 : Schéma illustrant la technique de PFGE.(Barour.,2020)

Après électrophorèse, le gel a été placé dans 200 ml d'une solution de bromure d'éthidium (20 µl/ 200ml) pendant 10 min. Puis on fait un lavage dans l'eau distillée pendant 30 min. On visualise le gel avec un transilluminateur UV et on le photographie avec le capteur d'image.

2.4.10.8 Analyse des pulsotypes de PFGE

L'interprétation des gels d'électrophorèse a été faite visuellement selon les critères de (Tenover et al., 1995). Chaque souche peut être considérée identique, très proche, probablement proche ou différente d'une autre souche si le nombre des fragments d'ADN diffère respectivement de 0, 1 à 3, 4 à 6 ou ≥ 7 . Les souches identiques, très proches, ou probablement proches peuvent avoir un ancêtre en commun.

2.5 Analyses statistiques

- L'analyse descriptive: la représentation graphique a été réalisée à l'aide du programme (Microsoft Office Excel, 2007).
- L'analyse des données: Pour comparer les corésistances des différents isolats, le test de Kruskal – Wallis a été utilisé (tableau 19). Ce test est un test statistique non paramétrique qui évalue les différences entre trois groupes d'échantillons indépendant ou plus, sur une seule variable continue non distribuée normalement (Kruskal & Wallis, 1952).
- Analyse en grappes: nous avons utilisé le logiciel gratuit (Past 3.22), pour déterminer le coefficient de corrélation entre le nombre de résistances et le nombre de souches pour chacun des phénotypes d'antibiogramme détectés, en utilisant un groupe d'appariement d'algorithmes et la mesure de similitude en utilisant la distance euclidienne. Le coefficient de corrélation était égal à 0, 776 (figure12).

3 RÉSULTATS

Une partie (phénotypique) des résultats de cette thèse a fait l'objet d'une publication :

Barour D, Berghiche A, Boulebda N (2019) **Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from cattle in Eastern Algeria**, *Veterinary World*, 12(8): 1195-1203.

3.1 Identification des isolats.

Sur les 310 échantillons étudiés, 300 ont poussé sur gélose Mac Conkey (MC), à partir desquels on a pu isoler 300 isolats d'*Escherichia coli*, ce qui représente un taux d'isolement de 100%.

Ces isolats ont été identifiés par caractérisation biochimique en utilisant la galerie Api 20E. Toutes les souches sont isolées à partir de matières fécales de bovins des régions de Souk Ahras, Tébessa, Oum El Bouaghi et Constantine.

3.2 Étude phénotypique de la sensibilité aux antibiotiques.

Cette étude vise à déterminer les taux de résistance des souches d'*E. Coli* à un panel de 13 antibiotiques, appartenant à neuf familles différentes, ainsi que de déterminer les taux de multirésistances ainsi que les différents phénotypes de résistance aux antibiotiques.

3.2.1 Taux de résistances aux antibiotiques dans les différentes régions de l'étude chez *Escherichia coli*

Le nombre de souches *E coli* testées pour leur sensibilité aux antibiotiques dans les quatre régions d'étude, est réparti comme suit : Souk Ahras (162 isolats), Tébessa (62 isolats), Oum el Bouaghi (50 isolats) et Constantine (26 isolats). Les taux de résistance sont représentés dans le (tableau 16).

- Région de Souk Ahras : on a enregistré des taux élevés de résistance pour l'ampicilline (55.55%), tétracycline (44.44%) et triméthoprim-sulfaméthoxazole (20.99%), par contre des taux modérés à faibles sont enregistrés pour le reste des antibiotiques testés, allant de (17.90%) pour la céphalotine, jusqu'à (1.23%) pour la gentamycine, Toutes les souches (3/1.82%) résistantes à la colistine sont isolées dans la région de Souk Ahras.

- Région de Tébessa : on a enregistré des taux élevés de résistance pour l'ampicilline (75.81%), tétracycline (48.39%) et céphalotine (22.58), par contre des taux faibles à modérés sont enregistrés pour le reste des antibiotiques testés, allant de (3.23%) pour l'acide nalidixique , jusqu'à (14.52%) pour le triméthoprime - sulfaméthoxazole . Une absence de résistance est enregistrée pour céfoxitine, gentamycine, ciprofloxacine, colistine et chloramphénicol

- Région de Oum El Bouaghi : On a enregistré des taux élevés de résistance pour l'ampicilline (56 %), tétracycline (42%) et céphalotine (36%), des taux faibles à modérés sont enregistrés pour le reste des antibiotiques testés, allant de (2%) pour la kanamycine , jusqu'à (18 %) pour l'amoxicilline –acide clavulanique , ici le taux de résistance au céfotaxime est de (16%)

Une absence de résistance est enregistrée pour la colistine et le nitrofurantoïne.

-Région de Constantine : on a enregistré des taux élevés de résistance pour l'ampicilline (100%),céphalotine (69.23%), céfotaxime (46.15%), tétracycline (42.31%) triméthoprime - sulfaméthoxazole (38.46%), acide nalidixique(34.61%), ciprofloxacine ,nitrofurantoïne et kanamycine (30.77%) pour chacun et (23.08%) pour le chloramphénicol, des taux faibles sont enregistrés pour la gentamycine et céfoxitine(7.67%) pour chacun.. Une absence de résistance est enregistrée pour la colistine

3.2.2 Taux global de résistance aux antibiotiques

Les taux de résistance (tableau 17) des 300 *E. coli* isolées montrent des niveaux élevés de résistance à l'ampicilline (63.67%) , à la tétracycline (44.67%) et à la céphalotine (26.33%), des taux de résistance modérés ont été observés pour le triméthoprim - sulfaméthoxazole (18.67%), céfotaxime (13.67%), l'acide nalidixique (11.33%)et l'amoxicilline / clavulanate (10.33%); cependant de faibles taux de résistance ont été observé pour la ciprofloxacine (9.67%), kanamycine (7.67%), chloramphénicol (6.33%), nitrofurantoïne (6.33%),céfoxitine (2,67%), gentamycine (2.67%) et pour la colistine (1%).

Tableau 16: Taux de résistance aux antibiotiques chez les isolats d'*Escherichia. Coli* dans les quatre régions de l'étude

Antibiotiques	Souk -Ahras	Tébessa	Oum el - Bouaghi	Constantine
	(n/%)	(n/%)	(n/%)	(n/%)
Ampicilline (AMP)	(90/55.55)	(47/75.81)	(28/56)	(26/100)
Amoxicillin+Clavulinate (AMC)	(16/9.88)	(3/4.84)	(9/18)	(3/11.54)
Céphalotine (KF)	(29/17.90)	(14/22.58)	(18/36)	(18/69.23)
Cefotaxime (CTX)	(17/10.49)	(4/6.45)	(8/16)	(12/46.15)
Cefoxitine(FOX)	(4/2.47)	(0/0)	(2/4)	(2/7.69)
Kanamycin(K)	(11/6.79)	(3/4.84)	(1/2)	(8/30.77)
Gentamycin (CN)	(2/1.23)	(0/0)	(4/8)	(2/7.69)
Trimetho(prim/Sulfamethoxazole (SXT)	(34/20.99)	(9/14.52)	(3/6)	(10/38.46)
Tétracycline (Te)	(72/44.44)	(30/48.39)	(21/42)	(11/42.31)
Nalidixic Acid (NA)	(21/12.96)	(2/3.23)	(2/4)	(9/34.61)
Ciprofloxacine(CIP)	(15/9.26)	(0/0)	(6/12)	(8/30.77)
Colistine (CT)	(3/1.85)	(0/0)	(0/0)	(0/0)
Nitrofurantoin(F)	(6/3.70)	(5/8.06)	(0/0)	(8/30.77)
Chloramphenicol(C)	(9/5.55)	(0/0)	(4/8)	(6/23.08)

Cependant, on a mis en évidence douze souches (4%) *E coli* productrices de bêta-lactamases à spectre étendu.

Tableau 17: Fréquences de résistance aux antibiotiques chez les 300 isolats d'*Escherichia. Coli*.

Familles des antibiotiques	Antibiotiques	Isolats sensibles		Isolats résistants	
		n	%	n	%
Beta-Lactamines	Ampicilline (AMP)	109	36,33	191	63,67
	Amoxicilline+ Clavulinate (AMC)	269	89,67	31	10,33
Céphalosporines	Céphalotine (KF)	221	73,67	79	26,33
	Céfotaxime (CTX)	259	86,33	41	13,67
	Céfoxitine(FOX)	292	97,33	8	2,67
Aminoglycosides	Kanamycine(K)	277	92,33	23	7,67
	Gentamicine (CN)	292	97,33	8	2,67
Sulfonamides	Triméthopri- me-Sulfamethoxazole (SXT)	244	81,33	56	18,67
Cyclines	Tétracycline (Te)	166	55,33	134	44,67
Quinolones	Nalidixic Acide (NA)	266	88,67	34	11,33
	Ciprofloxacine(CIP)	271	90,33	29	9,67
Polymyxines	Colistine (CT)	297	99	3	1
Nitrofuranes	Nitrofurantoin(F)	281	93,67	19	6,33
Phénicolés	Chloramphenicol(C)	281	93,67	19	6,33

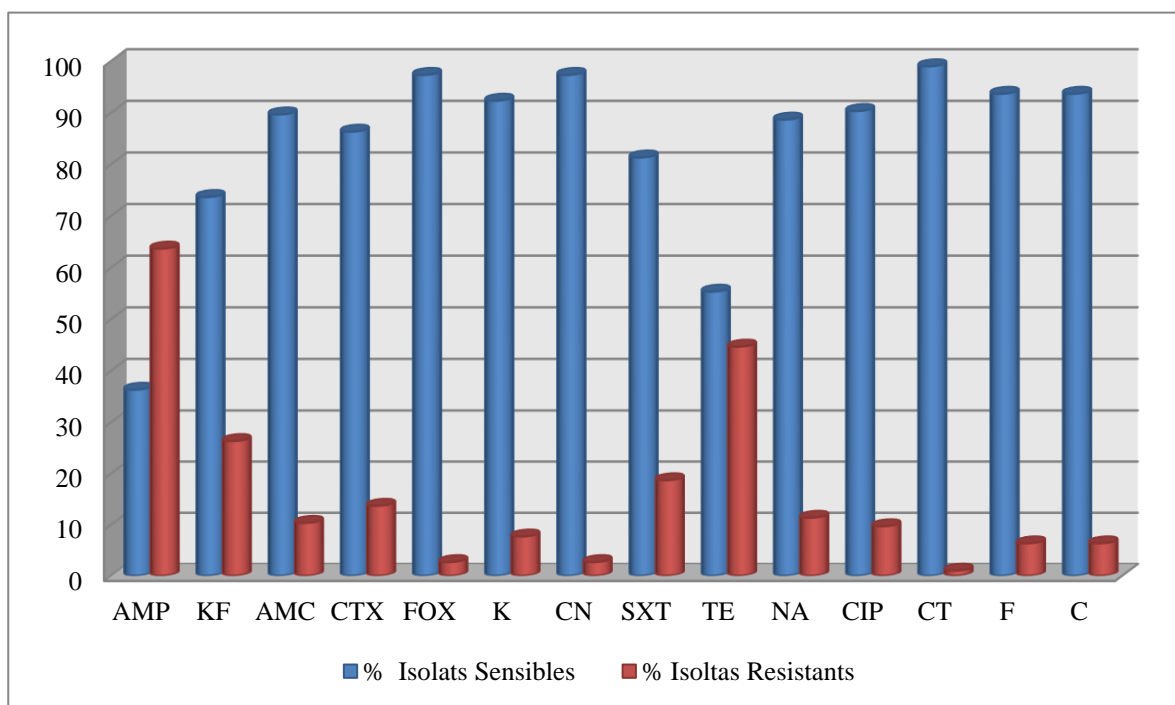


Figure 11 : Fréquences de résistance aux antibiotiques des 300 isolats d'*Escherichia coli*.

3.2.3 Corésistances et taux de Multirésistances (MDR)

L'analyse de corésistance révèle que (80/26.67%) des isolats sont sensibles à tous les antibiotiques, (20/60%) sont résistants à un seul antibiotique, (20/60%) sont résistants à deux antibiotiques, (35/11.67%) sont résistants à trois antibiotiques et (65/21.67%) sont résistants à plus de trois antibiotiques.

Sur la base des résultats du test de Kruskal – Wallis (test non paramétrique), on peut estimer qu'il existe une différence significative entre les différents taux de corésistance avec une valeur ($p = 0.0902$), montrant ainsi une grande variété de phénotypes (tableaux 18 et 19) Le taux d'isolats présentant une multi-résistance (MDR) a atteint (89/29.67%).

NB : la multidrug résistance (MDR) , signifie la résistance à trois familles d'antibiotiques ou plus, tout en considérant les bêta-lactamines et les céphalosporines comme deux familles différentes d'antibiotiques .

Tableau 18 : Co-résistances des 300 isolats d'*Escherichia coli* .

Nombre D'isolats E coli	Nombre (n) et pourcentages(%) des isolats résistants à :										Kruscal - Walis χ^2 p valeur
	Aucun antibiotique		Un antibiotique		Deux antibiotiques		Trois antibiotiques		Plus de trois antibiotiques		
	N	%	n	(%)	n	(%)	N	(%)	n	(%)	
300	80	26.67	60	20	60	20	35	11.67	65	21.67	0.00902

Tableau 19 : Résultats du test de Kruskal-Wallis

	A	B
A	1	0,01219
B	0,01219	1

Mann-Whitney pair wise comparaison
H (K2)=6,8182
Hc (tie-corrected)=6,8182

3.2.4 Variété de profils de phénotypes de résistance aux antibiotiques.

On a enregistré une grande variété de phénotypes avec 77 profils d'antibiorésistance différents, variant de la sensibilité à l'ensemble des antibiotiques (80/26.67%) jusqu'à la résistance à 11 antibiotiques(2/0.66%). Les deux phénotypes les plus fréquents sont AMP et AMP-TE avec des taux (13.33 %) et (11%) respectivement suivis par TE et la combinaison AMP-SXT-TE avec (5.67%) et (4%) respectivement. (tableau 20), Le coefficient de corrélation des différents clusters était égal à 0, 776.

Douze phénotypes différents sont producteurs de β -lactamases à spectre étendu , avec un taux de (4 %), tous sont des MDR allant de la résistance à cinq antimicrobiens jusqu'à la combinaison de 11.

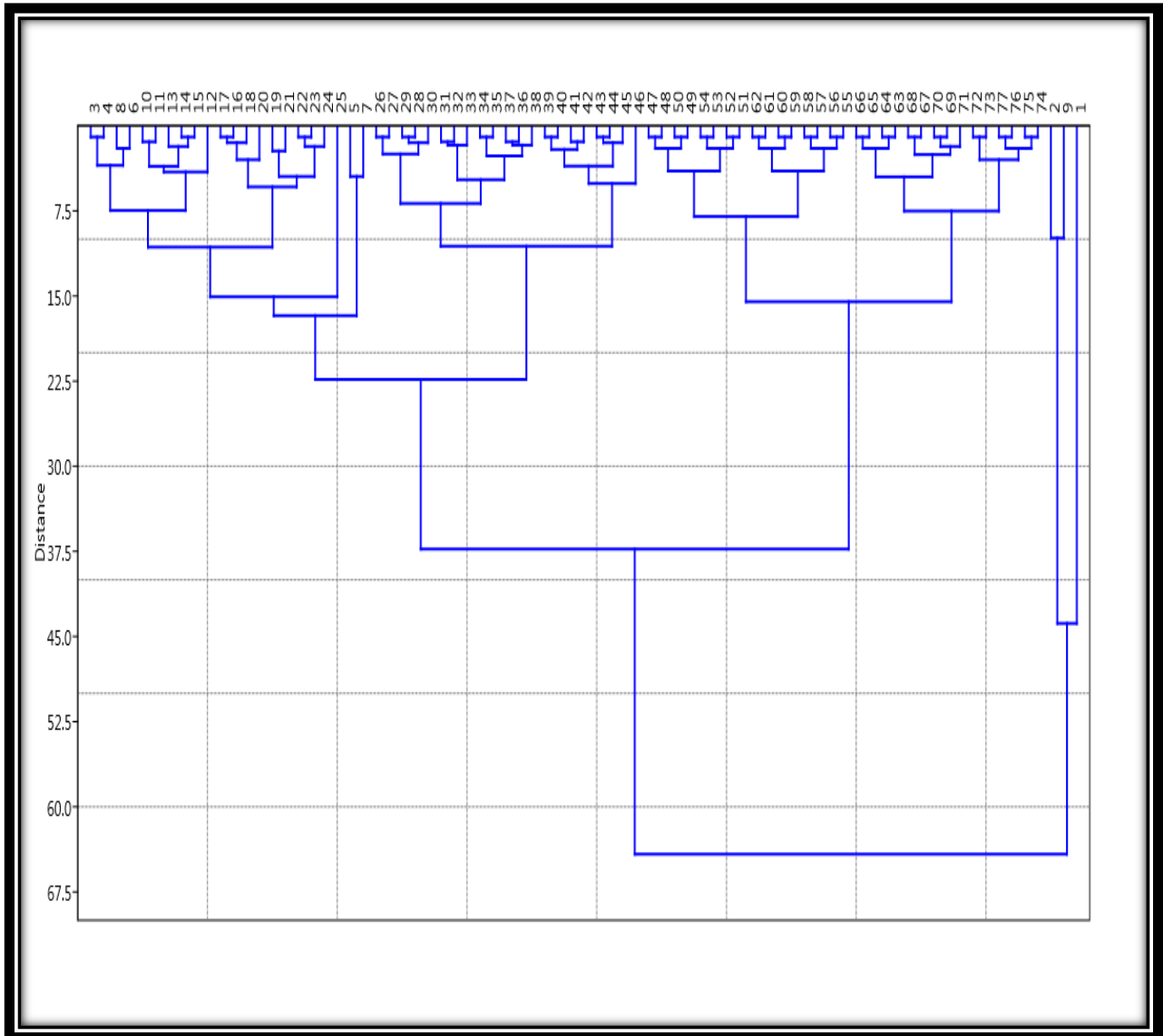


Figure 12 : Dendrogramme montrant les clusters d'antibiorésistance des 300 souches d'*E. Coli* isolées dans l'étude.

La marge supérieure indique les phénotypes d'antibiorésistance de 1 à 77(cluster). La marge de gauche indique la distance euclidienne entre les différents clusters.

Tableau 20: les phénotypes de résistance aux antibiotiques pour les souches d'*Escherichia coli* isolées dans l'étude, avec les codes des différents phénotypes.

Nombre de résistances	profils d'antibiogramme	Code du profil	Nombre de souches	Pourcentage de souches
0	Sensible à tous les antibiotiques	1	80	26,67
1	AMP	2	40	13,33
	KF	3	1	0,33
	FOX	4	1	0,33
	TE	5	17	5,67
	CIP	6	1	0,33
2	AMP+KF	7	13	4,33
	AMP+AMC	8	1	0,33
	AMP+TE	9	33	11
	AMP+NA	10	2	0,67
	K+TE	11	1	0,33
	TE+SXT	12	5	1,67
	TE+CIP	13	2	0,67
	AMP+F	14	1	0,33
	AMP+C	15	1	0,33
	NA+CIP	16	1	0,33
3	AMP+KF+AMC	17	1	0,33
	AMP+KF+SXT	18	1	0,33
	AMP+KF+TE	19	6	2
	AMP+KF+F	20	1	0,33
	AMP+KF+CTX	21	5	1,67
	AMP+AMC+SXT	22	2	0,67
	AMP+AMC+TE	23	2	0,67
	AMP+K+TE	24	3	1
	AMP+SXT+TE	25	12	4
	AMP+TE+C	26	1	0,33

Suite du tableau 20

	AMP+TE+NA	27	1	0,33
4	AMP+KF+AMC+FOX	28	1	0,33
	AMP+KF+AMC+SXT	29	1	0,33
	AMP+KF+AMC+F	30	1	0,33
	AMP+KF+CTX+CN	31	4	1,33
	AMP+KF+CTX+F	32	3	1
	AMP+KF+CTX+TE	33	4	1,33
	AMP+KF+CTX+K	34	1	0,33
	AMP+KF+CTX+NA	35	1	0,33
	AMP+KF+SXT+TE	36	2	0,67
	AMP+AMC+TE+C	37	1	0,33
	AMP+K+SXT+TE	38	2	0,67
	AMP+K+TE+NA	39	1	0,33
	AMP+SXT+TE+NA	40	1	0,33
5	AMP+KF+AMC+TE+CIP	41	1	0,33
	AMP+KF+AMC+TE+C	42	2	0,67
	AMP+KF+AMC+SXT+TE	43	1	0,33
	AMP+KF+CTX+K+F	44	1	0,33
	AMP+KF+CTX+TE+F	45	1	0,33
	AMP+SXT+TE+NA+CIP	46	4	1,33
6	AMP+KF+AMC+FOX+SXT+TE	47	1	0,33
	AMP+KF+AMC+TE+CIP+C	48	1	0,33
	AMP+KF+CTX+FOX+CN+TE	49	1	0,33
	AMP+KF+CTX+SXT+TE+NA	50	1	0,33
	AMP+KF+CTX+TE+NA+CT	51	1	0,33
	AMP+KF+CTX+K+SXT+F	52	1	0,33
	AMP+KF+AMC+CTX+SXT+TE	53	1	0,33
	AMP+KF+SXT+TE+NA+CIP	54	1	0,33
	AMP+AMC+K+SXT+TE+C	55	1	0,33
	AMP+SXT+TE+NA+CIP+C	56	1	0,33
7	AMP+KF+AMC+CTX+TE+NA+CIP	57	1	0,33

Suite du tableau 20

	AMP+KF+AMC+CTX+FOX+SXT+TE	58	1	0,33
	AMP+KF+AMC+CTX+SXT+TE+F	59	1	0,33
	AMP+KF+AMC+CTX+TE+NA+CT	60	1	0,33
	AMP+AMC+SXT+TE+NA+CIP+C	61	1	0,33
	AMP+FOX+K+SXT+TE+NA+CIP	62	1	0,33
8	AMP+KF+AMC+CTX+TE+NA+CIP+F	63	1	0,33
	AMP+KE+AMC+CTX+TE+CIP+F+C	64	1	0,33
	AMP+KF+CTX+K+SXT+TE+NA+CIP	65	1	0,33
	AMP+KF+CTX+K+SXT+TE+NA+F	66	1	0,33
	AMP+KF+CTX+FOX+SXT+TE+NA+CIP	67	1	0,33
9	AMP+KF+AMC+FOX+SXT+TE+NA+CIP+F	68	1	0,33
	AMP+KF+AMC+CTX+SXT+TE+NA+CIP+CT	69	1	0,33
	AMP+AMC+K+CN+SXT+TE+NA+CIP+C	70	1	0,33
	AMP+KF+K+SXT+TE+NA+CIP+F+C	71	2	0,67
	AMP+KF+CTX+K+SXT+TE+NA+CIP+C	72	1	0,33
10	AMP+KF+AMC+CTX+K+CN+SXT+TE+NA+C	73	1	0,33
	AMP+KF+AMC+CTX+K+SXT+TE+NA++CIP+C	74	1	0,33
	AMP+KF+CTX+K+SXT+TE+NA+CIP+F+C	75	1	0,33
11	AMP+KF+AMC+CTX++K+SXT+TE+NA+CIP+F+C	76	1	0,33
	AMP+KF+CTX+K+CN+SXT+TE+NA+CIP+F+C	77	1	0,33

3.3 Étude génotypique de la sensibilité aux antibiotiques

3.3.1 Détection des gènes de résistance aux bêta-lactamines

Parmi les 12 isolats d'*E. coli* productrices de BLSE, 03 hébergeaient le *blaCTX-* du groupe 1 (*bla CTX M-1* chez deux souches et *bla CTX M -3*-chez une seule souche). Les 12 isolats d'*E coli* hébergent le gène *blaTEM* 1, dont neuf hébergeaient les gènes *blaTEM* seul et 3 hébergent le *blaTEM* en association avec le gène *blaCTX-M* (tableau 22). le gène *bla SHV* n'a pas été détecté dans l'ensemble des isolats.

Tableau 21 : Les gènes β -lactamases détectés

Gènes bla (n/%)	<i>blaCTX M groupe 1</i>	<i>bla TEM1</i>	<i>blaSHV</i>
<i>E coli</i>	3/25%	12/100%	0/0%

Tableau 22 : Les associations de gènes β -lactamases détectées

	Les associations de gènes bla	Nombre de souches/Pourcentage
<i>E coli</i>	<i>Bla CTX M groupe 1 (CTXM-1 et CTXM-3) + bla TEM1</i>	3/ 25%
	<i>Bla TEM1</i>	9/ 75 %

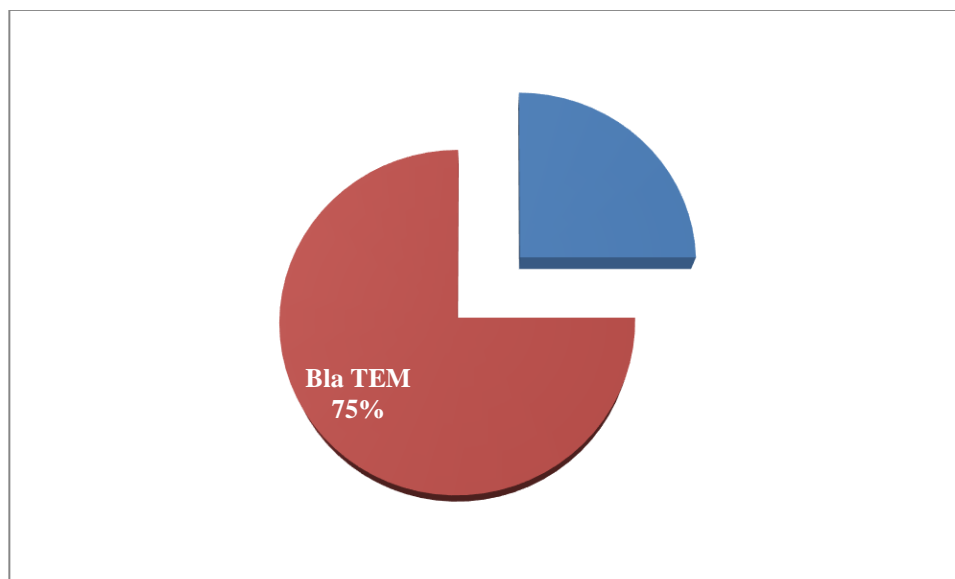


Figure 13: Distribution des gènes de β -lactamases détectés

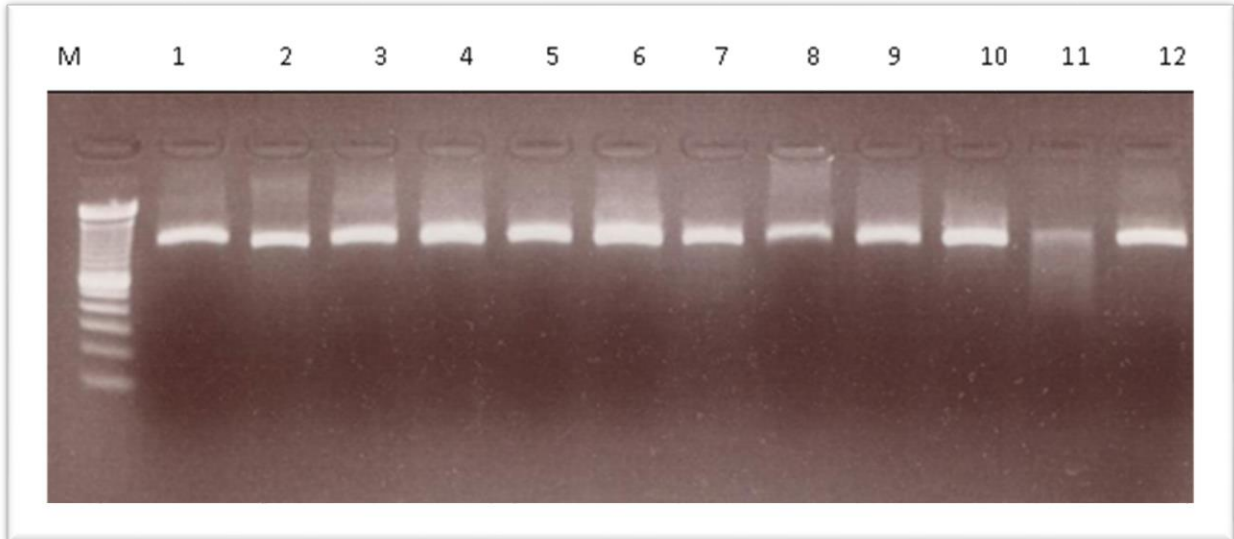


Figure 14 : Gel représentatif d'électrophorèse de PCR du gène *bla*_{TEM} (1150 pb) des souches étudiées.

M : marqueur de taille 100 pb, (tous les puits sont positifs)

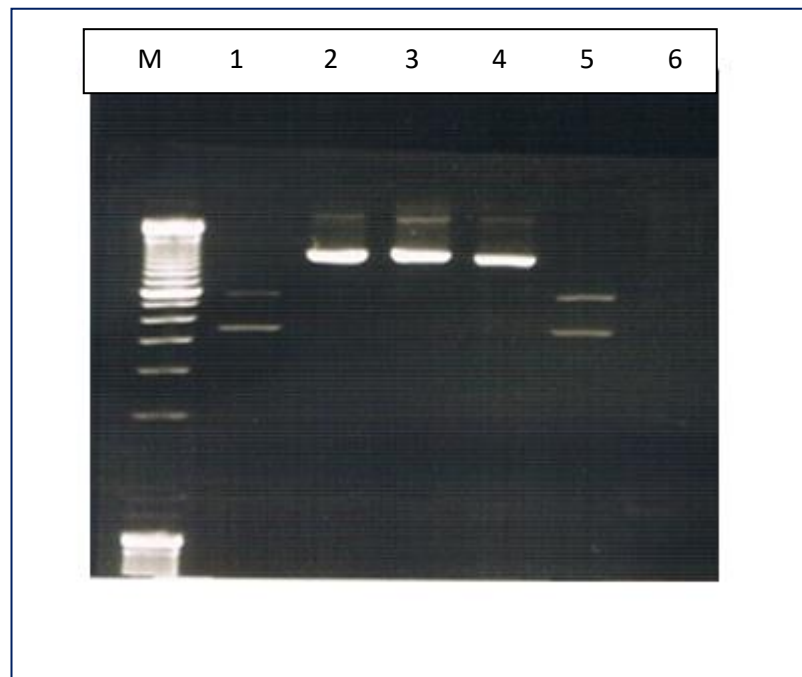


Figure 15 : Gel représentatif d'électrophorèse de PCR de gène *bla* CTX-M de groupe 1(1041pb).

M : Marqueur de taille 100 pb, Puits 2, 3 et 4 des isolats contenant le gène *bla* CTX-M de groupe 1

3.3.2 Détection de l'intégron de classe 1 et de la séquence *qacE-sulI*

Parmi les souches *E coli* productrices de BLSE, sept hébergent le gène de l'intégron de classe 1 soit (58.33%)(figure 16). Les mêmes souches positives pour l'intégron de classe 1, hébergent aussi la séquence *qacE-sulI*

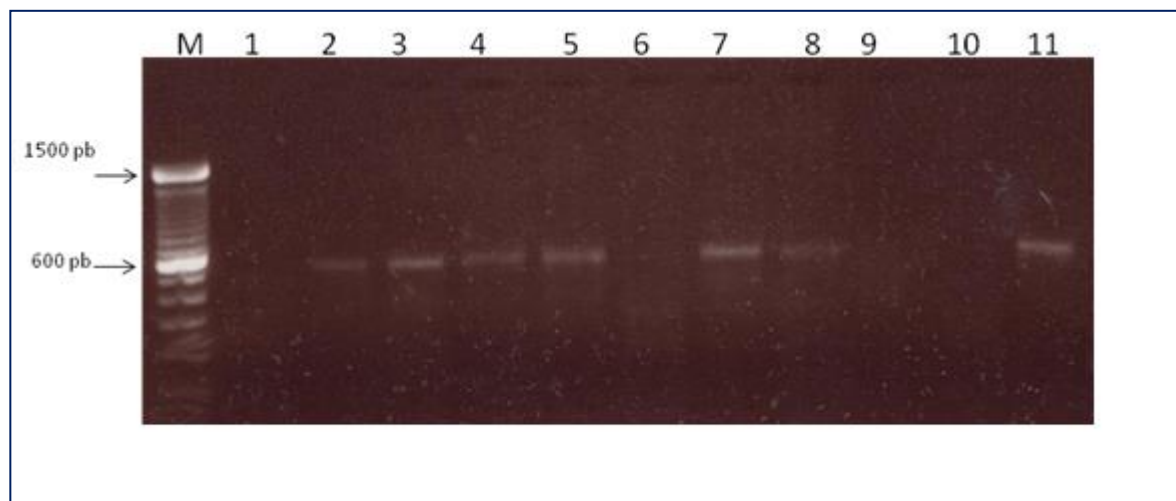


Figure 16: Gel représentatif de l'électrophorèse de PCR du gène *int1* (codant l'intégrase de l'intégron de classe 1).

M marqueur de taille 100 pb Ladder; Les puits 2,3,4,5,7,8,11 des souches contenant le gène *int1*.

3.3.3 Détection des gènes de résistance à la colistine

Trois souches (25%) d'*E coli* productrices de BLSE hébergent le gène *mcr-1* en coproduction du gène CTX-M du groupe1(figure 18), notant l'absence du gène *mcr-2* dans notre étude.

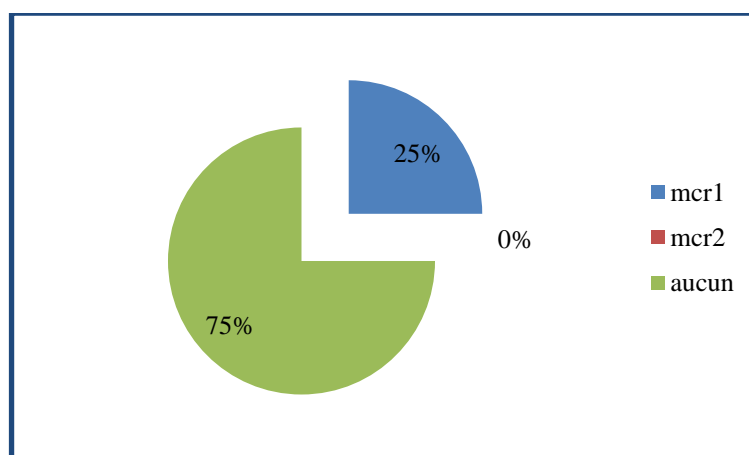


Figure 17: Distribution des gènes de résistance à la colistine *mcr1* et *mcr2*

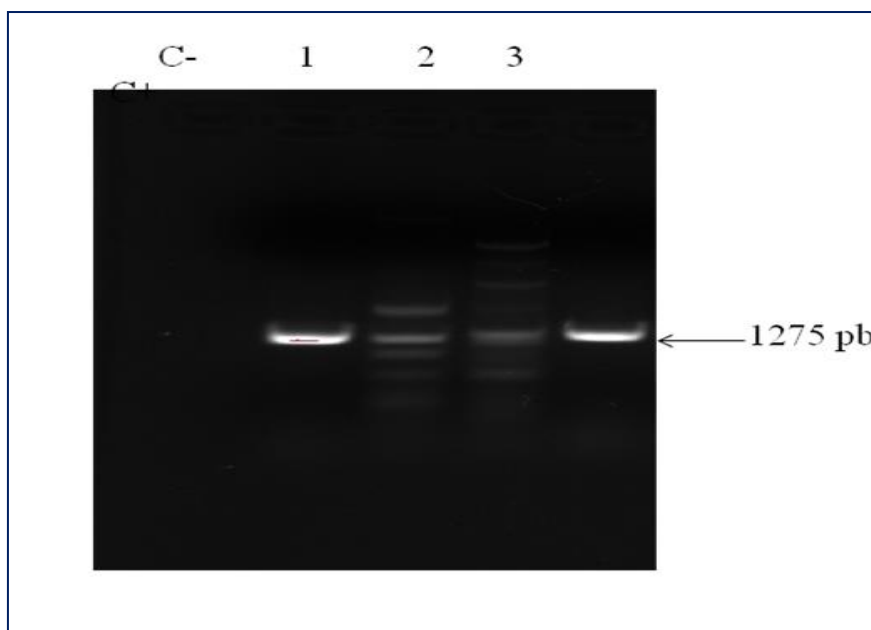


Figure 18 : Gel d'électrophorèse de PCR des gènes *mcr-1* et *mcr-2*.

C- : Témoin négatif (sans ADN), le puits 1,2 et 3 correspondent à des souches *E coli* hébergeant le gène *mcr-1*, C+ : souche contrôle positif contenant le gène *mcr-1*.

3.3.4 Détection des gènes de résistance aux quinolones

Dans notre étude on rapporte pour la première fois l'existence de gènes de résistance aux quinolones *qnrB* et *qnrS* chez des souches d'*E coli* d'origine bovine productrices de BLSE.

Trois souches (25%) *E coli* hébergent le gène *qnrB*, dont une souche en co-production de six autres gènes de résistance aux antibiotiques(*bla CTX-M du groupe1+bla TEM 1+ sull+tetA et tetB+mcr1*) (tableau 24) et deux souches hébergent le gène *qnrS* (16.66%), le gène *qnrA* n'a pas été détecté (figure19 et 20),

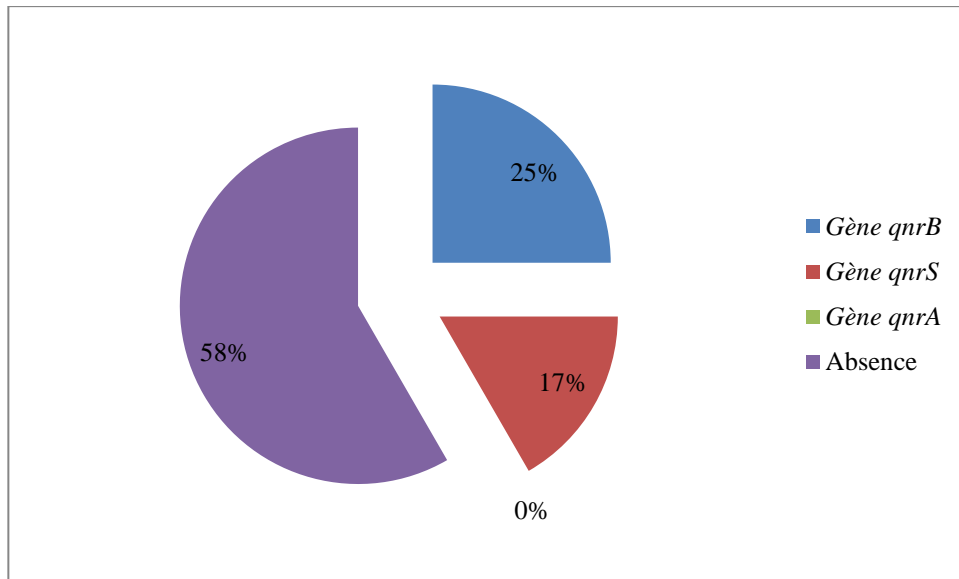


Figure 19 : Distribution des gènes de résistance aux fluoroquinolones

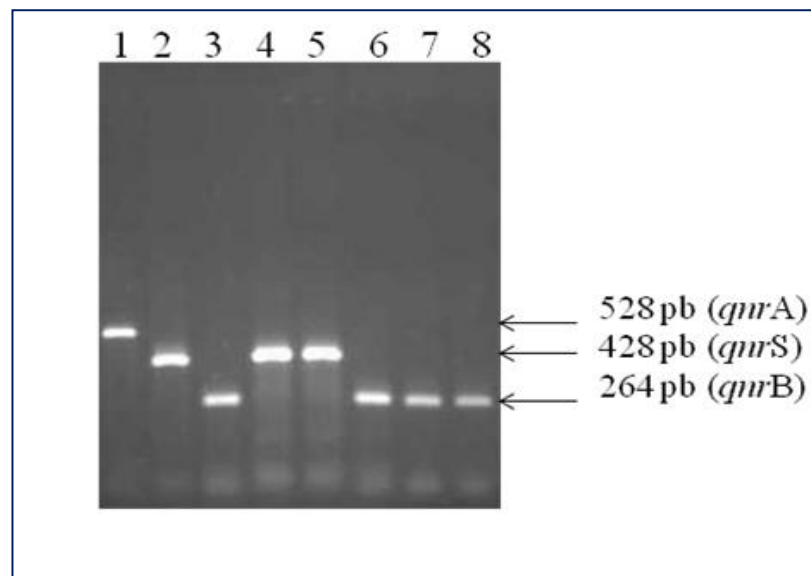


Figure 20 : Gel représentatif de PCR des gènes *qnr*.

Puits 1: contrôle *qnrA* positive, Puits 2: contrôle *qnrS* positive; Puits 3: contrôle *qnrB* positive. Puits 4 et 5: souches *qnrS* positives; Puits 6, 7 et 8: souches *qnrB* positives.

3.3.5 Détection des gènes de résistance aux tétracyclines

On a mis en évidence (6 /50%) souches porteuse du gène *tetA* et (2/16.66%) souches porteuse du gène *tetB*, (2/16.66%) portent l'association *tetA* et *tetB* et (2/16.66%) ne portent pas de gène de résistance à la tétracycline (figure 21).

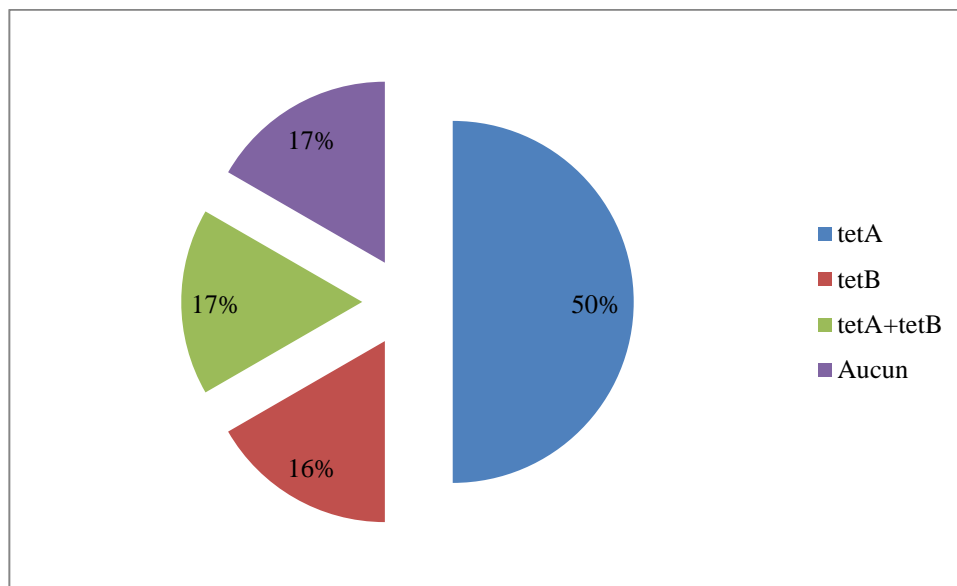


Figure 21 : Distribution des gènes de résistance aux tétracyclines : *tetA* et *tetB*

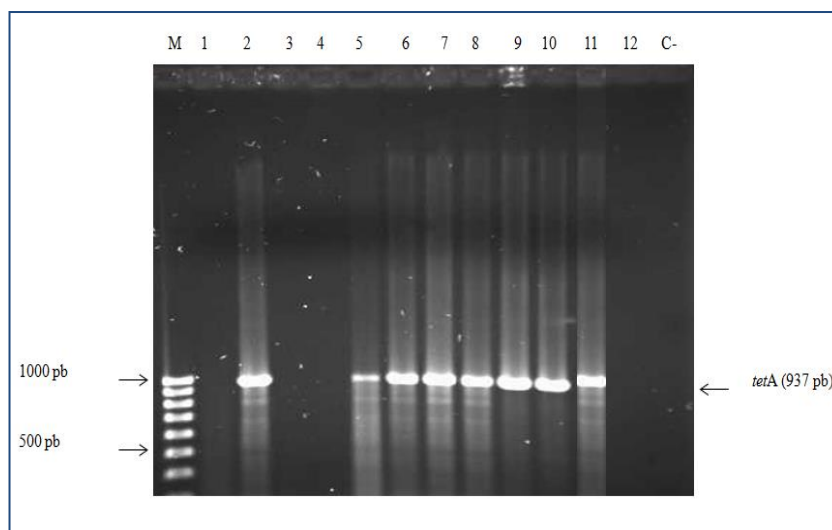


Figure 22 : Gel représentatif d'électrophorèse de PCR du gène *tetA*. M: marqueur de taille 100pb; les puits 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10 et 11 les souches contenant le gène *tetA* ; puits 1, 3, 4 et 12 : des souches n'ayant pas le gène *tetA*, C-: souche témoin positif.

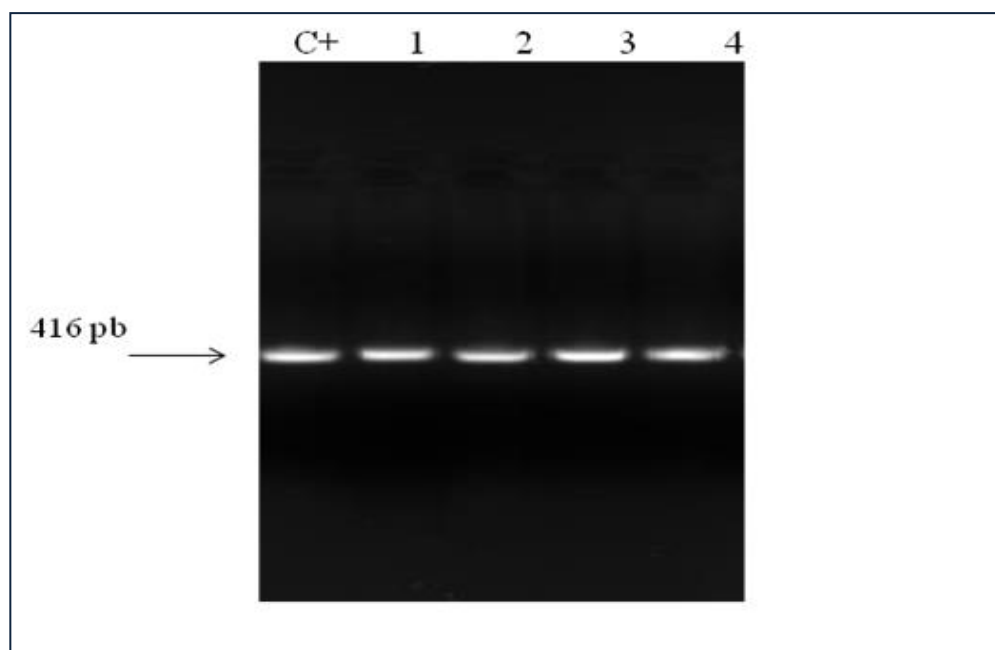


Figure 23 : Gel représentatif d'électrophorèse de PCR du gène *tet B*. C : souche de contrôle hébergeant le gène *tetB* ; Puits 1 à 4: les souches ayant le gène *tetB*.

3.3.6 Détection des gènes de résistance aux sulfamides et au triméthoprime

Parmi les souches étudiées (9/75%) hébergent le gène *sul1* et (3/25%) des souches n'hébergent aucun gène de résistance aux sulfamides et au triméthoprime, le gène *sul2* n'a pas été détecté (figure 24). 6 souches (66.66%) sur neuf portant le gène *sul1* hébergent en même temps les gènes *int1* ainsi que la région *qacE-sul-1* .

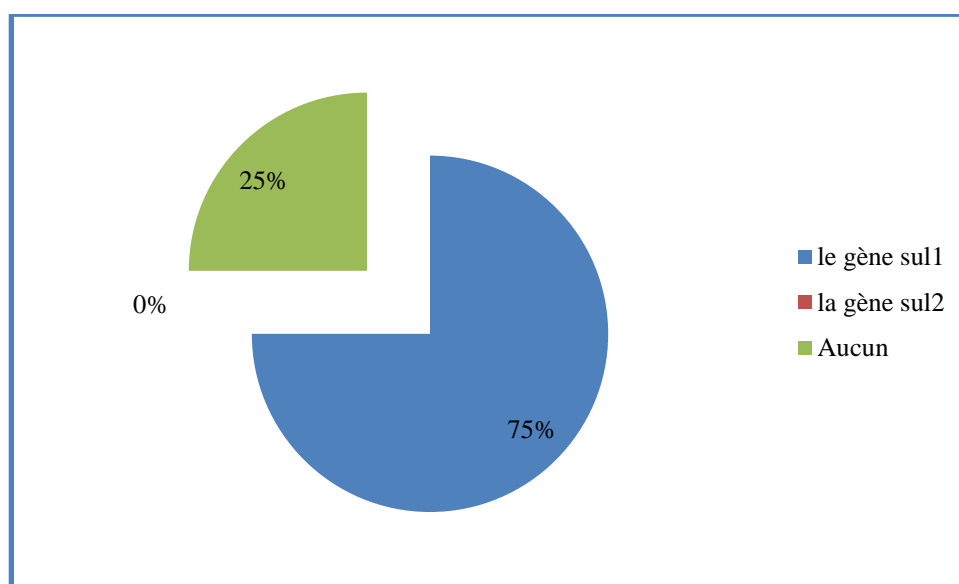


Figure 24: Distribution des gènes de résistance aux sulfamides et au triméthoprime.

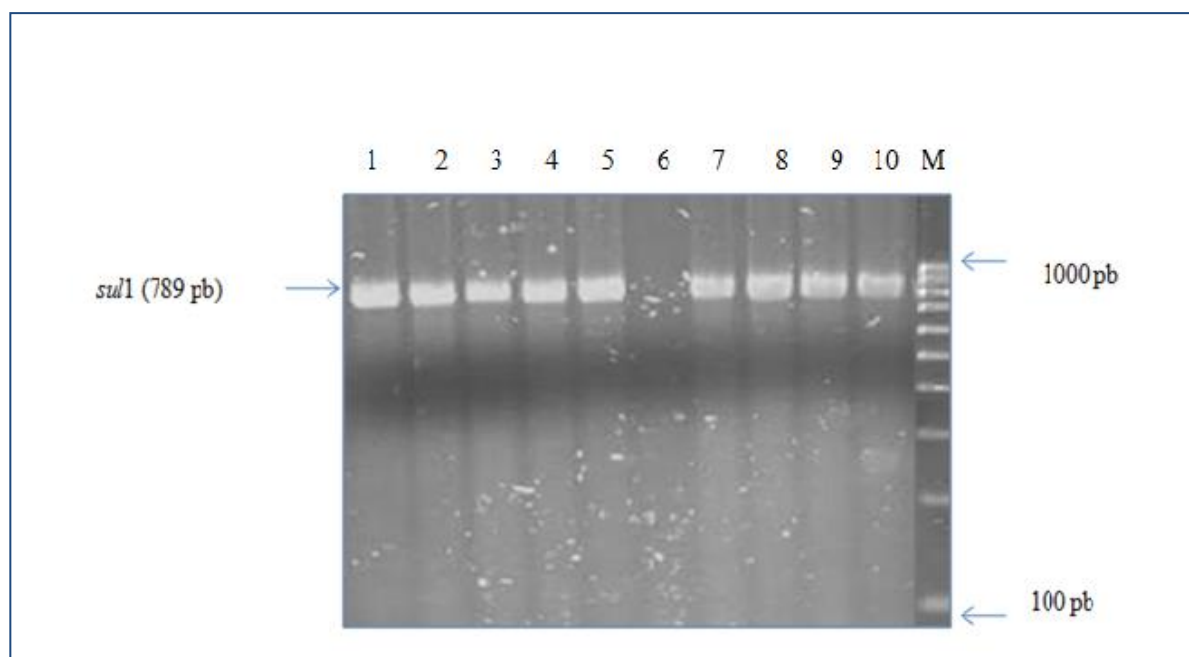


Figure 25 : Gel représentatif d'électrophorèse de PCR du gène *sul1*. M: marqueur de taille 100pb; les puits 1 à 5 et 7 à 10 : des souches contenant le gène *sul1* ; le puits 6: souche n'ayant pas le gène *sul1*.

3.4 Détection des gènes de virulence

Dix gènes qui déterminent les facteurs de virulence ont été identifiés parmi 32 gènes étudiés par PCR, soit (nombre d'isolats / %): le gène d'adhésion bactérienne *fimH* est présent dans l'ensemble des souches(12/100%), un autre gène d'adhésion bactérienne *eaeA* représente (1/ 8.33%), le gène d'acquisition du fer *iutA* (11/91.7%), le gène *eastI* codant la toxine thermostable chez *EAggEC* (3/ 25%), le gène *astI* codant l'enterotoxine thermostable d'*EAggEC* (1/8.33%), le gène d'invasion *ibeA* (2/16.66%), les gènes de résistance au sérum *traT* et *issA* ont été détectés dans (1/8.33%) des souches pour chacun, le gène d'enterohémolysine *ehxA* (1/8.33%).

On a détecté une seule souche portant le gène *stxI* codant pour la shiga-toxine 1 (1/8.33%),. Tous les isolats (12 *E coli*) contenaient au moins deux gènes de virulence et (7/58.33%) isolats présentaient trois gènes ou plus codant pour des facteurs de virulence, dont un isolat (1/8.33%) présente cinq facteurs de virulences (tableau 23).

Parmi les 12 souches productrices de BLSE, la combinaison des différents facteurs de virulence détectés, nous a fait ressortir 7 profils de virulence différents, soit : (profils/nombre des isolats): *fimH,iutA,stxI,ehxA,eaeA(1)*; *fimH,iutA,ibeA,iss(1)*;

fimH+iutA+ east1 (3), *fimH+iutA+ ast1*(1), *fimH,traT,iutA*(1) , *fimH,iutA*(4),*fimH,ibeA*(1)
 (tableau 23)

On a mis en évidence le pathovar STEC (contenant *fimH, iutA, stx1, ehx1, eaeA*) (1 / 8,33%) , MNEC (contenant le gène *ibeA* d'invasion de l'endothélium cérébral) (2, 16,66%) et EAaggEC(contenant le gène *east1* codant l'enterotoxine thermostable)(3/25%).

Tableau 23 : Phénotypes de virulences des souches E coli productrices de Béta lactamase à spectre étendu

Nombre de combinaisons	Phénotypes de virulence	(Nombre d'isolat/pourcentage)
5	<i>fimH+iutA+stx1+ehx1+eaeA</i>	(1 / 8.33%)
4	<i>fimH+iutA+ibeA+issA</i>	(1/8.33%)
3	<i>fimH+traT+iutA;</i> <i>fimH+iutA+east1</i> <i>fimH+iutA+ast1</i>	(1/8.33%) (3/25%) (1/8.33%)
2	<i>FimH+iutA</i> <i>FimH+ibeA</i>	(4/33.33%) (1/8.33%)

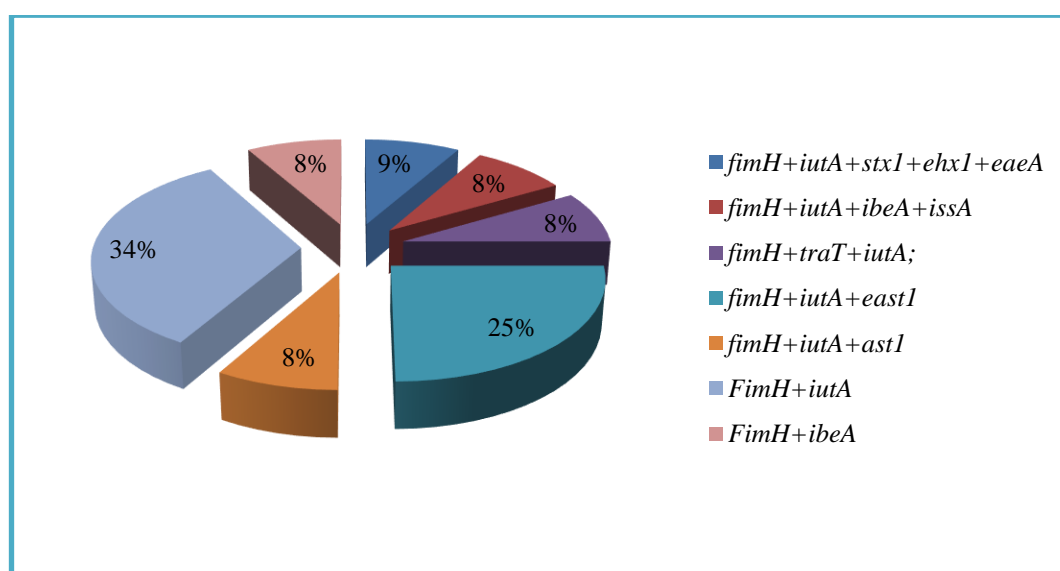


Figure 26 : Distribution des phénotypes de virulences des souches *E coli* productrices de BLSE

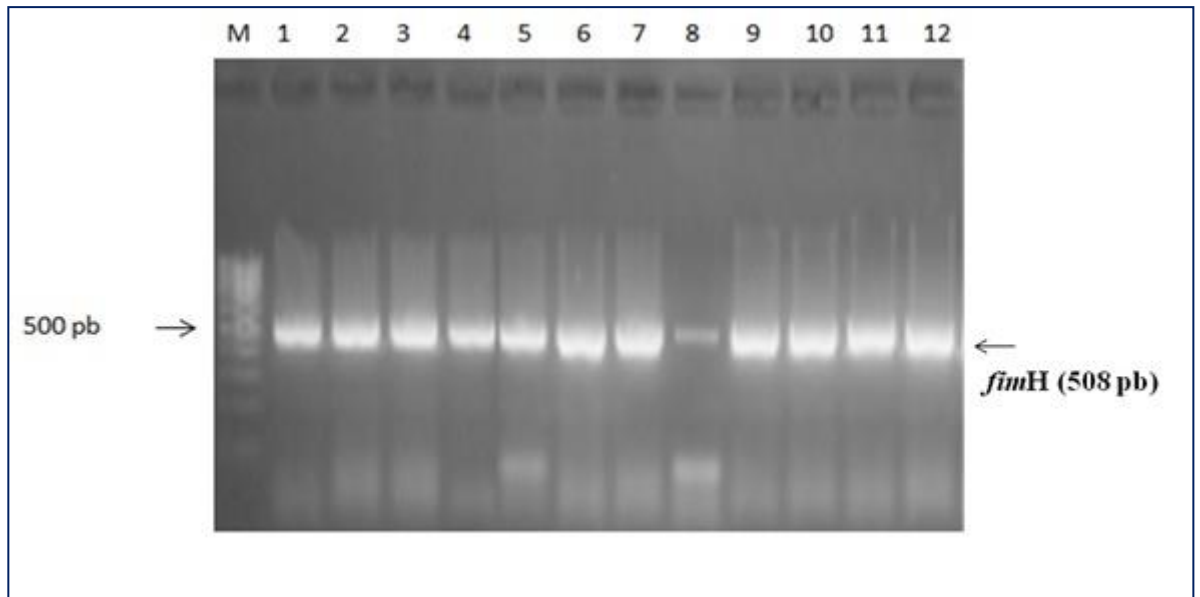


Figure 27 : Électrophorèse des produits d’amplification par PCR du gène *fimH*.
M: marqueur de taille 100 pb. Les puits 1 à 12: Tous les isolats de *E. coli* contenant le gène *fimH*

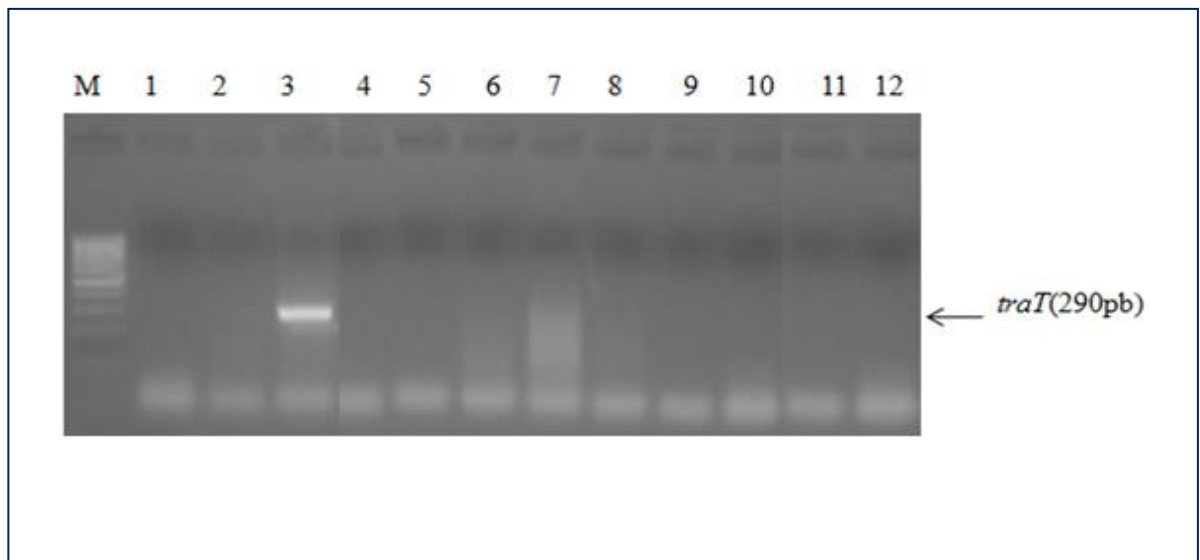


Figure 28: Gel représentatif d’électrophorèse des produits de PCR du gènes *traT*(290pb).
M: marqueur de taille 100 pb. Le puis 3 hébergeant le gène *traT*; Les puits 1, 2, ,4 à 12: des isolats n’hébergeant pas ce gène.

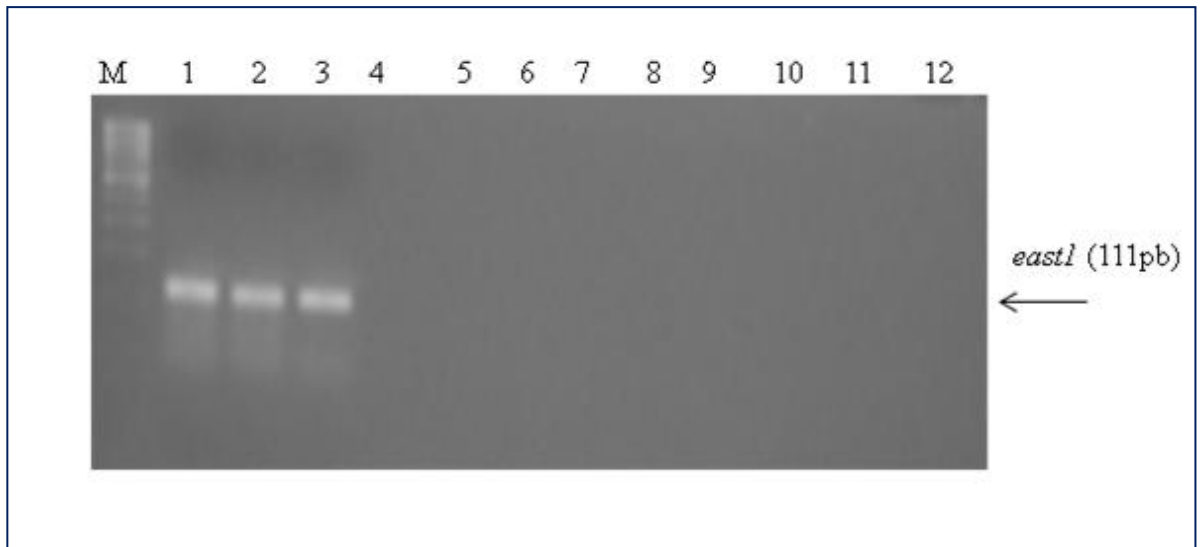


Figure 29 : Gel représentatif d'électrophorèse des produits de PCR du gène *eastI* (111pb).

M: marqueur de taille 100 pb. Les puits 1, 2 et 3 sont ceux des 3 isolats hébergeant le gène *eastI*; Les puits 4 à 12 : des isolats n'hébergeant pas ce gène.

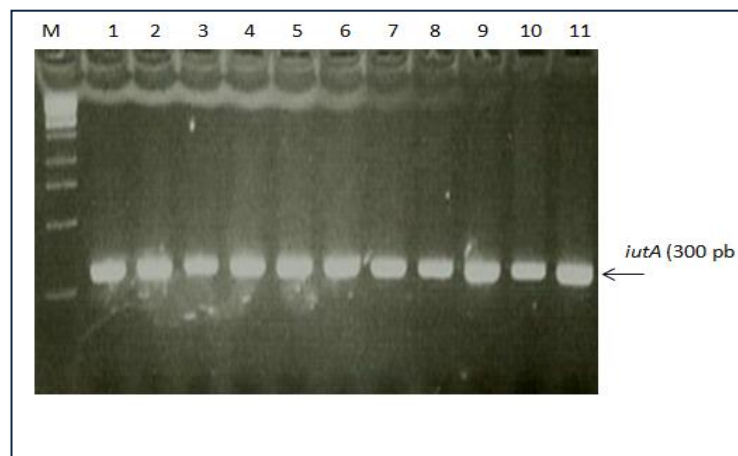


Figure 30 : Gel représentatif de la PCR du gène *iutA*.
M : Marquer de taille Sizer™1000. Les puits 1 à 11 : Isolats de *E. coli* hébergeant le gène *iutA*.

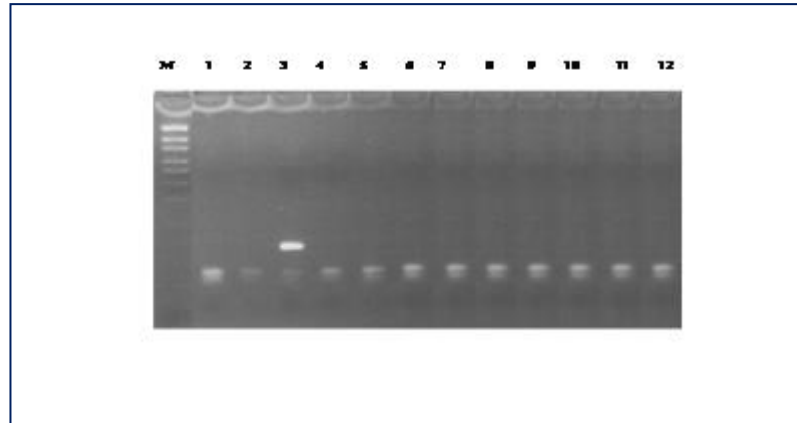


Figure 31 : Gel représentatif de l'amplification par PCR du gène *AstI*, des souches *Escherichia coli*.

M : Marqueur de taille 100pb, puits 3: *E. coli* (*AstI* +).

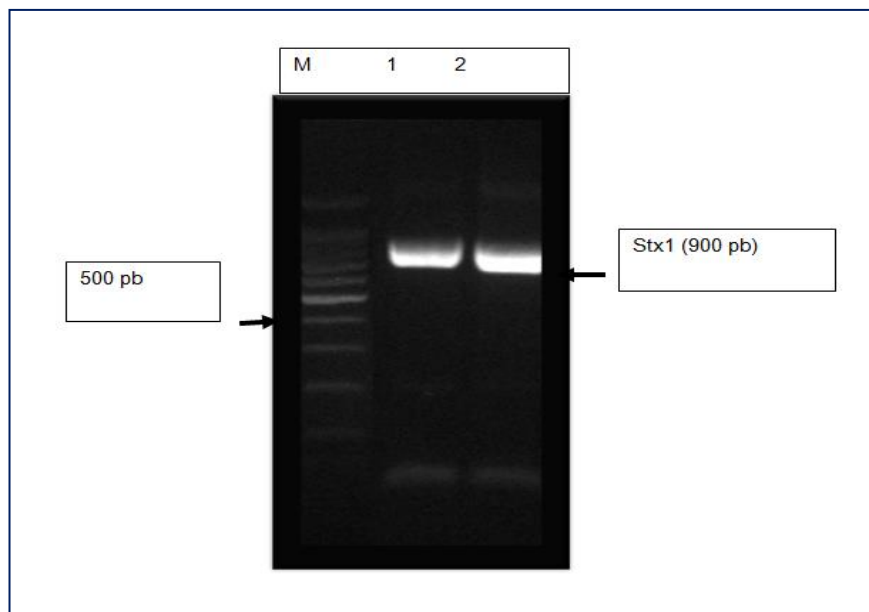


Figure 32 : Amplification du gène *stx 1* des souches *Escherichia coli*
M:Marqueur de taille 100 pb, 1 : *E. coli* (*stxI*+), 2: souche de référence EHEC EDL933(O157 :H7).

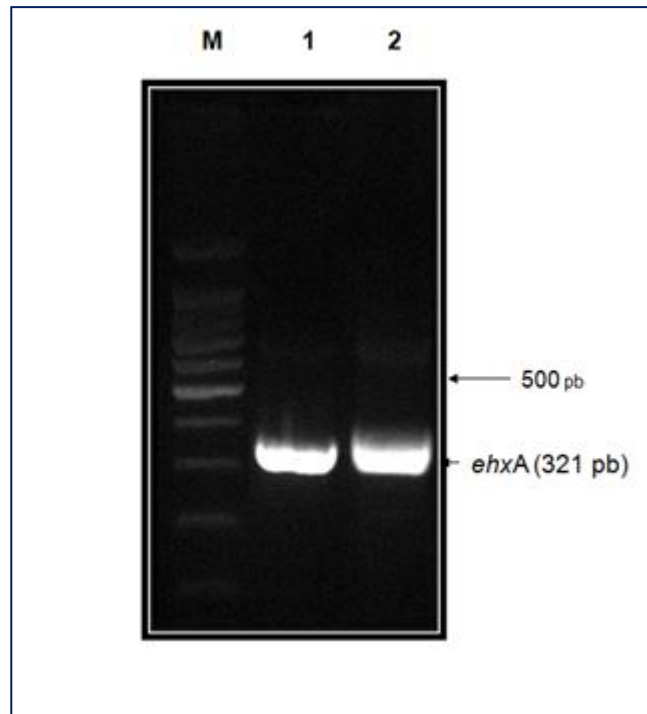


Figure 33 . Amplification du gène *ehxA*, des souches *Escherichia coli*

M: Marqueur de taille 100 pb,

1 : *E. coli* (*ehxA*+), 2 : souche de référence EHEC EDL933(O157 :H7) (*ehxA*+)

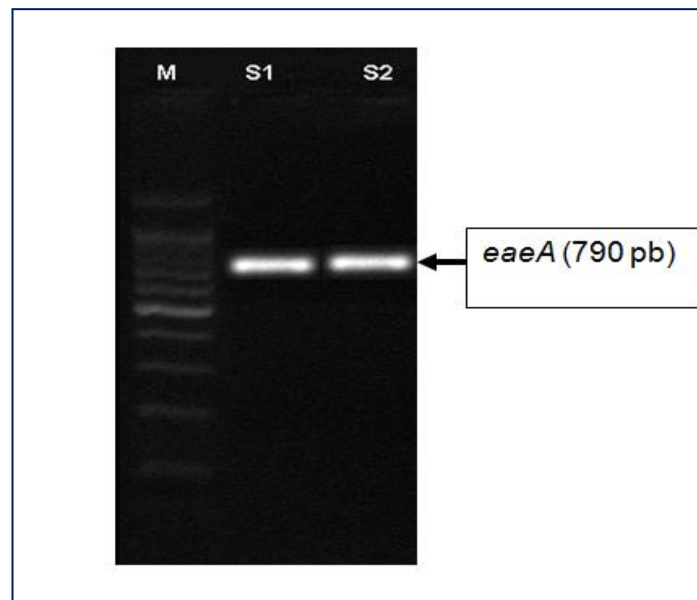


Figure 34 : Amplification du gène *eaeA* des souches de *Escherichia. coli*.

M:Marqueur de taille 100 pb, S1 : *E. coli* (*eaeA*+), S2 : souche de référence *E. coli* O157 :H7 (*eaeA*+).

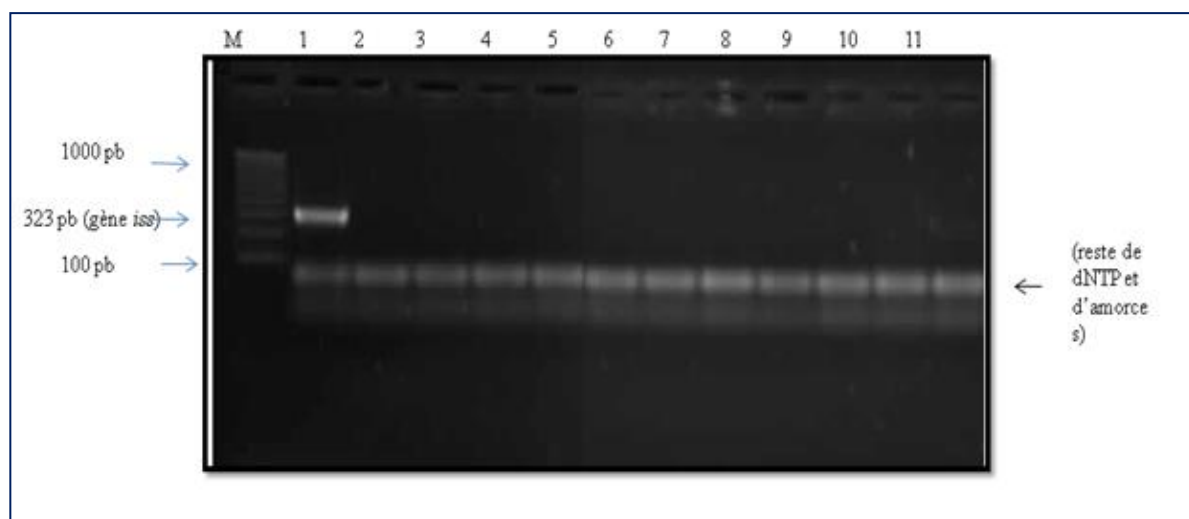


Figure 35 : Électrophorèse des produits d'amplification par PCR du gène *iss*, des souches *Escherichia coli*.

M: marqueur de taille 100 pb. Le puits 1: correspond à *E. coli* contenant le gène *iss* (fragment amplifié de taille 323 pb), Les autres puits: les souches de *E. coli* n'hébergeant pas le gène *iss*.

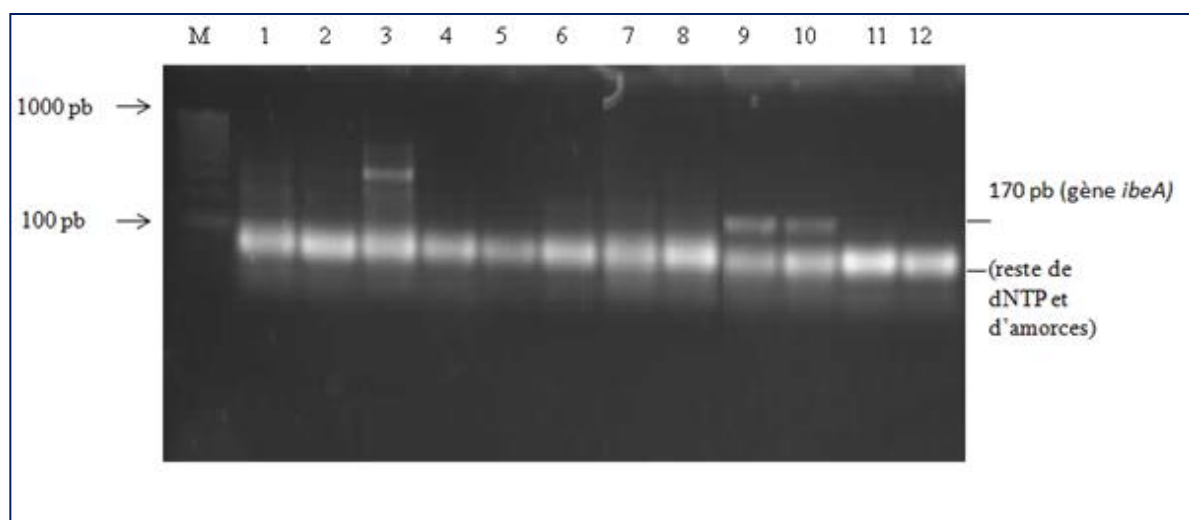


Figure 36: Électrophorèse des produits d'amplification par PCR du gène *ibeA*, des souches *Escherichia coli*.

M: marqueur de taille 100 pb. Le puits 9 et 10: correspond respectivement à *E. coli* contenant le gène *ibeA* (fragment amplifié de taille 170 pb), Les autres puits: les souches de *E. coli* n'hébergeant pas le gène *ibeA*. (Remarque: le puits 3 correspondant à une souche *E. coli* ayant une bande non spécifique de ce gène, considérée donc *ibeA*-négatif).

3.5 Détermination des groupes phylogénétiques.

Pour l'ensemble des souches productrices de BLSE , on a détecté deux groupes phylogénétiques : A₁(10/ 83.33%) et B1(2/ 16.66%).(figure 37 et 38)

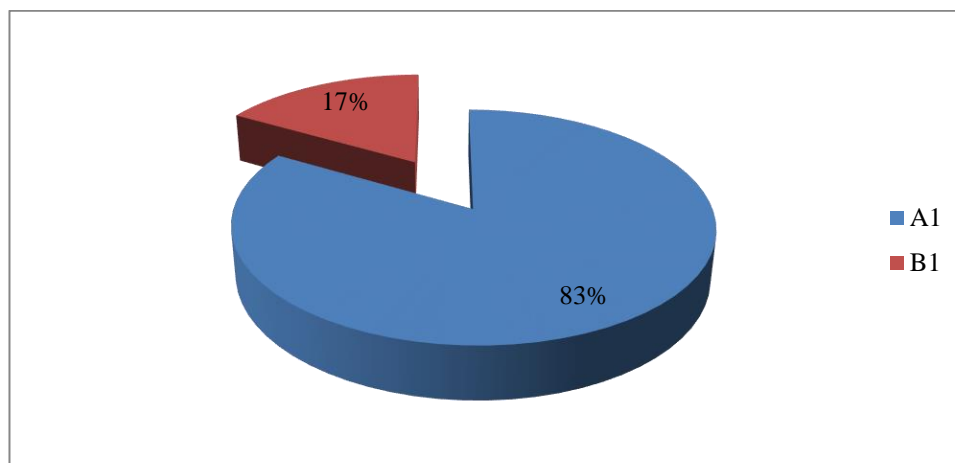


Figure 37 : distribution des groupes phylogénétiques chez *Escherichia coli* productrices de BLSE.

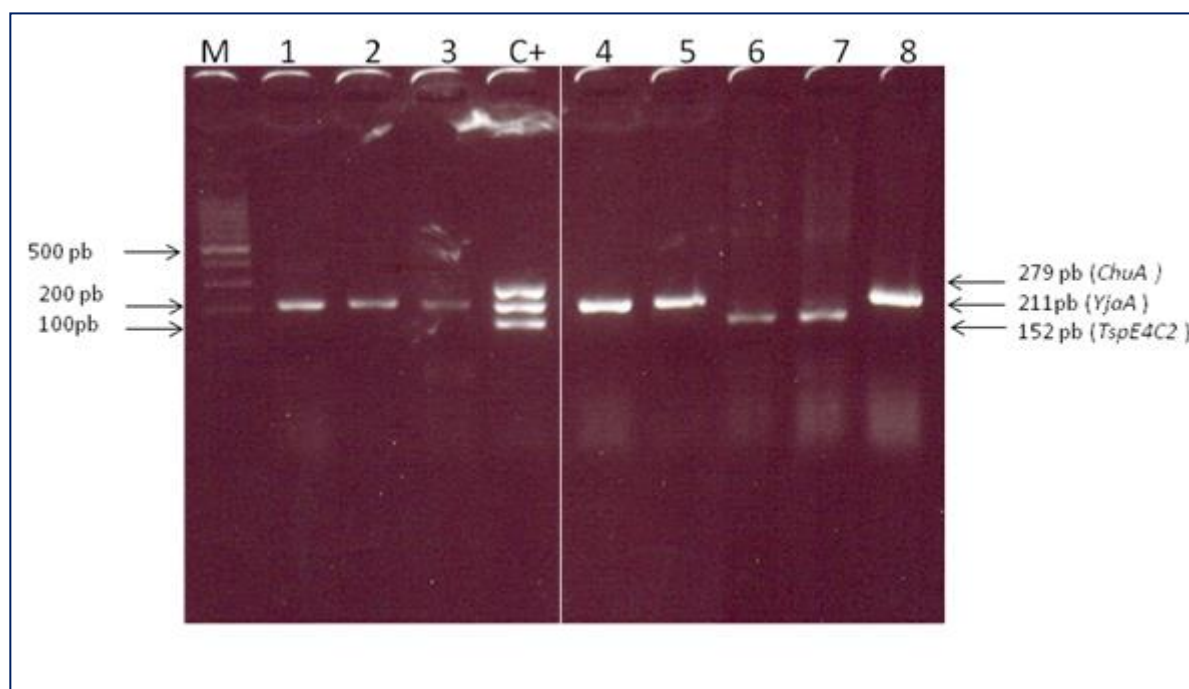


Figure 38 : Gel représentatif de l'amplification des gènes ChuA, YjaA, TspE4C2 des Isolats d'*Escherichia. coli* pour la détermination des groupes phylogénétiques. M: Marquer de taille 100pb, puits 1, 2, 3, 4, 5 et 8: des isolats de *E. coli* appartenant au phylogroupe A₁ (*ChuA*⁻, *YjaA*⁺, *TspE4C2*⁻) , les puits 6 et 7: des isolats appartenant au phylogroupe B1 (*ChuA*⁻, *YjaA*⁻, *TspE4C2*⁺), C+: Souche utilisé comme contrôle positif et appartenant au phylogroupe B2+ (*ChuA*⁺, *YjaA*⁺, *TspE4C2*⁺)..

3.6 Typage des souches par électrophorèse en champs pulsés (PFGE)

Les 12 isolats d' *E.coli* ont été différents entre eux, donc non clonales. En effet les profils de macrorestriction par *Xba*I-PFGE ont été différents désigné arbitrairement de P1 à P12) (figure 39).

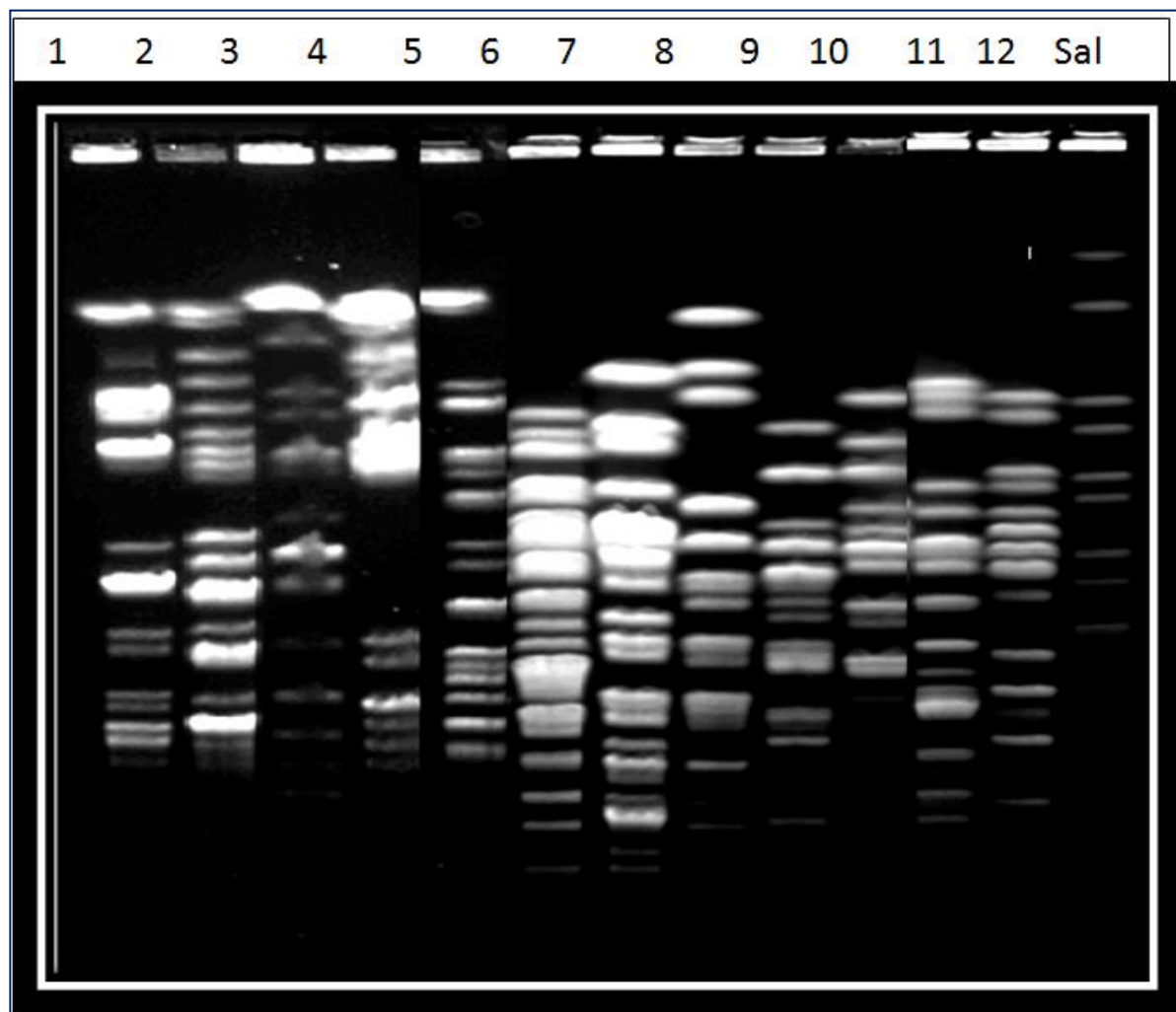


Figure 39: Électrophorèse en champ pulsé de l'ADN génomique digéré par *Xba*I des isolats d' *Escherichia coli*.

Salm : ADN de *S. enterica* sérovar Braenderup H9812 digéré par *Xba*I utilisé comme marqueur de taille standard ; Lignes 1 à 12 : correspond respectivement aux isolats : *E. coli* x (P1), *E. coli* x (P2), *E. coli* x (P3), *E. coli* x (P4), *E. coli* x (P5), *E. coli* x (P6), *E. coli* x (P7), *E. coli* x (P8), *E. coli* x (P9), *E. coli* x (P10), *E. coli* x (P11), *E. coli* x (P12).

Tableau 24: Tableau récapitulatifs des phénotypes de résistances et des différents gènes de résistance et de virulence ainsi que les groupes phylogéniques des souches E coli productrices de BLSE

Code des souches E coli	Profil ATB gramme Les résistances	Gène de virulence	Intégrons/présence de la région qacE-sul1 de l'intégron de classe 1	Gènes de résistance	Phylogroupes
1.	AMP+CTX+K+SXT+TE+NA+CIP+ C+ KF	<i>fimH, IutA, , astI</i>	Int1/ qacE-sul1+	<i>bla_{TEM1}, sul1, tetB, qnrB</i>	A
2.	AMP +K+SXT+ KF+ F+ CTX	<i>fimH, IutA, stx-1, ehxA, eaeA</i>	Int1/ qacE-sul1+	<i>bla_{TEM1}, sul1</i>	B1
3.	AMP+.AMC+.CTX+.K.+SXT.+TE+.NA.+CIP+.C+KF	<i>FimH, traT, iutA</i>	Int1/ qacE-sul1+	<i>bla_{TEM1}, sul1, tetA, qnrS</i>	A
4.	AMP..AMC..CTX.K.CN.SXT.TE.NA.C ;KF	<i>FimH, iutA, ibeA, iss</i>	-	<i>bla_{TEM1}, sul1, tetA,</i>	A
5.	AMP+KF+K+SXT+TE+NA+CIP+C+ CTX+ F	<i>FimH, iutA, eastI</i>	Int1/ qacE-sul1+	<i>bla_{TEM1}, sul1, tetA,</i>	A
6.	AMP+ +K+SXT+TE NA+F+ KF+CTX	<i>FimH, iutA,</i>	-	<i>bla_{TEM1}, sul1, tetB</i>	A
7.	AMP.KF.CTX. .TE.+NA+CT	<i>FimH, iutA</i>	-	<i>bla_{CTX-M-3}, bla_{TEM1}, tetA, mcr-1</i>	B1
8.	AMP+KF+AMC+CTX+FOX+SXT+TE	<i>FimH, iutA</i>	-	<i>bla_{TEM1}, sul1</i>	A
9.	AMP..CTX.K. SXT.TE.NA.CIP. KF	<i>FimH, iutA, east,</i>	-	<i>bla_{TEM1}, tetA, qnrS</i>	A
10.	AMP.KF.AMC..CTX.SXT.TE.NA.CIP ,CT	<i>FimH, ibeA</i>	Int1/ qacE-sul1+	<i>bla_{CTX-M-1}, bla_{TEM1} sul1, tetB, tetA, , qnrB, mcr-1</i>	A
11.	AMP+CTX+K+ SXT+TE+NA+CIP+F+C CN,KF	<i>FimH, iutA</i>	Int 1/ qacE-sul1+	<i>bla_{TEM1}, sul1, tetB, tetA, qnrB</i>	A
12.	AMP.KF.AMC..CTX..TE.NA, CT	<i>FimH, iutA, eastI,</i>	Int1/ qacE-sul1+	<i>bla_{CTX-M-1}, bla_{TEM1}, tetA, mcr-1</i>	A

4. DISCUSSION

Depuis leur découverte, les antibiotiques constituent la pierre angulaire de la médecine moderne. Néanmoins, l'utilisation de manière excessive ou inadaptée des antibiotiques chez les humains et chez les animaux a entraîné l'émergence et la diffusion de la résistance aux antibiotiques.

Actuellement il est admis que le mécanisme de résistance aux antibiotiques s'exerce en deux temps (sélection de la résistance dans la flore commensale puis le transfert de celle-ci à la flore pathogène).

Escherichia coli est l'espèce prédominante de la flore commensale digestive anaérobie facultative du côlon de l'homme et de nombreux animaux à sang chaud, de ce fait l'étude de la résistance aux antibiotiques chez cette espèce bactérienne est aujourd'hui primordiale car elle pourrait être indicatrice du niveau général de résistance de l'ensemble de la microflore commensale digestive.

Dans cette étude, nous avons recherché les *E coli* productrices de BLSE à partir de matières fécales de bovins sains, pour se faire on a effectué une étude phénotypique du profil de résistance aux antibiotiques de l'ensemble de souches *E coli* isolées, la mise en évidence des souches d'*Escherichia coli* productrices de bêta-lactamases à spectre étendu, la caractérisation des gènes de résistance aux antibiotiques chez les souches *E coli* productrices de BLSE, notamment les gènes codant pour des bêta-lactamases et d'autres gènes de résistance associés, caractérisation de leurs gènes de virulence, détection des groupes phylogéniques et détermination de leur clonalité par PFGE..

Nous avons prélevé 310 bovins dans différentes fermes des wilayas de Souk Ahras, Tébessa, Oum el Bouaghi et Constantine. Ce chiffre assez élevé permet de renforcer la validité et la précision des résultats trouvés. Il est situé dans la bonne moyenne des échantillons utilisés dans des études similaires qui s'échelonnent entre 35 et 657 prélèvements.

On a isolé 300 *E coli* à partir des 300 prélèvements qui ont poussé, ce qui représente un taux d'isolement de 100%. ce pourcentage concorde avec (Bywater et al., 2004).

En comparant les fréquences de résistances aux 14 antibiotiques utilisés on constaté des taux élevés de résistance à l'ampicilline, tétracycline, céfalotine et le triméthoprime-sulfaméthoxazole dans les quatre régions d'étude, cependant certaines différences sont à noter, notamment, l'absence totale de la résistance à la colistine qui est un antibiotique

critique (de dernier recours), dans les fermes de Tébessa, Oum El Bouaghi et Constantine, cependant les trois souches d'*E coli* résistantes à la colistine, sont isolées des fermes de la wilaya de Souk Ahras. Ces mêmes souches sont productrices de BLSE, dont une souche est isolée d'un veau souffrant de diarrhée et une autre à partir d'un nouveau-né, sachant que des études précédentes confirment l'idée que les jeunes animaux constituent une source d'entérobactéries productrices de BLSE chez les bovins (Résapath, 2013).

Des taux importants de résistance au céfotaxime (céphalosporine de troisième génération) sont enregistrés dans la région de Constantine (46.15%) et Oum El- Bouaghi (16%), notant également que les taux de résistances les plus hauts pour la plupart des antibiotiques utilisés sont enregistrés dans la région de Constantine, ceci pourrait s'expliquer par la pression de sélection des antibiotiques utilisés dans les fermes de cette région.

Les fréquences totales de résistance des 300 *E. coli* isolées, montrent des taux élevés de résistance à l'ampicilline (63.67%), à la tétracycline (44.67%) et à la céfalotine (26.33%), des taux de résistance modérés ont été observés pour le triméthoprime - sulfaméthoxazole, céfotaxime, l'acide nalidixique et l'amoxicilline-clavulinate; cependant de faibles taux de résistance ont été observés pour: la ciprofloxacine, kanamycine chloramphénicol, nitrofurantoïne, céfoxitine, gentamycine et pour la colistine. Cependant, on a mis en évidence 12 souches *E coli* soit (4%) productrices de bêta-lactamases à spectre étendu.

Les bêta-lactamines sont les antibiotiques les plus utilisées pour le traitement des infections causées par les entérobactéries. La résistance à cette famille d'antibiotique se développe suite à des mutations ou à l'acquisition de matériel génétique tel que les plasmides, les transposons ou les intégrons provenant de bactéries résistantes (Courvalain & Leclercq, 2012). Dans l'est Algérien, cette classe d'antibiotiques est largement utilisée (Berghiche et al., 2018; Mammeri, 2018). Leur vaste utilisation à long terme rend leur taux de résistance élevé suite à la pression de sélection, cette résistance chez *E. coli* est principalement assurée par les β -lactamases, qui comptent actuellement plus de 200 enzymes qui hydrolysent le cycle β -lactame et l'inactivent, de cette manière cette résistance représente un risque très élevé pour la santé publique (Livermore, 1995; Singh et al., 2009).

Parmi les β -lactamines, l'Ampicilline est l'un des plus anciens antibiotiques utilisés chez les bovins; il est indiqué pour le traitement des septicémies, infections digestives, respiratoires et génito-urinaires (Petit, 2014); cet antimicrobien a le taux de résistance le plus élevé avec 63.67%, ce résultat est compatible avec celui de (Li et al., 2018), mais

supérieur à (de Jong et al., 2009; Enne et al., 2008; Mainda et al., 2015), par contre le taux de résistance à l'association amoxicilline et le clavulinate s'avère bas avec 10,33%.

La tétracycline est un antibiotique bactériostatique à large spectre indiqué chez les bovins pour le traitement des septicémie, des infections respiratoires, digestives, génito-urinaires et interdigitales; la résistance à cet antibiotique chez *E. coli* est en hausse (Desfontis, 2010; Petit, 2014), cette résistance est d'origine plasmidique et ayant une grande variabilité des déterminants génétiques (Prescott et al., 2000). Un grand nombre de déterminants génétiques de la résistance à la tétracycline permet aux bactéries sensibles d'acquérir facilement des facteurs de résistance (Sayah et al., 2005).

Nous avons signalé un taux de résistance élevé à la tétracycline de l'ordre de 44.67%, ce qui peut s'expliquer par son utilisation excessive par les cliniciens vétérinaires en Algérie (Berghiche et al., 2017; Mammeri, 2018), ce résultat est similaire à celui de (Abbassi et al., 2017).

D'autres chercheurs ont signalé des taux de résistance plus faibles à cette molécule (Mainda et al., 2015; Sayah et al., 2005) d'autres plus élevés tels que (Sawant et al., 2007); les niveaux élevés de résistance pour cet antibiotique peuvent être expliqués par les mécanismes de résistance à la tétracycline qui sont très anciens (D'Costa et al., 2011) et par le fait que la tétracycline est un composé naturel auquel les bactéries peuvent être exposées en dehors de son utilisation en thérapie et prophylaxie chez l'homme ou comme promoteurs de croissance chez le bétail (Prescott et al., 2000).

La résistance à de nombreuses molécules de céphalosporines est souvent le résultat de mutations stables (Prescott et al., 2000), une résistance plasmidique acquise aux céphalosporines de troisième génération est également rapportée (Payne & Amyes, 1991). Les bactéries peuvent facilement conserver ces mutations stables qui confèrent une résistance aux céphalosporines, même en absence de pression de sélection qui maintient cette résistance (Sayah et al., 2005).

Dans notre étude, les céphalosporines de première génération sont représentés par la céfalotine, pour laquelle un taux de résistance de 26.33% est observé, ce qui est proche des résultats de (Sayah et al., 2005) et inférieur à ceux de (Zheng et al., 2018), par contre la prévalence de résistance aux céphalosporines de deuxième et troisième générations, principalement céfoxitine et céfotaxime est faible à modérée respectivement (2.67% et 13.67%), avec la mise en évidence de douze souches d'*E. coli* productrices de BLSE,

d'autres études ont rapporté l'absence de résistance au céfotaxime (Abbassi et al., 2017; Bywater et al., 2004; de Jong et al., 2009; Lim et al., 2007) et un taux de résistance proche pour les céphalosporines de troisième génération est enregistré par (Zheng et al., 2018).

En Algérie, plusieurs études ont été réalisées sur la caractérisation des β -lactamases à spectre étendu sur de nombreux hôtes, chez l'homme par (Iabadene et al., 2008; A. Touati et al., 2006), chez la volaille par (Belmahdi et al., 2016; Meguenni et al., 2014), et chez les animaux de compagnie (chiens et chats) par (Yousfi et al., 2016), mais aucune étude n'a abordé le sujet des BLSE chez les *E. coli* commensales d'origine bovine.

Douze souches productrices de BLSE ont été détectées, la comparaison de ce taux avec d'autres études est difficile, vu les différences dans les méthodes de détection comme dans certaines études utilisant un enrichissement sélectif (milieux additionnés de céfotaxime) (Schmid et al., 2013), notre taux de souches productrices de BLSE est supérieur à celui de (Abbassi et al., 2017; Hassen et al., 2019) et inférieur à celui de (Haenni et al., 2014).

Pour le triméthoprime - sulfaméthoxazole, un taux de résistance modéré est observé (18.67%); concordant avec (Li et al., 2018). En association les deux molécules: triméthoprime et sulfaméthoxazole sont en synergie et produisent un effet bactéricide à large spectre (Petit, 2014), l'utilisation de cet antibiotique en alimentation animale, comme son utilisation incontrôlée en médecine humaine, peut contribuer longtemps au développement et à la transmission de gènes codant pour ce marqueur de résistance (Soufi et al., 2009); la résistance aux sulfamides est largement répandue et la résistance croisée entre les sulfamides est complète (Prescott et al., 2000), donc la prudence dans l'utilisation de cet antibiotique est de mise.

En Algérie, de nombreux antibiotiques ont été interdits par décision ministérielle depuis 2006, tels que la gentamycine, la ciprofloxacine, le chloramphénicol et le nitrofurantoïne, malgré cette interdiction, nous avons enregistré des taux de résistance non négligeables pour ces molécules, respectivement (2.67%, 9.67%, 6.33% et 6.33%), et le Réseau National de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques enregistre des niveaux significatifs de résistance au chloramphénicol (23,5%) et aux furannes (18,3%) pour des souches d'*E. coli*, malgré leur interdiction depuis le 24 décembre 2006 (Rahal, et al., 2015)

D'autres chercheurs ailleurs ont également signalé une résistance au chloramphénicol dans des isolats *E coli* provenant de poulets et de porcs en absence d'utilisation de phénicolés pendant de nombreuses années (Bager et al., 2001; Keyes et al., 2000). La corésistance du chloramphénicol avec d'autres composés non apparentés semble être l'explication probable, comme l'exemple de la corésistance causée par l'utilisation de sulfamides et de streptomycine a cause d'une liaison génétique (Chiew et al., 1998; Keyes et al., 2000).

Des taux de résistance modérés à faibles sont observés pour l'acide nalidixique avec 11.33% et la ciprofloxacine avec 9.67%, notant que la ciprofloxacine comme sus- cité est prohibée, ce qui peut s'expliquer par le fait que la résistance aux fluoroquinolones est liée à une mutation chromosomique et que le développement d'une résistance à un antibiotique de cette famille d'antibiotiques provoque des résistances aux autres fluoroquinolones (Sayah et al., 2005).

(Bywater et al., 2004). ont signalé une incidence relativement élevée anormalement de la résistance à la ciprofloxacine chez *Campylobacter spp.*, malgré l'interdiction de son utilisation, de telles observations comme pour le chloramphénicol, expliquent au moins certaines différences entre la résistance aux antibiotiques et l'utilisation vétérinaire de certaines classes d'antibiotiques.

La kanamycine est une molécule relativement ancienne, mais son taux de résistance est faible (7.67 %), ce qui peut s'expliquer par la faible utilisation des aminoglycosides par les praticiens vétérinaires (Mammeri, 2018). Pour la gentamycine, nous avons trouvé un faible taux de résistance (2.67%) , cette résistance s'explique par son utilisation illégale car son utilisation est interdite en Algérie.

La colistine a présenté un taux de résistance de (1%), en Tunisie (Hassen et al., 2019) ont enregistré un taux de (2.5%) et (0%) mentionné par (de Jong et al., 2009) qui ont mené cette étude dans cinq pays européens. La colistine est largement utilisée pour le traitement des infections colibacillaires chez les animaux, mais en médecine humaine elle a été exclue des protocoles thérapeutiques en raison de sa toxicité rénale particulière et est devenue un antibiotique prescrit uniquement pour le traitement des infections humaines graves causées par des bactéries résistantes à tout autre antibiotique (Dortet et al., 2016). La colistine est également l'un des antibiotiques les plus critiques, l'OMS a récemment recommandé de réduire son utilisation chez les animaux dont les denrées sont destinées à la consommation (AMCRA, 2017).

L'analyse de corésistance révèle que (21.67%) souches sont sensibles à plus de trois antibiotiques. Le taux d'isolats présentant une multirésistance(MDR) a atteint (29.67%).

Les MDRs représentent un risque imminent pour la santé humaine et animale, compte tenu des limites qu'elles engendrent au choix de l'antibiothérapie pour les infections ainsi que des dangers d'échec thérapeutique. Les taux de MDRs rapportés dans notre étude peuvent être le résultat d'une résistance indépendante pour chaque antibiotique ou d'une corésistance. Quelques facteurs majeurs peuvent contribuer à augmenter le taux de MDR : le transfert des déterminants de la résistance par des éléments génétiques mobiles, y compris les plasmides, les transposons, les cassettes de gènes via les intégrons et en modifiant la régulation du locus *mar* (Sáenz et al., 2004).

En raison de l'exploitation anarchique des agents antimicrobiens, une incidence élevée de MDR peut se produire, ce qui peut finalement remplacer les micro-organismes sensibles, existant dans l'environnement saturé par les antibiotiques (van den Bogaard & Stobberingh, 2000). Le taux de MDR ici enregistré est plus élevé que celui trouvé par d'autres auteurs (Enne et al., 2008; Lim et al., 2007; Sayah et al., 2005), ce qui motive la surveillance des MDR au sein des souches d'*E coli*.

En fonction de profils de résistance aux antibiotiques, les 300 isolats d'*E coli* appartiennent à 77 différents phénotypes, montrant une grande variété, variant de la sensibilité à l'ensemble des antibiotiques (80/26.67%) jusqu'à la résistance à 11 antibiotiques (0.66%). Les deux phénotypes les plus fréquents sont AMP et AMP-TE suivis par TE et la combinaison AMP-SXT-TE.

Tous les MDR sont résistants à l'AMP et à un niveau moindre à la tétracycline, ce qui suggère que les souches d'*E coli* résistantes à ces antibiotiques ont une capacité accrue à être résistantes aux autres antibiotiques, il a été rapporté dans plusieurs études précédentes que les phénotypes les plus courants incluaient une résistance unique à la tétracycline ou en association avec d'autres antibiotiques (Lim et al., 2007; Mainda et al., 2015; Sayah et al., 2005).

Douze phénotypes différents sont producteurs de β -lactamases à spectre étendu avec un taux de (4 %), tous sont des MDR allant de la résistance à cinq antimicrobiens jusqu'à la combinaison de 11.

Le phénotype BLSE implique la résistance aux pénicillines et aux céphalosporines, à l'exception des céphamycines, il est à l'origine de nombreux échecs thérapeutiques (Courvalain & Leclercq, 2012), ce qui nécessite la surveillance des souches porteuses de ce phénotype.

La propagation de souches d'entérobactéries produisant les BLSE est un phénomène complexe impliquant trois mécanismes. Le premier est la dissémination clonale, où une souche produisant des BLSE peut se propager par contact horizontal entre les individus, le deuxième type est la transmission d'un ou plusieurs plasmides à une autre souche bactérienne de la même espèce ou d'espèces différentes, le troisième est le transfert des éléments de résistance présents dans les transposons ou intégrons entre différents plasmides. Les plasmides ont souvent d'autres gènes de résistance (y compris les aminosides, les tétracyclines, les sulfamides et le triméthoprime), d'où la notion de corésistance, de co-expression et de co-sélection (Rodriguez-Villalobos & Struelens, 2006).

Dans cette étude, la forte variabilité des phénotypes de résistance peut s'expliquer par la corésistance (acquisition de résistance à plusieurs antibiotiques de différentes classes), car les plasmides échangés ont généralement plusieurs gènes de résistance tels que la corésistance d'*E coli* aux céphalosporines, pénicillines, chloramphénicol, tétracyclines et aux fluoroquinolones.

De la même manière que pour la sélection croisée, l'utilisation d'un antibiotique auquel la bactérie résiste permettra la co-sélection de toutes les résistances supportées par le même plasmide. La diffusion et l'acquisition de résistances sont indépendantes de l'utilisation d'antibiotiques, mais leur utilisation, sans être au courant de l'état de sensibilité bactérienne, peut rapidement provoquer la sélection de souches MDR (AFSSA, 2006).

L'étude génotypique des gènes codant les BLSE, révèle la prédominance du gène *blaTEM 1*, les 12 isolats d'*E coli* hébergent ce gène, dont neuf hébergeaient le *blaTEM1* seul et 3 hébergent le *blaTEM1* en association avec le gène *blaCTX-M* du groupe 1 (CTX-M-1 et CTX-M-3).

En Algérie, l'association du *blaTEM-1* avec *CTX-M* a été rapporté dans (38,2%) des isolats à partir de viande hachée crue de bœuf (Rebbah et al., 2018) et récemment une forte prévalence de *BlaTEM* (25,4%) a été aussi détectée dans des échantillons fécaux de volaille (Chabou et al., 2018). Notant que le *Bla TEM* a été signalé pour la première fois en Algérie dans des isolats humains prélevés dans des hôpitaux entre 2010 et 2011 (Bakour et al., 2013) ensuite (Yousfi et al., 2016) ont rapportés la présence de *blaTEM* chez *E. coli* isolées chez les chien et chats dans la wilaya de Béjaia.

Dans notre étude le *bla CTX -M* (*bla CTX-M-1* et *bla CTX M-3*) sont présent chez (25%) des souches productrices de BLSE, l'analyse du profil d'antibiorésistance révèle la

coexistence du gène *mcr1* chez ces mêmes souches , l'une de ces souches appartenant au groupe phylogénique B1 et deux appartiennent au groupe phylogénique A₁ et aux pathovars NMEC et EA_gEC , notant le caractère courant de multirésistances aux antibiotiques chez les entérobactéries productrices de *CTX-M* en raison de la présence de plasmides contenant du *blaCTX-M* incorporant divers gènes codant pour la résistance aux antibiotiques (Mamlouk et al., 2006)

BlaCTX-M 3 a été signalé pour la première fois en Algérie en 2006 à partir d'isolats cliniques d'Enterobacteriaceae à Bejaia (Touati et al., 2006), par la suite, *bla CTX-M* a été détecté chez *E coli* isolées de différentes espèces animales : volaille , chiens et chats et de denrées d'origine animale (Chabou et al., 2018; Meguenni et al., 2014; Rebbah et al., 2018; Yousfi et al., 2016).

Nos résultats concordent avec ceux de (Rebbah et al., 2018) qui ont trouvé une prédominance des gènes *CTX-M-1* et *CTX -M-3* dans les souches *E coli* isolées de viande hachée de bœuf en Algérie , de même en Europe, *CTX-M* du groupe 1 est prédominants dans les pays de l'Ouest et du nord de l'Europe (Coque et al., 2008),

Le gène *bla SHV* n'a pas été détecté dans l'ensemble de nos isolats. En Algérie des travaux antérieurs ont mis en évidence le gène *blaSHV* chez divers espèces animales (Davoust et al., 2018; Yousfi et al., 2016).

Il est important de signaler que notre détection d'intégrons de classe 1 chez des souches *E coli* isolées de fèces bovines est la première en Algérie, Parmi les souches *E coli* productrices de BLSE, (58.33%) hébergent le gène de l'intégron de classe 1 et aussi la séquence *qacE-sull*.on note une absence de l'intégron de classe 2, Nos résultats concordent avec l'étude de (Hassen et al., 2018) en Tunisie où 50 % des souches *E coli* productrices de BLSE d'origine bovine hébergent les intégrons de classe 1,

En Algérie quelques études on mis en évidence l'intégron de classe 1 dans la viande hachée de bœuf et chez la volaille (Messaili et al., 2019; Rebbah et al., 2018) et chez l'homme l'intégron de classe1 a été détecté chez *Klebsiella pneumoniae* et *E coli*, respectivement par (Messai et al., 2008) et (Ayad, 2017).Il a été admis que la multirésistance aux antibiotiques est associée à des plasmides transmissibles et à l'importance des intégrons dans l'acquisition de gènes de résistance , constituant ainsi le principal vecteur de multirésistance chez les bactéries à Gram négatif (Cambray et al., 2010;

Escudero et al., 2015), d'où le risque d'existence de souches hébergeant l'intégron de classe 1.

Il est intéressant de signaler dans cette étude la première détection du gène *mcr-1* dans les fèces de bovins dans l'Est de l'Algérie. Nous avons décrit la présence du gène *mcr-1* dans trois souches d'*E. coli*, avec une coproduction du gène *CTX-M*, l'une de ces souches appartenant au groupe phylogénique B1 et deux au groupe phylogénique A1, notant l'absence de détection du gène *mcr-2* dans notre étude. Ce résultat concorde avec celui de (Hassen et al., 2019) qui ont aussi enregistré chez *E. coli* isolées de fèces bovines une coproduction des gènes *mcr-1* et *CTX-M-1*,

En Algérie, quelques études ont confirmé la présence du gène *mcr-1* chez l'homme, l'animal et l'eau de mer (Bachiri et al., 2018; Berrazeg et al., 2016; Chabou et al., 2016; Drali et al., 2018; Olaitan et al., 2016; Yanat, Machuca, Yahia, et al., 2016) et plus récemment à partir de terres agricoles à Oran (Ouest de l'Algérie) (M. Touati et al., 2019).

la résistance plasmidique à la colistine médiée par le gène *mcr-1* est une préoccupation émergente qui s'est déjà propagée dans le monde entier (Olaitan et al., 2016). En Afrique, de nombreuses études ont mis en évidence le gène *mcr-1* chez des souches d'*E. coli* d'origine animale (Grami et al., 2016; Hassen et al., 2019; Olaitan et al., 2016; Perreten et al., 2016).

Les fluoroquinolones sont une classe d'antimicrobiens largement utilisée. De nombreux membres de cette classe sont actuellement utilisés chez l'homme; le principal d'entre eux est la ciprofloxacine. Les fluoroquinolones sont également largement et de plus en plus utilisés en médecine vétérinaire (Riddle et al., 2000), cependant, avec leur utilisation croissante en pratique clinique, la résistance aux quinolones a atteint des dimensions inquiétantes dans le monde entier (Rodríguez-Martínez et al., 2016; Tran & Jacoby, 2002). Dans notre étude on rapporte pour la première fois la mise en évidence de gènes de résistance aux quinolones *qnrB* et *qnrS*, respectivement chez trois et deux souches d'*E. coli* d'origine bovine productrices de BLSE dont une souche hébergeant *qnrB* en coproduction de six autres gènes de résistance aux antibiotiques (*bla CTX-M* du groupe 1 + *bla TEM1* + *sulI* + *tetA* et *tetB* + *mcr1*).

En Algérie (Rebbah et al., 2018) ont également mis en évidence *qnrS1*, *qnrB*, chez *E. coli* issue de bœuf et récemment (Benameur et al., 2018) ont décrits pour la première fois la présence du gène *qnrS* chez *Enterobacter cloacae* d'origine aviaire dans l'Ouest de l'Algérie, (Yousfi et al., 2016) ont mis en évidence les gènes de résistance plasmidique aux quinolones chez des *E. coli* isolées de chiens et chats, chez l'homme quelques études

rapportant la résistance aux quinolones chez les entérobactéries (Iabadene et al., 2008; Meradi et al., 2011) et (Yanat, Machuca, Díaz-De-Alba, et al., 2016) ont décrits pour la première fois chez l'homme le gène *qnrD*.

Actuellement, *tet (A)* et / ou *tet (B)*, codant pour les mécanismes d'efflux, ont été signalé comme les déterminants de résistance à la tétracycline les plus courants dans les isolats d'*E coli* provenant d'humains et d'animaux dans de nombreux pays (Ahmed et al., 2010; Hu et al., 2013; Karami et al., 2006; Schwaiger et al., 2010; Shin et al., 2015; Tuckman et al., 2007), l'application anarchique de tétracyclines chez les animaux destinés à l'alimentation améliore l'émergence de souches multirésistantes, suite à la pression sélective des antibiotiques induite par la présence de fortes concentrations environnementales de ces derniers (Karami et al., 2006; Koo & Woo, 2011).

(50%) souches portent le gène *tetA* et (16.66%) souches portent le gène *tetB*, (16.66%) portent l'association *tetA* et *tetB*, en Algérie, (Rebbah et al., 2018) ont signalé une prédominance du gènes *tetA* par rapport au *tetB* chez *E coli* d'origine bovine, en Tunisie, (Hassen et al., 2019) ont trouvé une prédominance du *tetA* (62.5%) chez des souches *E coli* bovines productrices de BLSE et ceci concorde avec nos résultats,

Concernant la résistance aux sulfamides et au triméthoprim, on a détecté (9/75%) souches hébergeant le gène *sul1*, le gène *sul2* n'a pas été détecté. ce qui concorde avec (Hassen et al., 2019), contrairement Il a été rapporté par (Gow et al., 2008; Guerra et al., 2003) que le taux de détection de *sul2* était de deux à cinq fois supérieur à celui de *sul1* chez les souches *E coli* bovines, par contre. (Rebbah et al., 2018) ont mis en évidence *sul1, sul2* et *sul3* chez des *E coli* d'origine bovine.

Le gène *sul1* se trouve normalement lié à d'autres gènes de résistance dans les intégrons de classe 1, tandis que *sul2* se trouve généralement sur de petits plasmides non conjugables (Sköld, 2000) ou sur de grands plasmides multirésistants transmissibles (Enne, Livermore, Stephens et Hall, 2001). dans notre étude six souches sur neuf portant le gène *sul1* hébergent aussi les gènes *int1* ainsi que la région *qacE-sul-1*.

Les plasmides qui portent des gènes de résistance aux antibiotiques peuvent également être porteurs de gènes de virulence et par conséquent, pourraient être co-sélectionnés (Barbosa & Levy, 2000). Dans cette étude, dix gènes qui déterminent les facteurs de virulence ont été identifiés parmi 32 autres gènes étudiés par PCR. Le gène d'adhésion bactérienne *fimH* est présent dans l'ensemble des souches étudiées (100%), ceci concorde avec (Badi et al., 2018; Messaili et al., 2019) qui ont constaté une prédominance

de ce gène , un autres gènes d'adhésion bactérienne : *eaeA* représente (8.33%), le gène d'acquisition du fer *iutA* était présent dans 11 souches , le gène *east1* et *ast* codant la toxine thermostable chez EAaggEC sont retrouvés chez 3 et 1 souche respectivement., le gène d'invasion *ibeA* (16.66%), les gènes de résistance au sérum *traT* et *iss* et le gène d'enterohémolysine *ehxA* ont été détecté dans 1 souche pour chacun.

On a détecté une seule souche portant le gène *stx1* codant pour la shiga-toxine 1 et qui représente un facteur de virulence chez STEC. Sept profils de virulence différents ont été détectés

Les gènes *fimH*, *iutA*, *traT* et *iss*, détectés dans différentes combinaisons parmi les 12 isolats, sont essentiels dans le processus de colonisation et de survie dans l'intestin et sont couramment détectés chez ExPEC , mais ne sont spécifiques à aucun des pathovars d'*E. coli*. Cependant, les gènes *eaeA*, *ehxA*, *stx1*, *stx2*, *ibeA*, *ipaH* et *east1* sont reconnus comme des gènes clés dans les voies de virulence d'*E. coli* et leur présence peut définir divers pathovars. Ainsi, en fonction de la présence de ces gènes spécifiques, certains isolats pourraient être classés (Coura et al., 2017; Kaper et al., 2004) en STEC(1 souche) contenant le gène *stx1* , en MNEC (2 souches) contenant le gène *ibeA* d'invasion de l'endothélium cérébral et en EAaggEC (3 souches) contenant le gène *east1* codant l'enterotoxine thermostable.

Le seul isolat appartenant au pathovar STEC est isolé a partir de fèces de vache en bonne santé, STEC est fréquente chez les bovins avec environ 75% des épidémies chez l'homme qui est un hôte accidentel, ce pathovar est associé aux produits alimentaires d'origine bovine tels que les produits laitiers, le lait et la viande (Hughes et al., 2006; Käppeli et al., 2011; Nguyen & Sperandio, 2012). La présence d'isolats de STEC chez les bovins met en évidence le rôle des bovins ou des produits alimentaires d'origine bovine dans la transmission de ce pathovar vers l'homme et l'environnement.

Pour l'ensemble des souches productrices de BLSE , on a détecté deux groupes phylogéniques : A₁(10 isolats) et B₁(2 isolats).Nos résultats concordent avec des études précédentes en Algérie et en Tunisie selon lesquelles la majorité des isolats d'origine animale d'*E. coli* producteurs de BLSE appartenaient aux phylogroupes A et B₁, tandis que les isolats cliniques étaient principalement des phylogroupes B₂ et D ((Ferjani et al., 2018; Kilani et al., 2015; Messaili et al., 2019; Rebbah et al., 2018).

La dissémination des gènes de résistance est souvent associée à la diffusion de souches clonales et/ou de plasmides épidémiques. Les résultats de l'électrophorèse en champ pulsé ont montré une variabilité génotypique entre l'ensemble des souches étudiées (12 pulsotypes différents) , ce qui écarte la possibilité d'une transmission de souches

clonales, par contre (Rebbah et al., 2018; Sghaier et al., 2019) ont trouvé une diversité génétique au sein des isolats d'E coli d'origine bovine ce qui suppose la possibilité d'une propagation clonale.

5 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, 50 % des antibiotiques produits dans le monde sont destinés aux animaux pour prévenir et traiter les maladies. Le traitement de ces infections bactériennes est souvent irrationnel.

Les antimicrobiens sont parfois utilisés pour promouvoir la croissance à des doses subthérapeutiques. L'environnement d'élevage riche en antibiotique permet la sélection de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques utilisés, ces souches sélectionnées seraient favorisées par rapport aux souches sensibles et coloniseraient les animaux hôtes. Il est admis actuellement que le mécanisme de résistance aux antibiotiques s'exerce en deux temps, d'abord une sélection de la résistance dans la flore commensale puis le transfert de celle-ci à la flore pathogène.

Les mécanismes de résistance les plus importants ayant un impact clinique crucial sont ceux de la résistance aux bêta-lactamines chez les entérobactéries et ceci principalement par production de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE). Les gènes codant ces BLSE sont principalement de type *blaSHV*, *blaTEM*, et *blaCTX-M*. Les souches bactériennes productrices de BLSE sont généralement multirésistantes à plusieurs familles d'antibiotiques, les souches d'*E coli* productrices de BLSE jouissent de plusieurs gènes de résistance à de nombreux antibiotiques qui peuvent se transmettre simultanément, cette multirésistance peut conduire à des impasses thérapeutiques.

Les résultats phénotypiques de la sensibilité aux antibiotiques de 300 isolats d'*E coli* prélevés de bovins dans l'Est de l'Algérie, ont montré des fréquences élevées de résistance à l'ampicilline, tétracycline, céphalotine et à d'autres antibiotiques, douze souches d'*E coli* produisant des BLSE ont été détectées. Les souches productrices de BLSE sont à l'origine de nombreux échecs thérapeutiques, ce qui nécessite la surveillance des souches porteuses de ce phénotype. L'analyse de la corésistance a montré un taux élevé de souches MDR, 77 phénotypes de résistance différents ont également été détectés, montrant une grande variété de résistance, allant de 1 à 11 combinaisons d'antimicrobiens.

Les résultats de l'analyse phylogénétique concordent avec les rapports précédents, selon lesquels la majorité des isolats d'origine animale d'*E coli* producteurs de BLSE appartenaient aux phylogroupes A et B1.

Parmi les gènes codant pour les BLSE, le gène *blaTEM 1* s'avère prédominant, suivi du gène *blaCTX-M* du groupe 1.

Nous rapportons pour la première fois, la détection d'intégrons de classe 1 et de la séquence *qacE-sulI* chez 7 isolats, de même que la première mise en évidence du gène *mcr-1* chez trois isolats *E coli* et les gènes de résistance aux quinolones *qnrB* et *qnrS* respectivement chez trois et deux isolats et ceci à partir de fèces de bovins dans l'Est de l'Algérie.

On a mis en évidence 6 isolats portant le gène *tetA* et 2 isolats portant le gène *tetB*, le gène *sulI* a été détecté chez 9 isolats.

Les résultats de l'électrophorèse en champ pulsé ont montré que les isolats *E coli* présentent une variabilité génotypique avec 12 pulsotypes différents, ce qui écarte la possibilité d'une transmission de souches clonales.

Les plasmides qui portent des gènes de résistance aux antibiotiques peuvent également être porteurs de gènes de virulence et par conséquent, pourraient être co-sélectionnés, dans cette étude, dix gènes qui déterminent les facteurs de virulence ont été identifiés, avec une prédominance du gène d'adhésion bactérienne *fimH* et le gène d'acquisition du fer *iutA*, on a détecté une seule souche portant le gène *stx1* codant pour la shiga-toxine 1.

L'étude des différents phénotypes de virulence a montré la présence de certains pathovars pathogènes (STEC, MNEC, EAaggEC). Ces résultats sont préoccupants vu la possibilité de dissémination potentielle de ces souches à l'homme, par contact direct avec les animaux, par consommation de produits alimentaires d'origine animale ou par pollution de l'environnement.

Ces taux élevés de résistance aux antibiotiques, ainsi que la multitude de gènes de résistance et de facteurs de virulences détectés, à partir d'isolats d'*E coli* commensaux du microbiote intestinal de bovins, souligne l'urgence de mettre en œuvre des mesures de sensibilisation à grande échelle sur le problème de la résistance aux antibiotiques; ainsi que la mise en œuvre de contrôle de l'utilisation des antibiotiques en particulier par les vétérinaires praticiens; le contrôle des pratiques d'élevage notamment l'usage des antibiotiques comme promoteurs de croissance chez les animaux d'élevage et le renforcement des réseaux de contrôle de la résistance bactérienne aux antibiotiques.

Le renforcement des laboratoires d'analyses vétérinaires afin de faciliter le recours aux antibiogrammes, pour cibler le traitement antibiotique de choix, l'usage des probiotiques en médecine vétérinaire peut également aider à améliorer la santé animale.

Une politique globale de surveillance de l'antibiorésistance s'impose, car le phénomène est constaté partout dans le monde et menace la capacité à traiter les maladies infectieuses et compromet de nombreuses avancées médicales et de santé publique, et pour se faire une harmonisation intersectorielle visant à mieux coordonner les politiques de santé humaine, de santé animale et d'environnement s'impose

L'antibiorésistance ne connaît pas de barrière, ni entre l'homme et l'animal, ni entre les différentes espèces bactériennes, dans ce cadre l'OMS en 2015 a établi un plan d'action mondial pour combattre la résistance aux antimicrobiens, y compris la résistance aux antibiotiques qui est aujourd'hui la menace la plus urgente. Ce plan a pour but de maintenir le plus longtemps possible et sans discontinuation, la capacité de traiter et de prévenir les maladies infectieuses au moyen de médicaments sûrs et efficaces de qualité garantie, utilisés de manière responsable et accessibles à tous ceux qui en ont besoin.

Références Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

01. Aarestrup, F. M., Wegener, H. C., & Collignon, P. (2008). Resistance in bacteria of the food chain : Epidemiology and control strategies. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 6(5), 733-750. <https://doi.org/10.1586/14787210.6.5.733>
02. Abbassi, M. S., Kilani, H., Zouari, M., Mansouri, R., El Fekih, O., Hammami, S., & Ben Chehida, N. (2017). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Healthy Poultry, Bovine and Ovine in Tunisia : A Real Animal and Human Health Threat. *J Clin Microbiol Biochem Technol*, 3(2), 019-023.
03. AFSSA. (2006). *Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine*. (p. 214) [Rapport du groupe de travail « Antibiorésistance »]. AFSSA. www.afssa.fr/Documents/SANT-Ra-ABR.pdf
04. Agus, A., Massier, S., Darfeuille-Michaud, A., Billard, E., & Barnich, N. (2014). Understanding host-adherent-invasive *Escherichia coli* interaction in Crohn's disease : Opening up new therapeutic strategies. *BioMed Research International*, 2014, 567929. <https://doi.org/10.1155/2014/567929>
05. Ahmed, M. O., Clegg, P. D., Williams, N. J., Baptiste, K. E., & Bennett, M. (2010). Antimicrobial resistance in equine faecal *Escherichia coli* isolates from North West England. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 9(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-9-12>
06. Alekshun, M., & Levy, S. (2000). *Bacterial drug resistance : Response to survival threats*. In : Storz, G., Hengge-Aronis, R. (Eds.), *Bacterial Stress Responses* (2^e éd., p. 323–366). ASM Press, Washington, D.C.
07. Alekshun, M. N., & Levy, S. B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128(6), 1037-1050. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.004>
08. Al-Gallas, N, Ben Aissa , R., Attia Annabi, T., Bahri, O., & Boudabous, A. (2002). Isolation and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from meat and dairy products. *Food Microbiology*, 19(4), 389-398. <https://doi.org/10.1006/fmic.2002.0488>
09. Al-Gallas, N, Bahri, O., Bouratbeen, A., Ben Haasen, A., & Ben Aissa, R. (2007). Etiology of acute diarrhea in children and adults in Tunis, Tunisia, with emphasis on diarrheagenic *Escherichia coli* : Prevalence, phenotyping, and molecular epidemiology. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(3), 571-582.
10. AMCRA. (2017). L'OMS recommande d'arrêter l'utilisation préventive des antibiotiques chez les animaux. *Accesced on 17-04-2019*. <https://www.amcra.be/fr/nouvelles/loms-recommande-darrter-lutilisation-prventive-des-antibiotiques-chez-les-animaux/?lid=14308>
11. Andremont, A. (1997). Définition de la multirésistance bactérienne : Prévalence et incidence des bactéries multirésistantes en réanimation. Impact écologique. *Réanimation Urgences*, 6(2, Part 2), 175-182. [https://doi.org/10.1016/S1164-6756\(97\)80078-3](https://doi.org/10.1016/S1164-6756(97)80078-3)
12. ANSES. (2014). *Réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales. Bilan 2014*. <https://www.anses.fr/fr/system/files/LABO-Ra-Resapath2014.pdf>
13. Attotron Biosensor Corporation. (s. d.). Consulté 11 février 2020, à l'adresse <http://biomodel.uah.es/en/lab/cybertory/analysis/massager.htm>

14. Ayad, A. (2017). *Etude des mécanismes de résistance aux antibiotiques chez Escherichia coli au niveau des hôpitaux de l'Ouest algérien*. Université Abou Bekr Belkaid –Tlemcen.
15. Bachiri, T., Lalaoui, R., Bakour, S., Allouache, M., Belkebla, N., Rolain, J. M., & Touati, A. (2018). First Report of the Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-1* in *Escherichia coli* ST405 Isolated from Wildlife in Bejaia, Algeria. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, 24(7), 890-895. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0026>
16. Badi, S., Cremonesi, P., Abbassi, M. S., Ibrahim, C., Snoussi, M., Bignoli, G., Luini, M., Castiglioni, B., & Hassen, A. (2018). Antibiotic resistance phenotypes and virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolated from animals and animal food products in Tunisia. *FEMS Microbiology Letters*, 365(10). <https://doi.org/10.1093/femsle/fny088>
17. Bager, F., Emborg, H.-D., & Monnet, D. L. (2001). *DANMAP 2000* (Consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark) [Report].
18. Bakour, S., Touati, A., Sahli, F., Ameer, A., Haouchine, D., & Rolain, J.-M. (2013). Antibiotic resistance determinants of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Algeria. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 76. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.04.009>
19. Barbosa, T. M., & Levy, S. B. (2000). The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resistance Updates*, 3(5), 303-311. <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0167>
20. Beaber, J. W., Burrus, V., Hochhut, B., & Waldor, M. K. (2002). Comparison of SXT and R391, two conjugative integrating elements : Definition of a genetic backbone for the mobilization of resistance determinants. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 59(12), 2065-2070. <https://doi.org/10.1007/s000180200006>
21. Beaudry, M., Zhu, C., Fairbrother, J. M., & Harel, J. (1996). Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(1), 144-148.
22. Belmahdi, M., Bakour, S., Al Bayssari, C., Touati, A., & Rolain, J.-M. (2016). Molecular characterisation of extended-spectrum β -lactamase- and plasmid AmpC-producing *Escherichia coli* strains isolated from broilers in Béjaïa, Algeria. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 6, 108-112. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.04.006>
23. Benameur, Q., Hassiba, T. M., Assaous, F., Guettou, B., Meki, B., Rahal, K., & Ben-Mahdi, M.-H. (2018). Characterization of quinolone-resistant Enterobacteriaceae strains isolated from poultry in Western Algeria: First report of *qnrS* in an *Enterobacter cloacae*. *Veterinary World*, 11, 469-473. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.469-473>
24. Bennett, J. E., Dolin, R., & Blaser, M. (2014). *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases* (8^e éd.). Saunders.
25. Berghiche, A., Khenenou, T., Bouzebda-Afri, F., Lamraoui, R., & Labied, I. (2017). Detection of the antibiotic residues in broiler chickens by microbiological screening test in Algeria. *Glob. Vét*, 19(2), 504–508.
26. Berghiche, A., Khenenou, T., Kouzi, A., & Labiad, I. (2018). An investigation on the predominant diseases, its diagnosis, and commonly used drugs in the poultry farms in the North-Eastern regions of Algeria. *Veterinary World*, 11(7), 986-989. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.986-989>

27. Berrazeg, M., Hadjadj, L., Ayad, A., Drissi, M., & Rolain, J.-M. (2016). First Detected Human Case in Algeria of mcr-1 Plasmid-Mediated Colistin Resistance in a 2011 *Escherichia coli* Isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(11), 6996-6997. <https://doi.org/10.1128/AAC.01117-16>
28. Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., & Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5331), 1453-1462. <https://doi.org/10.1126/science.277.5331.1453>
29. Borderon, E., & Horodniceanu, T. (1978). Metabolically deficient dwarf-colony mutants of *Escherichia coli*; deficiency and resistance to antibiotics of strains isolated from urine culture. *Journal of clinical microbiology*, 8(6), 629-634.
30. Brennan, E., Martins, M., McCusker, M. P., Wang, J., Alves, B. M., Hurley, D., El Garch, F., Woehrlé, F., Miossec, C., McGrath, L., Srikumar, S., Wall, P., & Fanning, S. (2016). Multidrug-Resistant *Escherichia coli* in Bovine Animals, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 22(9), 1650-1652. <https://doi.org/10.3201/eid2209.160140>
31. Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B., & Guédon, G. (2002). Conjugative transposons: The tip of the iceberg. *Molecular Microbiology*, 46(3), 601-610. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03191.x>
32. Bywater, R., Deluyker, H., Deroover, E., de Jong, A., Marion, H., McConville, M., Rowan, T., Shryock, T., Shuster, D., Thomas, V., Vallé, M., & Walters, J. (2004). A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and commensal bacteria isolated from food-producing animals. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(4), 744-754. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh422>
33. Cambray, G., Guerout, A.-M., & Mazel, D. (2010). Integrons. *Annual Review of Genetics*, 44, 141-166. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102209-163504>
34. Cattoir, V., Poirel, L., Rotimi, V., Soussy, C.-J., & Nordmann, P. (2007). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(2), 394-397. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm204>
35. Chabou, S., Leangapichart, T., Okdah, L., Le Page, S., Hadjadj, L., & Rolain, J.-M. (2016). Real-time quantitative PCR assay with Taqman(®) probe for rapid detection of MCR-1 plasmid-mediated colistin resistance. *New Microbes and New Infections*, 13, 71-74. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2016.06.017>
36. Chabou, S., Leulmi, H., Davoust, B., Aouadi, A., & Rolain, J.-M. (2018). Prevalence of extended-spectrum β -lactamase- and carbapenemase-encoding genes in poultry faeces from Algeria and Marseille, France. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 13, 28-32. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.11.002>
37. Chapman, T. A., Wu, X.-Y., Barchia, I., Bettelheim, K. A., Driesen, S., Trott, D., Wilson, M., & Chin, J. J.-C. (2006). Comparison of Virulence Gene Profiles of *Escherichia coli* Strains Isolated from Healthy and Diarrheic Swine. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 4782-4795. <https://doi.org/10.1128/AEM.02885-05>
38. Chiew, Y. F., Yeo, S. F., Hall, L. M., & Livermore, D. M. (1998). Can susceptibility to an antimicrobial be restored by halting its use? The case of streptomycin versus Enterobacteriaceae. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41(2), 247-251.
39. Chopra, I., O'Neill, A. J., & Miller, K. (2003). The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 6(3), 137-145. [https://doi.org/10.1016/S1368-7646\(03\)00041-4](https://doi.org/10.1016/S1368-7646(03)00041-4)

40. Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4555-4558.
41. Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited : Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 58-65. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>
42. Clermont, O., Olier, M., Hoede, C., Diancourt, L., Brisse, S., Keroudean, M., Glodt, J., Picard, B., Oswald, E., & Denamur, E. (2011). Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(3), 654-662. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.02.005>
43. CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute). (2018). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty fifth information supplement. M100-S28*. National committee for clinical laboratory standards, Wayne PA.
44. Coetzee Jn. (1977). High frequency cotransduction of a Morganocinogenic plasmid and markers of R plasmids. *Journal of General Microbiology*, 103(1), 165-180. <https://doi.org/10.1099/00221287-103-1-165>
45. Coimbra, R. S., Grimont, F., Lenormand, P., Burguière, P., Beutin, L., & Grimont, P. A. (2000). Identification of *Escherichia coli* O-serogroups by restriction of the amplified O-antigen gene cluster (rfb-RFLP). *Research in Microbiology*, 151(8), 639-654. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(00\)00134-0](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(00)00134-0)
46. Collectif. (2008). *Résistance des micro-organismes aux agents antibactériens*. In *Le Manuel Vétérinaire Merck* (3rd ed, p. 2053-2054). D'APRES. <https://www.unitheque.com/le-manuel-veterinaire-merck/apres/Livre/7156>
47. Coque, T. M., Baquero, F., & Cantón, R. (2008). Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Eurosurveillance*, 13(47), 19044. <https://doi.org/10.2807/ese.13.47.19044-en>
48. Coura, F. M., de Araújo Diniz, S., Mussi, J. M. S., Silva, M. X., Lage, A. P., & Heinemann, M. B. (2017). Characterization of virulence factors and phylogenetic group determination of *Escherichia coli* isolated from diarrheic and non-diarrheic calves from Brazil. *Folia Microbiologica*, 62(2), 139-144. <https://doi.org/10.1007/s12223-016-0480-9>
49. Courvalain, P., & Leclerq, R. (2012). *Antibiogramme* (. 3rd ed). ESKA.
50. Cowan, S. T. (1954). Abbreviation of Bacterial Generic Names. *Science*, 120(3131), 1103-1104.
51. Cuevas Ramos, G. (2010). *Effets génotoxiques des souches de Escherichia coli produisant la colibactine* [Phd, Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier]. <http://thesesups.ups-tlse.fr/940/>
52. Davoust, B., Aouadi, A., & Rolain, J.-M. (2018). Prevalence of extended-spectrum β -lactamase- and carbapenemase-encoding genes in poultry faeces from Algeria and Marseille, France. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 13, 28-32. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.11.002>
53. D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G. B., Poinar, H. N., & Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 477(7365), 457-461. <https://doi.org/10.1038/nature10388>
54. de Jong, A., Bywater, R., Butty, P., Deroover, E., Godinho, K., Klein, U., Marion, H., Simjee, S., Smets, K., Thomas, V., Vallé, M., & Wheadon, A. (2009). A pan-European survey of antimicrobial susceptibility towards human-use antimicrobial drugs among zoonotic and commensal enteric bacteria isolated from healthy food-

- producing animals. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(4), 733-744. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp012>
55. Denis, F., Bingen, E., Martin, C., Ploy, M.-C., & Quentin, R. (2012). *Bactériologie médicale*. Elsevier Health Sciences.
 56. Desfontis, J.-C. (2010). *Guide pratique des médicaments à usage vétérinaire*. MED'COM.
 57. Diallo, A. A. (2013). *Escherichia coli pathogènes et résistantes aux antibiotiques dans les effluents d'origine humaine et animale : Prévalence et caractérisation avant et après traitement épuratoire* [Phd, Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier]. <http://thesesups.ups-tlse.fr/2112/>
 58. Dobrindt, U, Chowdary, M., Krumbholz, G., & Hacker, J. (2010). Genome dynamics and its impact on evolution of *Escherichia coli*. *Medical Microbiology and Immunology*, 199(3), 145-154. <https://doi.org/10.1007/s00430-010-0161-2>
 59. Dobrindt, Ulrich. (2005). (Patho-)Genomics of *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 295(6-7), 357-371. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.07.009>
 60. Dortet, L., Bonnin, R., Jousset, A., Gauthier, L., & Naas, T. (2016). Émergence de la résistance à la colistine chez les entérobactéries : Une brèche dans le dernier rempart contre la pan-résistance ! *Journal des Anti-infectieux*, 18(4), 139-159. <https://doi.org/10.1016/j.antinf.2016.09.003>
 61. Drali, R., Berrazeg, M., Zidouni, L. L., Hamitouche, F., Abbas, A. A., Deriet, A., & Mouffok, F. (2018). Emergence of mcr-1 plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from seawater. *The Science of the Total Environment*, 642, 90-94. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.387>
 62. Enne, V. I., Cassar, C., Sprigings, K., Woodward, M. J., & Bennett, P. M. (2008). A high prevalence of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from pigs and a low prevalence of antimicrobial resistant *E. coli* from cattle and sheep in Great Britain at slaughter. *FEMS Microbiology Letters*, 278(2), 193-199. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00991.x>
 63. Enriquez, B. (2002). *Les antibiotiques en médecine vétérinaire. Pharmacie et Toxicologie expérimentales et cliniques : Notions générales sur les antibiotiques, les antibiotiques antibactériens, les antibiotiques antifongiques*. Polycopié. (Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité Pédagogique de Pharmacie et Toxicologie, p. 157).
 64. Escobar-Páramo, P., Grenet, K., Le Menac'h, A., Rode, L., Salgado, E., Amorin, C., Gouriou, S., Picard, B., Rahimy, M. C., Andremont, A., Denamur, E., & Ruimy, R. (2004). Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9), 5698-5700. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5698-5700.2004>
 65. Escudero, J. A., Loot, C., Nivina, A., & Mazel, D. (2015). The Integron : Adaptation On Demand. *Microbiology Spectrum*, 3(2), MDNA3-0019-2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0019-2014>
 66. European bioinformatic institute. (s. d.). *The European Bioinformatics Institute < EMBL-EBI*. Consulté 11 février 2020, à l'adresse <https://www.ebi.ac.uk/>
 67. Faculté de médecine. Pierre et Marie Curie. (2003). *Bactériologie*. <http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/bacterio.pdf>
 68. Farmer, J. J., Davis, B. R., Hickman-Brenner, F. W., McWhorter, A., Huntley-Carter, G. P., Asbury, M. A., Riddle, C., Wathen-Grady, H. G., Elias, C., & Fanning, G. R. (1985). Biochemical identification of new species and biogroups of

- Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 21(1), 46-76.
69. Ferjani, S., Saidani, M., Maamar, E., Harbaoui, S., Hamzaoui, Z., Hosni, H., Amine, F. S., & Boubaker, I. B. B. (2018). *Escherichia coli* colonizing healthy children in Tunisia: High prevalence of extra-intestinal pathovar and occurrence of non-extended-spectrum- β -lactamase-producing ST131 clone. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(6), 878-885. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.07.015>
70. Freney, J., Renaud, F., Leclercq, R., & Riegel, P. (2007). *Précis de bactériologie clinique* (2e éd.). ESKA.
71. Freter, R., Brickner, H., Fekete, J., Vickerman, M. M., & Carey, K. E. (1983). Survival and implantation of *Escherichia coli* in the intestinal tract. *Infection and Immunity*, 39(2), 686-703.
72. Gautom, R. K. (1997). Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(11), 2977-2980.
73. Giguere, S., Prescott, J. F., Baggot, J. D., Walker, R. D., & Dowling, P. M. (Éds.). (2007). *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* (4 edition). Wiley-Blackwell.
74. Gow, S. P., Waldner, C. L., Harel, J., & Boerlin, P. (2008). Associations between Antimicrobial Resistance Genes in Fecal Generic *Escherichia coli* Isolates from Cow-Calf Herds in Western Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3658-3666. <https://doi.org/10.1128/AEM.02505-07>
75. Grami, R., Mansour, W., Mehri, W., Bouallègue, O., Boujaâfar, N., Madec, J.-Y., & Haenni, M. (2016). Impact of food animal trade on the spread of mcr-1-mediated colistin resistance, Tunisia, July 2015. *Euro Surveillace: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles*, 21(8), 30144. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.8.30144>
76. Guardabassi, L., Dijkshoorn, L., Collard, J. M., Olsen, J. E., & Dalsgaard, A. (2000). Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic Acinetobacter strains. *Journal of Medical Microbiology*, 49(10), 929-936. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-49-10-929>
77. Guardabassi, Luca, & Courvalin, P. (2006). Modes of Antimicrobial Action and Mechanisms of Bacterial Resistance. *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*, 1-18. <https://doi.org/10.1128/9781555817534.ch1>
78. Guerra, B., Junker, E., Schroeter, A., Malorny, B., Lehmann, S., & Helmuth, R. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(3), 489-492. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg362>
79. Guinée, P. A. M., Jansen, W. H., Wadström, T., & Sellwood, R. (1981). *Escherichia Coli* Associated with Neonatal Diarrhoea in Piglets and Calves. In P. W. de Leeuw & P. A. M. Guinée (Éds.), *Laboratory Diagnosis in Neonatal Calf and Pig Diarrhoea : Proceedings of a Workshop on Diagnostic Techniques for Enteropathogenic Agents Associated with Neonatal Diarrhoea in Calves and Pigs, held at the Central Veterinary Institute, Department of Virology, Lelystad, The Netherlands, June 3-5, 1980* (p. 126-162). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-009-8328-1_18
80. Haenni, M., Châtre, P., Métayer, V., Bour, M., Signol, E., Madec, J.-Y., & Gay, E. (2014). Comparative prevalence and characterization of ESBL-producing Enterobacteriaceae in dominant versus subdominant enteric flora in veal calves at

- slaughterhouse, France. *Veterinary Microbiology*, 171(3-4), 321-327. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.023>
81. Hall, R. M., & Collis, C. M. (1995). Mobile gene cassettes and integrons : Capture and spread of genes by site-specific recombination. *Molecular Microbiology*, 15(4), 593-600. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02368.x>
82. Harbottle, H., Thakur, S., Zhao, S., & White, D. G. (2006). Genetics of antimicrobial resistance. *Animal Biotechnology*, 17(2), 111-124. <https://doi.org/10.1080/10495390600957092>
83. Hariharan, H. (2007). Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, 4th ed. *The Canadian Veterinary Journal*, 48(7), 744.
84. Hassen, B., Saloua, B., Abbassi, M. S., Ruiz-Ripa, L., Mama, O. M., Hassen, A., Hammami, S., & Torres, C. (2019). mcr-1 encoding colistin resistance in CTX-M-1/CTX-M-15- producing *Escherichia coli* isolates of bovine and caprine origins in Tunisia. First report of CTX-M-15-ST394/D *E. coli* from goats. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 67, 101366. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101366>
85. Hassen, B., Sghaier, S., Abbassi, M. S., Ferjani, M. A., Ben Said, M., Hassen, A., & Hammami, S. (2018). Multidrug Resistance and the Predominance of blaCTX-M in Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae of Animal and Water Origin. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 201-206. <https://doi.org/10.1159/000495409>
86. Helmuth, R. (2000). *Antibiotic resistance in Salmonella*, p. 89-106. In A. Wray, C. Wray (ed.), *Salmonella in domestic animals*. CABI Publishing, New York.
87. Heymann, D. L. (2014). *Control of Communicable Diseases Manual* (.20th ed). Jones & Bartlett Publishers.
88. Hu, G.-Z., Pan, Y.-S., Wu, H., Hu, H., Xu, R., Yuan, L., Liu, J.-H., & Feng, J.-K. (2013). Prevalence of tetracycline resistance genes and identification of tet(M) in clinical isolates of *Escherichia coli* from sick ducks in China. *Journal of Medical Microbiology*, 62(6), 851-858. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.051896-0>
89. Hughes, J. M., Wilson, M. E., Johnson, K. E., Thorpe, C. M., & Sears, C. L. (2006). The Emerging Clinical Importance of Non-O157 Shiga Toxin—Producing *Escherichia coli*. *Clinical Infectious Diseases*, 43(12), 1587-1595. <https://doi.org/10.1086/509573>
90. Huovinen, P., Sundström, L., Swedberg, G., & Sköld, O. (1995). Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(2), 279-289.
91. Iabadene, H., Messai, Y., Ammari, H., Ramdani-Bouguessa, N., Lounes, S., Bakour, R., & Arlet, G. (2008). Dissemination of ESBL and Qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(1), 133-136. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn145>
92. Iida, S., Meyer, J., & Arber, W. (1981). Cointegrates between bacteriophage P1 DNA and plasmid pBR322 derivatives suggest molecular mechanisms for P1-mediated transduction of small plasmids. *Molecular & General Genetics: MGG*, 184(1), 1-10. <https://doi.org/10.1007/bf00271186>
93. Jacoby, G. A. (1994). Extrachromosomal resistance in gram-negative organisms : The evolution of beta-lactamase. *Trends in Microbiology*, 2(10), 357-360.
94. Jin, D. J., & Gross, C. A. (1988). Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli* rpoB gene that lead to rifampicin resistance. *Journal of Molecular Biology*, 202(1), 45-58. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(88\)90517-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(88)90517-7)

95. Johnson, J. R., & Russo, T. A. (2002). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* : « the other bad *E coli* ». *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 139(3), 155-162. <https://doi.org/10.1067/mlc.2002.121550>
96. Jouini, A., Vinué, L., Slama, K. B., Sáenz, Y., Klibi, N., Hammami, S., Boudabous, A., & Torres, C. (2007). Characterization of CTX-M and SHV extended-spectrum beta-lactamases and associated resistance genes in *Escherichia coli* strains of food samples in Tunisia. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(5), 1137-1141. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm316>
97. Kahn, C N., Line, S., & Aiello, S. (2010). *The merck veterinary manual* (. 10th ed). Merck et Co Inc.
98. Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews. Microbiology*, 2(2), 123-140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
99. Käppeli, U., Hächler, H., Giezendanner, N., Beutin, L., & Stephan, R. (2011). Human Infections with Non-O157 Shiga Toxin-producing *Escherichia coli*, Switzerland, 2000–2009. *Emerging Infectious Diseases*, 17(2), 180-185. <https://doi.org/10.3201/eid1702.100909>
100. Karami, N., Nowrouzian, F., Adlerberth, I., & Wold, A. E. (2006). Tetracycline resistance in *Escherichia coli* and persistence in the infantile colonic microbiota. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(1), 156-161. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.156-161.2006>
101. Karmali, M. A., Gannon, V., & Sargeant, J. M. (2010). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Veterinary Microbiology*, 140(3-4), 360-370. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.04.011>
102. Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N., & Lewis, K. (2004). Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 186(24), 8172-8180. <https://doi.org/10.1128/JB.186.24.8172-8180.2004>
103. Keyes, K., Hudson, C., Maurer, J. J., Thayer, S., White, D. G., & Lee, M. D. (2000). Detection of florfenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolated from sick chickens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(2), 421-424.
104. Kilani, H., Abbassi, M. S., Ferjani, S., Mansouri, R., Sghaier, S., Ben Salem, R., Jaouani, I., Douja, G., Brahim, S., Hammami, S., Ben Chehida, N., & Boubaker, I. B.-B. (2015). Occurrence of bla CTX-M-1, qnrB1 and virulence genes in avian ESBL-producing *Escherichia coli* isolates from Tunisia. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5, 38. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00038>
105. Koo, H.-J., & Woo, G.-J. (2011). Distribution and transferability of tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 145(2), 407-413. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.003>
106. Kruskal, W. H., & Wallis, W. A. (1952). Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47(260), 583-621. JSTOR. <https://doi.org/10.2307/2280779>
107. Kumar, A., & Schweizer, H. P. (2005). Bacterial resistance to antibiotics : Active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 1486-1513. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.004>
108. Le minor, L., Sansonetti, P., Richard, C., Mollaet, H., Bercovier, H., & Alonso, J. M. (1989). *Bactériologie médicale .Chapitre Entérobactéries* (2ème Edition). Flammarion.<https://www.decite.fr/livres/bacteriologie-medicale-782257124180.html>
109. Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4), 999-1007. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001>

110. Lezzar, N. (2006). *Influence d'un traitement oral à la flumequine sur la résistance aux quinolones des souches d'Escherichia coli dans la flore fécale du poulet de chair* [Thèse de Magistère]. Université Constantine 1.
111. Li, X., Aly, S. S., Su, Z., Pereira, R. V., Williams, D. R., Rossitto, P., Champagne, J. D., Chase, J., Nguyen, T., & Atwill, E. R. (2018). Phenotypic Antimicrobial Resistance Profiles of *E. coli* and Enterococcus from Dairy Cattle in Different Management Units on a Central California Dairy. *Clinical Microbiology: Open Access*, 7(2), 1-7. <https://doi.org/10.4172/2327-5073.1000311>
112. Li, X.-Z., & Nikaido, H. (2004). Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*, 64(2), 159-204.
113. Licht, T. R., Christensen, B. B., Krogfelt, K. A., & Molin, S. (1999). Plasmid transfer in the animal intestine and other dynamic bacterial populations : The role of community structure and environment. *Microbiology* , 145 (Pt 9), 2615-2622. <https://doi.org/10.1099/00221287-145-9-2615>
114. Lim, S.-K., Lee, H.-S., Nam, H.-M., Cho, Y.-S., Kim, J.-M., Song, S.-W., Park, Y.-H., & Jung, S.-C. (2007). Antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* strains isolated from fecal samples of cattle and pigs in Korea during 2003–2004. *International Journal of Food Microbiology*, 116(2), 283-286. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.014>
115. Livermore, D. M. (1995). Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(4), 557-584.
116. Lozniewski, A., & Rabaut, C. (2010). *Resistance bactérienne aux antibiotiques/ Infections associées aux soins.CClinSE*. <http://nosobase.chu-lyon.fr/recommandations>
117. Lukjancenko, O., Wassenaar, T. M., & Ussery, D. W. (2010). Comparison of 61 sequenced *Escherichia coli* genomes. *Microbial Ecology*, 60(4), 708-720. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9717-3>
118. Lymberopoulos, M. (2004). *Identification, caractérisation et distribution phylogénétique du fimbriae IR chez Escherichia coli*. [Masters, Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique]. <http://espace.inrs.ca/1865/>
119. Machado, J., Grimont, F., & Grimont, P. a. D. (1998). Computer identification of *Escherichia coli* rRNA gene restriction patterns. *Research in Microbiology*, 149(2), 119-135.
120. Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria : An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268-281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
121. Mahillon, J. (1998). Transposons as gene haulers. *Apmis*, 106(84), 29-36.
122. Mainda, G., Bessell, P. R., Bessell, P. B., Muma, J. B., McAteer, S. P., Chase-Topping, M. E., Gibbons, J., Stevens, M. P., Gally, D. L., & deC Bronsvort, B. M. (2015). Prevalence and patterns of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* isolated from Zambian dairy cattle across different production systems. *Scientific Reports*, 5, 12439. <https://doi.org/10.1038/srep12439>
123. Mainil, J. (2010). *Mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques in Journées nationales GTV: Antibiothérapie—Santé animale et santé publique. Lille.France*. [Communication orale]. <https://orbi.uliege.be/handle/2268/169407>

124. Mamlouk, K., Boutiba-Ben Boubaker, I., Gautier, V., Vimont, S., Picard, B., Ben Redjeb, S., & Arlet, G. (2006). Emergence and outbreaks of CTX-M beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains in a Tunisian hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(11), 4049-4056. <https://doi.org/10.1128/JCM.01076-06>
125. Mammeri, A. (2018). Antibiotic Therapy Practices Of Dairy Cows And Eventual Impact On Foodstuffs Quality In The Governorate Of Biskra, Algeria. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 9, 1472-1481.
126. Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V. A., & Davies, J. (2000). Antibiotic resistance in the ECOR collection : Integrons and identification of a novel aad gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(6), 1568-1574. <https://doi.org/10.1128/aac.44.6.1568-1574.2000>
127. Mazel, Didier. (2006). Integrons : Agents of bacterial evolution. *Nature Reviews. Microbiology*, 4(8), 608-620. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1462>
128. Médecine Sorbonne Université. (s. d.). *FMPMC-PS - Bactériologie—Niveau DCEMI*. Consulté 18 février 2020, à l'adresse <http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/POLY.Chp.2.2.3.html#ID-36>
129. Meguenni, N., Le Devendec, L., Jouy, E., Le Corvec, M., Bounar-Kechih, S., Bakour, R., & Kempf, I. (2014). First Description of an Extended-Spectrum Cephalosporin- and Fluoroquinolone-Resistant Avian Pathogenic *Escherichia coli* Clone in Algeria. *Avian Diseases*, 59(1), 20-23. <https://doi.org/10.1637/10804-022414-Reg.1>
130. Meradi, L., Djahoudi, A., Abdi, A., Bouchakour, M., Claude, J. D. P. G., & Timinouni, M. (2011). Résistance aux quinolones de types qnr, aac (6')-Ib-cr chez les entérobactéries isolées à Annaba en Algérie. *Pathologie biologique*, 59(4), e73-e78. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2009.05.003>
131. Messai, Y., Benhassine, T., Naim, M., Paul, G., & Bakour, R. (2006). Prevalence of beta-lactams resistance among *Escherichia coli* clinical isolates from a hospital in Algiers. *Revista Espanola De Quimioterapia*, 19(2), 144-151.
132. Messai, Y., Iabadene, H., Benhassine, T., Alouache, S., Tazir, M., Gautier, V., ... & Bakour, R. (2008). Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). *Pathologie Biologie*, 56(5), 319-325. <http://doi.org/10.1016/j.patbio.2008.05.008>
133. Messaili, C., Messai, Y., & Bakour, R. (2019). Virulence gene profiles, antimicrobial resistance and phylogenetic groups of fecal *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens in Algeria. *Veterinaria Italiana*, 55(1), 35-46. <https://doi.org/10.12834/VetIt.799.3865.2>
134. Michael, G. B., Butaye, P., Cloeckart, A., & Schwarz, S. (2006). Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in Salmonella : An update. *Microbes and Infection*, 8(7), 1898-1914. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.12.019>
135. Miquel, S. (2010). *Facteurs de virulence de Escherichia coli adhérents et invasifs associés à la maladie de Crohn : Caractérisation et régulation de leur expression* [Phdthesis, Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I ; Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II]. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00719695>
136. Mora, A., Herrera, A., López, C., Dahbi, G., Mamani, R., Pita, J. M., Alonso, M. P., Llovo, J., Bernárdez, M. I., Blanco, J. E., Blanco, M., & Blanco, J. (2011). Characteristics of the Shiga-toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain. *International Microbiology*, 14(3), 121-141. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.142>

137. Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), 142-201.
138. NCBI .GenBank. (s. d.). *GenBank Overview*. Consulté 11 février 2020, à l'adresse <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
139. Neely, A. N., & Holder, I. A. (1999). Antimicrobial resistance. *Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries*, 25(1), 17-24. [https://doi.org/10.1016/s0305-4179\(98\)00134-x](https://doi.org/10.1016/s0305-4179(98)00134-x)
140. Nguyen, Y., & Sperandio, V. (2012). Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 90. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00090>
141. Nikaido, H. (2009). Multidrug resistance in bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 119-146. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923>
142. Norman, A., Hansen, L. H., & Sørensen, S. J. (2009). Conjugative plasmids : Vessels of the communal gene pool. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 364(1527), 2275-2289. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0037>
143. OIE.(2015).Fichesrepères/l'antibiorésistance.http://www.oie.int/fileadmin/Home/FR/Media_Center/docs/pdf/Fact_sheets/ANTIBIO_FR.pdf.http://www.oie.int/fileadmin/Home/FR/Media_Center/docs/pdf/Fact_sheets/ANTIBIO_FR.pdf
144. Olaitan, A. O., Chabou, S., Okdah, L., Morand, S., & Rolain, J.-M. (2016). Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. *The Lancet. Infectious Diseases*, 16(2), 147. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00540-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00540-X)
145. Payne, D. J., & Amyes, S. G. (1991). Transferable resistance to extended-spectrum beta-lactams : A major threat or a minor inconvenience? *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 27(3), 255-261.
146. Penit, P. (2014). *Etude épidémiologiques des gastro-entérites aiguës médicalisées et spécificités chez les enfants* [Université De Rouen]. <http://docplayer.fr/71638767-These-pour-le-diplome-d-etat-de-docteur-en-pharmacie.html>
147. Perreten, V., Strauss, C., Collaud, A., & Gerber, D. (2016). Colistin Resistance Gene mcr-1 in Avian-Pathogenic *Escherichia coli* in South Africa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(7), 4414-4415. <https://doi.org/10.1128/AAC.00548-16>
148. Perrot, V. (1998). Une évolution sans doute réversible. *Recherche*, 314, 68-69.
149. Petit, S. (2014). *Dictionnaire des médicaments vétérinaires* (.19th ed). Point Vétérinaire., France.
150. Pilet, C., Bourdon, J. L., Toma, B., Marchal, N., & Balbastre, C. (1979). *Bactériologie médicale et vétérinaire : Systématique bactérienne* (2e éd.). Doin.
151. Pitout, J. D. D., Hanson, N. D., Church, D. L., & Laupland, K. B. (2004). Population-based laboratory surveillance for *Escherichia coli*-producing extended-spectrum beta-lactamases : Importance of community isolates with blaCTX-M genes. *Clinical Infectious Diseases*, 38(12), 1736-1741. <https://doi.org/10.1086/421094>
152. Poole, K. (2001). Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 4(5), 500-508.
153. Prescott, J. F., Baggot, J. D., & Walker, R. D. (2000). *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* (.3rd ed). Wiley.
154. Price, L. B., Graham, J. P., Lackey, L. G., Roess, A., Vailes, R., & Silbergeld, E. (2007). Elevated risk of carrying gentamicin-resistant *Escherichia coli* among U.S. poultry workers. *Environmental Health Perspectives*, 115(12), 1738-1742. <https://doi.org/10.1289/ehp.10191>

155. Puyt, J.-D. (2001). *Médicaments anti-infectieux en médecine vétérinaire : Bases de l'antibiothérapie*. Pfizer santé animale.
156. Rahal, Khaira, Missoum, M.F.K., Bensliman, A., Ammari, H., Abboun, A., & Benamrouche, N. (2015). *Surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques* (Rapport d'évaluation N° 14; p. 216). Réseau Algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques.
157. Ramdani-Bougoussa, N., Mendonça, N., Leitão, J., Ferreira, E., Tazir, M., & Caniça, M. (2006). CTX-M-3 and CTX-M-15 Extended-Spectrum β -Lactamases in Isolates of *Escherichia coli* from a Hospital in Algiers, Algeria. *Journal of Clinical Microbiology*, *44*(12), 4584-4586. <https://doi.org/10.1128/JCM.01445-06>
158. Rebbah, N., Messai, Y., Châtre, P., Haenni, M., Madec, J. Y., & Bakour, R. (2018). Diversity of CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamases in *Escherichia coli* Isolates from Retail Raw Ground Beef : First Report of CTX-M-24 and CTX-M-32 in Algeria. *Microbial Drug Resistance*, *24*(7), 896-908. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0171>
159. Résapath,. (2013). *Réseau d'épidémiologie de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales* (Bilan 2012).
160. Richard, C. (1989). Bactériologie et épidémiologie des souches typiques, atypiques et potentiellement pathogènes d'*Escherichia coli*. *Information du Technicien Biologiste*, *2*, 45-52.
161. Riddle, C., Lemons, C. L., Papich, M. G., & Altier, C. (2000). Evaluation of Ciprofloxacin as a Representative of Veterinary Fluoroquinolones in Susceptibility Testing. *Journal of Clinical Microbiology*, *38*(4), 1636-1637.
162. Rodríguez-Martínez, J. M., Machuca, J., Cano, M. E., Calvo, J., Martínez-Martínez, L., & Pascual, A. (2016). Plasmid-mediated quinolone resistance : Two decades on. *Drug Resistance Updates*, *29*, 13-29. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.09.001>
163. Rodriguez-Villalobos, H., & Struelens, M.-J. (2006). Résistance bactérienne par β -lactamases à spectre étendu : Implications pour le réanimateur. *Réanimation*, *15*(3), 205-213. <https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2006.03.006>
164. Rowe-Magnus, D. A., Guerout, A.-M., Ploncard, P., Dychinco, B., Davies, J., & Mazel, D. (2001). The evolutionary history of chromosomal super-integrations provides an ancestry for multiresistant integrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(2), 652-657.
165. Rubens, C. E., McNeill, W. F., & Farrar, W. E. (1979). Evolution of multiple-antibiotic-resistance plasmids mediated by transposable plasmid deoxyribonucleic acid sequences. *Journal of Bacteriology*, *140*(2), 713-719.
166. Russo, T. A., & Johnson, J. R. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli* : ExPEC. *The Journal of Infectious Diseases*, *181*(5), 1753-1754. <https://doi.org/10.1086/315418>
167. Sáenz, Y., Vinué, L., Ruiz, E., Somalo, S., Martínez, S., Rojo-Bezares, B., Zarazaga, M., & Torres, C. (2010). Class 1 integrons lacking qacEDelta1 and sul1 genes in *Escherichia coli* isolates of food, animal and human origins. *Veterinary Microbiology*, *144*(3-4), 493-497. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.01.026>
168. Sáenz, Yolanda, Briñas, L., Domínguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J., & Torres, C. (2004). Mechanisms of Resistance in Multiple-Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Strains of Human, Animal, and Food Origins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *48*(10), 3996-4001. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.10.3996-4001.2004>

169. Sanders, C. C., & Sanders, W. E. (1992). beta-Lactam resistance in gram-negative bacteria: Global trends and clinical impact. *Clinical Infectious Diseases*, *15*(5), 824-839.
170. Sanders, P., Bousquet-Mélou, A., Chauvin, C., & Toutain, P.-L. (2011). Utilisation des antibiotiques en élevage et enjeux de santé publique. *INRA Productions Animales*, *24*(2), 199-204.
171. Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *74*(12), 5463-5467.
172. Sawant, A. A., Hegde, N. V., Straley, B. A., Donaldson, S. C., Love, B. C., Knabel, S. J., & Jayarao, B. M. (2007). Antimicrobial-Resistant Enteric Bacteria from Dairy Cattle. *Appl. Environ. Microbiol.*, *73*(1), 156-163. <https://doi.org/10.1128/AEM.01551-06>
173. Sayah, R. S., Kaneene, J. B., Johnson, Y., & Miller, R. (2005). Patterns of Antimicrobial Resistance Observed in *Escherichia coli* Isolates Obtained from Domestic- and Wild-Animal Fecal Samples, Human Septage, and Surface Water. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(3), 1394-1404. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1394-1404.2005>
174. Schmid, A., Hörmansdorfer, S., Messelhäusser, U., Käsbohrer, A., Sauter-Louis, C., & Mansfeld, R. (2013). Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* on Bavarian dairy and beef cattle farms. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(9), 3027-3032. <https://doi.org/10.1128/AEM.00204-13>
175. Schwaiger, K., Hölzel, C., & Bauer, J. (2010). Resistance gene patterns of tetracycline resistant *Escherichia coli* of human and porcine origin. *Veterinary Microbiology*, *142*(3), 329-336. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.066>
176. Schwarz, S., & Chaslus-Dancla, E. (2001). Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research*, *32*(3-4), 201-225. <https://doi.org/10.1051/vetres:2001120>
177. Scott, G. (2009). Antibiotic resistance. *Medicine*, *37*(10), 551-556. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2009.07.013>
178. Sghaier, S., Abbassi, M. S., Pascual, A., Serrano, L., Díaz-De-Alba, P., Said, M. B., Hassen, B., Ibrahim, C., Hassen, A., & López-Cerero, L. (2019). Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae from animal origin and wastewater in Tunisia: First detection of O25b-B23-CTX-M-27-ST131 *Escherichia coli* and CTX-M-15/OXA-204-producing *Citrobacter freundii* from wastewater. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *17*, 189-194. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.01.002>
179. Shin, S. W., Shin, M. K., Jung, M., Belaynehe, K. M., & Yoo, H. S. (2015). Prevalence of Antimicrobial Resistance and Transfer of Tetracycline Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolates from Beef Cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(16), 5560-5566. <https://doi.org/10.1128/AEM.01511-15>
180. Silbergeld, E. K., Graham, J., & Price, L. B. (2008). Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. *Annual Review of Public Health*, *29*, 151-169. <https://doi.org/10.1146/annurev.publhealth.29.020907.090904>
181. Singh, R., Saxena, A., & Singh, H. (2009). Identification of group specific motifs in Beta-lactamase family of proteins. *Journal of Biomedical Science*, *16*(1), 109. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-16-109>
182. Smati, M. (2014). *Place de la structure génétique de l'espèce Escherichia coli dans l'état de son commensalisme intestinal et dans l'expression de sa virulence.*

- [Phdthesis, Université Paris-Nord - Paris XIII]. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01231869>
183. Smith, J. T., & Lewin, C. S. (1993). Mechanisms of antimicrobial resistance and implications for epidemiology. *Veterinary Microbiology*, 35(3-4), 233-242. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(93\)90148-z](https://doi.org/10.1016/0378-1135(93)90148-z)
 184. Soufi, L., Abbassi, M. S., Sáenz, Y., Vinué, L., Somalo, S., Zarazaga, M., Abbas, A., Dbaya, R., Khanfir, L., Ben Hassen, A., Hammami, S., & Torres, C. (2009). Prevalence and Diversity of Integrons and Associated Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolates from Poultry Meat in Tunisia. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(9), 1067-1073. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0284>
 185. Soussy, C.-J. (2007). Résistance bactérienne aux antibiotiques. In *Les infections urinaires* (p. 21-46). Springer, Paris. https://doi.org/10.1007/978-2-287-48617-3_2
 186. Spratt, B. G. (1994). Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science*, 264(5157), 388-393. <https://doi.org/10.1126/science.8153626>
 187. Stamm, W. E., & Norrby, S. R. (2001). Urinary tract infections: Disease panorama and challenges. *The Journal of Infectious Diseases*, 183 Suppl 1, S1-4. <https://doi.org/10.1086/318850>
 188. Stenutz, R., Weintraub, A., & Widmalm, G. (2006). The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(3), 382-403. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00016.x>
 189. Stevenson, G., Kessler, A., & R. Reeves, P. (1995). A plasmid-borne O-antigen chain length determinant and its relationship to other chain length determinants. *FEMS Microbiology Letters*, 125(1), 23-30. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(94\)00485-A](https://doi.org/10.1016/0378-1097(94)00485-A)
 190. Sugiyama, T., Kido, N., Kato, Y., Koide, N., Yoshida, T., & Yokochi, T. (1997). Evolutionary relationship among rfb gene clusters synthesizing mannose homopolymer as O-specific polysaccharides in *Escherichia coli* and Klebsiella. *Gene*, 198(1-2), 111-113. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(97\)00300-4](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(97)00300-4)
 191. Targant, H. (2010). *L'îlot de multirésistance aux antibiotiques, Salmonella Genomic Island 1 (SGI1) : Variabilité, diffusion inter - espèces et implication dans la virulence* [Thèse de doctorat]. Université Claude Bernard.
 192. Technelysium ,DNA sequencing software. (s. d.). *Chromas and ChromasPro DNA Sequencing Software – Technelysium Pty Ltd*. Consulté 11 février 2020, à l'adresse <http://technelysium.com.au/wp/>
 193. Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(9), 2233-2239.
 194. Toleman, M. A., Bennett, P. M., & Walsh, T. R. (2006). ISCR Elements: Novel Gene-Capturing Systems of the 21st Century. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2), 296-316. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00048-05>
 195. Tornieporth, N. G., John, J., Salgado, K., de Jesus, P., Latham, E., Melo, M. C., Gunzburg, S. T., & Riley, L. W. (1995). Differentiation of pathogenic *Escherichia coli* strains in Brazilian children by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(5), 1371-1374.
 196. Touati, A., Benallaoua, S., Forte, D., Madoux, J., Brasme, L., & de Champs, C. (2006). First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Béjaïa, Algeria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27(5), 397-402. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.12.007>

197. Touati, M., Hadjadj, L., Berrazeg, M., Baron, S., & Rolain, J. M. (2019). Emergence of *Escherichia coli* harboring *mcr-1* and *mcr-3* gene in North West Algerian farmlands. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.10.001>
198. Tran, J. H., & Jacoby, G. A. (2002). Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(8), 5638-5642. <https://doi.org/10.1073/pnas.082092899>
199. Tuckman, M., Petersen, P. J., Howe, A. Y. M., Orłowski, M., Mullen, S., Chan, K., Bradford, P. A., & Jones, C. H. (2007). Occurrence of Tetracycline Resistance Genes among *Escherichia coli* Isolates from the Phase 3 Clinical Trials for Tigecycline. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(9), 3205-3211. <https://doi.org/10.1128/AAC.00625-07>
200. Van Bambeke, F., Chauvel, M., Reynolds, P. E., Fraimow, H. S., & Courvalin, P. (1999). Vancomycin-dependent *Enterococcus faecalis* clinical isolates and revertant mutants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(1), 41-47.
201. Van den Bogaard, A. E., London, N., Driessen, C., & Stobberingh, E. E. (2001). Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(6), 763-771.
202. Van den Bogaard, A. E., & Stobberingh, E. E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14(4), 327-335.
203. Van Elsas, J. D., Semenov, A. V., Costa, R., & Trevors, J. T. (2011). Survival of *Escherichia coli* in the environment : Fundamental and public health aspects. *The ISME Journal*, 5(2), 173-183. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.80>
204. Varon, E., & Gutmann, L. (2000). Mechanisms and spread of fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Research in Microbiology*, 151(6), 471-473. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)00167-4](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)00167-4)
205. Wang, X., Wang, Y., Zhou, Y., Li, J., Yin, W., Wang, S., Zhang, S., Shen, J., Shen, Z., & Wang, Y. (2018). Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerging Microbes & Infections*, 7(1), 122. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0124-z>
206. WHO. (1980). *Escherichia coli* diarrhoea. *Bulletin of the World Health Organization*, 58(1), 23-36.
207. Wittum, T. E., Mollenkopf, D. F., Daniels, J. B., Parkinson, A. E., Mathews, J. L., Fry, P. R., Abley, M. J., & Gebreyes, W. A. (2010). CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases present in *Escherichia coli* from the feces of cattle in Ohio, United States. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(12), 1575-1579. <https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0615>
208. Wu, X.-Y., Chapman, T., Trott, D. J., Bettelheim, K., Do, T. N., Driesen, S., Walker, M. J., & Chin, J. (2007). Comparative analysis of virulence genes, genetic diversity, and phylogeny of commensal and enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from weaned pigs. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1), 83-91. <https://doi.org/10.1128/AEM.00990-06>
209. Yamashita, S. K., Louie, M., Simor, A. E., & Rachlis, A. (2000). Microbiological surveillance and parenteral antibiotic use in a critical care unit. *The Canadian Journal of Infectious Diseases*, 11(2), 107-111.
210. Yanat, B., Machuca, J., Díaz-De-Alba, P., Mezhoud, H., Touati, A., Pascual, Á., & Rodríguez-Martínez, J.-M. (2016). Characterization of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants in High-Level Quinolone-Resistant Enterobacteriaceae Isolates from the Community : First Report of *qnrD* Gene in

- Algeria. *Microbial Drug Resistance*, 23(1), 90-97.
<https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0031>
211. Yanat, B., Machuca, J., Yahia, R. D., Touati, A., Pascual, Á., & Rodríguez-Martínez, J.-M. (2016). First report of the plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in a clinical *Escherichia coli* isolate in Algeria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 48(6), 760-761.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.09.003>
212. Yousfi, M., Mairi, A., Touati, A., Hassissene, L., Brasme, L., Guillard, T., & De Champs, C. (2016). Extended spectrum β -lactamase and plasmid mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* fecal isolates from healthy companion animals in Algeria. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 22(7), 431-435.
<https://doi.org/10.1016/j.jiac.2016.03.005>
213. Zaket, baba ahmed, Decré, D., Genel, N., Zahia, B., Arlet, G., & Drissi, M. (2013). Molecular and Epidemiological Characterization of Enterobacterial Multidrug-Resistant Strains in Tlemcen Hospital (Algeria) (2008–2010). *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 19. <https://doi.org/10.1089/mdr.2012.0161>
214. Zheng, J.-S., Zhu, T.-T., Liu, Y., Liu, T., Li, Y.-Q., Zhang, Z., Shi, D.-F., Bao, J., & Yu, L. (2018). An Epidemiological Study of Drug Resistance and Resistance Genes in Bovine *Escherichia coli* Isolates in Heilongjiang Province of China. *Acta Scientiae Veterinariae*, 46(1), 9. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.89374>
215. Andremont A. (2006). Rôle de la flore commensale dans la dynamique d'évolution de la résistance bactérienne. *Revue francophone des laboratoires*, 379 (suppl), 49-50
216. De Preter, V., and Verbeke, K. (2013). Metabolomics as a diagnostic tool in gastroenterology. *World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics* 4, 97-107.
217. Dowd S E, Callaway T R, Wolcott R D, Sun Y, Mckeehan T, Hagevoort R G et al. (2008). Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP), *BMC Microbiol*, 8 (125), 1-8
218. Guillemot D, Brisabois A, Brugere H, Guillot J F, Laval A, Millemann Y et al. (2006). *Usage vétérinaire des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine*. [En ligne]. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments [http://lesrapports.ladocumentationfrancaise.fr/BRP/074000079/0000.pdf] (consultée le 13 juillet 2011)
219. Lagier, J.C., Million, M., Hugon, P., Armougom, F., and Raoult, D. (2012). Human gut microbiota: repertoire and variations. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2, 136.
220. Louis, E., and Marteau, P. (2010). *Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin*, Wolter Kluwer France edn (R. Zittoun).
221. Madec J Y, Calavas D (2010). Surveillance de la résistance chez les bactéries de portage chez l'animal de production. *In : Journées Nationales des GTV Lille*, 26-27-28 juillet 2010, 115-118
222. Madec J Y, Meunier D (2006). Résistances aux bêta-lactamines : les entérobactéries résistent aux troisièmes générations. *Point Vétérinaire*, 264, 12-13
223. Marteau, P. (2013). Microbiote intestinal. *EMC Gastroenterologie* 8, 1-8.
224. Millemann Y, Poirel L (2010). Effets collatéraux de l'antibiothérapie sur la flore commensale. *In : Journées Nationales des GTV Lille*, 26-27-28 juillet 2010, 31-36

225. Salyers A A, Gupta A, Wang Y (2004). Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends in Microbiology*, **12** (9), 412-416.
226. Sorum H, Sunde M (2001). Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. *Vet. Res.*, **32** (3-4), 227-241
227. Wilssens A, Buttiaux R (1958). Les bactéries de la flore fécale de la vache saine. *In* : Annales de l'institut Pasteur, volume 94, Paris, Masson et Cie, 332-340

Production scientifique



Veterinary World

Open access and peer reviewed international journal

NAAS (National Academy of Agricultural Sciences -INDIA) - 5.71, SCOPUS: Citescore – 1.29, SJR - 0.454, SNIP - 0.956

PUBLICATION CERTIFICATE

This is to certify that article entitled:

Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from cattle in Eastern Algeria

Djanette Barour, Amine Berghiche and Nadji Boulebda

has been published online at <http://www.veterinaryworld.org/Vol.12/August-2019/4.pdf> on 07-08-2019.

Citation: Barour D, Berghiche A, Boulebda N (2019) Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from cattle in Eastern Algeria, Veterinary World, 12(8): 1195-1203. **doi:** 10.14202/vetworld.2019.1195-1203

Anjum V. Sherasiya
Editor-in-Chief

Certificate issue date: 07-08-2019

EISSN: 2231-0916, **Website:** <http://www.veterinaryworld.org>

Corresponding author: Djanette Barour: Department of Veterinary Science, Institute of Agronomic and Veterinarian Sciences, University of Mohamed Cherif Messaâdia, Souk Ahras, Algeria; Laboratory of Science and Technique of the Living, University of Mohamed Cherif Messaâdia, Souk Ahras, Algeria.
E-mail: djanette.barour@yahoo.fr

Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from cattle in Eastern Algeria

Djanette Barour^{1,2}, Amine Berghiche^{1,2} and Nadji Boulebda^{1,2}

1. Department of Veterinary Science, Institute of Agronomic and Veterinarian Sciences, University of Mohamed Cherif Messaâdia, Souk Ahras, Algeria; 2. Laboratory of Science and Technique of the Living, University of Mohamed Cherif Messaâdia, Souk Ahras, Algeria.

Corresponding author: Djanette Barour, e-mail: djanette.barour@yahoo.fr

Co-authors: AB: amine_berghiche@yahoo.com, NB: nadji.boulebdala@laposte.net

Received: 23-04-2019, **Accepted:** 24-06-2019, **Published online:** 07-08-2019

doi: 10.14202/vetworld.2019.1195-1203 **How to cite this article:** Barour D, Berghiche A, Boulebda N (2019) Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from cattle in Eastern Algeria, *Veterinary World*, 12(8): 1195-1203.

Abstract

Background and Aim: Lack of information about the antibiotic resistance in commensal *Escherichia coli* from Algerian livestock prompted us to do this study to determine the different levels of antimicrobial susceptibility, antibiotic multidrug resistance (MDR) rates, and phenotypical patterns of *E. coli* strains isolated from healthy cattle to control the spread of animal-resistant strains to humans and the environment.

Materials and Methods: A total of 198 cattle were sampled (swabbed in the rectum), reared in the farms of Souk Ahras, Tebessa, and Oum el Bouaghi governorates of Eastern Algeria. Isolation of *E. coli* strains was performed on MacConkey agar and then the different strains were identified to the species level using an API 20E identification kit. Antimicrobial susceptibility was determined using a panel of 13 antibiotic disks by disk diffusion method on Mueller-Hinton agar. The double-disk synergy test with cefotaxime and amoxicillin-clavulanate disks was used for the screening of extended-spectrum beta-lactamase phenotypes. For colistin susceptibility, the minimum inhibitory concentration was examined using broth microdilutions technique.

Results: The results showed that among the 198 *E. coli* isolates, elevated resistance rates were observed for ampicillin (59.09%) and tetracycline (43.43%), and moderate resistance rates for cephalothin (16.16%), trimethoprim/sulfamethoxazole (15.15%), and amoxicillin/clavulanate (11.62%); however, low resistance rates were found for nalidixic acid (8.08%), ciprofloxacin (7.07%), kanamycin (6.56%), cefotaxime (4.54%), chloramphenicol (4.04%), nitrofurantoin (2.52%), cefoxitin (2.02%), gentamycin (1.01%), and no resistance to colistin. However, nine extended-spectrum β -lactamases producing *E. coli* strains were identified. Forty-four different patterns were determined, indicating a wide variety of resistance, ranging from one antimicrobial to a combination of 10. Analysis of coresistances revealed that 63 isolates (31.82%) were susceptible to all antibiotics used in the study, 42 isolates (21.21%) were resistant to one antibiotic, 43 isolates (21.72%) were resistant to two antibiotics, 24 isolates (12.12%) resistant to three antibiotics, 26 isolates (13.13%) were resistant for more than three agents, and 45 isolates (22.73%) were MDR (which means resistant to three or more families of antibiotics).

Conclusion: This study demonstrates that commensal *E. coli* remains a potential source of antibiotic resistance in view of the high prevalence of antimicrobial resistance. The vast range of MDR phenotypes, especially extended-spectrum β -lactamases producing strains, emphasizes the urgent requirement to adopt measures to control the use of antimicrobials, in particular, by private veterinarians, as well as the strengthening of veterinary surveillance networks for antimicrobial resistance to control the spread of MDR bacteria from animals to humans and the environment.

Keywords: antimicrobial resistance, cattle, Eastern Algeria, *Escherichia coli*.

Introduction

Antimicrobial agents are used therapeutically in animals and humans for control of bacterial infections and may be incorporated into commercial livestock and poultry feed at subtherapeutic doses for growth promotion [1,2]. Antibiotics have significantly reduced mortality associated with infectious diseases during the 20th century; unfortunately, their massive and repeated use, in animal farming, has led to the emergence of bacteria multidrug resistance (MDR)

to these drugs [3]. While antimicrobials are used to target pathogenic organisms, simultaneous selection pressure is exerted on the commensal enterobacteria, encouraging the development and maintenance of antimicrobial resistance in these bacteria [4]. Both antimicrobial-resistant pathogens and commensal organisms can disseminate to humans through direct contact with animals [5] or through the food chain [6,7]. Despite the abundance of phenotypes of antibiotic resistance observed within bacteria, only four mechanisms by which these resistances are acquired have been described, all of which are controlled by the action of specific genes: Enzymatic inactivation or modification of antimicrobial agents, impermeability of the bacteria cell wall or membrane, active expulsion of the drug by the cell efflux pump, and alteration in target receptors [8,9]. Thus, the genes coding for the antibacterial resistance determinants are located either on the

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

bacterial chromosome, or on mobile genetic elements such as plasmids, transposons, and integrons and can be transmitted vertically and horizontally [8,10].

Commensal *Escherichia coli* are part of the intestinal flora of human and animals with certain strains being pathogenic and causing conditions including gastroenteritis, cystitis, meningitis, peritonitis, and septicemia. Changes in the antibiotic resistance of this species may serve as an early warning of the development of resistance by related pathogenic bacteria [7,11-13]. Several international studies have been reported on the fecal carriage of resistant *E. coli* in cattle [14-18]; but in Algeria, the majority of published papers are focused only on human pathogenic strains of *E. coli* [19-22], while some papers have been reported on resistant *E. coli* strains in poultry [23,24], the current information on antimicrobial resistance in commensal *E. coli* strains in cattle is very limited.

Lack of information about the antibiotic resistance in commensal *E. coli* from livestock requires us to deepen research in this area to know the epidemiology of antimicrobial susceptibility of *E. coli* strains and contribute for a better use of antibiotics in Algerian cattle, whose food is intended for human consumption. For these reasons, we carried out this study using the disk diffusion method on Mueller-Hinton agar, in *E. coli* isolates from healthy cattle during a period of 2 years, to determine their different levels of antimicrobial susceptibility, the rates of MDR, and their different phenotypically patterns of antibiotic resistance.

Materials and Methods

Ethical approval

This study did not require any ethical approval from the University Animal Ethics Committee and was performed in accordance with Algerian laws and regulations on animal welfare.

Study area

This study was carried out in several localities of the governorates of Souk Ahras, Tébessa, and Oum el Bouaghi, all located in the east of Algeria (Figure-1).

Sample collection

From March 2016 to March 2018, 198 cattle were swabbed in the rectum. Swabs loaded with feces were then dissolved into 2 ml of sterile physiological saline and sent directly to the laboratory.

E. coli isolation and identification

The samples were inoculated on Mac Conkey agar for 24 h at 37°C; positive lactose colonies were tested by Gram stain and oxidase testing. The isolates were then identified to the species level using an API 20E identification kit (bioMérieux, France).

Antimicrobial susceptibility testing

Antibiotic sensitivity was determined using disk diffusion method on Mueller-Hinton agar (Merck), following Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standards [25]. The double-disk synergy test with cefotaxime and amoxicillin-clavulanate disks was used for the screening of extended-spectrum β -lactamases (ESBL) phenotype. *E. coli* ATCC 25922 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 were used

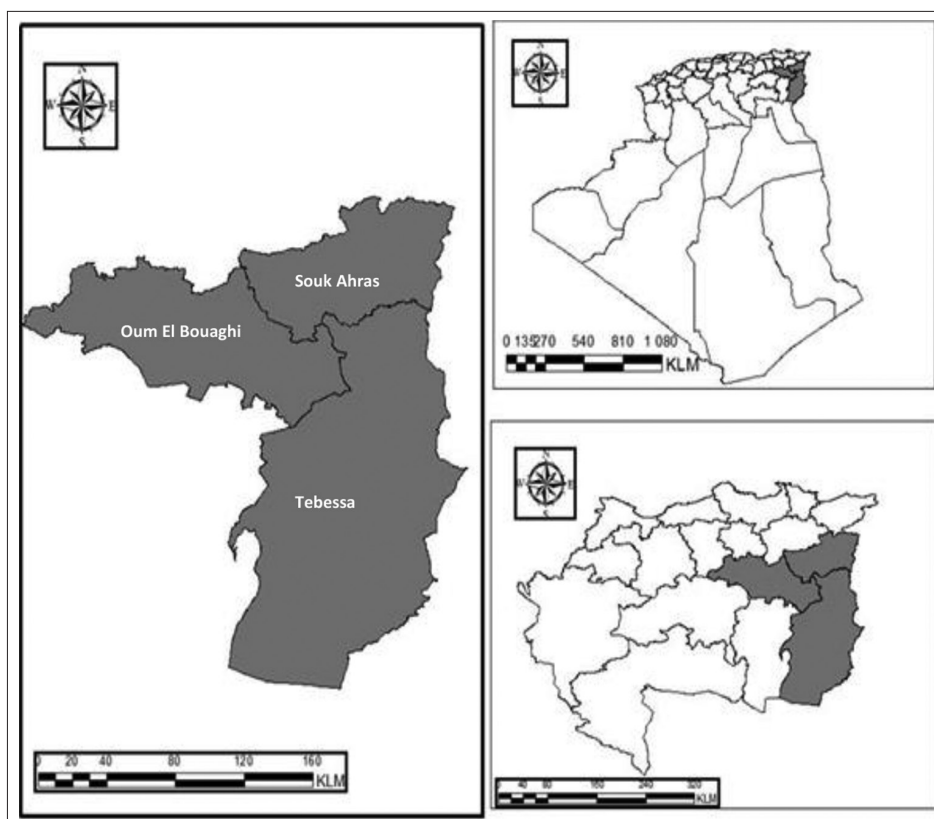


Figure-1: Map of Algeria showing the sampling sites of the study (The map was generated in "ESRI® ArcGIS 9.1 for desktop" software).

as ESBL negative and positive reference strains, respectively.

The antibiotics tested (Oxoid) their concentrations and the breakpoints are shown in Table-1 [25,26]. Only for colistin susceptibility, the minimum inhibitory concentration (MIC) was examined using broth microdilutions technique (Table-1) [25,26]. The MIC for each isolate was read as the lowest dilution demonstrating no visible growth, based on CLSI [26].

Statistical analysis

- Descriptive analysis: The graphic representation was performed using the program (Microsoft Office Excel, 2007).
- Data analysis: To compare coresistances in different isolates, the Kruskal–Wallis test was used. This test was a non-parametric statistical test that assesses the differences among three or more independently sampled groups on a

single, non-normally distributed continuous variable [27].

- Cluster analysis: We used the free software (Past 3.22), to determine the coefficient of correlation between the number of resistances and the number of strains for each of the antibiogram profiles detected, using algorithm paired group and similarity measure using Euclidean distance. The correlation coefficient was equal to 0.07798 (Figure-2).

Results and Discussion

This study aimed to determine the resistance rates of commensal *E. coli* strains to a panel of 13 antibiotics belonging to nine different families, as well as to determine the rates of MDR and the different phenotypical patterns of antibiotic resistance. Among the 198 fecal samples, 198 *E. coli* strains were isolated, which represents 100% isolation rate; this percentage is in accordance with Bywater *et al.* [28].

Table-1: Disk drug concentrations and diffusion zone breakpoints for antimicrobial sensitivity and the minimal inhibitory concentration only for colistin sensitivity [25,26].

Antimicrobial agent (drug code)	Disk drug concentration (µg)	Breakpoints (mm)		
		Sensitive	Intermediate	Resistant
AMP	10 µg	≥17	14-16	≤13
AMC	20/10 µg	≥18	14-17	≤13
KF	30 µg	≥18	15-17	≤14
CTX	30 µg	≥26	23-25	≤22
Fox	30 µg	≥18	15-17	≤14
k	30 µg	≥18	14-17	≤13
CN	10 µg	≥15	13-14	≤12
SXT	1.25/23.75 µg	≥16	11-15	≤10
Te	30 µg	≥15	12-14	≤11
Na	30 µg	≥19	14-18	≤13
CIP	5 µg	≥21	16-20	≤15
F	300 µg	≥17	15-16	≤14
C	30 µg	≥18	13-17	≤12
CT		MIC (µg/ml)		
		WT ≤2		NWT ≥4

WT=Wild type, NWT=Non-wild type, MIC=Minimum inhibitory concentration , AMP=Ampicillin, AMC=Amoxicillin/clavulanate, KF=Cephalothin, CTX=Cefotaxime, Fox=Cefoxitin, k=Kanamycin, CN=Gentamycin, SXT=Trimethoprim/sulfamethoxazole, Te=Tetracyclines, Na=Nalidixic acid, CIP=Ciprofloxacin, F=Nitrofurantoin, C=Chloramphenicol, CT=Colistin

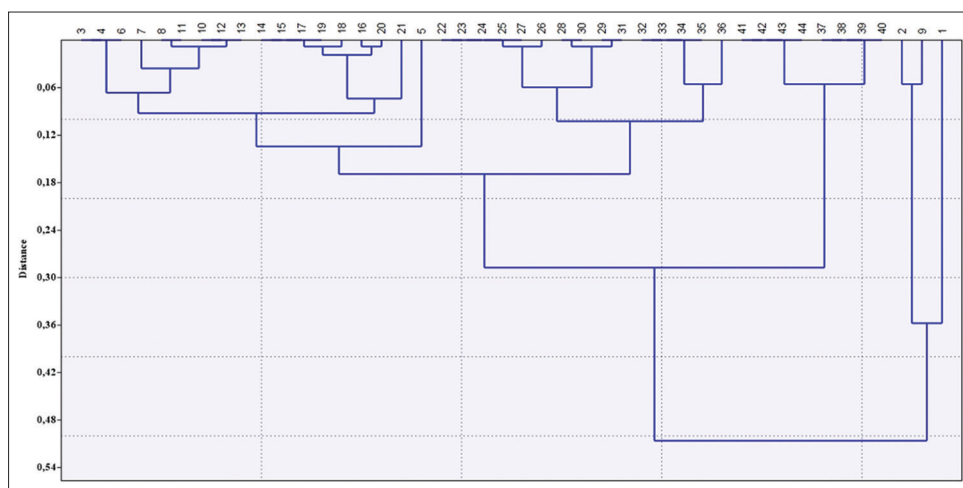


Figure-2: Patterns of antimicrobial resistance phenotypes for *E. coli* strains isolated in the study. The upper margin indicates the antibiogram patterns of phenotypic antimicrobial resistance detected from 1 to 44. The left margin indicates the distance between the different clusters.

Antibiotic resistance rates

The resistance rates (Table-2) of the 198 isolated *E. coli* show high rates of resistance for ampicillin (AMP) (59.09%) and tetracycline (TE) (43.43%), moderate rates of resistance were observed for cephalothin (16.16%), trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT) (15.15%), and amoxicillin/clavulanate (11.62%); however, the low resistance rates have been observed for nalidixic acid (8.08%), ciprofloxacin (7.07%), kanamycin (6.56%), cefotaxime (4.54%), chloramphenicol (4.04%), nitrofurantoin (2.52%), ceftiofur (2.02%), gentamycin (1.01%), and no resistance was recorded for colistin (0%). However, nine extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* were detected.

Beta-lactams are the most commonly used antibiotics (Figure-3) for the treatment of infections caused by *Enterobacteriaceae*. Resistance to beta-lactam antibiotics develops as a result of mutations or the acquisition of genetic material such as plasmids, transposons, or integrons from other resistant bacteria [29]. In Eastern Algeria, this class of antibiotics is widely used [2,30]. Their extensive and long-term use render their resistance rate high as a function of selection pressure, this resistance in *E. coli* is mostly ensured by β -lactamases, which presently contains

more than 200 enzymes that hydrolyze the β -lactam cycle and inactivate it in a manner that represents a very high risk to public health [31,32].

Among β -lactam antibiotics, AMP is one of the oldest drugs used in bovines; it is indicated for the treatment of septicemia, digestive, respiratory, and genitourinary infections [33]; this antimicrobial has the highest resistance rate with 59.09%, the finding is compatible with that of Sawant *et al.* [34], But higher than other findings of previous studies [17,35,36] and the resistance rate of the combination amoxicillin and clavulanate is lower with 11.62%.

Tetracycline is a wide-spectrum bacteriostatic antibiotic indicated in cattle for the treatment of septicemia, respiratory, digestive, genitourinary, and interdigital infections; resistance to this antibiotic in *E. coli* is increasing [33,37], this resistance to tetracycline is mediated by plasmid, with a high variability of genetic determinants [38]. A large number of genetic determinants of tetracycline resistance allows sensitive bacteria to acquire resistance factors [39]. We reported a high resistance rate to tetracycline with 43.43%, which may be explained by its extensive use by clinical veterinarians in Algeria [30,40], this result is similar to the finding of Abbassi *et al.* [14] Other researchers have found lower rates of resistance to this

Table-2: Frequencies of antibiotics resistance in *E. coli* isolates.

Families of antibiotics	Antibiotics	Sensitive isolates	Resistant isolates
		n (%)	n (%)
Beta-lactams	AMP	81 (40.91)	117 (59.09)
	AMC	175 (88.38)	23 (11.62)
Cephalosporin	KF	166 (83.84)	32 (16.16)
	CTX	189 (95.45)	9 (4.54)
	FOX	194 (97.98)	4 (2.02)
Aminoglycosides	K	185 (93.43)	13 (6.56)
	CN	196 (98.99)	2 (1.01)
Sulfonamides	SXT	168 (84.85)	30 (15.15)
Cyclins	Te	112 (56.56)	86 (43.43)
Quinolones	NA	182 (91.92)	16 (8.08)
	CIP	184 (92.93)	14 (7.07)
Polymyxins	CT	198 (100)	0 (0)
Nitrofurans	F	193 (97.47)	5 (2.52)
Phenicol	C	190 (95.96)	8 (4.04)

AMP=Ampicillin, AMC=Amoxicillin+clavulanate, KF=Cephalothin, CTX=Cefotaxime, FOX=Ceftiofur, K=Kanamycin, CN=Gentamycin, SXT=Trimethoprim/sulfamethoxazole, Te=Tetracycline, NA=Nalidixic acid, CIP=Ciprofloxacin, CT=Colistin, F=Nitrofurantoin, C=Chloramphenicol

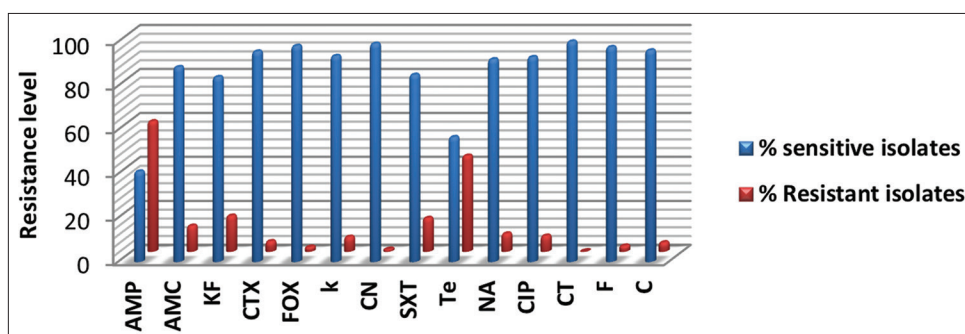


Figure-3: Frequencies of antibiotics resistance in *Escherichia coli* isolates.

molecule [17,39] as well as higher rates such as those obtained by Sawant *et al.* [34]; the high levels can be interpreted by the mechanisms of tetracycline resistance which are very ancient [41] and that tetracycline is a naturally occurring compound which bacteria can be exposed to in the outside in their use as human therapy, as prophylactics or as growth promoters in livestock [38].

Resistance to the many molecules of the cephalosporin family is often a result of stable mutations [38], a plasmid-mediated acquired resistance to the third-generation cephalosporins is now also reported by Payne and Amyes [42]. Bacteria can easily retain these stable mutations which confer resistance to cephalosporins, even in the absence of selective pressure to maintain resistance [39].

In our study, the first-generation cephalosporins are represented by cephalothin, for which a moderate resistance rate is observed 16.16%, which is in agreement with the results of Sayah *et al.* [39]. The prevalence of resistance to the second- and third-generation cephalosporins, predominantly cefoxitin and cefotaxime, is low in our study with 2.02% and 4.54%, respectively, although nine *E. coli* strains ESBL producing were identified using a double-disk synergy test with cefotaxime and amoxicillin-clavulanate disks, other studies have reported the absence of cefotaxime resistance [14,28,35,43] and a similar resistance rate to our result for the third-generation cephalosporins is found [44].

In Algeria, several studies have been performed on the characterization of extended-spectrum β -lactamases on many hosts, in humans by Touati *et al.* and Iabadene *et al.* [21,45], in poultry by Belmahdi *et al.* [23] and Meguenni *et al.* [24], and in pets (dogs and cats) by Yousfi *et al.* [46], but there are not any studies that investigate the topic of ESBL in commensal *E. coli* in cattle.

For trimethoprim/sulfamethoxazole, a moderate resistance rate is observed (15.15%); this agrees with Li *et al.* [44]. In combination of the two molecules: Trimethoprim/sulfamethoxazole is synergistic and produces a wide-spectrum bactericidal effect [33], the use of this antibiotic in animal feed, like its uncontrolled use in human medicine, can contribute for a long time to the development and transmission of genes encoding this marker of resistance [47]; sulfonamide resistance is widely prevalent and cross-resistance between sulfonamides is complete [38], so caution in the use of these antibiotics is required.

In Algeria, many antibiotics have been banned by ministerial decision since 2006, such as gentamycin, ciprofloxacin, chloramphenicol, and nitrofurantoin, despite these prohibition resistance levels have been recorded for these molecules with 1.1%, 7.07%, 4.04%, and 2.52%, respectively, and the National Network for the Surveillance of the Resistance of Bacteria to Antibiotics is still recording significant levels of resistance to chloramphenicol (23.5%) and

furans (18.3%) for *E. coli* strains, despite their prohibition since December 24, 2006 [48].

Other researchers from other countries have also reported chloramphenicol resistance in *E. coli* isolates from chickens and pigs in the absence of phenicol use for many years [49,50]. Coresistance of chloramphenicol with other unrelated compounds seems to be the probable explanation, as coresistance caused by the use of sulfonamides and streptomycin due to gene linkage has been reported [50-53].

Weak resistance rates are observed for nalidixic acid with 8.08% and ciprofloxacin with 7.07%, noting that ciprofloxacin is prohibited, which may be explained by the fact that fluoroquinolone resistance is linked to a chromosome mutation and the development of resistance to one agent causes cross-resistance to other fluoroquinolones [39].

Bywater *et al.* have abnormally reported a relatively high incidence of ciprofloxacin resistance in *Campylobacter* spp., despite the prohibition of its use, such observations as for chloramphenicol, explains at least some differences between antibiotic resistance and veterinary use of certain classes of antibiotics.

Kanamycin is a relatively old molecule, but its resistance rate is low 6.56%, explained by the low use of its family (aminoglycosides) by Algerian veterinary practitioners [30]. For gentamycin, we found a low resistance rate with 1.01%; this resistance explained by its illegal use because it is prohibited for use in Algeria.

Colistin is the only antibiotic that has not presented resistance (0%), which is in agreement with the results of de Jong *et al.* [35], who conducted this study in five European countries. Colistin is widely used for the treatment of colibacillary infections in animals but in human medicine has been excluded from therapeutic protocols due to its particular renal toxicity and became an antibiotic prescribed only for the treatment of serious human infections caused by bacteria resistant to any other antibiotics [54]. Colistin is also one of the most critical antibiotics, which the WHO has recently recommended to reduce in food-producing animals [55]

Coresistances and MDR rate

Analysis of coresistance for the 198 *E. coli* isolates (Table-3) showed that 63 isolates (31.82%) were sensitive to all antibiotics used in the study, 42 isolates (21.21%) were resistant to one antibiotic, 43 isolates (21.72%) to two antibiotics, 24 isolates (12.12%) to three antibiotics, and 26 isolates (13.13%) for more than three antibiotics. Based on Kruskal-Wallis test results (non-parametric test), it can be estimated that there is a significant difference between the different coresistance rates with $p=0.09023$, thus showing a wide variety of phenotypes (Table-4).

On the other side, 45 isolates (22.73%) were MDR, which means resistant to three or more families of antibiotics since we considered beta-lactams and cephalosporins as two different families.

Table-3: Coresistances of the 198 *E. coli* isolates from cattle.

Number of <i>E. coli</i> isolates	Number (n) and percentages (%) of isolates resistant to					Kruskal–Wallis χ^2 p-value
	No agent	One agent	Two agents	Three agents	More than three agents	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
198	63 (31.82)	42 (21.21)	43 (21.72)	24 (12.12)	26 (13.13)	0.09023

E. coli=*Escherichia coli*

MDR bacteria present an impending risk to human and animal health, considering the limitations that they impose on the selection of antibiotic therapy for infections as well as the dangers of therapeutic failure. The MDR reported in our study can be the result of an independent resistance for each antibiotic or a coresistance.

A few major factors can contribute to increase bacterial MDR: The transfer of resistance determinants by movable genetic elements including plasmids, transposons, and gene cassettes into integrons and by changing regulation in mar locus [56].

Due to the indiscriminate exploitation of antimicrobial agents, high incidence of MDR may apparently occur, which may ultimately replace drug-sensitive microorganisms in the saturated antibiotic environment [7]. The MDR rate we have recorded is higher than that recorded by other authors [36,39,43], which motivates the monitoring of MDR *E. coli* strains.

Variety of antimicrobial resistance phenotypes

Depending to their antibiotic resistance phenotypes, the 198 isolates of *E. coli* belong to 44 different phenotypes (Figure-2), thus showing a large variety of resistances, ranging from one antimicrobial to a combination of 10 (Table-5).

The two most frequent phenotypes with the same rate are AMP and AMP-TE with 14.65%, followed by the combination AMP-SXT-TE with 5.55% and TE with 5.05%. All MDR phenotypes are AMP resistant with a lower resistance level to tetracycline, which suggests that *E. coli* strains resistant to these antibiotics have an increased ability to be resistant for other antimicrobials, it has been reported in several previous studies that the most common phenotypes included a sole resistance to tetracycline or in association with other antibiotics [17,39,43].

There were nine different phenotypes detected with a rate of 4.54% producing extended-spectrum β -lactamases and all are MDR ranging from five antimicrobials to a combination of 10. ESBL phenotype includes resistance to penicillins and cephalosporins, with the exception of cephamycins, which is the cause of many therapeutic failures [29], which requires the surveillance of strains with this type of phenotype.

The propagation of enterobacterial strains producing ESBL is a complex phenomenon involving three mechanisms. The first is clonal dissemination, where a strain producing ESBL can spread through horizontal contact between individuals. The second type is the transmission of one or several plasmids to

Table-4: Kruskal–Wallis test.

	A	B
A	1	0.01219
B	0.01219	1

Mann–Whitney pair wise comparison

H (K2)=6.818
Hc (tie-corrected)=6.818

another bacterial strain of the same or different species. The third is the transfer of resistance elements present in transposons or integrons between different plasmids. Plasmids often have other resistance genes (including aminoglycosides, tetracyclines, sulfonamides, and trimethoprim), hence, the notion of coresistance, coexpression, and coselection [57].

In this study, the high variability of resistance phenotypes can be explained by coresistance (acquisition of resistance to several antibiotics of different classes), as the plasmids exchanged usually have several resistance genes such as the coresistance of *E. coli* to cephalosporins, penicillins, chloramphenicol, tetracyclines, and fluoroquinolones.

In the same way as for cross-selection, the use of an antibiotic to which the bacterium resists will allow the coselection of all the resistances supported by the same plasmid. The diffusion and acquisition of resistances are independent of the use of antibiotics, but their use, without being aware of the state of bacterial sensitivity, can quickly cause the selection of MDR strains [58].

- The upper margin indicates the antibiogram patterns of phenotypic antimicrobial resistance detected from 1 to 44
- The left margin indicates the distance between the different clusters.

Conclusion

Antibiotic sensitivity of 198 isolates of *E. coli* collected from cattle in Eastern Algeria showed high frequencies of resistance to AMP and TE and a high level of *E. coli* producing ESBLs was detected. ESBL strains are the cause of many therapeutic failures, which require the surveillance of strains that contain this phenotype. The coresistance analysis showed a high rate of MDR strains, 44 different phenotypes were also detected, showing a high variety of resistance, ranging from 1 to 10 antimicrobials combination.

The high rate of antimicrobial resistance in commensal *E. coli* from Algerian livestock emphasizes the urgency of intervention to implement the measures to control the use of antimicrobials, in particular, by

Table-5: Patterns of antimicrobial resistance phenotypes for *Escherichia coli* strains isolated in the study, with antibiogram pattern codes.

Number of resistances	Antibiogram patterns	Code of patterns	Number of strains
0	Susceptible to all antimicrobials	1	63
1	AMP	2	29
	KF	3	1
	FOX	4	1
	TE	5	10
	CIP	6	1
2	AMP+KF	7	6
	AMP+AMC	8	1
	AMP+TE	9	29
	AMP+NA	10	2
	K+TE	11	1
	TE+SXT	12	2
	TE+CIP	13	2
3	AMP+KF+AMC	14	1
	AMP+KF+SXT	15	1
	AMP+KF+TE	16	4
	AMP+KF+F	17	1
	AMP+AMC+SXT	18	2
	AMP+AMC+TE	19	1
	AMP+K + TE	20	3
	AMP+SXT+TE	21	11
4	AMP+KF+AMC+FOX	22	1
	AMP+KF+AMC+SXT	23	1
	AMP+KF+AMC+F	24	1
	AMP+AMC+TE+C	25	1
	AMP+K + SXT+TE	26	2
	AMP+K + TE+NA	27	1
5	AMP+KF+AMC+TE+CIP	28	1
	AMP+KF+AMC+TE+C	29	2
	AMP+KF+CTX+TE+NA	30	1
	AMP+SXT+TE+NA+CIP	31	2
6	AMP+KF+AMC+FOX+SXT+TE	32	1
	AMP+KF+AMC+CTX+TE+NA	33	1
	AMP+KF+AMC+TE+CIP+C	34	1
	AMP+AMC+K + SXT+TE+C	35	1
7	AMP+KF+AMC+CTX+TE+NA+CIP	36	1
8	AMP+KF+AMC+CTX+SXT+TE+NA+CIP	37	1
	AMP+KF+AMC+CTX+TE+NA+CIP+F	38	1
	AMP+KF+CTX+K + SXT+TE+NA+CIP	39	1
	AMP+KF+CTX+K + SXT+TE+NA+F	40	1
9	AMP+KF+AMC+FOX+SXT+TE+NA+CIP+F	41	1
	AMP+AMC+K + CN+SXT+TE+NA+CIP+C	42	1
10	AMP+KF+AMC+CTX+K + CN+SXT+TE+NA+C	43	1
	AMP+KF+AMC+CTX+K + SXT+TE+NA+++CIP+C	44	1

AMP=Ampicillin, KF=Cephalothin, FOX=Cefoxitin, TE=Tetracycline, CIP=Ciprofloxacin, AMC=Amoxicillin+clavulanate, NA=Nalidixic acid, K=Kanamycin, SXT=Trimethoprim/sulfamethoxazole, F=Nitrofurantoin, CTX=Cefotaxime, C=Chloramphenicol, CN=Gentamycin

private veterinarians, and to strengthen networks to control bacterial resistance to antibiotics, which can spread to humans and the environment.

Authors' Contributions

DB collected the samples and provided the bacteriological analyzes. AB contributed by statistical analyses and the creation of the map; DB and AB prepared the manuscript; and NB supervised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

The authors are thankful to the Veterinary Department of the Institute of Agronomic and

Veterinarian Sciences and the Laboratory of Science and Technique of the Living of Mohamed Cherif Messaïdia University, Souk Ahras, Algeria, for providing all the facilities to carry out the present study. The authors did not receive any fund for this study.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

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

References

- van den Bogaard, A.E., London, N., Driessen, C. and Stobberingh, E.E. (2001) Antibiotic resistance of fecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J. Antimicrob. Chemother.*, 47(6): 763-771.
- Berghiche, A., Khenenou, T., Kouzi, A. and Labiad, I. (2018) An investigation on the predominant diseases, its diagnosis, and commonly used drugs in the poultry farms in the North-Eastern regions of Algeria. *Vet. World*, 11(7): 986-989.
- Berghiche, A. (2019) Special attention is needed for reduce antibiotic residue risk in the white meat produced in Algeria. *J. Food Qual. Hazard. Control*, 6(2): 44.
- Barbosa, T.M. and Levy, S.B. (2000) The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resist. Updat.*, 3(5): 303-311.
- Price, L.B., Graham, J.P., Lackey, L.G., Roess, A., Vailes, R. and Silbergeld, E. (2007) Elevated risk of carrying gentamicin-resistant *Escherichia coli* among U.S. poultry workers. *Environ. Health Perspect.*, 115(12): 1738-1742.
- Silbergeld, E.K., Graham, J. and Price, L.B. (2008) Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. *Annu. Rev. Public Health*, 29(1): 151-169.
- van den Bogaard, A.E. and Stobberingh, E.E. (2000) Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 14(4): 327-335.
- Harbottle, H., Thakur, S., Zhao, S. and White, D.G. (2006) Genetics of antimicrobial resistance. *Anim. Biotechnol.*, 17(2): 111-124.
- Hariharan, H. (2007) Antimicrobial therapy in veterinary medicine. 4th ed. *Can. Vet. J.*, 48(7): 744.
- Rubens, C.E., McNeill, W.F. and Farrar, W.E. (1979) Evolution of multiple-antibiotic-resistance plasmids mediated by transposable plasmid deoxyribonucleic acid sequences. *J. Bacteriol.*, 140(7): 713-719.
- Aarestrup, F.M., Wegener, H.C. and Collignon, P. (2008) Resistance in bacteria of the food chain: Epidemiology and control strategies. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, 6(5): 733-750.
- Heymann, D.L. (2014) Control of Communicable Diseases Manual. 20th ed. Jones and Bartlett Publishers, Washington, DC. p729.
- Kahn, C.N., Line, S. and Aiello, S. (2010) The Merck Veterinary Manual. 10th ed. Merck and Co Inc., Whitehouse Station, New Jersey. p1351.
- Abbassi, M.S., Kilani, H., Zouari, M., Mansouri, R., El Fekih, O., Hammami, S. and Ben Chehida, N. (2017) Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from healthy poultry, bovine and ovine in Tunisia: A real animal and human health threat. *J. Clin. Microbiol. Biochem. Technol.*, 3(2): 19-23.
- Brennan, E., Martins, M., McCusker, M.P., Wang, J., Alves, B.M., Hurley, D., El Garch, F., Woehrlé, F., Miossec, C., McGrath, L., Srikumar, S., Wall, P. and Fanning, S. (2016) Multidrug-resistant *Escherichia coli* in bovine animals Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, 22(9): 1650-1652.
- Haenni, M., Châtre, P., Métayer, V., Bour, M., Signol, E., Madec, J.Y. and Gay, E. (2014) Comparative prevalence and characterization of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in dominant versus subdominant enteric flora in veal calves at slaughterhouse, France. *Vet. Microbiol.*, 171(3-4): 321-327.
- Mainda, G., Bessell, P.R., Bessell, P.B., Muma, J.B., McAteer, S.P., Chase-Topping, M.E., Gibbons, J., Stevens, M.P., Gally, D.L. and deC Bronsvort, B.M. (2015) Prevalence and patterns of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* isolated from Zambian dairy cattle across different production systems. *Sci. Rep.*, 5(1): 12439.
- Wittum, T.E., Mollenkopf, D.F., Daniels, J.B., Parkinson, A.E., Mathews, J.L., Fry, P.R., Abley, M.J. and Gebreyes, W.A. (2010) CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases present in *Escherichia coli* from the feces of cattle in Ohio, United States. *Foodborne Pathog. Dis.*, 7(12): 1575-1579.
- Messai, Y., Benhassine, T., Naim, M., Paul, G. and Bakour, R. (2006) Prevalence of beta-lactams resistance among *Escherichia coli* clinical isolates from a hospital in Algiers. *Rev. Esp. Quimioter.*, 19(2): 144-151.
- Ramdani-Bouguessa, N., Mendonça, N., Leitão, J., Ferreira, E., Tazir, M. and Caniça, M. (2006) CTX-M-3 and CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamases in isolates of *Escherichia coli* from a hospital in Algiers, Algeria. *J. Clin. Microbiol.*, 44(12): 4584-4586.
- Touati, A., Benallaoua, S., Forte, D., Madoux, J., Brasme, L. and de Champs, C. (2006) First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Béjaia, Algeria. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 27(5): 397-402.
- Tani, Z.B.A., Decré, D., Genel, N., Zahia, B., Arlet, G. and Drissi, M. (2013) Molecular and epidemiological characterization of enterobacterial multidrug-resistant strains in Tlemcen hospital (Algeria) (2008-2010). *Microb. Drug Resist.*, 19(3): 185.
- Belmahdi, M., Bakour, S., Al Bayssari, C., Touati, A. and Rolain, J.M. (2016) Molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase- and plasmid AmpC-producing *Escherichia coli* strains isolated from broilers in Béjaia, Algeria. *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, 6(3): 108-112.
- Meguenni, N., Le Devendec, L., Jouy, E., Le Corvec, M., Bounar-Kechih, S., Bakour, R. and Kempf, I. (2014) First description of an extended-spectrum cephalosporin-and fluoroquinolone-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* clone in Algeria. *Avian Dis.*, 59(1): 20-23.
- CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute). (2015) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty Fifth Information Supplement. M100-S25. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne PA.
- CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute). (2017) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Seventh Information Supplement. M100-S27. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne PA.
- Kruskal, W.H. and Wallis, W.A. (1952) Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J. Am. Stat. Assoc.*, 47(260): 583-621.
- Bywater, R., Deluyker, H., Deroover, E., de Jong, A., Marion, H., McConville, M., Rowan, T., Shryock, T., Shuster, D., Thomas, V., Vallé, M. and Walters, J. (2004) A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and commensal bacteria isolated from food-producing animals. *J. Antimicrob. Chemother.*, 54(4): 744-754.
- Courvalain, P. and Leclercq, R. (2012) AntibioGramme. 3rd ed. ESKA, Paris, France. p800.
- Mammeri, A. (2018) Antibiotic therapy practices of dairy cows and eventual impact on foodstuffs quality in the governorate of Biskra, Algeria. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.*, 9(6): 1472-1481.
- Livermore, D.M. (1995) Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8(4): 557-584.
- Singh, R., Saxena, A. and Singh, H. (2009) Identification of group specific motifs in beta-lactamase family of proteins. *J. Biomed. Sci.*, 16(1): 109.
- Petit, S. (2014) Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires. 19th ed. Point Vétérinaire, France. p2558.
- Sawant, A.A., Hegde, N.V., Straley, B.A., Donaldson, S.C., Love, B.C., Knabel, S.J. and Jayarao, B.M. (2007) Antimicrobial-resistant enteric bacteria from dairy cattle. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(1): 156-163.
- de Jong, A., Bywater, R., Butty, P., Deroover, E., Godinho, K., Klein, U., Marion, H., Simjee, S., Smets, K., Thomas, V., Vallé, M. and Wheadon, A. (2009) A pan-European survey

- of antimicrobial susceptibility towards human-use antimicrobial drugs among zoonotic and commensal enteric bacteria isolated from healthy food-producing animals. *J. Antimicrob. Chemother.*, 63(4): 733-744.
36. Enne, V.I., Cassar, C., Sprigings, K., Woodward, M.J. and Bennett, P.M. (2008) A high prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from pigs and a low prevalence of antimicrobial-resistant *E. coli* from cattle and sheep in Great Britain at slaughter. *FEMS Microbiol. Lett.*, 278(2): 193-199.
 37. Desfontis, J.C. (2010) Guide Pratique des Médicaments à Usage Vétérinaire. MED'COM, Paris. p1737.
 38. Prescott, J.F., Baggot, J.D. and Walker, R.D. (2000) Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. 3rd ed. Wiley, Ames, IA. p824.
 39. Sayah, R.S., Kaneene, J.B., Johnson, Y. and Miller, R. (2005) Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(3): 1394-1404.
 40. Berghiche, A., Khenenou, T., Bouzebda-Afri, F., Lamraoui, R. and Labied, I. (2017) Detection of the antibiotic residues in broiler chickens by microbiological screening test in Algeria. *Glob. Vét.*, 19(2): 504-508.
 41. D'Costa, V.M., King, C.E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W.W.L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G.B., Poinar, H.N. and Wright, G.D. (2011) Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 477(7365): 457-461.
 42. Payne, D.J. and Amyes, S.G. (1991) Transferable resistance to extended-spectrum beta-lactams: A major threat or a minor inconvenience? *J. Antimicrob. Chemother.*, 27(3): 255-261.
 43. Lim, S.K., Lee, H.S., Nam, H.M., Cho, Y.S., Kim, J.M., Song, S.W., Park, Y.H. and Jung, S.C. (2007) Antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* strains isolated from fecal samples of cattle and pigs in Korea during 2003-2004. *Int. J. Food Microbiol.*, 116(2): 283-286.
 44. Li, X., Aly, S.S., Su, Z., Pereira, R.V., Williams, D.R., Rossitto, P., Champagne, J.D., Chase, J., Nguyen, T. and Atwill, E.R. (2018) Phenotypic antimicrobial resistance profiles of *E. coli* and *Enterococcus* from dairy cattle in different management units on a central California dairy. *Clin. Microbiol.*, 7(2): 1-7.
 45. Iabadene, H., Messai, Y., Ammari, H., Ramdani-Bouguessa, N., Lounes, S., Bakour, R. and Arlet, G. (2008) Dissemination of ESBL and qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria. *J. Antimicrob. Chemother.*, 62(1): 133-136.
 46. Yousfi, M., Mairi, A., Touati, A., Hassissene, L., Brasme, L., Guillard, T. and De Champs, C. (2016) Extended-spectrum β -lactamase and plasmid mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* fecal isolates from healthy companion animals in Algeria. *J. Infect. Chemother.*, 22(7): 431-435.
 47. Soufi, L., Abbassi, M.S., Sáenz, Y., Vinué, L., Somalo, S., Zarazaga, M., Abbas, A., Dbaya, R., Khanfir, L., Ben Hassen, A., Hammami, S. and Torres, C. (2009) Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in *Escherichia coli* isolates from poultry meat in Tunisia. *Foodborne Pathog. Dis.*, 6(9): 1067-1073.
 48. Rahal, K., Missoum, M.F.K., Bensliman, A., Ammari, H., Abboun, A. and Benamrouche, N. (2015) Surveillance de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques, Rapport D'évaluation, Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques, Algérie. p216.
 49. Bager, F., Emborg, H.D. and Monnet, D.L. (2001) DANMAP 2000, Report. Consumption of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Bacteria from Food Animal, Foods and Humans. Danish Zoonosis Center, Denmark.
 50. Keyes, K., Hudson, C., Maurer, J.J., Thayer, S., White, D.G. and Lee, M.D. (2000) Detection of florfenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolated from sick chickens. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44(2): 421-424.
 51. Chiew, Y.F., Yeo, S.F., Hall, L.M. and Livermore, D.M. (1998) Can susceptibility to an antimicrobial be restored by halting its use? The case of streptomycin versus *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 41(2): 247-251.
 52. Harada, K., Asai, T., Kojima, A., Ishihara, K. and Takahashi, T. (2006) Role of coresistance in the development of resistance to chloramphenicol in *Escherichia coli* isolated from sick cattle and pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 67(2): 230-235.
 53. Kehrenberg, C. and Schwarz, S. (2001) Occurrence and linkage of genes coding for resistance to sulfonamides, streptomycin and chloramphenicol in bacteria of the genera *Pasteurella* and *Mannheimia*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 205(2): 283-290.
 54. Dortet, L., Bonnin, R., Jousset, A., Gauthier, L. and Naas, T. (2016) Émergence de la résistance à la colistine chez les entérobactéries: Une brèche dans le dernier rempart contre la pan-résistance! *J. Anti Infect.*, 18(4): 139-159.
 55. AMCRA. (2017) L'OMS Recommande D'arrêter L'utilisation Préventive des Antibiotiques Chez les Animaux. Available from: <http://www.amcra.be/fr/nouvelle/loms-recommande-darrter-lutilisation-prventive-des-antibiotiques-chez-les-animaux/?lid=14308>. Retrieved on 17-04-2019.
 56. Sáenz, Y., Briñas, L., Domínguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J. and Torres, C. (2004) Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48(10): 3996-4001.
 57. Rodriguez-Villalobos, H. and Struelens, M.J. (2006) Résistance bactérienne par β -lactamases à spectre étendu: Implications pour le réanimateur. *Réanimation*, 15(3): 205-213.
 58. AFSSA. (2006) Usages Vétérinaires des Antibiotiques, Résistance Bactérienne et Conséquences Pour la Santé Humaine. Rapport du Groupe de Travail "Antibiorésistance". AFSSA, Maisons-Alfort. p214.
