

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique
Université de Saïda Dr Moulay Tahar



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département d'Agronomie et Sciences de la Nutrition

Mémoire de Master
En Biotechnologie
Spécialité : Biotechnologie végétale

**PHAGOTECH AI : Stratégie d'innovation par
phagothérapie et intelligence artificielle pour
le biocontrôle des résistances antimicrobiennes
dans les élevages algériens**

Présenté par : HADJI Khaoula Imane

Président : Mr. BELLIL Yahia, MCA, USMT

Examineur : Mme. CHAHROUR Wassila, MCA, USMT

Rapporteur : Mr. BENABBOU Taha Ahmed, MCA, USMT

Année Universitaire : 2025–2026

Dédicaces

À ma grand-mère chérie, Qui a été un pilier fondamental dans la construction de ma personnalité depuis mon enfance. Je lui dédie ce travail en reconnaissance de ces années de bienveillance et de sérénité passées à ses côtés, qui m'ont donné la force de poursuivre mon parcours scientifique. À mes parents, Ma source d'inspiration et mon refuge. Je leur dédie le fruit de mes efforts en guise de gratitude pour leurs sacrifices incommensurables et leur soutien indéfectible, qui ont été le moteur de ma détermination tout au long de mes années d'études. À mes amies : Kawther, Douaa, Khaoula, Lina, Maria, Soulef et Khadidja, Merci d'avoir été bien plus que de simples amies. Vous avez été un soutien précieux face aux défis du laboratoire, partageant avec moi mes ambitions et mes réussites. Vous avez été les meilleures compagnes de ce parcours académique que nous avons bâti ensemble.

Remerciements

Tout d'abord, je remercie Dieu, le Tout-Puissant, de m'avoir accordé la force, la patience et la persévérance nécessaires pour mener à bien ce travail.

J'adresse mes plus sincères remerciements à mon encadreur, Monsieur BENABBOU Taha Ahmed, pour son accompagnement, sa disponibilité, ses précieux conseils et son soutien tout au long de cette étude.

Je remercie également les membres du jury, Monsieur BELLIL Yahia et Madame CHAHROUR Wassila, d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Mes sincères remerciements vont à Mademoiselle GUENNOUN Nassima pour son aide technique et sa disponibilité.

J'exprime également ma gratitude à Madame FARHAOUI Hadjira, responsable du laboratoire de microbiologie, pour son accueil et les moyens mis à disposition pour la réalisation des manipulations expérimentales.

Je remercie chaleureusement Monsieur HAMAD Ahmed, chef de laboratoire, pour son accueil, sa bienveillance et son soutien, ainsi que Monsieur BENHMIDA Nasreddine, coordinateur des laboratoires, pour sa disponibilité et son appui tout au long de ce travail.

Enfin, je remercie profondément ma famille pour son amour, ses encouragements et son soutien indéfectible, qui m'ont permis d'achever ce parcours.

Liste des abréviations

ADN Acide DésoxyriboNucléique

ADNe ADN extracellulaire

AME Aminoglycoside-Modifying Enzymes (enzymes modificatrices d'aminoglycosides)

ANPP Agence Nationale des Produits Pharmaceutiques

APEC Avian Pathogenic Escherichia coli (*E. coli* aviaire pathogène)

ARN Acide RiboNucléique

BPF Bonnes Pratiques de Fabrication

BLSE Bêta-Lactamases à Spectre Élargi

CMI Concentration Minimale Inhibitrice

CRBT Centre de Recherche en Biotechnologie

CRISPR-Cas Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
– CRISPR-associated protein

DSASI Direction des Statistiques Agricoles et des Systèmes d'Information

DSV Direction des Services Vétérinaires

ECDC European Centre for Disease Prevention and Control (Centre Européen de Prévention et de Contrôle des Maladies)

EFSA European Food Safety Authority (Autorité Européenne de Sécurité des Aliments)

EMA European Medicines Agency (Agence Européenne des Médicaments)

ENSV École Nationale Supérieure Vétérinaire (Alger)

- FAO** Food and Agriculture Organization (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture)
- FDA** Food and Drug Administration (États-Unis)
- GLASS** Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System
- IAHP** Influenza Aviaire Hautement Pathogène
- ICTV** International Committee on Taxonomy of Viruses (Comité International de Taxonomie des Virus)
- ITELV** Institut Technique des Élevages
- MADR** Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural
- MDR** MultiDrug-Resistant (multirésistant aux antibiotiques)
- MEP** Matrice Extracellulaire Polymérique
- OIE** Office International des Épizooties (ancien nom de l'OMSA)
- OMS** Organisation Mondiale de la Santé
- OMSA** Organisation Mondiale de la Santé Animale (anciennement OIE)
- ONA** Office National Avicole
- ONAB** Office National des Aliments du Bétail
- PAN-RAM** Plan d'Action National sur la Résistance aux Antimicrobiens
- PDP** Polysaccharide DéPolymérase
- PLP** Protéines de Liaison à la Pénicilline
- PSE** Polysaccharides Extracellulaires
- QAC** Quaternary Ammonium Compounds (Ammoniums quaternaires)
- RAM** Résistance aux AntiMicrobiens
- SARM** *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méthicilline
- T3SS** Type III Secretion System (Système de Sécrétion de Type III)
- T6SS** Type VI Secretion System (Système de Sécrétion de Type VI)

THG Transfert Horizontal de Gènes

UFC Unité Formant Colonie

UPEC Uropathogenic Escherichia coli (*E. coli* uropathogène)

USTHB Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene

WHO World Health Organization (version anglaise de l’OMS)

XDR Extensively Drug-Resistant (résistance extensive aux antibiotiques)

AMC Amoxicilline + Acide clavulanique.

AMX Amoxicilline.

API 20 E Appareillage et Procédé d’Identification.

ATB Antibiotique.

BN Bouillon nutritif.

CAZ Ceftazidime.

CIP Ciprofloxacine.

CIT Citrate trisodique.

CN Gentamicine.

CTX Céfotaxime.

DO Densité optique.

E. coli *Escherichia coli*.

ED Eau distillée.

GN Gélose nutritive.

I Intermédiaire.

IND Indole.

IPM Imipénème (antibiotique de la famille des carbapénèmes).

Mac Gélose MacConkey.

MH Gélose Mueller-Hinton.

NaCl Chlorure de sodium.

R Résistante.

S Sensible.

SXT Triméthoprim – sulfaméthoxazole.

VP Réaction de Voges-Proskauer.

Résumé

Ce travail vise à étudier la résistance aux antibiotiques d'entérobactéries isolées de litière avicole dans la région de Saïda (Algérie), à évaluer le potentiel de bactériophages locaux comme agents de biocontrôle, et à développer un outil numérique d'aide au diagnostic vétérinaire basé sur l'intelligence artificielle. Six isolats (1V, 2P, 3P, 4R, 5S, 6V) ont été obtenus par ensemencement sur milieu MacConkey. La caractérisation biochimique, complétée par galerie API 20E, a identifié la souche 4R comme *Enterobacter cloacae* (83,2 %). L'antibiogramme a révélé une multirésistance généralisée : 100 % des souches résistantes à l'amoxicilline-acide clavulanique et au cotrimoxazole, 83 % à la céfotaxime, 67 % à la ceftazidime et à la ciprofloxacine ; seuls les carbapénèmes ont conservé une bonne efficacité. L'ensemble des isolats est classé multirésistant (MDR), dont deux en résistance étendue (XDR). La détermination des CMI (amoxicilline, amoxicilline-clavulanate) a confirmé ces résistances et suggéré une hyperproduction enzymatique chez la majorité des souches. La formation de biofilm, évaluée au cristal violet, a classé l'ensemble des isolats comme producteurs modérés (DO comprises entre 0,082 et 0,111 à 492 nm). Les bactériophages isolés d'eaux usées locales ont montré une activité lytique confirmée par spot test sur trois isolats représentatifs, et un effet cinétique statistiquement significatif (ANOVA à mesures répétées) sur trois des cinq souches testées en cinétique de croissance, notamment absent chez les deux souches XDR de l'étude. En complément, un prototype d'application web exploitant des modèles de langage multimodaux a été développé pour orienter précocement les éleveurs vers un avis vétérinaire. Ces résultats positionnent les bactériophages caractérisés comme des candidats prometteurs pour une stratégie de biocontrôle intégrée, associant caractérisation microbiologique et outil numérique d'aide à la décision, adaptée aux élevages avicoles algériens.

Mots-clés : litière avicole, entérobactéries, multirésistance, biofilm, bactériophages, biocontrôle, intelligence artificielle, One Health.

Abstract

This study investigates antibiotic resistance among Enterobacteriaceae isolated from poultry litter in the Saïda region (Algeria), evaluates the potential of locally isolated bacteriophages as biocontrol agents, and presents the development of an artificial intelligence-based digital tool for veterinary diagnostic support. Six isolates (1V, 2P, 3P, 4R, 5S, 6V) were obtained by inoculation on MacConkey agar. Biochemical characterization, supplemented by the API 20E gallery, identified isolate 4R as *Enterobacter cloacae* (83.2%). Antimicrobial susceptibility testing revealed widespread multidrug resistance : 100% of isolates were resistant to amoxicillin–clavulanic acid and cotrimoxazole, 83% to cefotaxime, and 67% to both ceftazidime and ciprofloxacin ; only carbapenems retained good efficacy. All isolates met multidrug-resistant (MDR) criteria, with two classified as extensively drug-resistant (XDR). MIC determination (amoxicillin, amoxicillin-clavulanate) confirmed these resistance levels and suggested enzymatic hyperproduction in most strains. Biofilm formation, assessed by the crystal violet method, classified all isolates as moderate producers (OD range 0.082–0.111 at 492 nm). Bacteriophages isolated from local wastewater demonstrated confirmed lytic activity by spot test on three representative isolates, and a statistically significant kinetic effect (repeated-measures ANOVA) on three of the five strains tested in growth kinetics – notably absent in the study’s two XDR strains. In addition, a prototype web application leveraging multimodal language models was developed to facilitate early referral of farmers to veterinary professionals. These findings position the characterized bacteriophages as promising candidates for an integrated biocontrol strategy, combining microbiological characterization with a digital decision-support tool tailored to Algerian poultry farming.

Keywords : poultry litter, Enterobacteriaceae, multidrug resistance, biofilm, bacteriophages, biocontrol, artificial intelligence, One Health.

ملخص

تتناول هذه الدراسة مقاومة المضادات الحيوية لدى بكتيريا الأمعائيات (Enterobacteriaceae) المعزولة من فرشة الدواجن في منطقة سعيدة (الجزائر)، وتقيم إمكانية استخدام العاثيات البكتيرية (bacteriophages) المعزولة محلياً كعوامل لمكافحة الحيوية، كما تعرض تطوير أداة رقمية قائمة على الذكاء الاصطناعي للمساعدة في التشخيص البيطري. تم الحصول على ست عزلات (1V، 2P، 3P، 4R، 5S، 6V) عن طريق التلقيح على وسط MacConkey. أظهر التوصيف الكيميائي الحيوي، المدعوم بمجموعة API، 20E أن العزلة 4R تنتمي إلى نوع *Enterobacter cloacae* بنسبة تطابق 83.2%. كشفت اختبارات الحساسية للمضادات الحيوية عن مقاومة متعددة واسعة الانتشار: 100% من العزلات مقاومة لمزيج أموكسيسيلين-حمض الكلافولانيك وللكوتريموكسازول، و83% مقاومة لل سيفوتاكسيم، و67% مقاومة لكل من السيفتازيديم والسيبروفلوكساسين؛ ولم تحتفظ بفعالية جيدة سوى الكاربابينيمات. استوفت جميع العزلات معايير المقاومة المتعددة للأدوية (MDR)، بينما صُنِّفت عزلتان ضمن فئة المقاومة الواسعة للأدوية (XDR). أكد تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) لكل من الأموكسيسيلين ومزيج أموكسيسيلين-حمض الكلافولانيك مستويات المقاومة هذه، وأشار إلى احتمال فرط إنتاج إنزيمي لدى معظم السلالات. صُنِّفت جميع العزلات، بحسب تقييم تكوّن الغشاء الحيوي (biofilm) بطريقة الكريستال فيوليت، ضمن فئة الإنتاج المعتدل (نطاق الكثافة الضوئية 0.082--0.111 عند 492 نانومتر). أظهرت العاثيات البكتيرية المعزولة من مياه الصرف المحلية نشاطاً حلالاً مؤكداً باختبار البقعة (spot test) على ثلاث عزلات ممثلة، كما سُجِّل تأثير حركي دال إحصائياً (تحليل التباين للقياسات المتكررة) على ثلاث من أصل خمس سلالات خضعت لاختبار حركية النمو -- وهو تأثير غاب بشكل ملحوظ لدى السلالتين الأكثر مقاومة (XDR) في الدراسة. بالإضافة إلى ذلك، تم تطوير نموذج أولي لتطبيق ويب يعتمد على نماذج لغوية متعددة الوسائط لتسهيل التوجيه المبكر للمربين نحو استشارة بيطرية. تضع هذه النتائج العاثيات المميزة كمرشحات واعدة لاستراتيجية مكافحة حيوية متكاملة، تجمع بين التوصيف الميكروبيولوجي وأداة رقمية للمساعدة في اتخاذ القرار، مصممة خصيصاً لتربية الدواجن في الجزائر.

الكلمات المفتاحية: فرشة الدواجن، الأمعائيات، المقاومة المتعددة للأدوية، الغشاء الحيوي، العاثيات البكتيرية، مكافحة الحيوية، الذكاء الاصطناعي، صحة واحدة (One Health).

Table des matières

Dédicaces	1
Remerciements	2
Liste des abréviations	3
Résumé	7
Abstract	8
ملخص	9
Table des matières	10
Table des figures	11
Liste des tableaux	12
Introduction Générale	13
Chapitre 1 L'ÉLEVAGE AVICOLE EN ALGÉRIE ET LE PÉ-	
RIL DE L'ANTIBIORÉSISTANCE	15
1.1 Aperçu sur la filière avicole algérienne	16
1.1.1 Historique et évolution du secteur	16
1.1.2 Importance socio-économique	16
1.1.3 Production nationale de viande blanche et d'œufs . . .	16
1.1.4 Types d'élevages	17
1.1.5 Organisation des bâtiments d'élevage et gestion de la litière	17
1.1.6 Principaux défis sanitaires	18
1.2 L'usage des antibiotiques en aviculture	19
1.2.1 Historique de l'utilisation des antibiotiques	19

1.2.2	Antibiotiques les plus utilisés	20
1.2.3	Modalités d'utilisation	21
1.2.4	Situation réglementaire en Algérie	21
1.2.5	Risques liés à l'utilisation excessive ou inappropriée	22
1.3	Le phénomène de l'antibiorésistance	22
1.3.1	Définition et importance mondiale	22
1.3.2	Mécanismes moléculaires de résistance bactérienne	23
1.3.3	Transfert horizontal des gènes de résistance	24
1.3.4	Facteurs favorisant l'émergence dans les élevages	25
1.3.5	Conséquences sanitaires et économiques	25
1.3.6	Concept One Health et risques pour la santé publique	25
Chapitre 2 Les Entérobactéries Avicoles et le Défi du Biofilm		27
2.1	Les principales bactéries pathogènes en aviculture	28
2.1.1	Présentation générale des entérobactéries	28
2.1.2	Salmonella spp.	29
2.1.3	Autres entérobactéries d'intérêt vétérinaire	29
2.1.4	Sources de contamination et colonisation de la litière	30
2.2	Le biofilm bactérien	31
2.2.1	Définition et généralités	31
2.2.2	Composition et structure	31
2.2.3	Étapes de formation du biofilm	32
2.2.4	Biofilms dans les bâtiments avicoles	33
2.2.5	Mécanismes de résistance associés aux biofilms	33
2.3	Limites des stratégies actuelles de décontamination	34
2.3.1	Désinfection chimique conventionnelle	34
2.3.2	Antibiothérapie	35
2.3.3	Biosécurité classique	36
2.3.4	Cas des élevages algériens et nécessité d'approches innovantes	36
Chapitre 3 La Phagothérapie et le Biocontrôle comme Stratégie d'Innovation		37
3.1	Biologie des bactériophages	38
3.1.1	Historique de la découverte	38
3.1.2	Classification taxonomique	38
3.1.3	Morphologie et structure	39
3.1.4	Cycle lytique et cycle lysogénique	39
3.1.5	Critères de sélection des phages thérapeutiques	40
3.2	Le biocontrôle par phagothérapie	41
3.2.1	Définition et principes	41

3.2.2	Applications en médecine humaine	41
3.2.3	Applications vétérinaires et en aviculture	42
3.2.4	Applications en sécurité alimentaire	42
3.2.5	Activité anti-biofilm des bactériophages	42
3.3	Avantages et défis de la formulation PHAGOTECH AI	43
3.3.1	Concept de PHAGOTECH AI	43
3.3.2	Avantages spécifiques de l'approche phagique	44
3.3.3	Défis de formulation et de stabilité	45
3.3.4	Contraintes réglementaires	46
3.3.5	Perspectives de valorisation en Algérie	47
Chapitre 4	Matériel et méthodes	49
4.1	L'objectif de l'étude :	50
4.2	Provenance des échantillons	52
4.3	Isolement des Entérobactéries	53
4.4	Purification des isolats bactériens	54
4.5	Dénombrement de la flore totale et de la flore résistante	54
4.6	Purification des isolats bactériens	55
4.7	Observation microscopique	55
4.8	Conservation des isolats	56
4.8.1	Conservation à court terme	56
4.8.2	Conservation à long terme	56
4.9	Caractérisation biochimique des isolats	57
4.9.1	Recherche de la catalase	57
4.9.2	Test de l'oxydase	58
4.9.3	Test du citrate de Simmons	59
4.9.4	Test de l'indole	59
4.9.5	Test de Voges-Proskauer (VP)	60
4.9.6	Test du rouge de méthyle (RM)	60
4.9.7	Fermentation du mannitol	60
4.9.8	Test de mobilité	60
4.9.9	Identification à l'aide de la galerie API20E	61
4.10	Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	62
4.10.1	Préparation de l'inoculum pour la détermination de la CMI	63
4.10.2	Méthode de dilution en gélose (méthode des spots)	63
4.11	Test de diffusion en milieu gélosé (antibiogramme)	64
4.11.1	Inoculation des boîtes	64
4.11.2	Dépôt des disques d'antibiotiques	64
4.11.3	Lecture des boîtes et interprétation	64
4.11.4	Recherche des bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE)	65

4.12	Recherche de bactériophages	65
4.12.1	Culture bactérienne	67
4.12.2	Isolement des bactériophages	67
4.12.3	Protocole de cinétique de lyse en microplaque	68
4.12.4	Évaluation de la formation de biofilm	69
4.13	Développement de l'application d'assistance à la santé animale	71
4.13.1	Approche méthodologique	71
4.13.2	Architecture logicielle	71
4.13.3	Modèle de données	72
4.13.4	Intégration des services d'intelligence artificielle	72
4.13.5	Sécurité et gestion des accès	73
4.13.6	Déploiement	74
4.13.7	Limites méthodologiques	74
Chapitre 5	Résultats et discussion	75
5.1	Isolement et dénombrement des Entérobactéries	76
5.1.1	Caractéristiques physico-chimiques des échantillons de litière	76
5.1.2	Dénombrement des isolats	77
5.1.3	Isolement et purification des isolats bactériens	78
5.1.4	Examen microscopique des isolats	79
5.1.5	Recherche de l'activité catalase	80
5.1.6	Recherche de l'activité oxydase	82
5.1.7	Test d'utilisation du citrate de Simmons	83
5.1.8	Test Mannitol Mobilité	84
5.1.9	Tests Rouge de Méthyle (RM) et Voges–Proskauer (VP)	85
5.1.10	Test de production d'indole	85
5.2	Identification biochimique	86
5.2.1	Identification de la souche 4R	86
5.3	Détermination des profils de résistance aux antibiotiques (An- tibiogramme)	88
5.4	Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)	91
5.5	Évaluation de la formation de biofilm	93
5.6	Isolement et évaluation de l'activité lytique des bactériophages	95
5.6.1	Mise en évidence de l'activité lytique par spot test . .	95
5.6.2	Analyse des profils de lyse par souche	97
5.6.3	Discussion sur le potentiel thérapeutique et antibiofilm des bactériophages isolés	98
5.7	Cinétique de lyse bactérienne par les bactériophages	99
5.7.1	Dispositif expérimental	99
5.7.2	Résultats et interprétation	100

5.7.3	Activité antibiofilm des bactériophages	101
5.7.4	Perspectives thérapeutiques et lutte contre le biofilm .	103
5.8	Développement d'un outil numérique d'aide à la décision vé- térinaire	103
5.8.1	Justification stratégique dans le cadre du projet PHA- GOTECH AI	103
5.8.2	Objectifs de l'outil	104
5.8.3	Fonctionnement du système	104
5.8.4	Articulation avec le volet microbiologique du mémoire	106
Conclusion Générale		107
Bibliographie		109

Table des figures

1.1	illustre les conditions d'élevage avicole semi-intensif évoquées dans le texte.	19
1.2	carte mondiale de la RAM et projections 2050 évoquées dans le texte.	22
1.3	schéma des 4 mécanismes de résistance (inactivation enzymatique, modification de cible, efflux, imperméabilité).	24
2.1	litière avicole (copeaux de bois) comme réservoir bactérien. . .	30
2.2	schéma des 4 étapes de formation du biofilm.	33
4.1	Échantillons de litière de poulet collectés sur différents sites pour l'isolement bactérien.	53
4.2	Préparation des tubes de culture et mise en œuvre des techniques aseptiques sous bec Bunsen pour l'isolement et l'activation bactérienne	53
4.3	Schéma récapitulatif du protocole de la coloration de Gram . .	56
4.4	Protocole de conservation à long terme des cultures bactériennes	57
4.5	Test de catalase sur lames	58
4.6	Test de l'oxydase : principe et interprétation	59
4.7	Inoculation d'une galerie d'identification biochimique	61
4.8	Aspect de la galerie API2oE avant incubation	62
4.9	Site de prélèvement des échantillons environnementaux pour l'isolement des bactériophages.	66
4.10	Architecture logicielle en trois couches de l'application Animal Health Assistant.	71
5.1	Dénombrement de la flore cultivable (UFC/g de litière, échelle $\log_{10}$) par échantillon.	77
5.2	Aspect des colonies bactériennes développées sur le milieu MacConkey après incubation	79
5.3	Aspect microscopique de l'isolat 1v et R4 après coloration de Gram (grossissement $\times 1000$)	80
5.4	Réaction au test de catalase observée chez les isolats 1v ,2p ,3p ,4R	81

5.5	Résultats du test oxydase pour les isolats 1V ,2p ,3p,4R,5S ,6v	83
5.6	Resultat de la galerie api20E de la souche 4R	86
5.7	Capture d'écran de l'affichage de grille d'identification de la souche KA 09 par le site web https://lab.upbm.org	87
5.8	Profils d'antibiogramme des isolats 1V, 2P, 3P et 4R illustrant différents niveaux de résistance aux antibiotiques testés	89
5.9	Concentrations minimales inhibitrices (échelle $\log_{10}$) de l'Amoxicilline seule et de l'Amoxicilline-clavulanate pour chaque souche. Les flèches ouvertes indiquent une CMI hors gamme testée ($>2560 \mu\text{g/mL}$).	92
5.10	Formation de biofilm chez les six isolats (moyenne $\pm$ écart-type), avec seuils de classification de Stepanović <i>et al.</i> (2007). La ligne pointillée grise indique OD_c (0,037), la ligne orange $2 \times \text{OD}_c$ (producteur modéré) et la ligne rouge $4 \times \text{OD}_c$ (fort producteur).	94
5.11	Évaluation de l'activité lytique par méthode de spot test sur les souches 4R, 1V et 3P.	96
5.12	Cinétique de croissance bactérienne (DO_{600} , moyenne $\pm$ écart-type, $n=3$) de t_0 à t_{3h30} . Les astérisques indiquent une interaction condition $\times$ temps significative (ANOVA à mesures répétées).	100
5.13	Variation du biofilm résiduel (DO_{570}) en présence de phages par rapport au témoin positif, par isolat.	102
5.14	Flux de traitement de l'application Animal Health Assistant, de la saisie des symptômes à l'orientation vers un professionnel.	106

Liste des tableaux

1.1	Indicateurs clés de la filière avicole algérienne (2020–2023) . . .	19
1.2	Mécanismes de résistance des principales entérobactéries avicoles aux antibiotiques critiques	26
2.1	Comparaison de la résistance des formes planctoniques et biofilm des entérobactéries avicoles	35
3.1	Feuille de route proposée pour le développement de PHAGOTECH AI	48
4.1	Antibiotiques utilisés pour l’antibiogramme	65
4.2	Classification des producteurs de biofilm selon la densité optique mesurée.	70
4.3	Principales entités du modèle de données de l’application. . .	72
5.1	Valeurs de pH des échantillons de litière de poulet.	76
5.2	Dénombrement de la flore cultivable sur milieu MacConkey (UFC/g de litière).	77
5.3	Résultats du test de la catalase.	81
5.4	Résultats du test de l’oxydase.	82
5.5	Résultats du test du citrate de Simmons.	84
5.6	Résultats du test mannitol–mobilité.	84
5.7	Résultats des tests Rouge de Méthyle (RM) et Voges Proskauer (VP).	85
5.8	Résultats du test de production d’indole.	85
5.9	Résultats de la galerie API 20 E de la souche 4R.	86
5.10	Résultats de l’antibiogramme des souches isolées et statut de résistance (MDR/XDR).	88
5.11	Concentrations minimales inhibitrices ($\mu\text{g/mL}$) de l’Amoxicilline et de l’Amoxicilline-clavulanate, et interprétation selon le CLSI (2025).	91
5.12	Valeurs de DO (492 nm) de la microplaque biofilm.	93
5.13	Classification des isolats selon leur capacité de formation de biofilm (seuils de Stepanović <i>et al.</i> , 2007).	94

5.14	Évaluation de l'activité lytique des bactériophages sur les isolats bactériens par la méthode des spots.	96
5.15	Résultats de l'ANOVA à mesures répétées (plan mixte) sur la cinétique de croissance (0–210 min).	100
5.16	Réduction du biofilm (DO_{570}) en présence de phages par rapport au témoin positif (T+), et significativité statistique. . . .	102

Introduction Générale

La résistance aux antimicrobiens (RAM) constitue aujourd’hui l’une des menaces sanitaires les plus préoccupantes à l’échelle mondiale, responsable de plus d’un million de décès directement imputables chaque année et associée à près de cinq millions de décès supplémentaires (Murray et al., 2022). Le secteur de l’élevage intensif, et en particulier la filière avicole, occupe une place centrale dans la dynamique de cette crise : l’usage extensif et souvent insuffisamment contrôlé des antibiotiques y a favorisé l’émergence de souches bactériennes multirésistantes, capables de persister dans l’environnement des élevages sous forme de biofilms particulièrement tolérants aux traitements conventionnels.

La litière avicole représente à cet égard un écosystème microbien d’un intérêt tout particulier. Constituant un réservoir riche en matière organique, en humidité et en nutriments, elle héberge une flore bactérienne abondante et diversifiée, au sein de laquelle les entérobactéries occupent une place prépondérante. Certaines de ces bactéries, en acquérant des mécanismes de résistance sophistiqués – production de bêta-lactamases à spectre étendu, hyperproduction enzymatique, imperméabilité membranaire –, compromettent gravement l’efficacité des antibiothérapies disponibles et constituent un risque réel de dissémination vers l’homme et l’environnement, selon l’approche intégrée « One Health ». Le contexte algérien n’échappe pas à cette problématique : plusieurs études récentes ont mis en évidence des taux préoccupants de résistance, notamment aux bêta-lactamines et aux fluoroquinolones, chez les entérobactéries isolées d’élevages avicoles nationaux (Belhout et al., 2021 ; Khennouchi et al., 2023).

Face aux limites croissantes de l’antibiothérapie conventionnelle et des mesures de désinfection classiques – notamment leur incapacité à pénétrer efficacement les biofilms bactériens établis –, des alternatives biologiques innovantes s’imposent. Parmi celles-ci, la phagothérapie, qui repose sur l’utilisation de bactériophages comme agents naturels de biocontrôle, suscite un intérêt scientifique croissant. Sa spécificité d’hôte élevée, son indépendance vis-à-vis des mécanismes de résistance aux antibiotiques, et son potentiel

d'action sur les communautés bactériennes structurées en biofilm en font une piste particulièrement prometteuse pour compléter, voire suppléer, les stratégies actuelles de contrôle.

C'est dans ce contexte que s'inscrit le présent travail, réalisé au sein du Laboratoire de Biotoxicologie, Pharmacognosie et Valorisation Biologique des Plantes de l'Université de Saïda Dr Moulay Tahar. Il se fixe pour objectifs d'isoler et de caractériser phénotypiquement les entérobactéries présentes dans la litière avicole de la région de Saïda, d'évaluer leur profil de résistance aux antibiotiques ainsi que leur capacité à former des biofilms, et enfin d'explorer, à travers des bactériophages isolés à partir d'eaux usées locales, le potentiel d'une stratégie de biocontrôle adaptée aux conditions et aux contraintes spécifiques des élevages avicoles algériens.

Chapitre 1

L'ÉLEVAGE AVICOLE EN ALGÉRIE ET LE PÉRIL DE L'ANTIBIORÉSISTANCE

1.1 Aperçu sur la filière avicole algérienne

1.1.1 Historique et évolution du secteur

La filière avicole algérienne constitue l'un des secteurs agro-alimentaires les plus dynamiques du pays. Son développement remonte aux années 1970, période durant laquelle l'État algérien a engagé une politique volontariste de modernisation agricole dans le cadre des plans de développement nationaux. La création de l'Office National des Aliments du Bétail (ONAB) en 1969 et de l'Office National Avicole (ONA) en 1972 ont posé les jalons d'une industrialisation progressive de la production avicole (Aggad et al., 2021).

Durant les décennies 1980–1990, le secteur a connu une libéralisation progressive, ouvrant la voie à l'initiative privée. Cette transition a engendré une multiplication rapide des unités de production, qu'elles soient de type industriel ou semi-intensif. Depuis les années 2000, l'Algérie a significativement accru ses capacités de production, portées par une demande intérieure croissante liée à la dynamique démographique (la population algérienne dépassant 45 millions d'habitants en 2023) et à l'évolution des habitudes alimentaires (Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural [MADR], 2023).

1.1.2 Importance socio-économique

La filière avicole représente un pilier fondamental de l'économie agricole algérienne. Elle contribue à hauteur de 25 à 30 % de la production nationale de protéines animales et emploie directement ou indirectement plusieurs centaines de milliers de personnes, couvrant l'ensemble de la chaîne de valeur : production d'aliments, élevage, abattage, transformation et distribution (FAO, 2022). Sur le plan nutritionnel, la viande de volaille et les œufs constituent des sources protéiques accessibles pour les ménages à revenus modestes, jouant ainsi un rôle crucial dans la sécurité alimentaire nationale.

D'un point de vue macro-économique, la filière génère un chiffre d'affaires estimé à plusieurs dizaines de milliards de dinars annuellement. Cependant, elle demeure fortement tributaire des importations de matières premières (soja, maïs, médicaments vétérinaires), ce qui la rend vulnérable aux fluctuations des marchés internationaux et aux variations du taux de change (Bensahla Tani et al., 2020).

1.1.3 Production nationale de viande blanche et d'œufs

Selon les données les plus récentes du Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural (2023), l'Algérie produit annuellement environ 400 000 à

450 000 tonnes de viande blanche (poulets de chair principalement) et plus de 6 milliards d'œufs de consommation. Ces chiffres positionnent l'Algérie parmi les premiers producteurs avicoles du Maghreb. Néanmoins, des disparités régionales importantes persistent, avec une concentration de la production dans les wilayas du centre et du nord-est du pays (Tizi-Ouzou, Boumerdès, Sétif, Constantine), tandis que les régions du sud et des hauts plateaux restent sous-exploitées (MADR, 2023 ; Rahal et al., 2020).

1.1.4 Types d'élevages

On distingue principalement deux grandes catégories d'élevages avicoles en Algérie :

- **Les élevages de poulets de chair (broilers) :**

ils constituent la composante dominante de la filière. Les animaux y sont élevés sur une période de 35 à 42 jours dans des conditions d'intensification élevée, avec des densités pouvant atteindre 15 à 20 animaux par m², ce qui engendre des pressions sanitaires considérables.

- **Les élevages de poules pondeuses :**

ils visent la production d'œufs de consommation. Les animaux y sont maintenus pendant 60 à 72 semaines en système de cages conventionnelles ou, plus rarement, en systèmes alternatifs (volières, plein air). La gestion sanitaire diffère substantiellement de celle des broilers, notamment en raison de la durée prolongée du cycle de production.

À ces deux catégories s'ajoutent, dans une moindre mesure, des élevages de dindes et de canards, ainsi que des élevages traditionnels de basse-cour, lesquels présentent des risques sanitaires particuliers liés à l'absence de contrôle vétérinaire régulier (Aggad et al., 2021).

1.1.5 Organisation des bâtiments d'élevage et gestion de la litière

Les bâtiments d'élevage algériens présentent une grande hétérogénéité selon le niveau d'intensification. Les élevages industriels disposent de structures modernes avec ventilation dynamique, régulation thermique automatisée, abreuvoirs nipples et chaînes d'alimentation mécanisées. À l'opposé, de

nombreux élevages semi-intensifs ou familiaux fonctionnent avec des infrastructures rudimentaires, insuffisamment ventilées et difficilement assainissables (Bensahla Tani et al., 2020).

La litière — constituée typiquement de copeaux de bois, de paille ou de balles de riz — joue un rôle central dans la dynamique microbiologique des bâtiments avicoles. Sa gestion est déterminante pour la maîtrise des agents pathogènes. Une litière humide, mal gérée, favorise la multiplication d'entérobactéries pathogènes telles qu'*Escherichia coli*, *Salmonella* spp. et *Campylobacter* spp. (De Reu et al., 2018). Des études menées dans des élevages algériens ont révélé que les charges bactériennes de la litière peuvent dépasser 10^8 UFC/g en milieu de bande, constituant un réservoir permanent de contamination (Rahal et al., 2020).

1.1.6 Principaux défis sanitaires

La filière avicole algérienne est confrontée à un spectre de défis sanitaires multidimensionnels. Parmi les plus préoccupants, on note :

- **Les maladies virales :**

la maladie de Newcastle, la maladie de Gumboro (bursite infectieuse) et, plus récemment, l'influenza aviaire hautement pathogène (IAHP H5N1) représentent des menaces permanentes pour les élevages.

- **Les infections bactériennes :**

la colibacillose, la salmonellose et la mycoplasmoses constituent les principales causes de mortalité et de saisies à l'abattoir.

- **Les problèmes de résistance aux antimicrobiens :**

l'usage extensif et souvent inapproprié des antibiotiques a favorisé l'émergence de souches multirésistantes, compromettant l'efficacité thérapeutique et menaçant la santé publique.

- **Les déficiences de biosécurité :**

l'absence ou l'insuffisance de mesures de biosécurité dans de nombreux élevages artisanaux favorise la circulation des agents pathogènes entre bandes et entre exploitations.



FIG. 1.1 : illustre les conditions d'élevage avicole semi-intensif évoquées dans le texte.

Tab. 1.1 : Indicateurs clés de la filière avicole algérienne (2020–2023)

Indicateur	Valeur (2020–2023)
Production de viande blanche (MADR, 2023)	~400 000–450 000 t/an
Production d'œufs (MADR, 2023)	> 6 milliards unités/an
Nombre d'exploitations avicoles (FAO, 2022)	~25 000–30 000
Emplois générés (direct + indirect) (Bensahla Tani et al., 2020)	> 500 000
Part dans la production nationale de protéines animales (FAO, 2022)	25–30 %
Taux de mortalité moyen en bande (broilers) (Aggad et al., 2021)	5–12 %

1.2 L'usage des antibiotiques en aviculture

1.2.1 Historique de l'utilisation des antibiotiques

L'introduction des antibiotiques en aviculture remonte aux années 1950, lorsque l'on découvrit fortuitement que les sous-produits de la fermentation

de *Streptomyces aureofaciens* (tétracyclines) amélioreraient la croissance des poulets. Cette observation conduisit à une utilisation massive de faibles doses d'antibiotiques comme facteurs de croissance dans les aliments du bétail, pratique qui s'est généralisée à l'échelle mondiale pendant plusieurs décennies (Van Boeckel et al., 2019). En Algérie, l'utilisation des antibiotiques en élevage avicole s'est développée parallèlement à l'intensification de la filière, sans cadre réglementaire suffisamment contraignant jusqu'à une période récente.

1.2.2 Antibiotiques les plus utilisés

En aviculture algérienne, le spectre des antibiotiques employés est large et couvre plusieurs classes pharmacologiques. Les familles les plus fréquemment utilisées comprennent :

- Les tétracyclines (oxytétracycline, doxycycline) : largement employées pour leur large spectre et leur faible coût, notamment contre les infections respiratoires et digestives.
- Les fluoroquinolones (enrofloxacin, ciprofloxacin) : antibiotiques critiqueusement importants pour la médecine humaine, utilisés massivement en médecine vétérinaire avicole algérienne malgré les risques de transfert de résistance.
- Les aminoglycosides (gentamicin, néomycin) : utilisés principalement par voie orale pour les entérites bactériennes.
- Les bêta-lactamines (amoxicilline) : prescrites pour les infections respiratoires et systémiques.
- Les macrolides (tylosine, érythromycin) : employés notamment contre les mycoplasmoses.
- Les sulfamides et triméthoprime (triméthoprime-sulfaméthoxazole) : utilisés dans les infections entériques à Gram négatif.

Une étude conduite par Hammoudi et al. (2022) dans plusieurs wilayas algériennes a révélé que les tétracyclines et les fluoroquinolones représentaient à elles seules plus de 60 % des antibiotiques utilisés dans les élevages avicoles enquêtés, avec des pratiques souvent inadéquates : sous-dosage, durées de traitement insuffisantes, automédication sans prescription vétérinaire.

1.2.3 Modalités d'utilisation

- **Utilisation thérapeutique** : les antibiotiques sont administrés pour traiter des infections avérées, principalement par voie orale via l'eau de boisson ou l'aliment. Cette voie d'administration collective présente l'inconvénient d'exposer l'ensemble du troupeau à l'antibiotique, y compris les individus sains, favorisant ainsi l'émergence de résistances.
- **Utilisation prophylactique** : les antibiotiques sont administrés de manière préventive, souvent en début de bande ou lors de périodes de stress (changements climatiques, vaccinations). Cette pratique, bien que courante, est particulièrement problématique car elle expose les bactéries commensales à des pressions sélectives continues (WHO, 2019).
- **Utilisation comme promoteurs de croissance** : bien qu'interdite dans l'Union Européenne depuis 2006, cette pratique demeure répandue dans de nombreux pays en développement, dont l'Algérie. L'administration de sous-doses d'antibiotiques améliore l'indice de conversion alimentaire et le gain de poids, mais génère une pression sélective chronique sur le microbiome intestinal, favorisant l'émergence et la dissémination de gènes de résistance (Tiseo et al., 2019).

1.2.4 Situation réglementaire en Algérie

Le cadre réglementaire algérien relatif à l'utilisation des médicaments vétérinaires est défini principalement par la loi n° 88-08 du 26 janvier 1988 relative à la médecine vétérinaire, complétée par plusieurs arrêtés ministériels ultérieurs. La loi prévoit en théorie l'obligation de prescription vétérinaire pour tout acte thérapeutique et l'interdiction de la vente directe d'antibiotiques aux éleveurs. Cependant, l'application effective de ces dispositions reste insuffisante, les éleveurs ayant souvent un accès libre aux antibiotiques via les pharmacies vétérinaires, sans contrôle systématique des prescriptions (Hammoudi et al., 2022).

En 2022, l'Algérie a adhéré au Plan d'Action National sur la Résistance aux Antimicrobiens (PAN-RAM) dans le cadre de l'approche One Health, marquant une volonté politique de renforcer la surveillance et la réglementation. Néanmoins, la mise en œuvre effective de ces mesures reste un défi majeur en raison des ressources humaines et matérielles limitées des services vétérinaires territoriaux (MADR, 2022).

1.2.5 Risques liés à l'utilisation excessive ou inappropriée

L'utilisation non rationnelle des antibiotiques en aviculture engendre des risques multidimensionnels : sélection et amplification de bactéries résistantes dans les élevages, contamination des aliments d'origine animale par des résidus antibiotiques, dissémination environnementale de gènes de résistance via les effluents d'élevage, et transfert potentiel de souches résistantes à l'homme via la chaîne alimentaire ou le contact direct. Ces risques s'inscrivent pleinement dans la problématique de la résistance aux antimicrobiens (RAM), reconnue par l'OMS comme l'une des dix principales menaces pour la santé mondiale (WHO, 2021).

1.3 Le phénomène de l'antibiorésistance

1.3.1 Définition et importance mondiale

L'antibiorésistance (ou résistance aux antimicrobiens, RAM) se définit comme la capacité d'un microorganisme à survivre et à se multiplier en présence de concentrations d'antibiotiques qui seraient normalement suffisantes pour l'inhiber ou le détruire. Ce phénomène est un processus évolutif naturel, mais il est considérablement accéléré par l'utilisation excessive, inappropriée et non rationnelle des antibiotiques chez l'homme et l'animal (WHO, 2021).

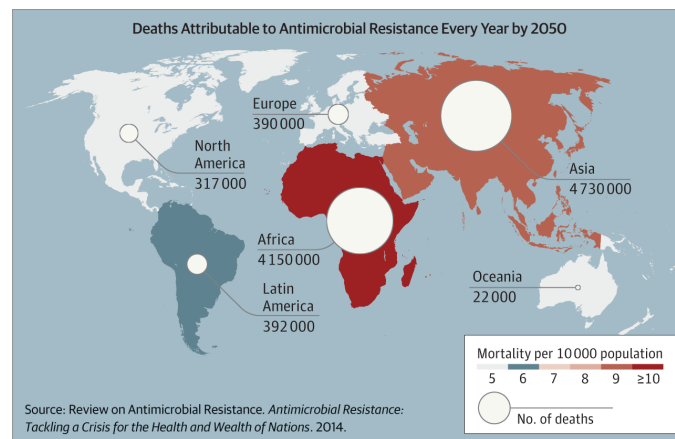


FIG. 1.2 : carte mondiale de la RAM et projections 2050 évoquées dans le texte.

Selon un rapport de la Commission Lancet sur la résistance aux antimicrobiens (Murray et al., 2022), la RAM a été directement responsable de

1,27 million de décès dans le monde en 2019, et associée à 4,95 millions de décès supplémentaires. Les projections à l'horizon 2050 sont alarmantes, avec une estimation de 10 millions de décès annuels imputables à la RAM si aucune mesure corrective d'envergure n'est prise. Sur le plan économique, les pertes associées à la RAM pourraient représenter 100 000 milliards de dollars d'ici 2050, avec un impact disproportionné sur les pays à revenus faibles et intermédiaires, dont l'Algérie (World Bank, 2022).

1.3.2 Mécanismes moléculaires de résistance bactérienne

Les bactéries ont développé une remarquable diversité de mécanismes moléculaires pour contrecarrer l'action des antibiotiques. Ces mécanismes peuvent être classés en quatre grandes catégories :

- Inactivation enzymatique de l'antibiotique : production d'enzymes capables d'hydrolyser ou de modifier chimiquement la molécule antibiotique, la rendant inactive. Les bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) et les carbapénémases constituent des exemples emblématiques de cette stratégie, particulièrement préoccupants en santé publique vétérinaire.
- Modification de la cible moléculaire : altération des protéines de liaison à la pénicilline (PLP), des ribosomes ou des topoisomérases bactériennes, de sorte que l'antibiotique ne peut plus se fixer efficacement à sa cible et exercer son activité inhibitrice.
- Efflux actif : expression de pompes d'efflux membranaires qui expulsent activement les molécules antibiotiques hors de la cellule bactérienne, maintenant leur concentration intracellulaire en dessous du seuil d'efficacité. Cette stratégie confère souvent une résistance à de multiples familles d'antibiotiques simultanément.
- Imperméabilité membranaire : modification des porines ou de la composition lipidique de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, réduisant la perméabilité et donc l'accumulation intracellulaire des antibiotiques.

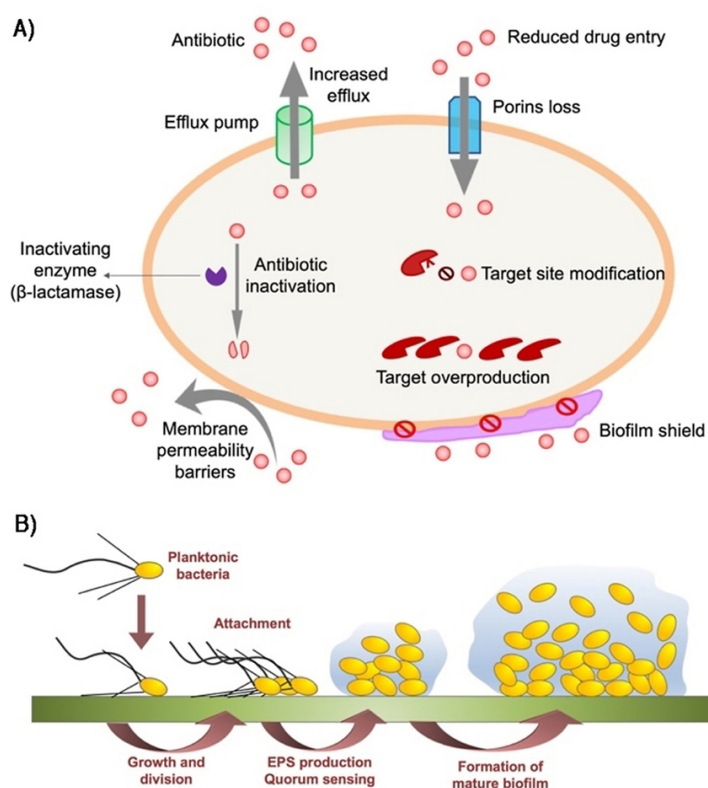


FIG. 1.3 : schéma des 4 mécanismes de résistance (inactivation enzymatique, modification de cible, efflux, imperméabilité).

Il est important de souligner que ces mécanismes peuvent coexister au sein d'une même souche bactérienne, générant des phénotypes de multirésistance (MDR) voire de résistance extensive (XDR), rendant les options thérapeutiques extrêmement limitées (Munita & Arias, 2016).

1.3.3 Transfert horizontal des gènes de résistance

L'une des caractéristiques les plus préoccupantes de la résistance bactérienne est sa dissémination par transfert horizontal de gènes (THG), qui permet aux déterminants génétiques de résistance de se propager au-delà des barrières d'espèces. Les principaux mécanismes de THG sont :

- La conjugaison : transfert direct de matériel génétique (plasmides, éléments transposables) entre deux bactéries en contact physique. Les plasmides porteurs de gènes de résistance (résistomes plasmidiques) peuvent se transférer entre entérobactéries de différentes espèces, voire de différents genres bactériens.

- La transduction : transfert de gènes bactériens via des bactériophages, avec des implications directes pour le sujet de ce mémoire.
- La transformation : captation et intégration d'ADN libre dans l'environnement par des bactéries compétentes.

Des études récentes ont démontré que des gènes de résistance d'importance critique pour la médecine humaine, tels que les gènes *mcr* (résistance à la colistine, antibiotique de dernier recours), ont été détectés dans des entérobactéries isolées d'élevages avicoles algériens (Belhout et al., 2021 ; Khennouchi et al., 2023), soulignant le caractère urgent de la problématique.

1.3.4 Facteurs favorisant l'émergence dans les élevages

Les élevages intensifs constituent des conditions environnementales particulièrement propices à l'émergence et à la sélection de bactéries résistantes : haute densité animale favorisant la transmission inter-individuelle, utilisation prophylactique et métaphylactique d'antibiotiques, persistance de souches dans la litière et les biofilms des équipements, et déficiences de biosécurité permettant l'introduction de souches extérieures. La contiguïté géographique d'élevages non étanches favorise en outre la dissémination horizontale entre unités de production (Kraemer et al., 2021).

1.3.5 Conséquences sanitaires et économiques

Sur le plan sanitaire vétérinaire, la résistance aux antimicrobiens se traduit par des échecs thérapeutiques, une prolongation des épisodes pathologiques, une augmentation de la mortalité et une nécessité de recourir à des molécules de plus en plus larges spectres, elles-mêmes soumises à une érosion rapide de leur efficacité. Économiquement, les pertes se matérialisent sous la forme de mortalités accrues, de dégradation des indices zootechniques, d'augmentation des coûts de traitement et de risques accrus de saisies à l'abattoir (EFSA & ECDC, 2022).

1.3.6 Concept One Health et risques pour la santé publique

Le concept One Health (Santé Unique), formalisé par l'OMS, l'OIE (OMSA depuis 2022) et la FAO dans leur cadre tripartite, postule que la santé de l'être humain est indissociablement liée à la santé animale et à celle des

écosystèmes. La résistance aux antimicrobiens en constitue l'illustration paradigmatique : les gènes de résistance identifiés dans les entérobactéries avicoles sont fréquemment retrouvés dans des isolats cliniques humains, démontrant la réalité du lien entre résistance vétérinaire et résistance humaine (Donado-Godoy et al., 2021 ; Murray et al., 2022).

En Algérie, des études moléculaires ont confirmé le partage de plasmides porteurs de BLSE entre des souches d'*Escherichia coli* isolées de volailles, d'aliments d'origine avicole et de patients hospitalisés (Belhout et al., 2021), illustrant concrètement le continuum One Health et justifiant l'urgence d'approches intégrées de contrôle.

Tab. 1.2 : Mécanismes de résistance des principales entérobactéries avicoles aux antibiotiques critiques

Bactérie	Famille d'antibiotique	Mécanisme de résistance dominant	Fréquence en Algérie
<i>E. coli</i> (APEC)	Bêta-lactamines	Production de BLSE (CTX-M)	Très élevée (>50%)
<i>E. coli</i> (APEC)	Fluoroquinolones	Mutations <i>gyrA</i> / <i>parC</i> + efflux	Élevée (40–60%)
<i>Salmonella</i> spp.	Tétracyclines	Efflux (TetA/TetB)	Très élevée (>60%)
<i>Salmonella</i> spp.	Aminoglycosides	Enzymes modificateurs (AME)	Modérée (20–35%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Carbapénèmes	Carbapénémases (OXA-48)	Émergente (<10%)
<i>E. coli</i>	Colistine	Mutation chromosomique + <i>mcr-1</i>	Émergente (5–15%)

Sources : Belhout et al. (2021) ; Khennouchi et al. (2023) ; Hammoudi et al. (2022).

Chapitre 2

Les Entérobactéries Avicoles et le Défi du Biofilm

2.1 Les principales bactéries pathogènes en aviculture

2.1.1 Présentation générale des entérobactéries

La famille des Enterobacteriaceae (ou Enterobacterales selon la classification phylogénétique révisée de Adeolu et al., 2016) regroupe un ensemble de bacilles à Gram négatif, aéro-anaérobies facultatifs, oxydase-négatifs, fermentant le glucose. Ces bactéries constituent une composante normale du microbiote intestinal des volailles, mais plusieurs espèces ou pathotypes sont responsables de maladies importantes, tant en médecine vétérinaire aviaire qu'en santé publique humaine.

La particularité épidémiologique des entérobactéries en aviculture réside dans leur ubiquité : elles colonisent l'intestin des animaux, contaminent la litière, l'eau, l'alimentation, les surfaces des bâtiments et les équipements, et peuvent persister dans l'environnement pendant des semaines à des mois, notamment sous forme de biofilms. Leur plasticité génomique, facilitée par des mécanismes de transfert horizontal de gènes très actifs, leur permet d'acquérir rapidement des déterminants de résistance (Poirel et al., 2018).

Escherichia coli aviaire pathogène (APEC)

Les *E. coli* aviaires pathogènes (Avian Pathogenic *Escherichia coli*, APEC) constituent l'une des principales causes de pertes économiques dans la filière avicole mondiale. Contrairement aux *E. coli* commensaux, les APEC sont dotés d'un répertoire de facteurs de virulence spécifiques leur permettant de coloniser des sites extra-intestinaux et de provoquer la colibacillose aviaire, une pathologie polymorphe englobant la péricardite, la périhépatite, l'aérosacculite, la synovite et la septicémie (Kathayat et al., 2021).

Les facteurs de virulence caractéristiques des APEC incluent les adhésines (fimbriae de type 1 et P), les sidérophores (aérobactine, yersiniabactine) permettant la captation du fer, les toxines (hémolysines, cytotoxines nécrosantes), les protéines de résistance au sérum et des systèmes de sécrétion de type III (T3SS) et VI (T6SS). Des travaux récents ont mis en évidence des similitudes génomiques importantes entre les APEC et certains *E. coli* uropathogènes humains (UPEC), soulevant la question du risque zoonotique associé à ces souches (Poirel et al., 2018 ; Kathayat et al., 2021). En Algérie, les APEC producteurs de BLSE sont largement répandus dans les élevages avicoles. Des études menées par Belhout et al. (2021) et Khennouchi et al. (2023) ont retrouvé des taux de prévalence de BLSE chez les *E. coli* avicoles compris entre 40 et 65% selon les régions enquêtées, avec une prédominance

du type moléculaire CTX-M-15, le plus répandu au niveau mondial.

2.1.2 *Salmonella* spp.

Le genre *Salmonella* comprend deux espèces, *S. enterica* et *S. bongori*, la première regroupant la très grande majorité des sérotypes d'intérêt vétérinaire et médical. En aviculture, les principales entités pathogènes sont *Salmonella Pullorum* et *Salmonella Gallinarum* (responsables de la pullorose et de la typhose aviaire, maladies à caractère systémique grave), ainsi que de nombreux sérotypes zoonotiques dont *Salmonella Enteritidis* et *Salmonella Typhimurium*, responsables de salmonelloses non typhiques chez l'homme (EFSA & ECDC, 2022).

L'importance zoonotique de *Salmonella* en aviculture ne peut être surestimée : les volailles et les œufs constituent la principale source alimentaire de *Salmonella* pour les consommateurs humains dans le monde. La Commission européenne estime que les infections humaines à *Salmonella* d'origine aviaire représentent plusieurs centaines de milliers de cas annuels dans les pays industrialisés. En Algérie, les données de surveillance épidémiologique humaine restent lacunaires, mais des études ponctuelles ont mis en évidence une prévalence significative de *Salmonella* dans les viandes de volaille commercialisées (Rahal et al., 2020).

2.1.3 Autres entérobactéries d'intérêt vétérinaire

Au-delà d'*E. coli* et de *Salmonella*, d'autres membres des Enterobacterales présentent un intérêt croissant en pathologie aviaire :

- ***Klebsiella pneumoniae* :**

opportuniste majeur, capable de provoquer des pneumopathies et des septicémies, notamment chez les oiseaux immunodéprimés. La détection de souches productrices de carbapénémases (notamment OXA-48) dans des élevages algériens constitue une alerte épidémiologique de premier ordre (Djahoudi et al., 2022).

- ***Enterobacter cloacae* complex :**

fréquemment isolé de litières de volailles, cet opportuniste est porteur de nombreux mécanismes de résistance et peut contaminer les carcasses lors de l'abattage.

- **Proteus mirabilis :**

agent de pathologies diverses, notamment des dermatites et des infections articulaires chez les broilers à forte densité.

- **Yersinia pseudotuberculosis et Y. enterocolitica :**

peuvent provoquer des yersiniozes chez les volailles et présentent un intérêt zoonotique documenté.

2.1.4 Sources de contamination et colonisation de la litière

La contamination des élevages avicoles par les entérobactéries est d'origine multifactorielle. Les sources primaires comprennent les poussins d'un jour (portage vertical par les œufs ou contamination horizontale en couvoir), l'eau de boisson de mauvaise qualité microbiologique, les aliments composés mal stockés, les rongeurs et autres nuisibles, les intervenants humains, et le matériel et équipements insuffisamment désinfectés entre les bandes (Kraemer et al., 2021).



FIG. 2.1 : litière avicole (copeaux de bois) comme réservoir bactérien.

La litière constitue une matrice particulièrement favorable à la persistance et à la multiplication des entérobactéries : elle fournit des nutriments (fientes, résidus alimentaires), maintient une température et une humidité favorables à la croissance bactérienne, et offre des surfaces propices à la formation de biofilms. Des concentrations d'*E. coli* de l'ordre de 10^7 à 10^9 UFC/g de litière sont régulièrement rapportées en fin de bande, constituant un réservoir de contamination persistant pour la bande suivante si la gestion de la litière

(retournement, réduction d'humidité, désinfection) n'est pas optimale (De Reu et al., 2018).

2.2 Le biofilm bactérien

2.2.1 Définition et généralités

Un biofilm est défini comme une communauté structurée de microorganismes, encapsulés dans une matrice extracellulaire autosécrétée et adhérents à une surface biotique ou abiotique. Selon la définition canonique de Costerton et al. (1999), le biofilm représente le mode de vie prédominant des bactéries dans les environnements naturels, par opposition à la forme planctonique (bactéries libres), généralement considérée comme minoritaire dans les écosystèmes microbiens complexes.

Les biofilms présentent des propriétés phénotypiques radicalement différentes de celles des bactéries planctoniques équivalentes : métabolisme adapté, expression génique modifiée, tolérance accrue aux stress physico-chimiques, et résistance considérablement augmentée aux antibiotiques et aux désinfectants. Ces caractéristiques font des biofilms une problématique majeure en hygiène vétérinaire et en sécurité alimentaire (Flemming et al., 2016).

2.2.2 Composition et structure

La matrice extracellulaire polymérique (MEP) du biofilm est un système complexe dont la composition varie selon les espèces bactériennes impliquées et les conditions environnementales. Elle est constituée principalement de :

- Polysaccharides extracellulaires (PSE) : tels que la cellulose, le collagène, la pellicule et les capsules polysaccharidiques chez les entérobactéries. Les PSE assurent la cohésion mécanique du biofilm et forment une barrière physique contre les agents antimicrobiens.
- Protéines extracellulaires : curli (fibres amyloïdes d'*E. coli*), fimbriae et autres adhésines, contribuant à l'adhésion et à l'architecture du biofilm.
- ADN extracellulaire (ADNe) : libéré par lyse cellulaire ou par sécrétion active, l'ADNe joue un rôle structural important dans les stades précoces de la formation du biofilm et contribue à sa stabilité.
- Eau : représentant 85 à 97% du volume total du biofilm, l'eau est indispensable au transport des nutriments et des métabolites au sein

de la matrice.

Du point de vue structural, les biofilms matures présentent une organisation tridimensionnelle complexe, avec des micro-colonies séparées par des canaux aqueux permettant la circulation des nutriments et l'évacuation des déchets métaboliques. Cette architecture génère des gradients de concentration en oxygène, en pH et en nutriments, auxquels correspondent des sous-populations bactériennes aux phénotypes métaboliques distincts (Flemming et al., 2016).

2.2.3 Étapes de formation du biofilm

Étape 1 : Adhésion initiale réversible

Dans un premier temps, des bactéries planctoniques s'approchent d'une surface sous l'effet de forces hydrodynamiques et de gradients chimiotactiques. Des interactions physico-chimiques faibles (forces de Van der Waals, liaisons hydrophobes) permettent une adhésion initiale réversible, modulée par les propriétés de surface du substrat (hydrophobicité, charge électrique, rugosité) et de la bactérie.

Étape 2 : Colonisation et adhésion irréversible

En quelques minutes à quelques heures, les interactions bactérie-surface deviennent irréversibles grâce à l'expression d'adhésines spécifiques (fimbriae, pili, curli). Les bactéries commencent à se diviser et à sécréter les premiers composants de la matrice extracellulaire, initiant la formation d'une monocouche cellulaire.

Étape 3 : Maturation du biofilm

Sur une période allant de quelques heures à plusieurs jours, le biofilm s'épaissit et développe son architecture tridimensionnelle caractéristique. Les systèmes de signalisation quorum sensing coordonnent l'expression des gènes impliqués dans la production de matrice, la formation de micro-colonies et la résistance aux stress. Les biofilms matures peuvent atteindre des épaisseurs de quelques dizaines à plusieurs centaines de micromètres.

Étape 4 : Dispersion et dissémination

Dans la phase finale, des bactéries se détachent du biofilm, soit de manière passive (forces de cisaillement hydrodynamique), soit de manière active

et régulée (expression de dispersines, dégradation de la matrice). Ces bactéries dispersées retrouvent un phénotype planctonique et peuvent coloniser de nouvelles surfaces, propageant ainsi la contamination à distance (Bjarnsholt et al., 2013).

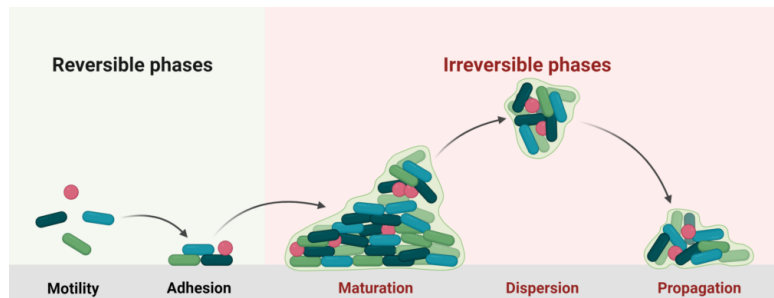


FIG. 2.2 : schéma des 4 étapes de formation du biofilm.

2.2.4 Biofilms dans les bâtiments avicoles

Dans les élevages avicoles, les biofilms se forment sur une grande variété de surfaces : lignes d'eau (canalisations, abreuvoirs nipples, réservoirs), chaînes d'alimentation, sol en béton, grillages de cages, et surfaces murales. Les circuits d'eau représentent des environnements particulièrement propices à la formation de biofilms, en raison du flux continu d'eau et de nutriments, de la température stable (20–28°C), et de l'impossibilité d'une désinfection mécanique complète dans les systèmes fermés.

Des études récentes ont démontré que des biofilms d'*E. coli* et de *Salmonella* établis sur des surfaces d'élevage peuvent persister pendant plusieurs semaines à plusieurs mois, résistant aux protocoles standard de nettoyage et de désinfection (Bridier et al., 2015 ; De Reu et al., 2018). Ces biofilms persistants représentent un réservoir primaire de contamination inter-bandes, mettant en échec les mesures classiques de vide sanitaire.

2.2.5 Mécanismes de résistance associés aux biofilms

La résistance accrue des bactéries en biofilm aux agents antimicrobiens est un phénomène multifactoriel faisant intervenir plusieurs mécanismes complémentaires :

- **Barrière physico-chimique de la matrice :**

les polysaccharides et protéines de la MEP peuvent directement adsorber, dégrader ou ralentir la diffusion des antibiotiques et des désinfectants, empêchant leur pénétration à des concentrations efficaces dans les couches profondes du biofilm.

- **Métabolisme réduit des cellules profondes :**

dans les zones hypoxiques du biofilm, les bactéries entrent dans un état de faible activité métabolique (bactéries persistantes, dormant-like cells), rendant inopérants les antibiotiques dont le mécanisme d'action nécessite une activité cellulaire active (bêta-lactamines, aminoglycosides).

- **Expression de gènes de résistance spécifiques au biofilm :**

des études transcriptomiques ont révélé que les bactéries en biofilm sur-expriment certains gènes de résistance (pompes d'efflux, enzymes d'inactivation) par rapport à leurs homologues planctoniques.

- **Communication quorum sensing :**

ce système de signalisation inter-bactérienne coordonne la réponse collective du biofilm aux agents antimicrobiens, notamment en régulant l'expression de la matrice extracellulaire et des facteurs de résistance.

En conséquence, la concentration minimale inhibitrice (CMI) requise pour éradiquer des bactéries en biofilm peut être 10 à 1000 fois supérieure à celle nécessaire pour inhiber les bactéries planctoniques équivalentes, rendant les biofilms cliniquement imperméables aux traitements antibiotiques conventionnels (Chua et al., 2016).

2.3 Limites des stratégies actuelles de décontamination

2.3.1 Désinfection chimique conventionnelle

Les protocoles classiques de décontamination des élevages avicoles reposent sur l'utilisation de désinfectants chimiques appartenant à différentes

Tab. 2.1 : Comparaison de la résistance des formes planctoniques et biofilm des entérobactéries avicoles

Propriété	Forme planctonique	Forme biofilm	Facteur d'augmentation
CMI (antibiotiques)	Valeur de référence	10–1000× supérieure	10–1000×
Résistance aux désinfectants	Faible à modérée	Très élevée	100–1000×
Susceptibilité aux phages	Élevée	Réduite mais existante	2–10×
Taux de mutation	Basal	Augmenté (SOS)	Jusqu'à 100×
Transfert horizontal de gènes	Faible	Très facilité	100–10000×
Tolérance au dessèchement	Faible	Élevée	10–100×

Sources : Flemming et al. (2016) ; Chua et al. (2016) ; Bjarnsholt et al. (2013).

familles : ammoniums quaternaires (QAC), aldéhydes (glutaraldéhyde, formaldéhyde), acides peracétiques, composés chlorés et peroxyde d'hydrogène. Ces produits présentent une efficacité bien établie contre les bactéries planctoniques, mais leur action sur les biofilms est considérablement réduite par les mécanismes décrits précédemment.

De plus, l'utilisation répétée de ces désinfectants à des concentrations sous-optimales a conduit à l'émergence de bactéries tolérantes, voire résistantes, aux agents désinfectants. Des phénomènes de co-résistance entre la tolérance aux biocides et la résistance aux antibiotiques ont été documentés, notamment via la sur-expression de pompes d'efflux multi-substrats (Guo et al., 2020). Ces données soulèvent des préoccupations majeures quant à la capacité des désinfectants conventionnels à contrôler efficacement les entérobactéries multirésistantes dans les élevages.

2.3.2 Antibiothérapie

L'antibiothérapie, pilier historique de la lutte contre les infections bactériennes en aviculture, se heurte aux limitations croissantes imposées par la

résistance aux antimicrobiens. Les taux élevés de résistance observés chez les entérobactéries avicoles algériennes aux principales familles d’antibiotiques (tétracyclines, fluoroquinolones, bêta-lactamines) réduisent considérablement les options thérapeutiques disponibles. Par ailleurs, l’incapacité des antibiotiques à pénétrer et à éradiquer les biofilms bactériens établis représente une limitation fondamentale de cette approche.

2.3.3 Biosécurité classique

Les mesures de biosécurité (vide sanitaire, désinfection des entrées, contrôle des accès, gestion des cadavres, traitement des effluents) constituent la base de la prévention sanitaire en élevage. Cependant, leur efficacité est souvent compromise en Algérie par des facteurs structurels : insuffisance d’investissement dans les infrastructures d’assainissement, manque de formation du personnel, déficit de contrôle et de suivi vétérinaire régulier, et coexistence de petites exploitations artisanales et industrielles au sein des mêmes bassins de production, facilitant la dissémination des agents pathogènes (Bensahla Tani et al., 2020).

2.3.4 Cas des élevages algériens et nécessité d’approches innovantes

Les élevages avicoles algériens présentent des vulnérabilités spécifiques qui aggravent les limitations des stratégies classiques. La prévalence élevée d’entérobactéries multirésistantes productrices de BLSE, la persistance de biofilms bactériens résistants aux désinfectants habituels, les conditions structurelles sous-optimales de nombreux bâtiments d’élevage, et les contraintes économiques des producteurs constituent un ensemble de facteurs qui rendent insuffisantes les approches conventionnelles et imposent le développement d’alternatives innovantes.

Dans ce contexte, la phagothérapie — utilisation de bactériophages comme agents biocontrôle — émerge comme une solution prometteuse, complémentaire aux mesures sanitaires classiques, capable de cibler spécifiquement les bactéries pathogènes multirésistantes, y compris celles organisées en biofilms, sans affecter le microbiote bénéfique ni induire des phénomènes de résistance aux antibiotiques (Kortright et al., 2019).

Chapitre 3

La Phagothérapie et le Biocontrôle comme Stratégie d'Innovation

3.1 Biologie des bactériophages

3.1.1 Historique de la découverte

Les bactériophages (du grec phagein : dévorer, et de bacterion : bâtonnet) ont été découverts indépendamment par le bactériologiste anglais Frederick Twort en 1915 et par le franco-canadien Félix d’Hérelle en 1917. D’Hérelle est généralement crédité de la paternité du terme et du concept de bactériophage, ainsi que des premières applications thérapeutiques. Dès les années 1920–1930, il développa des préparations phagiques utilisées pour traiter des épidémies de dysenterie bacillaire en France, en Inde et en Égypte, avec des résultats encourageants mais méthodologiquement non contrôlés selon les standards modernes.

L’avènement des antibiotiques dans les années 1940–1950 relégua la phagothérapie au second plan en Occident, mais elle continua d’être pratiquée et développée en Union Soviétique et dans les pays d’Europe de l’Est (Géorgie en particulier, avec l’Institut Eliava de Tbilissi, fondé en 1923 et toujours actif). La crise mondiale de l’antibiorésistance a conduit depuis les années 2000 à un regain d’intérêt considérable pour la phagothérapie, avec une multiplication des recherches fondamentales et cliniques à l’échelle internationale (Abedon et al., 2017).

3.1.2 Classification taxonomique

La classification des bactériophages a récemment connu une révision profonde sous l’impulsion du Comité International de Taxonomie des Virus (ICTV). Selon la classification actuelle (ICTV, 2023), les phages appartiennent au royaume Duplodnaviria (phages à ADN double brin) ou Monodnaviria (phages à ADN simple brin), ainsi qu’à plusieurs autres royaumes pour les phages à ARN. Les principales familles morphologiques pertinentes pour les applications thérapeutiques incluent :

- Caudoviricetes (anciennement ordre Caudovirales) : phages à queue (Myovirus, Siphovirus, Podovirus), représentant la majorité des phages connus et présentant un intérêt thérapeutique majeur grâce à leur efficacité lytique.
- Microviridae : phages à capside icosaédrique et ADN simple brin circulaire.
- Leviviridae et Fiersviridae : phages filamenteux ou à ARN, moins utilisés en phagothérapie. Pour les applications de biocontrôle en aviculture,

ce sont principalement les phages de l'ordre des Caudoviricetes, à cycle lytique strict, qui sont sélectionnés en raison de leur efficacité bactéricide directe et de l'absence de capacité lysogénique pouvant porter des gènes de virulence ou de résistance (Kortright et al., 2019).

3.1.3 Morphologie et structure

La majorité des bactériophages d'intérêt thérapeutique présentent une organisation morphologique commune comprenant :

- **Une tête (capside) :**

structure protéique icosaédrique ou allongée encapsidant le matériel génétique (ADN ou ARN, double ou simple brin). La taille de la capsidie varie de 20 à 200 nm selon les familles.

- **Une queue :**

structure protéique permettant la reconnaissance et la fixation à la bactérie hôte. La morphologie de la queue (contractile chez les Myovirus, non contractile longue chez les Siphovirus, très courte chez les Podovirus) détermine en partie les propriétés fonctionnelles du phage.

- **Des fibres de queue (tail fibers/spikes) :**

protéines de reconnaissance hautement spécifiques qui interagissent avec des récepteurs bactériens de surface (lipopolysaccharides, protéines de membrane externe, pili), déterminant le spectre d'hôte du phage.

3.1.4 Cycle lytique et cycle lysogénique

Cycle lytique :

Il est caractérisé par une séquence d'événements conduisant à la lyse rapide de la bactérie hôte et à la libération d'une nouvelle génération de phages. Ce cycle comprend l'adsorption (fixation du phage aux récepteurs spécifiques de la bactérie hôte), l'injection du génome phagique, le détournement de la machinerie cellulaire bactérienne pour la réplication du génome et la synthèse des protéines virales, l'assemblage des nouvelles particules phagiques, et la

lyse de la bactérie avec libération de 50 à 300 phages fils par cycle (période de latence : 20–60 minutes selon les conditions). Les phages strictement lytiques sont les candidats de choix pour la phagothérapie.

Cycle lysogénique

Dans le cycle lysogénique, le génome phagique (prophage) s'intègre dans le chromosome bactérien ou se maintient sous forme de plasmide circulaire, se répliquant passivement avec la bactérie hôte pendant un nombre variable de générations. L'induction (stress UV, agents alkylants) conduit à l'excision du prophage et à l'entrée dans le cycle lytique. Les phages tempérés (capables de lysogénie) sont exclus des applications thérapeutiques car ils peuvent potentiellement transduire des gènes de virulence ou de résistance entre bactéries, et ont un moindre pouvoir bactéricide immédiat (Abedon et al., 2017).

3.1.5 Critères de sélection des phages thérapeutiques

La sélection rigoureuse de phages pour des applications thérapeutiques ou de biocontrôle obéit à un cahier des charges strict défini par les instances scientifiques et réglementaires internationales. Les critères essentiels sont :

- Cycle lytique strict (absence de lysogénie).
- Large spectre d'hôte couvrant les souches cibles (wild-type et multirésistantes).
- Efficacité lytique élevée (taille de plage lytique, ratio phage/bactérie optimal).
- Absence de gènes codant pour des toxines, facteurs de virulence ou gènes de résistance aux antibiotiques dans le génome phagique (vérification par séquençage complet du génome).
- Stabilité physico-chimique satisfaisante (tolérance à une gamme de pH et de températures compatibles avec les conditions d'utilisation).
- Cinétique d'adsorption et de multiplication compatibles avec des applications pratiques.

3.2 Le biocontrôle par phagothérapie

3.2.1 Définition et principes

La phagothérapie désigne l'utilisation de bactériophages à des fins thérapeutiques, préventives ou sanitaires, dans le but de réduire les populations de bactéries pathogènes cibles. Le terme biocontrôle phagique est plus spécifiquement employé lorsque les phages sont utilisés non pas pour traiter une infection clinique établie, mais pour décontaminer un environnement, un aliment ou une surface. Dans le contexte avicole, ces deux approches sont complémentaires et trouvent chacune des applications distinctes (Sulakvelidze & Barrow, 2005).

Le principe fondamental de la phagothérapie repose sur la capacité des phages à reconnaître spécifiquement leurs bactéries hôtes via des interactions moléculaires hautement sélectives (analogues à une interaction ligand-récepteur), à se répliquer exponentiellement in situ au contact de la population bactérienne cible, et à lyser ces bactéries sans affecter les cellules eucaryotes de l'hôte ni les bactéries non cibles (Kortright et al., 2019).

3.2.2 Applications en médecine humaine

Les applications de la phagothérapie en médecine humaine connaissent un regain d'intérêt considérable depuis le début des années 2010, porté par la crise de l'antibiorésistance. Plusieurs cas cliniques emblématiques ont été rapportés dans la littérature médicale internationale, incluant le traitement de bactériémies à *Acinetobacter baumannii* XDR (Schooley et al., 2017), d'infections endovasculaires à *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), et d'infections chroniques à *Pseudomonas aeruginosa* chez des patients mucoviscidosiques.

L'essai clinique PhagoBurn (2015–2017), premier essai randomisé contrôlé européen de phagothérapie humaine, a testé un cocktail phagique anti-*Pseudomonas aeruginosa* dans les brûlures infectées. Les résultats, bien que mitigés en raison d'une inactivation partielle du cocktail phagique, ont fourni des données pharmacocinétiques et d'innocuité précieuses pour le développement futur (Jault et al., 2019). Plus récemment, l'Autorité Européenne des Médicaments (EMA) a publié des lignes directrices pour le développement de préparations phagiques en tant que médicaments biologiques innovants (EMA, 2022).

3.2.3 Applications vétérinaires et en aviculture

En médecine vétérinaire, la phagothérapie a été évaluée dans de nombreux modèles animaux et dans des conditions terrain. En aviculture spécifiquement, les travaux pionniers de Barrow et al. (1998) ont démontré la capacité de phages spécifiques à réduire les charges de *Salmonella* dans les intestins des poussins expérimentalement infectés, ouvrant la voie à une littérature abondante.

Des études de référence ont établi les preuves de concept suivantes en aviculture :

- Contrôle de *Salmonella* Enteritidis et Typhimurium : des cocktails de phages appliqués par voie orale chez des poulets de chair ont réduit significativement les charges de *Salmonella* dans le contenu intestinal et les cæca, diminuant le risque de contamination des carcasses à l'abattoir (Andreatti Filho et al., 2007 ; Meredith et al., 2022).
- Contrôle des APEC : des phages anti-*E. coli* appliqués par aérosol dans des bâtiments d'élevage ou par voie orale ont réduit la mortalité liée à la colibacillose aviaire dans des conditions expérimentales et de terrain (Huff et al., 2006).
- Décontamination des surfaces : l'application de préparations phagiques sur des surfaces contaminées par des entérobactéries a démontré une réduction significative des charges bactériennes et une activité anti-biofilm documentée (Tsonos et al., 2014).

3.2.4 Applications en sécurité alimentaire

Dans le domaine de la sécurité alimentaire, les phages ont été approuvés comme additifs alimentaires ou agents de décontamination par certaines autorités réglementaires internationales. Aux États-Unis, la FDA a approuvé plusieurs préparations phagiques pour la décontamination des aliments (ListShield™ anti-*Listeria monocytogenes* sur les charcuteries, SalmoFresh™ anti-*Salmonella* sur les produits carnés). Ces approbations constituent des précédents réglementaires importants pour le développement de formulations similaires dans d'autres pays (FDA, 2019).

3.2.5 Activité anti-biofilm des bactériophages

L'activité des bactériophages contre les biofilms bactériens constitue l'une de leurs propriétés les plus remarquables et potentiellement les plus utiles en

contexte avicole. Plusieurs mécanismes expliquent la capacité de phages à pénétrer et à dégrader les biofilms :

- Production de polysaccharide dépolymérase (PDP) : de nombreux phages encodent dans leur génome des enzymes capables de dégrader les polysaccharides de la matrice extracellulaire (exo- ou endopolysaccharide dépolymérase), facilitant la pénétration des phages dans les couches profondes du biofilm. Ces enzymes peuvent être localisées dans les fibres de queue ou les spikes du phage.
- Activité lytique sur les bactéries métaboliquement peu actives : certains phages sont capables d'infecter et de lyser des bactéries en état de quiescence métabolique, caractéristiques des couches profondes du biofilm, contrairement aux antibiotiques qui nécessitent une bactérie en phase de croissance active.
- Lyse de l'intérieur : une fois le phage entré dans la bactérie hôte au sein du biofilm, la lyse bactérienne libère des phages fils et des enzymes lytiques qui peuvent attaquer les bactéries voisines, propageant la désintégration du biofilm de l'intérieur vers l'extérieur.

De multiples études ont démontré des réductions de biofilms d'*E. coli* et de *Salmonella* allant de 2 à 5 $\log_{10}$ UFC/cm² après application de préparations phagiques, dans des conditions simulant les surfaces d'élevage (Tsonos et al., 2014 ; Pires et al., 2017).

3.3 Avantages et défis de la formulation PHAGOTECH AI

3.3.1 Concept de PHAGOTECH AI

PHAGOTECH AI est le nom de code proposé pour une formulation innovante de bactériophages développée spécifiquement pour le contexte algérien. Ce projet vise à concevoir un cocktail phagique multicomposant, ciblant simultanément les principales entérobactéries pathogènes des élevages avicoles algériens (*E. coli* APEC, *Salmonella* spp., *Klebsiella pneumoniae*), y compris leurs souches multirésistantes et leurs formes biofilm. L'approche PHAGOTECH AI intègre les principes de la phagothérapie moderne et du biocontrôle environnemental dans une formulation stabilisée adaptée aux contraintes logistiques des élevages algériens.

Le terme « PHAGOTECH » évoque la dimension biotechnologique du projet centrée sur les bactériophages, tandis que « AI » (Artificial Intelligence) souligne l'intégration d'un volet numérique d'aide à la décision basé sur l'intelligence artificielle (Chapitre V, section 5.8), conçu spécifiquement pour accompagner la stratégie de biocontrôle dans le contexte algérien.

3.3.2 Avantages spécifiques de l'approche phagique

Spécificité bactérienne élevée :

Contrairement aux antibiotiques à large spectre, les phages présentent une spécificité d'hôte très étroite, ciblant des espèces, voire des sérotypes ou des biotypes spécifiques. Cette propriété permet une action précise sur les bactéries pathogènes cibles sans perturber le microbiote intestinal bénéfique des volailles, contribuant ainsi à maintenir un équilibre écologique intestinal favorable à la santé et aux performances zootechniques (Loc Carrillo & Connerton, 2011).

Efficacité contre les souches multirésistantes :

La résistance bactérienne aux antibiotiques ne confère aucune protection contre les phages. En effet, les mécanismes moléculaires de la résistance aux antibiotiques (pompes d'efflux, bêta-lactamases, modifications de cibles) n'interfèrent pas avec les mécanismes d'infection phagique, qui reposent sur la reconnaissance de récepteurs de surface bactériens indépendants. Ainsi, des phages peuvent être actifs sur des souches BLSE, SARM ou même productrices de carbapénémases, pour lesquelles les options antibiotiques sont épuisées (Kortright et al., 2019).

Action anti-biofilm démontrée :

Comme décrit au chapitre précédent, les phages dotés d'enzymes dépolymérasas sont capables de pénétrer et de dégrader la matrice extracellulaire des biofilms, permettant l'accès aux bactéries enchâssées. Cette propriété représente un avantage décisif par rapport aux désinfectants chimiques et aux antibiotiques, incapables de pénétrer efficacement les biofilms épais.

Auto-amplification in situ :

Les phages ont la capacité unique de se répliquer exponentiellement au contact de leurs bactéries hôtes, augmentant leur concentration précisément là où les bactéries cibles sont présentes. Cette propriété d'auto-amplification

signifie qu’une dose initiale relativement modeste peut conduire à une réduction drastique de la population bactérienne cible, avec un effet « boule de neige » bénéfique du point de vue de l’efficacité.

Sécurité biologique :

Les phages sont présents naturellement en quantités astronomiques dans les environnements biosphériques (estimés à 10^{31} particules sur Terre) et sont ingérés quotidiennement par les êtres vivants via l’alimentation et l’eau. Leur sécurité pour l’hôte animal et humain est solidement établie par des décennies de phagothérapie clinique et par de nombreuses études de sécurité formelles. Les phages sélectionnés pour PHAGOTECH AI, strictement lytiques et dépourvus de gènes de virulence ou de résistance vérifiés par séquençage génomique complet, présenteront un profil de sécurité optimal (Górski et al., 2020).

3.3.3 Défis de formulation et de stabilité

Le développement d’une formulation phagique commercialement viable et adaptée aux conditions d’un pays en développement comme l’Algérie soulève des défis techniques et logistiques considérables.

Stabilité des phages :

Les bactériophages sont des entités biologiques sensibles aux variations de température, de pH, de lumière UV, de salinité et à certains agents chimiques. Le maintien d’une activité lytique satisfaisante dans les conditions climatiques algériennes (températures estivales pouvant dépasser 40°C dans les régions du centre et du sud) constitue un défi majeur. Des approches de stabilisation incluant la lyophilisation, l’encapsulation dans des systèmes biopolymériques (alginate, chitosane, whey protein), et l’utilisation d’excipients stabilisants (saccharose, tréhalose) ont démontré leur capacité à prolonger significativement la durée de vie des préparations phagiques (Leung et al., 2018 ; Malik et al., 2017).

Conservation et stockage :

La chaîne du froid requise pour la conservation des préparations phagiques liquides (2–8°C) peut représenter un obstacle logistique dans les zones rurales ou les régions où l’infrastructure frigorifique est insuffisante. Des formulations lyophilisées ou encapsulées, stables à température ambiante, représentent une

solution adaptée au contexte algérien et constituent un axe de développement prioritaire pour PHAGOTECH AI.

Spectre d'hôte et évitement de la résistance phagique :

Les bactéries peuvent développer des mécanismes de résistance aux phages (modification ou perte des récepteurs d'adsorption, systèmes anti-phage de restriction-modification, systèmes CRISPR-Cas bactériens). L'utilisation de cocktails phagiques combinant plusieurs phages avec des mécanismes d'adsorption différents (récepteurs bactériens différents) est la stratégie standard pour contourner ce problème, en exploitant les compromis évolutifs (fitness trade-offs) associés à la résistance phagique (Principi et al., 2019).

Production et mise à l'échelle industrielle :

La production de phages à grande échelle requiert des infrastructures de fermentation et de purification spécifiques (fermenteurs, systèmes de filtration tangentielle, chromatographie d'exclusion de taille) ainsi que des protocoles analytiques rigoureux de contrôle qualité. L'Algérie dispose d'une infrastructure biotechnologique naissante, avec des laboratoires universitaires et un secteur pharmaceutique en développement, qui pourraient constituer les bases d'une filière de production phagique nationale. Des partenariats public-privé et des transferts de technologie avec des pays pionniers en phagothérapie (Belgique, Géorgie, France) pourraient accélérer ce développement (Brives & Pourraz, 2020).

3.3.4 Contraintes réglementaires

L'encadrement réglementaire des bactériophages en tant que produits vétérinaires ou biocides constitue l'un des obstacles majeurs à leur commercialisation. En Europe, les phages utilisés comme médicaments vétérinaires sont soumis à la réglementation européenne sur les médicaments vétérinaires (Règlement (UE) 2019/6), qui impose des études de qualité, de sécurité et d'efficacité étendues. En Algérie, le cadre réglementaire pour les produits biothérapeutiques vétérinaires est en cours d'élaboration, et l'intégration des phages dans ce cadre nécessitera un travail de plaidoyer scientifique et de dialogue avec les autorités de santé (Direction des Services Vétérinaires, Agence Nationale des Produits Pharmaceutiques).

La stratégie réglementaire envisagée pour PHAGOTECH AI pourrait suivre une approche progressive : démarrage comme biocide vétérinaire (décontamination des environnements d'élevage), avec des études de démonstra-

tion d'efficacité et d'innocuité en conditions terrain algériennes, avant d'envisager une classification comme médicament vétérinaire pour les applications thérapeutiques. Des précédents européens (ListexTM P100, approuvé comme additif alimentaire aux Pays-Bas) et américains pourraient servir de modèles réglementaires (EFSA, 2020).

3.3.5 Perspectives de valorisation en Algérie

Le développement de PHAGOTECH AI s'inscrit dans une vision à long terme de valorisation industrielle et de souveraineté biotechnologique. Plusieurs axes de valorisation méritent d'être explorés :

Création d'une phagothèque nationale :

constitution d'une collection de bactériophages isolés à partir des élevages algériens, caractérisée génomiquement et phénotypiquement, représentant un patrimoine scientifique et biotechnologique de valeur.

Développement d'une unité pilote de production :

en partenariat avec des universités algériennes (USTHB, Université de Sétif, Université de Tlemcen) et des entreprises pharmaceutiques vétérinaires nationales, mise en place d'une capacité de production pilote conforme aux Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF).

Formation et transfert de compétences :

développement d'une expertise nationale en phagobiologie appliquée, via des formations de master et de doctorat, des stages internationaux et des programmes de recherche collaborative.

Intégration dans les programmes nationaux de lutte contre l'antibiorésistance :

positionnement de PHAGOTECH AI comme outil complémentaire dans le cadre du Plan d'Action National sur la RAM (PAN-RAM), contribuant à la mise en œuvre des engagements algériens dans l'approche One Health.

Tab. 3.1 : Feuille de route proposée pour le développement de PHAGO-TECH AI

Phase	Objectifs	Durée estimée	Partenaires potentiels
Phase 1 : Isolement et caractérisation	Isolement de phages anti-APEC et anti- <i>Salmonella</i> des élevages algériens; séquençage génomique; caractérisation phénotypique	12–18 mois	Laboratoires universitaires (Tlemcen, Sétif, USTHB)
Phase 2 : Formulation et stabilisation	Développement de cocktails phagiques; optimisation de la formulation (lyophilisation, encapsulation); tests de stabilité	18–24 mois	CRBT, instituts de recherche nationaux
Phase 3 : Évaluation préclinique	Tests d'efficacité <i>in vitro</i> (biofilms) et <i>in vivo</i> (modèles poulet); études de sécurité	18–24 mois	Écoles vétérinaires (ENSV Alger), ITELV
Phase 4 : Essais terrain	Évaluation en conditions d'élevages réels; études pharmacoeconomiques	24–36 mois	Éleveurs partenaires, MADR, ONAB
Phase 5 : Dépôt réglementaire	Constitution du dossier d'autorisation; dialogue réglementaire avec ANPP et DSV	12–18 mois	ANPP, DSV, consultants réglementaires

Chapitre 4

Matériel et méthodes

La litière avicole constitue un environnement particulièrement propice à la prolifération et à la dissémination de bactéries multirésistantes, en raison de la forte densité animale, de l'humidité, de la richesse en matière organique azotée et des pratiques d'élevage intensif qui la caractérisent. Lorsqu'elle n'est pas correctement gérée, elle peut constituer un réservoir important de bactéries résistantes aux antibiotiques et représenter, par son épandage ou sa manipulation, une voie de dissémination environnementale de l'antibiorésistance, avec des répercussions potentielles sur la santé animale et humaine. C'est dans ce contexte que s'inscrit la présente étude, dont l'objectif est de rechercher la présence de bactéries multirésistantes au sein de la litière de poulet issue d'élevages avicoles de la région de Saïda, et d'évaluer leur niveau de résistance vis-à-vis de certains antibiotiques d'importance clinique et vétérinaire.

4.1 L'objectif de l'étude :

Cette étude a pour objectif principal de caractériser les souches bactériennes isolées de la litière avicole dans la région de Saïda, afin d'évaluer leur profil de résistance aux antibiotiques ainsi que leur capacité à former des biofilms. Parallèlement à cette caractérisation phénotypique, ce travail vise à explorer et à valider le potentiel des bactériophages en tant qu'agents de biocontrôle efficaces, offrant ainsi une alternative biologique prometteuse face à la problématique de l'antibiorésistance au sein de la filière avicole, tout en s'inscrivant dans une approche intégrée de type « One Health ».

Matériel

- Autoclave ;
- Bain-marie ;
- Balance électronique ;
- Bec Bunsen ;
- Étuve microbiologique ;
- Portoirs ;
- Réfrigérateur ;
- Vortex ;

- Microscope ;
- Four Pasteur ;
- Lecteur de microplaques.

Verrerie et outils

Boîtes de Petri, tubes à essai, pipettes Pasteur, anses de platine, micro-pipettes avec embouts (0,1 à 1000 μL), spatules, béchers, flacons en verre, lames et lamelles, verres de montre, éprouvettes graduées, pinces, écouvillons stériles et microplaques à 96 puits.

Milieux de culture et réactifs

Milieux de culture

Milieux de culture liquides

- Bouillon nutritif (BN) ;
- Eau peptonée ;
- Milieu de Clark et Lubs ;
- Bouillon Luria-Bertani (LB) ;
- Eau physiologique stérile.

Milieux de culture solides

- Gélose MacConkey ;
- Gélose nutritive ;
- Gélose citrate de Simmons ;
- Gélose mannitol-mobilité ;
- LB solide ;
- LB semi-solide ;
- Gélose Mueller–Hinton.

Réactifs

- Cristal violet (0,1 %);
- Lugol;
- Alcool (décolorant pour la coloration de Gram);
- Fuchsine (contre-colorant);
- Disques d'oxydase;
- Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2);
- Réactif de Kovacs;
- Rouge de méthyle;
- Réactifs VP1 et VP2;
- Réactif TDA;
- Réactifs nitrate 1 et nitrate 2;
- Disques d'antibiotiques;
- Éthanol à 95 %;
- Huile à immersion;
- Eau distillée stérile;
- Glycérol stérile (15–20 %).

4.2 Provenance des échantillons

Cinq échantillons de litière de poulet (notés A à E) ont été prélevés le 6 mars 2026 à 14h00, au niveau d'un même élevage à 5 points différents de la région de Saïda. Les prélèvements ont été réalisés de manière aseptique et recueillis dans des sachets stériles afin de préserver l'intégrité des échantillons. Immédiatement après leur collecte, ils ont été transportés au laboratoire de microbiologie de l'Université de Saïda Dr Moulay Tahar, où les analyses nécessaires ont été effectuées.



FIG. 4.1 : Échantillons de litière de poulet collectés sur différents sites pour l'isolement bactérien.



FIG. 4.2 : Préparation des tubes de culture et mise en œuvre des techniques aseptiques sous bec Bunsen pour l'isolement et l'activation bactérienne

4.3 Isolement des Entérobactéries

Des dilutions décimales sériees (10^{-1} à 10^{-6}) ont été réalisées à partir des échantillons de litière de poulet en utilisant de l'eau physiologique stérile. Cent microlitres (100 μ L) de chaque dilution ont été étalés en surface sur mi-

lieu Mac Conkey, sélectif pour les Entérobactéries. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 37 °C pendant 24 à 48 heures. Après incubation, les colonies présentant des morphologies caractéristiques ont été sélectionnées et repiquées pour purification par la méthode des stries sur gélose nutritive. La pureté des isolats a été vérifiée par observation macroscopique et microscopique.

4.4 Purification des isolats bactériens

Pour garantir la pureté des isolats obtenus, chaque colonie a été sélectionnée individuellement à partir des boîtes de milieu MacConkey. Chaque colonie a ensuite été repiquée sur des boîtes de milieu GN par la méthode d'épuisement (isolement par stries).

Cette étape a été renouvelée à deux reprises pour chaque isolat, afin d'assurer l'obtention de cultures pures et homogènes. La pureté des isolats a été confirmée par une observation macroscopique (morphologie des colonies) et microscopique (coloration de Gram). Enfin, les souches pures ont été conservées pour les étapes ultérieures de l'étude.

4.5 Dénombrement de la flore totale et de la flore résistante

À partir des échantillons d'eaux usées, une série de dilutions décimales (de 10^{-1} à 10^{-6}) a été préparée à l'aide d'une solution stérile d'eau physiologique ou de TSE. Pour chaque dilution, 100 μ L ont ensuite été étalés avec soin à la surface de milieux sélectifs adaptés. Le dénombrement de la flore totale a reposé sur l'utilisation du milieu Slanetz et Bartley pour les Enterococaceae, et du milieu Mac Conkey pour les Enterobacteriaceae ainsi que pour certaines bactéries non entérobactériennes telles que les Aeromonadaceae et les Vibrionaceae.

Concernant la recherche des entérocoques résistants à la vancomycine, le milieu Slanetz et Bartley a été additionné de 6 μ g/mL de vancomycine. Pour la détection de la flore résistante, le milieu Mac Conkey a quant à lui été supplémenté soit en ceftazidime (2 μ g/mL), soit en colistine (4 μ g/mL). Les boîtes ont ensuite été incubées à 37 °C pendant 24 à 48 heures, durée nécessaire au développement et à l'apparition des colonies bactériennes.

4.6 Purification des isolats bactériens

Une fois la période d'incubation terminée, quatre à cinq colonies appartenant à la flore résistante ont été sélectionnées de façon aléatoire sur chaque boîte de Pétri. Chacune d'entre elles a ensuite été repiquée dans du bouillon nutritif. Après une nouvelle incubation à la température adéquate, le développement des cultures en milieu liquide a pu être observé. C'est à ce moment que les isolats ont été purifiés grâce à la technique d'isolement par stries. Cette opération a été répétée deux fois de suite, en reprenant à chaque étape une colonie parfaitement isolée sur la gélose. On aboutit ainsi à une culture dont le degré de pureté est apprécié par un examen à la fois macroscopique et microscopique. Une fois la purification achevée, des répliques des isolats ont été mises de côté pour conservation.

4.7 Observation microscopique

La coloration de Gram constitue une étape déterminante dans le processus d'identification des souches bactériennes. Elle permet de distinguer les bactéries à Gram positif, colorées en violet, de celles à Gram négatif, colorées en rose. Au-delà de cette différenciation, elle renseigne également sur la morphologie des cellules (bâtonnets, coques, etc.) ainsi que sur leur mode de groupement, conformément à la méthode classique. Cette coloration représente donc un outil essentiel dans la caractérisation bactérienne (Boutadjine et Boultif, 2019) (Annexe 2).

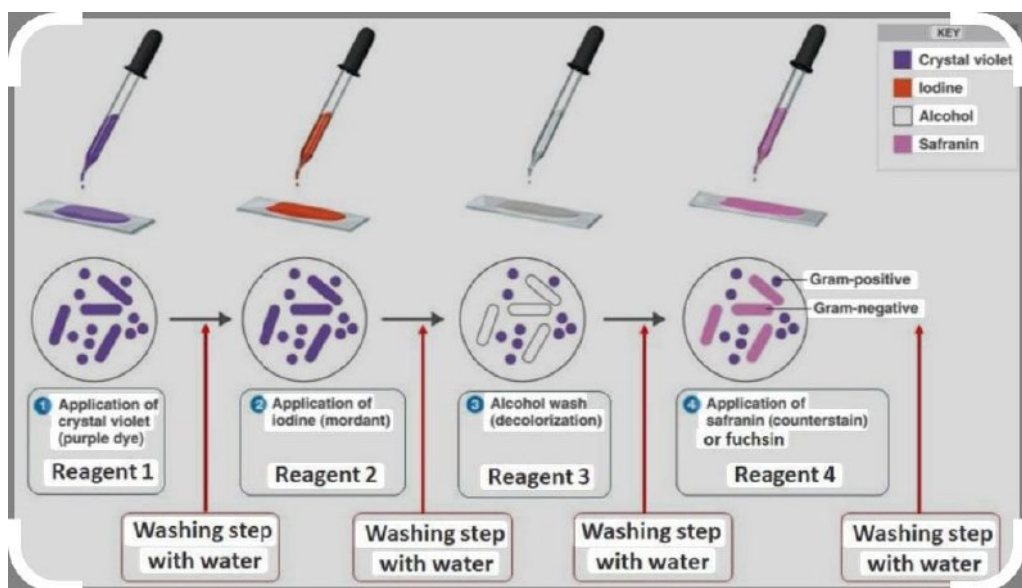


FIG. 4.3 : Schéma récapitulatif du protocole de la coloration de Gram

4.8 Conservation des isolats

4.8.1 Conservation à court terme

Les bactéries ont été ensemencées sur des tubes de gélose nutritive inclinée, puis incubées à 37 °C. Dès qu'une croissance visible était constatée, les tubes étaient conservés au réfrigérateur pendant quelques semaines, ce qui permettait de maintenir la viabilité des souches sur une période limitée.

4.8.2 Conservation à long terme

Les bactéries ont d'abord été ensemencées dans du bouillon nutritif (BN). Après 18 heures d'incubation à 37 °C, les cellules ont été récupérées par centrifugation (4000 tr/min, 10 min). Le surnageant éliminé, le culot a été repris dans un milieu de conservation composé de 60 % de BN et 40 % de glycérol. Les suspensions denses ainsi obtenues ont été réparties dans des tubes Eppendorf et stockées à -20 °C. Cette technique garantit le maintien, sur le long terme, de la viabilité des souches ainsi que de leurs caractéristiques génétiques.

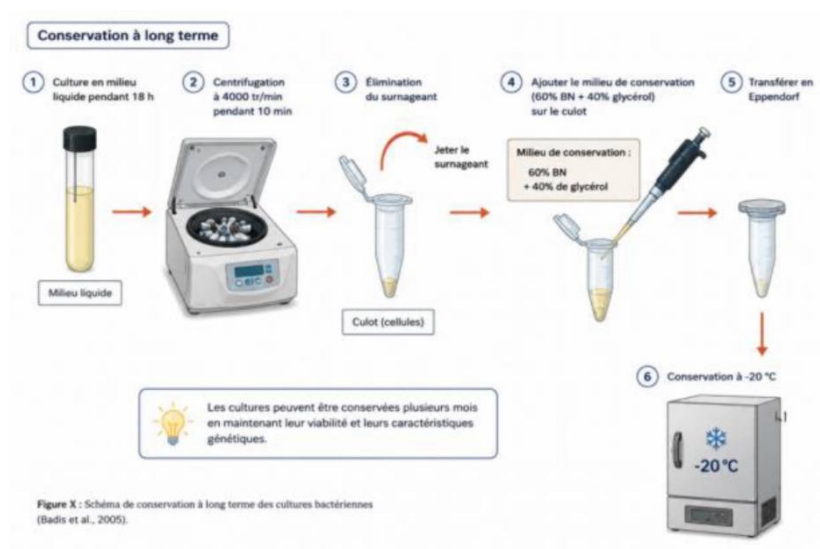


FIG. 4.4 : Protocole de conservation à long terme des cultures bactériennes

4.9 Caractérisation biochimique des isolats

L'identification précise du genre et de l'espèce d'une souche bactérienne nécessite des tests biochimiques complémentaires, destinés à explorer son métabolisme glucidique et protidique. Ces tests reposent généralement sur des réactions enzymatiques, des essais de fermentation des sucres, des analyses de dégradation des protéines, ainsi que divers autres tests ciblés permettant de dresser le profil métabolique de la souche étudiée.

4.9.1 Recherche de la catalase

La présence de cette enzyme a été mise en évidence en déposant une goutte de peroxyde d'hydrogène à 10 % sur une lame contenant la culture à tester. Un dégagement de bulles d'oxygène traduisait une réaction positive. En effet, au cours de leur respiration aérobie, certaines bactéries génèrent du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), composé toxique que certaines d'entre elles parviennent à neutraliser grâce à des enzymes spécifiques, dont la catalase.

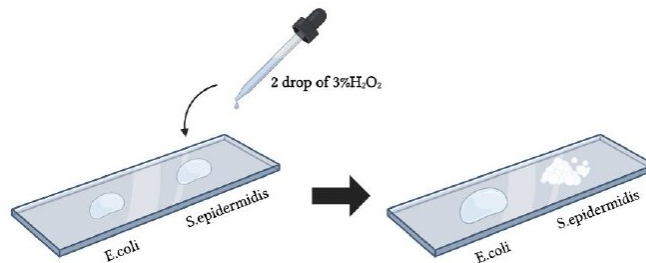


FIG. 4.5 : Test de catalase sur lames

4.9.2 Test de l'oxydase

La recherche de l'activité oxydase a été effectuée afin de détecter la présence de la cytochrome *c* oxydase, enzyme intervenant dans la chaîne respiratoire aérobie. Une colonie fraîche a été déposée sur un papier filtre imprégné de réactif de Kovacs (tétraméthyl-*p*-phénylènediamine). L'apparition d'une coloration violette en moins de 30 secondes a été interprétée comme un résultat positif, tandis que l'absence de changement de couleur a indiqué un résultat négatif. Ce test permet notamment de distinguer les entérobactéries, généralement oxydase-négatives, des autres bacilles à Gram négatif.

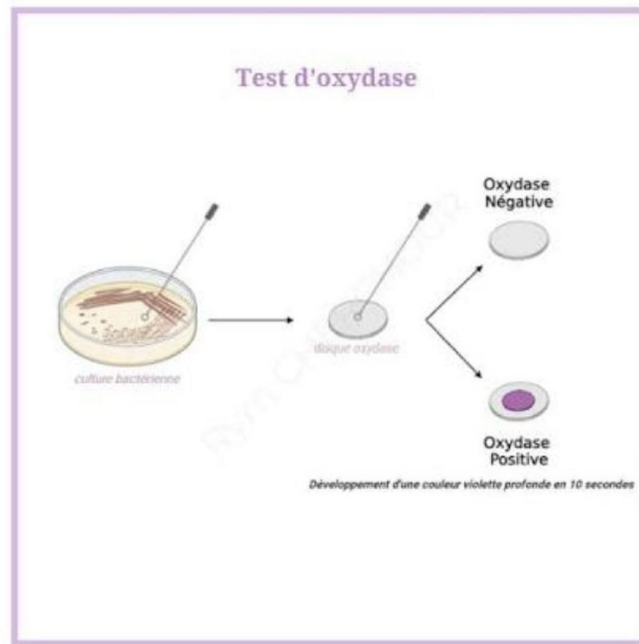


FIG. 4.6 : Test de l'oxydase : principe et interprétation

4.9.3 Test du citrate de Simmons

Ce test a été réalisé sur milieu de Simmons afin d'évaluer la capacité des bactéries à utiliser le citrate comme unique source de carbone et d'énergie. Les isolats ont été ensemencés par stries sur la pente du milieu, puis incubés à 37°C pendant 24 à 48 heures. Un virage du milieu du vert au bleu, témoignant d'une alcalinisation due à la production d'ammoniaque, a été interprété comme un résultat positif. À l'inverse, le maintien de la teinte verte du milieu a signifié que la bactérie était incapable d'utiliser le citrate.

4.9.4 Test de l'indole

La production d'indole à partir du tryptophane a été recherchée afin d'explorer les capacités protéolytiques des isolats. Les bactéries ont été cultivées en eau peptonée tryptophane pendant 24 à 48 heures à 37°C. Après incubation, quelques gouttes du réactif de Kovacs ont été ajoutées en surface du milieu. L'apparition d'un anneau rouge caractéristique à l'interface a confirmé la production d'indole (résultat positif), résultant de la dégradation du tryptophane par la tryptophanase. L'absence de coloration rouge a indiqué un résultat négatif.

4.9.5 Test de Voges–Proskauer (VP)

Le test de Voges–Proskauer a visé à détecter la production d’acétoïne (acétylméthylcarbinol), métabolite intermédiaire issu de la fermentation du glucose par la voie butanediol. Après culture de 48 heures en milieu Clark et Lubs à 37°C, 12 gouttes de solution de KOH à 40 % et 3 gouttes de solution d’alpha-naphtol à 5 % ont été ajoutées au tube. Le développement d’une coloration rose à rouge en 15 à 30 minutes a été interprété comme un résultat positif, témoignant de la présence d’acétoïne oxydée en diacétyle.

4.9.6 Test du rouge de méthyle (RM)

Réalisé parallèlement au test VP sur le même milieu de Clark et Lubs, le test au rouge de méthyle a permis d’évaluer la capacité des bactéries à produire des acides organiques stables (acide lactique, acide acétique, acide formique) lors de la fermentation du glucose par la voie des acides mixtes. Après 48 à 72 heures d’incubation à 37°C, quelques gouttes de rouge de méthyle ont été ajoutées à la culture. Un virage au rouge, traduisant un abaissement notable du pH ($< 4,5$), a été interprété comme un résultat positif, tandis qu’une coloration jaune ou orange a correspondu à un résultat négatif.

4.9.7 Fermentation du mannitol

La capacité des isolats à fermenter le mannitol a été étudiée sur milieu contenant ce sucre et un indicateur coloré de pH (rouge de phénol), en présence d’une cloche de Durham destinée à détecter la production éventuelle de gaz. Après 24 à 48 heures d’incubation à 37°C, un virage du rouge au jaune a indiqué la fermentation du mannitol avec production d’acides (résultat positif). La présence de bulles dans la cloche de Durham a reflété une fermentation accompagnée de dégagement gazeux. L’absence de changement de couleur a signifié l’incapacité de la souche à fermenter ce polyol.

4.9.8 Test de mobilité

La mobilité bactérienne a été évaluée par ensemencement en piqûre centrale dans un milieu gélosé semi-solide (gélose mobilité à 0,3–0,5 %), incubé à 37°C pendant 24 à 48 heures. Une diffusion bactérienne autour de la ligne de piqûre, se traduisant par un trouble ou une opacification du milieu en dehors du trajet d’inoculation, a été interprétée comme un signe de mobilité positive. En revanche, une croissance strictement limitée à la ligne de piqûre

a indiqué l'absence de mobilité. Ce test reflète la présence ou l'absence de flagelles fonctionnels chez les bactéries étudiées.

4.9.9 Identification à l'aide de la galerie API20E

La galerie API20E regroupe une série de tests biochimiques miniaturisés et standardisés, conçus pour permettre une identification rapide des souches isolées.

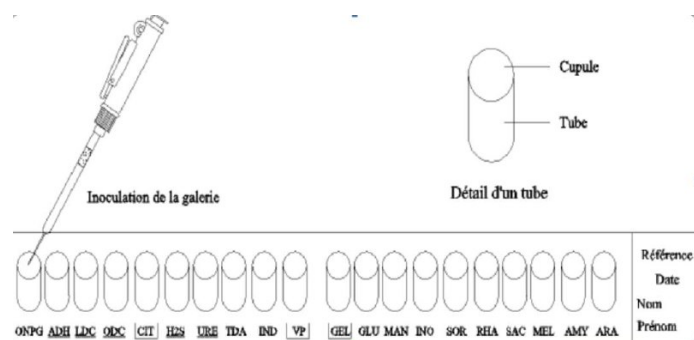


FIG. 4.7 : Inoculation d'une galerie d'identification biochimique

Préparation de la galerie

Le fond et le couvercle de la boîte d'incubation sont assemblés, puis de l'eau est versée dans les alvéoles afin de créer une atmosphère humide. La galerie est ensuite déposée stérilement à l'intérieur de la boîte.

Préparation de l'inoculum

Une colonie bien isolée, prélevée sur le milieu gélosé, est introduite dans un tube stérile contenant 5 mL d'eau physiologique, de manière à obtenir une suspension bactérienne dont la turbidité correspond à 0,5 sur l'échelle de McFarland.

Inoculation de la galerie

La suspension bactérienne est répartie dans les différents tubes de la galerie à l'aide d'une pipette Pasteur ou d'une micropipette. Afin d'éviter la formation de bulles d'air, l'extrémité de la pipette est positionnée contre la paroi de la cupule, la boîte étant légèrement inclinée vers l'avant.

Pour les tests CIT, VP et GEL, le tube ainsi que la cupule sont entièrement remplis. Pour les tests ADH, LDC, ODC, H₂S et URE, une atmosphère anaérobie est créée en recouvrant la cupule d'huile de paraffine. Pour

les autres réactions, seul le tube est rempli. La boîte est ensuite refermée et placée à l'étuve à 37 °C pour une durée de 18 à 24 heures.

Lecture et interprétation des résultats

Les réactifs nécessaires aux tests indirects (TDA, VP, IND) ont été ajoutés, et la lecture des galeries a été effectuée à 24 puis à 48 heures. L'interprétation des résultats a été réalisée à partir du site <https://lab.upbm.org>.



FIG. 4.8 : Aspect de la galerie API20E avant incubation

4.10 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI correspond à la plus faible concentration d'un antibiotique capable d'inhiber, in vitro, la croissance de 99 % de la population bactérienne testée. Concrètement, il s'agit de la plus petite concentration, parmi une série de dilutions doublantes, à partir de laquelle aucune croissance bactérienne visible n'est observée.

La CMI a été déterminée pour l'Amoxicilline et l'association Amoxicilline-Acide clavulanique.

4.10.1 Préparation de l'inoculum pour la détermination de la CMI

Étalon de turbidité

Une suspension étalon de turbidité 0,5 McFarland a été utilisée afin de standardiser la densité bactérienne de l'inoculum. Cet étalon est préparé en mélangeant des volumes définis de chlorure de baryum et d'acide sulfurique, ce qui entraîne la formation d'un précipité de sulfate de baryum conférant à la solution son aspect trouble caractéristique.

Pratiquement, 0,05 mL de chlorure de baryum dihydraté ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) à 1,175 % sont mélangés à 9,95 mL d'acide sulfurique (H_2SO_4) à 1 %. La suspension obtenue correspond approximativement à une concentration de $1 \text{ à } 2 \times 10^8$ UFC/mL pour la souche de référence *Escherichia coli* ATCC 25922.

L'ajustement de la densité de l'inoculum s'est fait par comparaison visuelle, sous un éclairage approprié, entre le tube test et l'étalon McFarland 0,5.

Préparation des solutions mères d'antibiotiques

Les séries de dilutions doublantes d'antibiotiques ont été obtenues à partir d'une solution mère initiale à 5120 $\mu\text{g/mL}$. Cette dernière a fait l'objet de dilutions successives au demi, à l'aide d'eau distillée stérile, permettant ainsi d'établir une gamme de concentrations comprises entre 1,25 et 5120 $\mu\text{g/mL}$. Les solutions ont ensuite été conservées à 4 °C, à l'abri de la lumière, et utilisées dans un délai n'excédant pas 7 jours, afin de préserver leur activité.

4.10.2 Méthode de dilution en gélose (méthode des spots)

Cette méthode nécessite une dilution au 1/10 de la suspension à 0,5 McFarland dans de l'eau physiologique, de façon à obtenir une concentration de 10^7 UFC/mL. L'inoculum final déposé sur la gélose Mueller-Hinton additionnée d'antibiotique avoisine 10^4 UFC par spot de 3 mm de diamètre, à raison de 2 μL d'inoculum par spot. Les spots sont laissés à sécher à température ambiante pendant 15 à 30 minutes, puis les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures. La CMI correspond à la première boîte de la série ne présentant aucune croissance microbienne. *Escherichia coli* a été utilisée comme souche de comparaison.

4.11 Test de diffusion en milieu gélosé (anti-biogramme)

4.11.1 Inoculation des boîtes

L'inoculation a été réalisée à l'aide d'un écouvillon stérile, trempé dans la suspension bactérienne ajustée, dans les 15 minutes suivant le calibrage de sa turbidité à 0,5 McFarland. L'écouvillon était ensuite tourné et pressé contre la paroi du tube, au-dessus du niveau du liquide, afin d'éliminer l'excès d'inoculum.

La surface séchée d'une gélose Mueller-Hinton a alors étéensemencée par écouvillonnage sur l'ensemble de la boîte, en répétant l'opération deux fois et en faisant pivoter la boîte d'environ 60° à chaque passage, de manière à garantir une répartition homogène de l'inoculum.

Le couvercle pouvait être laissé entrouvert entre 3 et 5 minutes, sans dépasser 15 minutes, le temps que l'excès d'humidité superficielle s'évapore avant l'application des disques d'antibiotiques.

4.11.2 Dépôt des disques d'antibiotiques

Les disques (Tableau 4.1) ont été disposés à la surface de la gélose préalablement inoculée, puis légèrement enfoncés afin d'assurer un bon contact avec le milieu. Qu'ils aient été déposés manuellement ou à l'aide d'un distributeur, les disques ont été espacés d'au moins 24 mm de centre à centre, sans dépasser 5 à 6 disques par boîte de 100 mm.

Les boîtes, couvercle vers le bas, ont été placées à l'étuve à 37 °C dans les 15 minutes suivant l'application des disques.

4.11.3 Lecture des boîtes et interprétation

Après 16 à 18 heures d'incubation, le diamètre des zones d'inhibition a été mesuré au millimètre près à l'aide d'une règle. Ces mesures ont été interprétées en se référant aux valeurs critiques définies par le référentiel CLSI M100-S (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI, 2012).

Tab. 4.1 : Antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme

Antibiotique	Abréviation	Concentration du disque
Amoxicilline + acide clavulanique	AMC	20/10 μg
Cefotaxime	CTX	30 μg
Ceftazidime	CAZ	30 μg
Gentamicine	CN	10 μg
Ciprofloxacine	CIP	5 μg
Cotrimoxazole	SXT	25 μg
Imipénème	IPM	10 μg

4.11.4 Recherche des bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE)

La production de BLSE a été recherchée à l'aide d'un test de synergie réalisé sur gélose Mueller-Hinton. Des disques de céphalosporine de 3^e génération (ceftazidime) ont été disposés à 2 ou 3 cm d'un disque d'amoxicilline + acide clavulanique (Jarlier et al., 1988). La présence d'une BLSE se traduisait par une image caractéristique en « bouchon de champagne », résultant de l'effet inhibiteur de l'acide clavulanique (Siu et al., 2003).

4.12 Recherche de bactériophages

L'isolement des bactériophages a été réalisé à partir d'échantillons d'eaux usées collectés le 07 avril 2026 à 07h22. Ces échantillons ont été sélectionnés pour leur potentiel à héberger des bactériophages capables d'infecter diverses espèces bactériennes et de mettre en évidence leur effet antibactérien naturel, comparable à celui d'un antibiotique. La procédure a consisté à incuber les échantillons d'eaux usées avec la bactérie cible afin de permettre l'infection et la lyse bactérienne, suivies d'une sélection rigoureuse des phages basée sur leur capacité d'amplification.



FIG. 4.9 : Site de prélèvement des échantillons environnementaux pour l'isolement des bactériophages.

4.12.1 Culture bactérienne

Les souches bactériennes étudiées dans le cadre de ce travail sont des isolats bactériens obtenus à partir d'échantillons de litière de poulet. Six souches ont été isolées et sélectionnées pour cette étude. Ces isolats sont cultivés à 37°C dans le milieu de culture Luria-Bertani (LB) pour maintenir leur viabilité.

4.12.2 Isolement des bactériophages

Récolte et préparation des échantillons

Les échantillons d'eaux usées (50 à 100 mL) ont été prélevés puis centrifugés à 7500 rpm pendant 10 minutes à 4°C, afin d'éliminer les débris solides et la matière organique en suspension. Le surnageant ainsi récupéré a été filtré sur membrane de porosité 0,22 μm afin d'éliminer les bactéries et autres particules résiduelles, puis conservé à 4°C jusqu'à son utilisation pour l'étape d'enrichissement.

Enrichissement des phages

L'enrichissement a été réalisé à partir d'une culture d'*Escherichia coli* incubée pendant 16 à 18 heures jusqu'à l'obtention d'une densité optique (DO_{600}) de 0,8. Pour ce faire, 1 mL de cette culture bactérienne a été mélangé à 2 mL du surnageant filtré (échantillon d'eau usée préalablement stocké à 4°C) et complété par 6 mL de milieu LB. Le mélange a ensuite été incubé sous agitation (200 rpm) à 37°C pendant une durée de 24 à 72 heures, ou jusqu'à observation d'une clarification du milieu (lyse bactérienne traduisant la multiplication phagique).

Préparation de la solution de CaCl_2 (100 mM)

Une solution de chlorure de calcium (CaCl_2) à 100 mM a été préparée, les ions calcium étant connus pour faciliter l'adsorption des phages à la surface des bactéries hôtes. Le calcul de la masse nécessaire a été effectué sur la base d'une masse molaire de 110,98 g/mol : pour une solution mère à 1 M, 110,98 g sont dissous dans 1000 mL ; pour obtenir une concentration de 0,1 M (100 mM), 11,098 g sont nécessaires pour 1000 mL, soit 1,1 g pour 100 mL de solution finale.

Purification des phages

À l'issue de l'incubation, le lysat obtenu a été centrifugé à 6000 rpm pendant 10 minutes à 4°C, puis le surnageant a été filtré sur membrane de 0,22 μm afin d'éliminer les cellules bactériennes résiduelles et d'obtenir un filtrat phagique purifié, désigné solution F.

Préparation de la suspension bactérienne

Une colonie isolée d'*E. coli* a été prélevée à l'écouvillon et ensemencée dans 10 mL de milieu de culture, composé de 9 mL de LB additionné de 1 mL de solution de CaCl_2 . La culture a été incubée à 37°C jusqu'à l'obtention d'une DO_{600} de $0,6 \pm 0,1$, correspondant à une durée d'incubation de 14 à 16 heures. Cette suspension bactérienne en phase exponentielle a ensuite été étalée sur milieu gélosé et laissée sécher 15 à 20 minutes avant le test de détection des phages.

Détection des phages par spot test

La solution F a été soumise à une série de dilutions décimales (10^{-1} à 10^{-5}) dans le tampon CaCl_2 . Des volumes de 10 à 20 μL de chaque dilution, ainsi que de la solution non diluée et de l'eau usée filtrée utilisée comme témoin, ont été déposés en spots distincts sur le tapis bactérien préalablement étalé. Après incubation, l'apparition de zones de lyse (plages claires) au niveau des spots a permis de confirmer la présence et l'activité lytique des bactériophages isolés.

4.12.3 Protocole de cinétique de lyse en microplaque

Préparation des suspensions bactériennes

Une colonie isolée de chacun des cinq isolats étudiés en cinétique (2P, 3P, 1V, Ec, 4R) a été ensemencée séparément dans 10 mL de milieu LB, puis incubée à 37°C jusqu'à l'obtention d'une densité optique (DO_{600}) de $0,6 \pm 0,1$, ce qui correspond généralement à une durée d'incubation de 14 à 16 heures. Ces cultures bactériennes en phase exponentielle de croissance ont ensuite été utilisées en parallèle pour la mise en place du test de cinétique de lyse, chaque isolat étant testé indépendamment selon le même protocole (section suivante).

Mise en place de la microplaque

Le suivi de la cinétique de lyse a été réalisé en microplaque, selon un plan expérimental comportant plusieurs conditions disposées en colonnes, chacune testée en triplicat. Un premier puits a été réservé au milieu seul (blanc), permettant de contrôler l'absence de contamination du milieu de culture. Une seconde série de puits a constitué le témoin bactérien, contenant 180 μL de la suspension bactérienne S1 additionnés de 20 μL de témoin (sans phage), afin de suivre la croissance bactérienne normale en l'absence d'infection. Une troisième série a permis d'évaluer l'effet lytique du phage non dilué : 180 μL de suspension bactérienne S1 ont été mélangés à 20 μL de la solution phagique non diluée (solution F). Enfin, une quatrième série a été consacrée à l'effet du phage dilué, en associant 180 μL de la suspension bactérienne S1 à 20 μL de phage dilué au 1/10 (10^{-1}) dans le tampon CaCl_2 . L'ensemble des conditions a été réparti en triplicat afin d'assurer la reproductibilité des mesures.

Lecture et suivi cinétique

La lyse bactérienne a été suivie par mesure de la densité optique à 600 nm (DO_{600}), effectuée toutes les 30 minutes pendant une incubation de 4 à 5 heures à 37°C, suivie d'une incubation complémentaire de 18 à 24 heures, permettant de caractériser l'évolution de la croissance bactérienne en présence ou en absence de phage et de mettre en évidence l'activité lytique de ce dernier au cours du temps.

4.12.4 Évaluation de la formation de biofilm

La capacité des isolats bactériens à former un biofilm a été évaluée par la méthode de coloration au Cristal Violet en microplaque, selon le protocole d'O'Toole (2011) avec quelques adaptations.

Protocole expérimental

Une culture bactérienne de nuit en milieu TSB (*Tryptic Soy Broth*) a d'abord été préparée et ajustée à une densité optique de 0,5 à 600 nm. L'inoculation a ensuite été réalisée dans des microplaques à 96 puits à fond plat, en déposant 20 μL de suspension bactérienne dans 180 μL de TSB par puits, avec trois répétitions par souche afin d'assurer la robustesse statistique des résultats. Un contrôle négatif constitué de 200 μL de TSB stérile a été systématiquement inclus. Les plaques ont alors été incubées pendant 24 heures à 37°C en conditions statiques, favorisant ainsi l'adhésion et le développement du biofilm à la surface des puits.

À l'issue de l'incubation, le contenu de chaque puits a été éliminé et les puits ont été lavés quatre fois au PBS afin de retirer les cellules planctoniques n'ayant pas adhéré. Le biofilm résiduel fixé a ensuite été coloré par une solution de Cristal Violet à 0,1 % pendant 15 minutes, puis le colorant lié a été solubilisé par de l'acide acétique à 30 %. La densité optique de chaque puits a finalement été mesurée à 492 nm à l'aide d'un lecteur ELISA, cette valeur étant directement proportionnelle à la biomasse du biofilm formé.

Classification des producteurs de biofilm

L'interprétation des résultats a été réalisée par comparaison de la densité optique mesurée dans chaque puits avec celle du contrôle négatif (DO_c), selon les critères présentés dans le Tableau 5.13.

Tab. 4.2 : Classification des producteurs de biofilm selon la densité optique mesurée.

Catégorie	Critère	Interprétation
Non-producteur	$DO \leq DO_c$	Absence de biofilm
Faible producteur	$DO_c < DO \leq 2 \times DO_c$	Biofilm initial ou faible
Producteur modéré	$2 \times DO_c < DO \leq 4 \times DO_c$	Biofilm structuré
Fort producteur	$DO > 4 \times DO_c$	Biofilm dense et mature

4.13 Développement de l'application d'assistance à la santé animale

4.13.1 Approche méthodologique

Le développement de l'application *Animal Health Assistant* a suivi une approche d'ingénierie logicielle classique en trois volets : la conception d'une architecture applicative client-serveur, l'intégration de services d'intelligence artificielle générative par le biais d'interfaces de programmation (API) tierces, et le déploiement conteneurisé de l'ensemble. Il est important de préciser qu'aucun modèle d'apprentissage automatique n'a été entraîné dans le cadre de ce travail : le système repose entièrement sur l'exploitation, par ingénierie de requêtes (*prompt engineering*), de modèles de langage multimodaux pré-entraînés et accessibles par API.

4.13.2 Architecture logicielle

L'application adopte une architecture en trois couches (Figure 4.10) :

- **Couche présentation** : interface web statique développée en HTML5, CSS3 et JavaScript natif (ES6), structurée en pages fonctionnelles distinctes (analyse rapide, diagnostic approfondi, annuaire des vétérinaires, annuaire des laboratoires, tableau de bord administrateur).
- **Couche applicative (backend)** : développée en Python 3.11 avec le framework *FastAPI* (version 0.111.0), choisi pour ses performances asynchrones et la génération automatique d'une documentation d'API interactive (spécification OpenAPI). Le serveur applicatif est exécuté via *Uvicorn* (version 0.30.1).
- **Couche de persistance** : base de données relationnelle gérée par l'ORM *SQLAlchemy* (version 2.0.30), utilisant SQLite en environnement de développement et compatible PostgreSQL en environnement de production.

FIG. 4.10 : Architecture logicielle en trois couches de l'application Animal Health Assistant.

4.13.3 Modèle de données

Six entités principales structurent la base de données (Tableau 4.3) : les utilisateurs (*User*, avec gestion des rôles administrateur/utilisateur), les vétérinaires (*Veterinarian*) et laboratoires (*Laboratory*) référencés dans les annuaires, les images téléversées (*UploadedImage*), les rapports d'analyse rapide (*AnalysisReport*) et les rapports de diagnostic approfondi (*DiagnosticReport*), ces derniers conservant l'ensemble des champs saisis par l'utilisateur, la réponse structurée du modèle de langage, ainsi que ses déclinaisons trilingues.

Tab. 4.3 : Principales entités du modèle de données de l'application.

Entité	Rôle
User	Comptes utilisateurs et administrateurs, authentification
Veterinarian / Laboratory	Annuaire consultables par ville
UploadedImage	Fichiers image téléversés par les utilisateurs
AnalysisReport	Résultats du module d'analyse rapide par image
DiagnosticReport	Résultats du module de diagnostic approfondi, incluant les traductions FR/AR

4.13.4 Intégration des services d'intelligence artificielle

Fournisseurs de modèles de langage

L'architecture logicielle a été conçue selon un principe d'indépendance vis-à-vis du fournisseur d'intelligence artificielle (*provider-agnostic design*), permettant de basculer entre plusieurs services par simple modification de configuration : Google Gemini (modèle *gemini-2.5-flash*, fournisseur par défaut), OpenRouter (avec accès à des modèles gratuits tels que *gemini-2.0-flash-exp*), et HuggingFace (modèle *LLaVA-1.5-7B* pour l'analyse d'image). Ce choix répond à une contrainte pratique du contexte algérien : la disponibilité de paliers d'usage gratuits chez plusieurs fournisseurs permet de limiter les coûts d'exploitation d'un tel outil dans une perspective de déploiement à l'échelle des élevages. Un modèle distinct (Grok, xAI) est mobilisé spécifiquement pour la mise en forme rédactionnelle du rapport vétérinaire final.

Méthodologie de conception des requêtes (prompt engineering)

Les requêtes adressées aux modèles de langage ont été conçues selon plusieurs principes destinés à maximiser la fiabilité et la reproductibilité des

réponses :

- **Formatage strict de sortie** : chaque requête impose une réponse exclusivement au format JSON structuré, sans texte libre additionnel, facilitant l'exploitation programmatique de la réponse.
- **Priorisation du texte sur l'image** : pour le module de diagnostic approfondi, la requête indique explicitement au modèle que la description textuelle des symptômes constitue la base exclusive du diagnostic, l'image ne devant être exploitée que pour l'extraction de signes visuels complémentaires – ceci afin d'éviter qu'une image de qualité insuffisante ne dégrade la qualité du diagnostic global.
- **Contraintes de structure et de complétude** : la requête impose un nombre minimal d'hypothèses diagnostiques (au moins trois maladies, deux bactéries, deux virus et deux parasites envisagés), une échelle de sévérité standardisée (Faible/Moyenne/Élevée), ainsi que des scores de probabilité et de confiance numériques compris entre 0 et 1 pour chaque hypothèse, permettant une hiérarchisation quantitative des résultats.
- **Génération trilingue simultanée** : la requête impose la génération, en un seul appel, des traductions française et arabe de l'ensemble des champs cliniques, avec la consigne explicite de produire des traductions médicalement adaptées plutôt que des traductions littérales.
- **Robustesse du traitement de la réponse** : un module de post-traitement (analyse syntaxique JSON avec retrait des balises de mise en forme superflues et repli sur une réponse par défaut en cas d'échec de l'analyse) garantit la stabilité du système face aux variations occasionnelles de format de réponse des modèles de langage.

4.13.5 Sécurité et gestion des accès

L'authentification repose sur le standard JSON Web Token (JWT), avec hachage des mots de passe par l'algorithme `bcrypt` (bibliothèque *passlib*). Deux niveaux d'habilitation sont définis : utilisateur standard (accès aux modules d'analyse et de diagnostic, consultation des annuaires) et administrateur (gestion complète des annuaires, consultation de l'historique des analyses de l'ensemble des utilisateurs, statistiques d'usage).

4.13.6 Déploiement

L'application est conteneurisée à l'aide de Docker et orchestrée via Docker Compose, avec un service backend (FastAPI/Uvicorn), un service frontend servi par un reverse-proxy Nginx assurant la répartition des requêtes vers l'API, et des volumes persistants dédiés au stockage des images téléversées et de la base de données. Cette conteneurisation vise à faciliter un déploiement futur sur une infrastructure serveur dédiée, dans une perspective de mise à disposition de l'outil à l'échelle régionale.

4.13.7 Limites méthodologiques

Conformément aux exigences de rigueur scientifique, il convient de souligner que la performance diagnostique de cet outil n'a fait l'objet d'aucune validation clinique comparative dans le cadre de ce travail. Son développement relève d'une démonstration de faisabilité technique et d'une contribution exploratoire à la stratégie PHAGOTECH AI, et non d'une évaluation scientifique de sa fiabilité diagnostique, laquelle constituerait un travail de recherche à part entière, distinct de l'objet microbiologique central de ce mémoire.

Chapitre 5

Résultats et discussion

L'objectif principal de cette étude est d'investiguer la présence de bactéries multi-résistantes au sein de la litière de poulet, un environnement critique pour la santé avicole et publique. La première étape consiste à isoler et à caractériser les souches bactériennes présentes dans ce milieu afin d'évaluer leur profil de résistance aux antibiotiques. Cette évaluation quantitative et qualitative permettra de mesurer l'ampleur de la dissémination des bactéries résistantes dans les élevages avicoles, en particulier celles présentant des résistances aux molécules critiques pour la santé humaine et animale. Par ailleurs, cette étude vise à explorer le potentiel thérapeutique des bactériophages isolés à partir d'échantillons d'eaux usées comme alternative biologique aux antibiotiques. La caractérisation de l'interaction entre ces bactériophages et les isolats bactériens issus de la litière constitue un axe majeur pour le développement de stratégies de biocontrôle efficaces, visant à limiter la propagation des souches résistantes et à améliorer la biosécurité dans le secteur avicole.

5.1 Isolement et dénombrement des Entérobactéries

5.1.1 Caractéristiques physico-chimiques des échantillons de litière

Avant la mise en culture, le pH des cinq échantillons de litière de poulet (A à E) a été mesuré. Les résultats sont présentés dans le Tableau 5.1.

Tab. 5.1 : Valeurs de pH des échantillons de litière de poulet.

Échantillon	pH mesuré	Caractère
A	8,12	Basique
B	7,73	Légèrement basique
C	7,59	Quasi-neutre
D	8,37	Basique
E	8,35	Basique

Les valeurs de pH obtenues varient entre 7,59 et 8,37, reflétant un caractère globalement alcalin de la litière avicole. Cette alcalinité résulte principalement de l'activité uréasique des bactéries qui dégradent l'urée des excréments en ammoniac, élevant ainsi le pH du milieu. Un pH alcalin constitue un environnement sélectif favorisant certaines Entérobactéries capables d'y survivre et de s'y multiplier.

5.1.2 Dénombrement des isolats

Le dénombrement de la flore cultivable sur milieu MacConkey a été réalisé sur les cinq échantillons de litière (A à E), à partir de dilutions décimales sériées de la suspension mère. Les résultats, exprimés en unités formant colonies par gramme de litière (UFC/g), sont présentés dans le Tableau 5.2.

Tab. 5.2 : Dénombrement de la flore cultivable sur milieu MacConkey (UFC/g de litière).

Échantillon	Dilution retenue	Colonies comptées	Concentration (UFC/g)
A	10^{-2}	138	$1,38 \times 10^5$
B	10^{-3}	135	$1,35 \times 10^6$
C	10^{-3}	290	$2,90 \times 10^6$
D	10^{-3}	285	$2,85 \times 10^6$
E	10^{-3}	178	$1,78 \times 10^6$

Valeurs retenues parmi les dilutions présentant un nombre de colonies statistiquement fiable (30 à 300 colonies par boîte). Pour l'échantillon A, la dilution 10^{-3} (14 colonies, $1,4 \times 10^5$ UFC/g) confirme la valeur retenue à 10^{-2} .

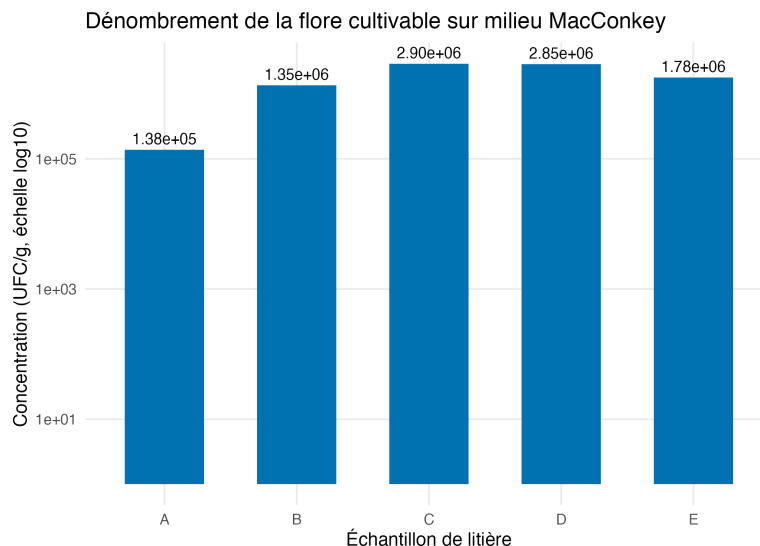


FIG. 5.1 : Dénombrement de la flore cultivable (UFC/g de litière, échelle $\log_{10}$) par échantillon.

Les charges bactériennes mesurées varient de $1,38 \times 10^5$ UFC/g (échantillon A) à $2,90 \times 10^6$ UFC/g (échantillon C), soit un écart de plus d'un

ordre de grandeur entre les cinq points de prélèvement d'un même élevage. Cette variabilité spatiale, déjà rapportée dans la littérature pour les litières avicoles, peut s'expliquer par des différences locales d'humidité, de densité animale ou d'ancienneté de la litière au niveau de chaque zone échantillonnée (Rahal et al., 2020).

Ces valeurs se situent au niveau ou légèrement en-deçà de la fourchette habituellement rapportée pour la flore totale de litière avicole (10^6 à 10^8 UFC/g; Younes et al., 2022). Cet écart apparent s'explique vraisemblablement par la nature sélective du milieu MacConkey utilisé, qui ne dénombre que les Entérobactéries (et quelques bacilles à Gram négatif non fermentaires apparentés), alors que les valeurs de référence de la littérature portent généralement sur la flore aérobie mésophile totale, dénombrée sur milieu non sélectif. Une charge d'Entérobactéries de l'ordre de 10^5 à 10^6 UFC/g reste néanmoins substantielle et confirme le caractère fortement contaminé de la litière avicole étudiée, cohérent avec l'isolement ultérieur de six morphotypes bactériens multirésistants à partir de ces mêmes échantillons.

5.1.3 Isolement et purification des isolats bactériens

Sur le milieu de culture sélectif MacConkey, une diversité morphologique notable a été observée. Les colonies présentaient une variété de formes (rondes), de tailles (petites, moyennes et grandes) et de couleurs (rose clair, rose foncé et blanc).

Face à cette hétérogénéité morphologique, une sélection rigoureuse des isolats a été réalisée. Pour chaque morphotype distinct observé sur les boîtes de Pétri, une souche représentative a été isolée individuellement puis ensemencée sur un milieu GN (Gélose Nutritive).

La pureté de ces cultures a été systématiquement vérifiée par des repiquages successifs sur gélose GN, suivis d'une incubation à 37°C pendant 24 heures. Cette procédure de purification a été rigoureusement répétée jusqu'à l'obtention de colonies présentant une uniformité totale en termes de taille, de forme et de couleur. Ce protocole garantit l'obtention de cultures pures, indispensables pour la réalisation des analyses phénotypiques et la détermination des profils de résistance (Idoui *et al.*, 2009).

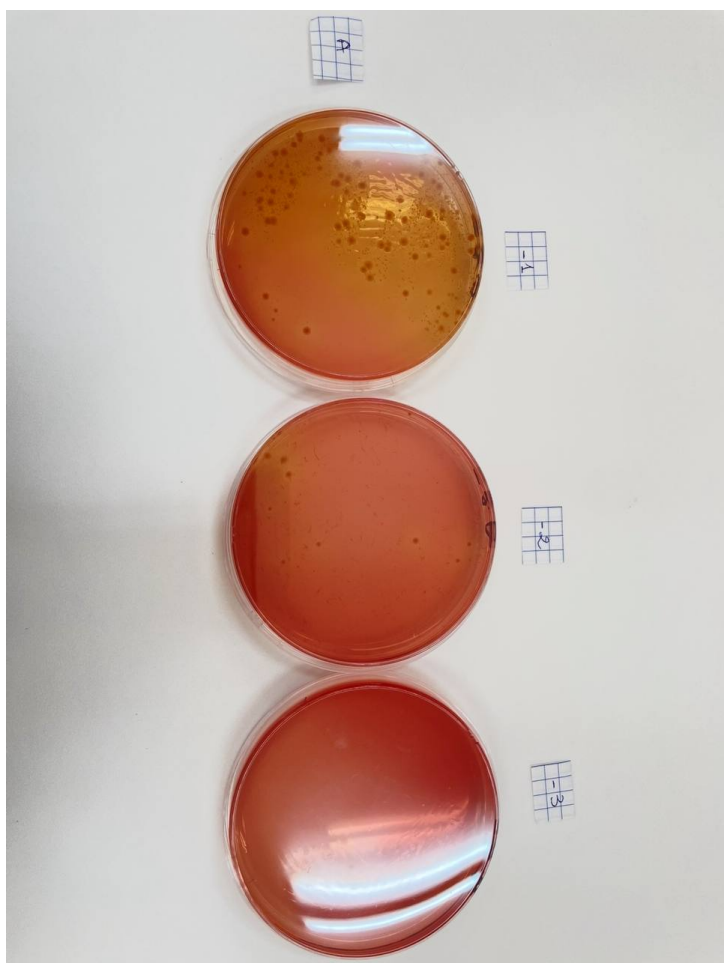


FIG. 5.2 : Aspect des colonies bactériennes développées sur le milieu Mac-Conkey après incubation

5.1.4 Examen microscopique des isolats

L'analyse microscopique des souches isolées, réalisée après coloration de Gram et observée à un grossissement de $\times 1000$, a permis de caractériser les profils morpho-tinctoriaux des bactéries étudiées.

Les isolats issus du milieu MacConkey se sont révélés être des bactéries à Gram négatif, caractérisées par une coloration rose au microscope. Ces souches présentent des morphologies variées, allant de la forme coccobacillaire à la forme bacillaire, avec une disposition soit isolée, soit en regroupements.

Un exemple d'aspect microscopique des souches 1v et 4 R est présenté dans la figure 5.8

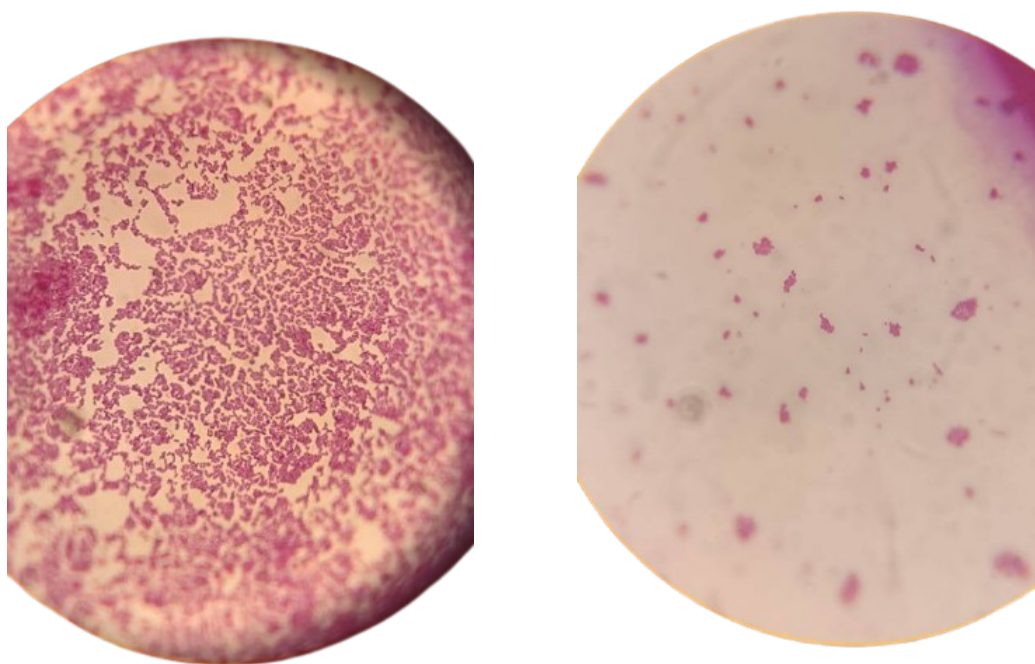


FIG. 5.3 : Aspect microscopique de l'isolat 1v et R4 après coloration de Gram (grossissement $\times 1000$)

5.1.5 Recherche de l'activité catalase

Le test de la catalase a été effectué afin de déterminer le profil respiratoire des six isolats bactériens (**1V**, **2P**, **3P**, **4R**, **5S** et **6V**). Les résultats obtenus, présentés dans le Tableau 5.3, révèlent une variabilité de la production de cette enzyme parmi les souches étudiées.

Tab. 5.3 : Résultats du test de la catalase.

Activité enzymatique	Isolat	Résultat du test
Catalase (+)	1V	Positif
Catalase (-)	2P	Négatif
Catalase (+)	3P	Positif
Catalase (+)	4R	Positif
Catalase (-)	5S	Négatif
Catalase (+)	6V	Positif

Comme l'indiquent les résultats, quatre isolats (**1V**, **3P**, **4R** et **6V**) présentent une activité catalase positive, se traduisant par un dégagement gazeux immédiat au contact du peroxyde d'hydrogène. Ces souches sont présumées posséder des mécanismes de défense contre le stress oxydatif, ce qui est souvent associé à un potentiel pathogène accru (Reiner, 2010).

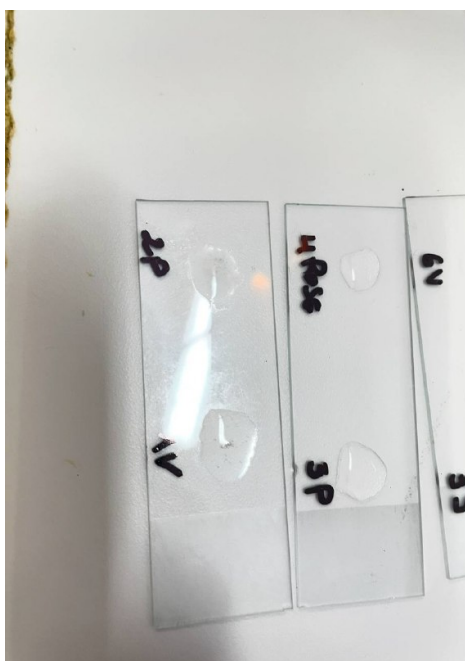


FIG. 5.4 : Réaction au test de catalase observée chez les isolats 1v ,2p ,3p ,4R

En revanche, les isolats **2P** et **5S** se sont révélés catalase négatifs, ne montrant aucun dégagement gazeux en présence de peroxyde d'hydrogène. Ces observations sont conformes aux données de la littérature, qui distinguent les

familles bactériennes selon leur capacité à métaboliser le peroxyde d'hydrogène (Facklam and Elliott, 1995 ; Taylor and Achanzar, 1972).

5.1.6 Recherche de l'activité oxydase

Le test de l'oxydase a été réalisé afin de compléter l'étude du profil métabolique et respiratoire de nos isolats. Ce test permet de mettre en évidence la présence de l'enzyme cytochrome *c* oxydase dans la chaîne respiratoire aérobie des bactéries. Les résultats obtenus pour les six souches sont présentés dans le Tableau 5.4.

Tab. 5.4 : Résultats du test de l'oxydase.

Activité enzymatique	Isolat	Résultat du test
Oxydase (–)	1V	Négatif
Oxydase (+)	2P	Négatif
Oxydase (+)	3P	Négatif
Oxydase (–)	4R	Négatif
Oxydase (+)	5S	Négatif
Oxydase (–)	6V	Négatif

Les résultats révèlent que trois isolats (**2P**, **3P** et **5S**) possèdent une activité oxydase positive, caractérisée par l'apparition rapide d'une coloration violette ou bleue. Cette activité indique la capacité de ces souches à utiliser l'oxygène comme accepteur final d'électrons dans leur chaîne respiratoire.

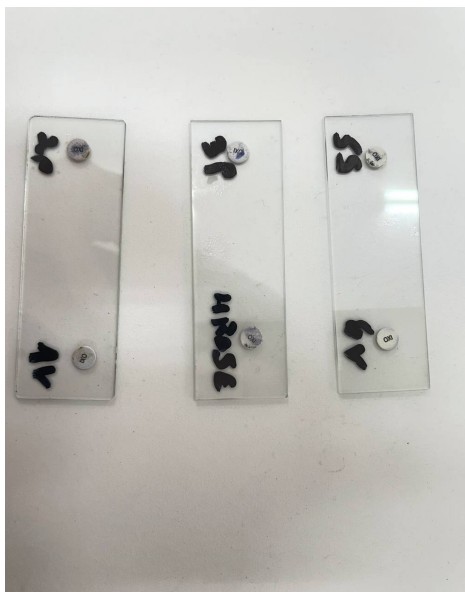


FIG. 5.5 : Résultats du test oxydase pour les isolats 1V ,2p ,3p,4R,5S ,6v

En revanche, les isolats **1V**, **4R** et **6V** ont présenté une réponse négative, suggérant l'absence de l'enzyme cytochrome *c* oxydase ou un métabolisme respiratoire différent. Ces variations du profil enzymatique des bactéries isolées de la litière de poulet témoignent de la diversité métabolique de la flore bactérienne présente dans cet environnement.

5.1.7 Test d'utilisation du citrate de Simmons

Le test du citrate de Simmons a été réalisé afin d'évaluer la capacité des isolats à utiliser le citrate comme unique source de carbone et les sels d'ammonium comme unique source d'azote. Ce test constitue un marqueur métabolique important pour différencier certains genres bactériens appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 5.5.

Tab. 5.5 : Résultats du test du citrate de Simmons.

Utilisation du citrate	Isolat	Résultat du test
Citrate (−)	1V	Négatif
Citrate (+)	2P	Positif
Citrate (+)	3P	Positif
Citrate (+)	4R	Positif
Citrate (−)	5S	Négatif
Citrate (+)	6V	Positif

Les résultats montrent que quatre isolats (**2P**, **3P**, **4R** et **6V**) sont capables de croître sur le milieu de Simmons, provoquant un virage du milieu du vert au bleu, caractéristique d’une réaction positive. Cette aptitude suggère la présence du système enzymatique permettant l’assimilation du citrate. En revanche, les isolats **1V** et **5S** sont restés négatifs, le milieu conservant sa coloration verte. Ces résultats contribuent à la caractérisation biochimique des isolats bactériens.

5.1.8 Test Mannitol Mobilité

Le test mannitol–mobilité permet d’évaluer simultanément la capacité de fermentation du mannitol et la mobilité bactérienne. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 5.6.

Tab. 5.6 : Résultats du test mannitol–mobilité.

Test	Isolat	Résultat
Mannitol (−) / Mobilité (−)	1V	Négatif / Négatif
Mannitol (+) / Mobilité (−)	2P	Positif / Négatif
Mannitol (+) / Mobilité (−)	3P	Positif / Négatif
Mannitol (+) / Mobilité (+)	4R	Positif / Positif
Mannitol (−) / Mobilité (−)	5S	Négatif / Négatif
Mannitol (−) / Mobilité (−)	6V	Négatif / Négatif

Les résultats montrent que trois isolats (**2P**, **3P** et **4R**) fermentent le mannitol, se traduisant par un virage du milieu au jaune. Les isolats **1V**, **5S** et **6V** n’ont présenté aucune fermentation. Concernant la mobilité, seul l’isolat **4R** a montré une croissance diffuse autour de la ligne d’ensemencement, indiquant une mobilité positive. Les autres isolats sont demeurés immobiles.

5.1.9 Tests Rouge de Méthyle (RM) et Voges–Proskauer (VP)

Les tests Rouge de Méthyle (RM) et Voges–Proskauer (VP) ont été réalisés afin d'étudier le type de fermentation du glucose par les isolats bactériens. Les résultats sont présentés dans le Tableau 5.7.

Tab. 5.7 : Résultats des tests Rouge de Méthyle (RM) et Voges Proskauer (VP).

Test	Isolat	Résultat
RM (–) / VP (–)	1V	Négatif / Négatif
RM (+) / VP (–)	2P	Positif / Négatif
RM (–) / VP (–)	3P	Négatif / Négatif
RM (–) / VP (+)	4R	Négatif / Positif
RM (–) / VP (–)	5S	Négatif / Négatif
RM (–) / VP (–)	6V	Négatif / Négatif

Les résultats montrent que seul l'isolat **2P** est positif au test RM, traduisant une fermentation acide mixte du glucose. À l'inverse, seul l'isolat **4R** est positif au test VP, indiquant une fermentation de type butanediolique avec production d'acétoïne. Les autres isolats ont présenté des résultats négatifs pour ces deux tests.

5.1.10 Test de production d'indole

Le test de l'indole a été réalisé afin d'évaluer la capacité des isolats bactériens à produire de l'indole à partir du tryptophane. Les résultats sont présentés dans le Tableau 5.8.

Tab. 5.8 : Résultats du test de production d'indole.

Production d'indole	Isolat	Résultat du test
Indole (+)	1V	Positif
Indole (+)	2P	Positif
Indole (–)	3P	Négatif
Indole (–)	4R	Négatif
Indole (+)	5S	Positif
Indole (+)	6V	Positif

L'analyse des résultats montre que quatre isolats (**1V**, **2P**, **5S** et **6V**) présentent une production positive d'indole, caractérisée par l'apparition d'un

anneau rouge après addition du réactif de Kovacs. Les isolats **3P** et **4R** sont restés négatifs. Ce test constitue un critère différentiel important pour l'identification biochimique des souches isolées.

5.2 Identification biochimique

La galerie API 20 E a été utilisée pour l'identification biochimique approfondie de la souche **4R**, isolée à partir de la litière de poulet.

5.2.1 Identification de la souche 4R

Les tableaux ?? et ??, ainsi que les figures correspondantes, présentent les résultats obtenus après l'inoculation de la souche **4R** dans la galerie API 20 E, suivie d'une incubation de 24 heures à 37°C.

Tab. 5.9 : Résultats de la galerie API 20 E de la souche 4R.

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP
—	+	+	+	+	—	+	—	—	—
GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
—	+	+	—	+	+	+	+	+	+



FIG. 5.6 : Resultat de la galerie api20E de la souche 4R

Les résultats biochimiques obtenus ont été saisis dans la grille d'identification disponible sur le site web <https://lab.upbm.org>.

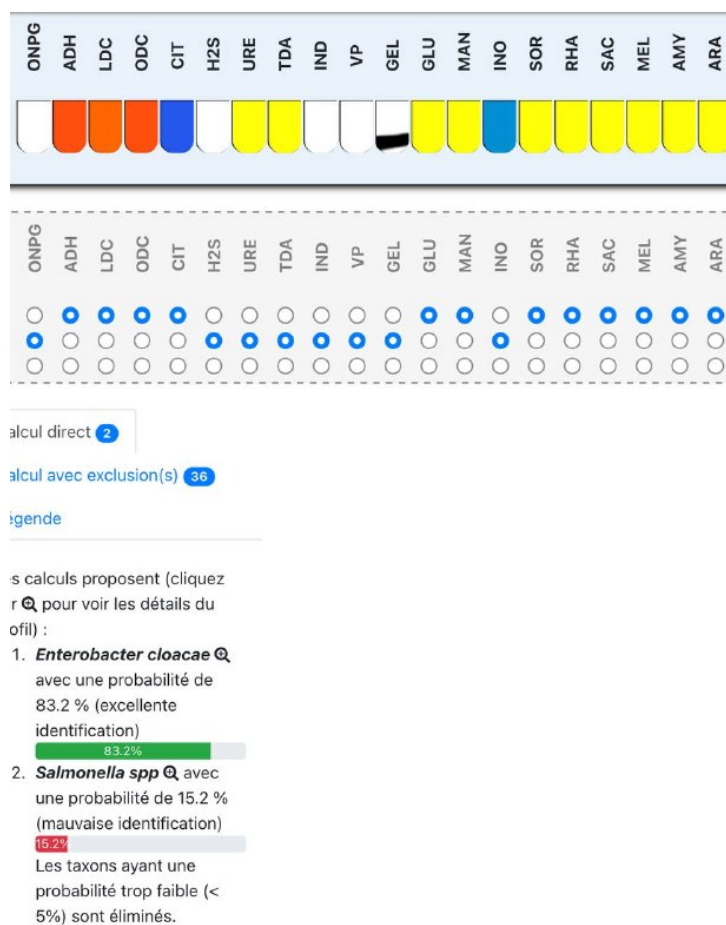


FIG. 5.7 : Capture d'écran de l'affichage de grille d'identification de la souche KA 09 par le site web <https://lab.upbm.org>

À partir du catalogue analytique, il s'avère que la souche **4R** correspond à *Enterobacter cloacae* avec une probabilité de 83,2 % (excellente identification). Il convient de noter que ces résultats d'identification sont basés sur les caractéristiques biochimiques observées dans la galerie API 20 E et qu'ils fournissent des indications préliminaires sur l'espèce bactérienne présente dans notre échantillon. Bien que le score de probabilité obtenu (83.2 %) permette d'identifier la souche 4R comme étant *Enterobacter cloacae*, cette détermination reste une identification présomptive fondée sur l'analyse phénotypique. Pour une identification plus précise et concluante, le recours à des méthodes supplémentaires peut s'avérer nécessaire. Des tests biochimiques complémentaires ou l'utilisation de techniques moléculaires permettraient de confirmer de manière définitive l'identité de la souche isolée. L'intérêt porté à cette souche réside dans son potentiel pathogène et sa capacité de survie

dans l'environnement de la litière de poulet. Par conséquent, une caractérisation plus poussée, notamment concernant son profil de sensibilité aux antibiotiques, est essentielle pour évaluer les risques associés à cette bactérie et pour proposer des mesures de contrôle adéquates.

5.3 Détermination des profils de résistance aux antibiotiques (Antibiogramme)

La sensibilité aux antibiotiques des six souches d'Entérobactéries isolées a été évaluée par la méthode de diffusion en gélose (méthode des disques) selon les recommandations du CLSI M100, 35^e édition (CLSI, 2025). Sept antibiotiques appartenant à différentes familles ont été testés : la Gentamicine (CN 10 µg), la Ciprofloxacine (CIP 5 µg), le Cotrimoxazole (SXT 25 µg), l'Imipénème (IPM 10 µg), la Céfotaxime (CTX 30 µg), l'Amoxicilline–Acide clavulanique (AMC 30 µg) et la Ceftazidime (CAZ 30 µg). Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés en millimètres et interprétés selon les valeurs critiques du CLSI 2025. Les résultats, ainsi que le statut multirésistant (MDR) ou hautement résistant (XDR) de chaque souche selon les critères de Magiorakos et al. (2012), sont présentés dans le Tableau 5.10.

Tab. 5.10 : Résultats de l'antibiogramme des souches isolées et statut de résistance (MDR/XDR).

Souche	CN10	CIP5	SXT25	IPM10	CTX30	AMC30	CAZ30	Statut
1V	R	R (13)	R	S (27)	R (22)	R	R (17)	XDR
2P	S (19)	I (24)	R	R (12)	R	R	R	XDR
3P	S (24)	S (26)	R	S (23)	R	R	R	MDR
4R	S (30)	R (17)	R	S (30)	R (21)	R	I (20)	MDR
5S	S (21)	R (13)	R	S (29)	R (20)	R	I (18)	MDR
6V	S (24)	R (18)	R	S (29)	I (24)	R	R (17)	MDR

R = Résistant **I** = Intermédiaire **S** = Sensible (valeur entre parenthèses = diamètre en mm)

MDR = Multirésistante (non-sensible à ≥ 1 antibiotique dans ≥ 3 catégories) **XDR**
= Hautement résistante (non-sensible dans toutes les catégories sauf ≤ 2) (Magiorakos et al., 2012)

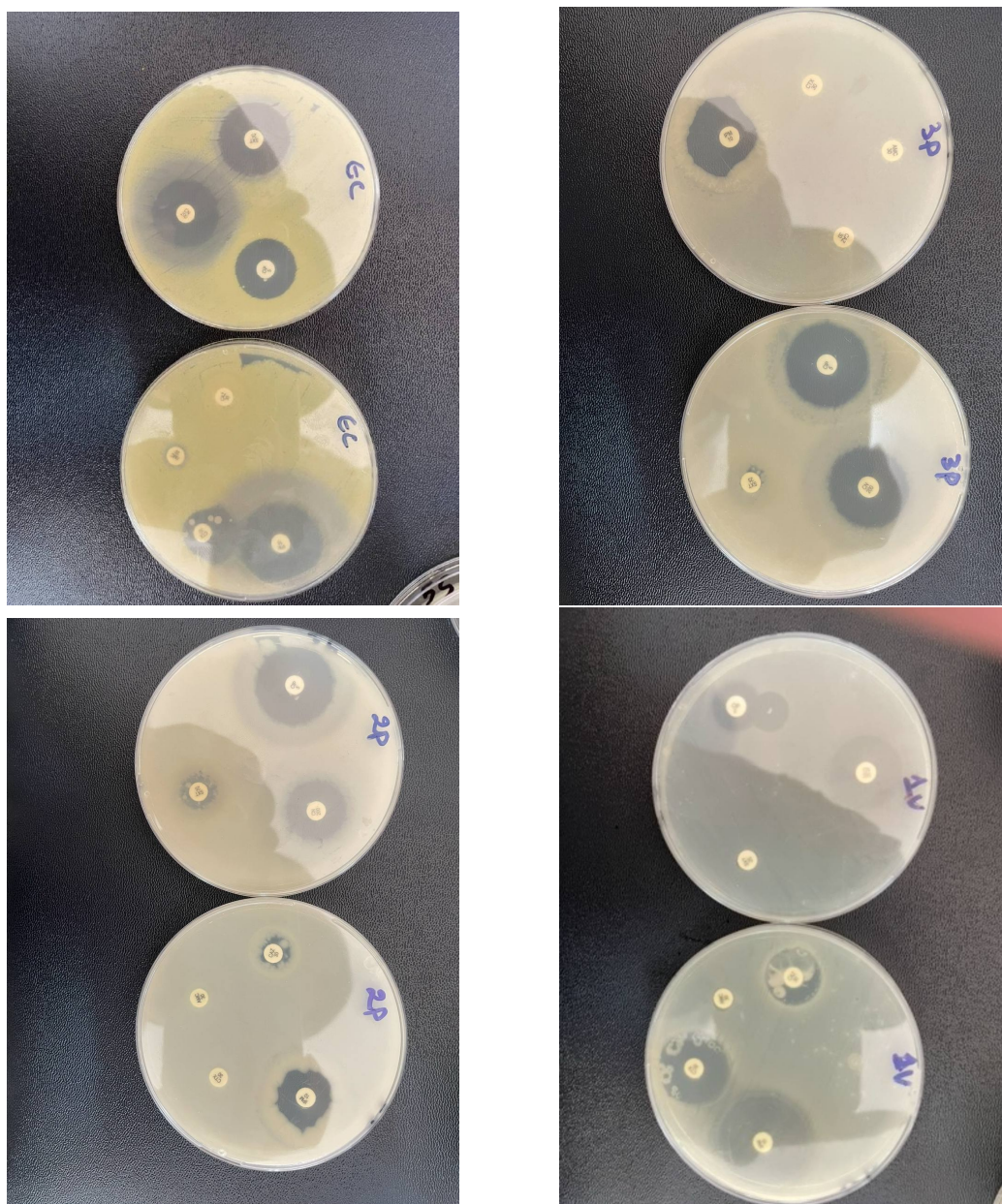


FIG. 5.8 : Profils d'antibiogramme des isolats 1V, 2P, 3P et 4R illustrant différents niveaux de résistance aux antibiotiques testés

L'analyse des profils de résistance des six souches d'Entérobactéries isolées de litière de poulet révèle une résistance élevée et généralisée, avec des niveaux variables selon la famille d'antibiotiques considérée (Tableau 5.10).

Concernant les inhibiteurs du folate et les associations bêta-lactamines/inhibiteur, une résistance totale a été observée : 100 % des souches (6/6) se sont ré-

vélées résistantes au Cotrimoxazole (SXT) ainsi qu'à l'Amoxicilline-Acide clavulanique (AMC). Cette résistance quasi-systématique à l'AMC suggère fortement une production de bêta-lactamases chez l'ensemble des isolats, mécanisme fréquemment rapporté chez les Entérobactéries d'origine avicole (Nhung et al., 2017).

Pour les céphalosporines de troisième génération, 83 % des souches (5/6) présentent une résistance à la Céfotaxime (CTX), la souche restante (6V) exprimant un phénotype intermédiaire — aucune souche ne demeurant pleinement sensible à cette molécule. La Ceftazidime (CAZ) est quant à elle affectée par une résistance chez 67 % des souches (4/6), les deux souches restantes (4R, 5S) présentant un phénotype intermédiaire. L'association d'une résistance à l'AMC et aux céphalosporines de 3^e génération chez la quasi-totalité des isolats est fortement évocatrice de la production de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE), et justifierait la réalisation d'un test de synergie de confirmation (double disque) sur l'ensemble des souches concernées.

Concernant les fluoroquinolones, 67 % des souches (4/6) montrent une résistance à la Ciprofloxacine (CIP), une souche (2P) présentant un phénotype intermédiaire et une seule souche (3P) demeurant pleinement sensible. Ce niveau de résistance élevé aux fluoroquinolones dans un environnement d'élevage avicole est cohérent avec les données rapportées à l'échelle internationale sur l'usage vétérinaire de cette famille d'antibiotiques en aviculture (Nhung et al., 2017).

À l'inverse, les aminoglycosides et les carbapénèmes demeurent les familles les plus actives : la résistance à la Gentamicine (CN) ne concerne qu'une seule souche sur six (17 %), à savoir 1V, et il en va de même pour l'Imipénème (IPM), pour lequel seule la souche 2P est résistante (17 %). L'Imipénème, antibiotique de dernier recours appartenant à la famille des carbapénèmes, demeure ainsi l'agent le plus actif sur l'ensemble des souches testées, confirmant que cette famille conserve globalement une bonne efficacité contre les Entérobactéries isolées de litière de poulet, en cohérence avec les données de la littérature (Founou et al., 2016).

L'analyse combinée de ces profils, présentée dans le Tableau 5.10, met en évidence un phénomène de multirésistance généralisé : l'ensemble des six souches (100 %) répond aux critères de multirésistance (MDR), dont deux souches (1V et 2P, soit 33 %) atteignent le statut de résistance étendue (XDR), n'étant sensibles qu'à une seule catégorie d'antibiotiques (respectivement les carbapénèmes et les aminoglycosides). Ce profil de résistance est particulièrement préoccupant dans le contexte de la filière avicole, la litière de poulet pouvant constituer un réservoir de gènes de résistance transmissibles à l'homme via la chaîne alimentaire ou l'environnement, selon une logique « One Health » (Founou et al., 2016).

5.4 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'Amoxicilline et de l'association Amoxicilline–Acide clavulanique (Amoclan) ont été déterminées par la méthode de dilution en série (méthode des spots) selon des dilutions doublantes, en utilisant *E. coli* comme souche de comparaison. Les résultats sont présentés dans le Tableau 5.11.

Tab. 5.11 : Concentrations minimales inhibitrices ($\mu\text{g/mL}$) de l'Amoxicilline et de l'Amoxicilline-clavulanate, et interprétation selon le CLSI (2025).

Souche	CMI Amox	Interp.	CMI Amoclan	Interp.
<i>E. coli</i>	10	I	160	R
1V	160	R	40	R
2P	10	I	160	R
3P	5	S	20	I
4R	40	R	>2560	R
5S	40	R	>2560	R
6V	320	R	2560	R

S = Sensible ($\leq 8 \mu\text{g/mL}$)

I = Intermédiaire (9–31 $\mu\text{g/mL}$)
 $\mu\text{g/mL}$) (CLSI, 2025)

R = Résistant (≥ 32

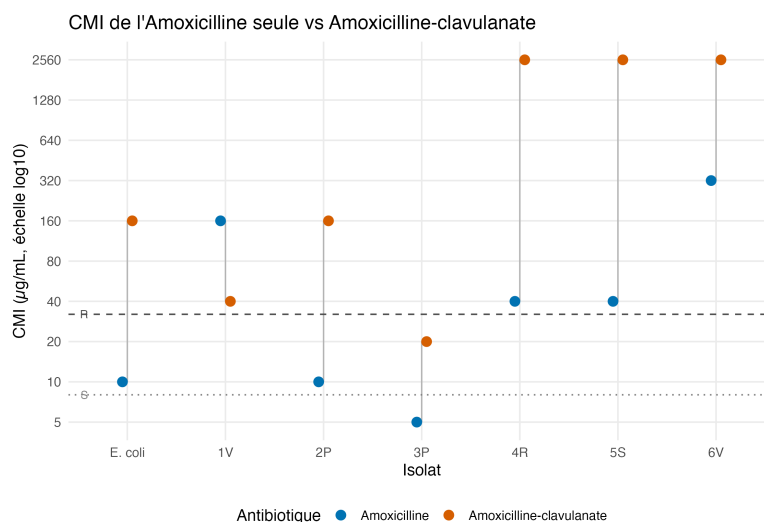


FIG. 5.9 : Concentrations minimales inhibitrices (échelle log₁₀) de l'Amoxicilline seule et de l'Amoxicilline-clavulanate pour chaque souche. Les flèches ouvertes indiquent une CMI hors gamme testée (>2560 µg/mL).

Toutes les souches présentent une CMI élevée à l'Amoxicilline seule, en cohérence avec la résistance quasi-universelle à l'AMC déjà rapportée en antibiogramme (Tableau 5.10), suggérant une production généralisée de bêta-lactamases au sein des isolats de litière avicole.

Un résultat particulièrement notable concerne l'effet de l'acide clavulanique sur la CMI de l'amoxicilline. Alors que l'ajout de cet inhibiteur de bêta-lactamases est classiquement attendu pour restaurer la sensibilité à l'amoxicilline, seule la souche 1V présente cet effet protecteur attendu, avec une diminution de la CMI d'un facteur 4 (160 → 40 µg/mL). À l'inverse, les cinq autres souches (2P, 3P, 4R, 5S, 6V), ainsi que la souche de comparaison *E. coli*, présentent une CMI **plus élevée** en présence de clavulanate qu'avec l'amoxicilline seule, un phénomène paradoxal en apparence mais bien documenté dans la littérature. Ce comportement s'explique par le fait que la concentration d'acide clavulanique est maintenue fixe lors du test (généralement 2 µg/mL), tandis que la concentration d'amoxicilline augmente de façon exponentielle au fil des dilutions : lorsque la bactérie hyperproduit une bêta-lactamase de type pénicillinase (souvent apparentée à TEM-1), la quantité fixe d'inhibiteur devient insuffisante pour neutraliser l'ensemble des molécules d'enzyme aux fortes concentrations d'antibiotique testées, ce qui se traduit par une CMI de l'association apparemment supérieure à celle de l'amoxicilline seule (Reguera et al., 1991 ; Stapleton et al., 1995). Ce mécanisme d'hyperproduction enzymatique constitue, avec la production de bêta-lactamases à

spectre étendu (BLSE) déjà évoquée en antibiogramme, l’une des hypothèses les plus probables pour expliquer la résistance combinée à l’amoxicilline et à l’association amoxicilline-clavulanate observée chez la quasi-totalité des isolats. Une confirmation par test de synergie à double disque ou par recherche moléculaire des gènes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* et *bla_{CTX-M}* permettrait de préciser le(s) mécanisme(s) en cause.

Ces résultats de CMI sont globalement cohérents avec les données d’antibiogramme, où l’ensemble des six souches était déjà classé résistant à l’AMC par diffusion en disque ; seule la souche 3P présente un profil discordant, intermédiaire en CMI (20 µg/mL) contre résistant en disque, une variabilité fréquemment rapportée pour les souches dont la CMI se situe à proximité immédiate du seuil critique de résistance (32 µg/mL).

Associée aux résultats précédents — profils MDR/XDR généralisés (section précédente) et capacité de formation de biofilm modérée chez l’ensemble des isolats (section 5.5) — cette hyperproduction présumée de bêta-lactamases dresse le portrait de populations bactériennes multirésistantes possédant plusieurs mécanismes de résistance combinés (enzymatique et physique via le biofilm), particulièrement préoccupantes dans le contexte de la biosécurité avicole et de la santé publique selon une approche « One Health ».

5.5 Évaluation de la formation de biofilm

La capacité de formation de biofilm des six isolats a été quantifiée par la méthode au Cristal Violet sur microplaque 96 puits selon le protocole d’O’Toole (2011), avec une densité optique mesurée à 492 nm. La valeur du contrôle négatif (OD_c) est de 0,037, servant de référence pour la classification selon les seuils de Stepanović *et al.* (2007). Les valeurs brutes sont présentées dans le Tableau 5.12.

Tab. 5.12 : Valeurs de DO (492 nm) de la microplaque biofilm.

Rangée	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
A	0,077	0,087	0,053	0,075	0,071	0,088	0,047	0,039	0,051	0,023	0,026	0,034
B	0,121	0,102	0,122	0,134	0,093	0,133	0,174	0,180	0,153	—	—	—
C (ctrl)	0,037	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

OD_c (contrôle négatif) = 0,037

Tab. 5.13 : Classification des isolats selon leur capacité de formation de biofilm (seuils de Stepanović *et al.*, 2007).

Souche	DO moyenne	Classification
1V	0,099	Producteur modéré
2P	0,095	Producteur modéré
3P	0,088	Producteur modéré
4R	0,105	Producteur modéré
5S	0,082	Producteur modéré
6V	0,111	Producteur modéré

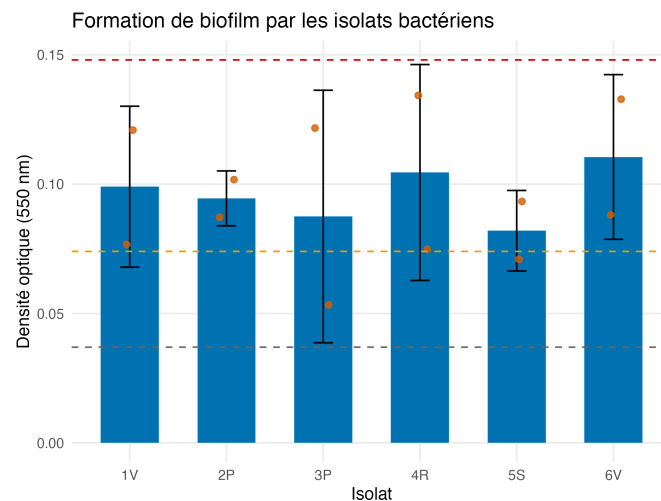


FIG. 5.10 : Formation de biofilm chez les six isolats (moyenne $\pm$ écart-type), avec seuils de classification de Stepanović *et al.* (2007). La ligne pointillée grise indique OD_c (0,037), la ligne orange $2 \times OD_c$ (producteur modéré) et la ligne rouge $4 \times OD_c$ (fort producteur).

L'ensemble des six souches présente une capacité de formation de biofilm classée comme modérée selon les critères de Stepanović *et al.* (2007), avec des valeurs de DO comprises entre 0,082 (5S) et 0,111 (6V), soit 2,2 à 3 fois la valeur du contrôle négatif. Aucune souche ne s'est révélée non-productrice ni fortement productrice de biofilm. Les valeurs de la rangée B sont systématiquement plus élevées que celles de la rangée A pour une même souche, ce qui pourrait refléter une variabilité inter-réplicats liée à la densité initiale de l'inoculum ou au temps d'adhésion ; cette observation souligne l'intérêt de disposer de l'ensemble des six répétitions prévues par le protocole pour consolider la robustesse statistique de cette classification.

La formation de biofilm, même modérée, constitue un avantage sélectif important pour ces bactéries dans l'environnement de la litière avicole. Le biofilm protège les bactéries des conditions environnementales défavorables (dessiccation, pH extrême) ainsi que des traitements désinfectants appliqués lors du nettoyage des élevages. De plus, les bactéries incluses dans un biofilm présentent une tolérance aux antibiotiques pouvant atteindre jusqu'à 1 000 fois celle des bactéries planctoniques, ce qui complique considérablement leur éradication (Stewart et Costerton, 2001). Ces résultats sont préoccupants dans le contexte de la biosécurité avicole et soulignent la nécessité d'utiliser des protocoles de désinfection adaptés, ciblant spécifiquement les communautés bactériennes sessiles plutôt que les seules formes planctoniques.

5.6 Isolement et évaluation de l'activité lytique des bactériophages

5.6.1 Mise en évidence de l'activité lytique par spot test

L'activité lytique des bactériophages isolés à partir d'échantillons d'eaux usées de la région de Saïda a été évaluée par la méthode du spot test sur tapis bactérien, selon le protocole décrit en section IV.12. Trois souches représentatives ont été sélectionnées pour cette évaluation : 4R (*Enterobacter cloacae*, identification confirmée par galerie API20E), 3P (*Klebsiella* sp., identification présomptive) et 1V (Enterobactérie non identifiée avec certitude au niveau du genre), choisies en raison de la diversité de leurs profils biochimiques et de leurs profils de résistance aux antibiotiques déjà documentés (Tableau 5.10). Les résultats sont présentés dans le Tableau 5.14 et illustrés à la Figure ??.

Des zones de lyse visibles, caractérisées par une diminution ou une disparition du tapis bactérien au niveau des zones de dépôt phagique, ont été observées sur les trois souches testées, confirmant la présence de particules phagiques actives dans le filtrat d'eaux usées enrichi. Les profils de lyse diffèrent toutefois nettement d'une souche à l'autre, tant en intensité qu'en persistance à travers les dilutions, reflétant une efficacité lytique variable selon l'hôte bactérien.

Tab. 5.14 : Évaluation de l'activité lytique des bactériophages sur les isolats bactériens par la méthode des spots.

Isolat	Pré-identification	SM	Phage pur	Dilution 10 ⁻¹	Dilution 10 ⁻²	Dilution 10 ⁻³	Spectre lytique
4R	<i>Enterobacter cloacae</i>	26 mm	13 mm	12 mm	13 mm	14 mm	Étroit – titre limité, activité stable
3P	<i>Klebsiella</i> sp.	24 mm	25 mm	25 mm	22 mm	23 mm	Large – titre élevé, plateau
1V	<i>Escherichia coli</i>	22 mm	26 mm	0 mm ^a	23 mm	25 mm	Large – titre élevé

SM : suspension mère (spot qualitatif du lysat brut).

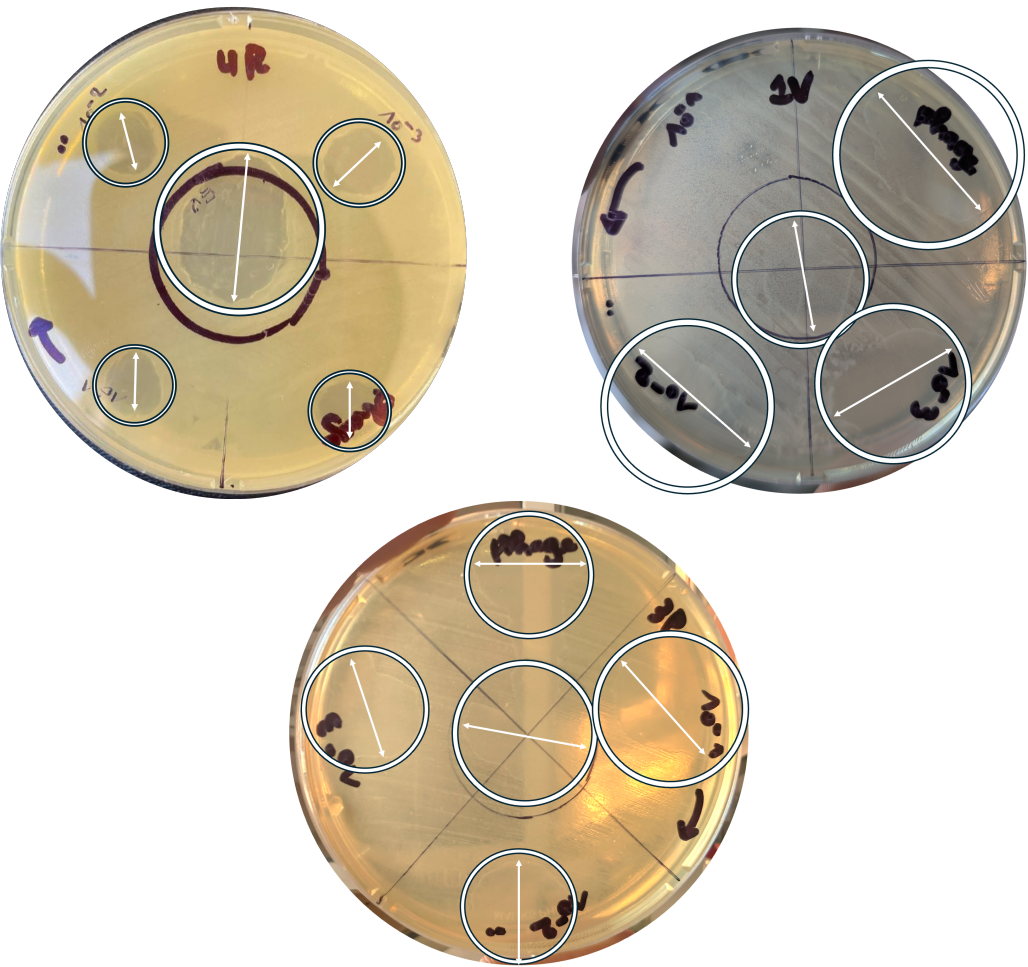


FIG. 5.11 : Évaluation de l'activité lytique par méthode de spot test sur les souches 4R, 1V et 3P.

5.6.2 Analyse des profils de lyse par souche

Souche 4R (*Enterobacter cloacae*)

La souche 4R a présenté le profil de lyse le plus restreint parmi les trois isolats testés, avec des zones d'inhibition de 26 mm pour la suspension mère, 13 mm pour le phage pur non dilué, puis des valeurs stables de 12 à 14 mm sur l'ensemble des dilutions testées (10^{-1} à 10^{-3}). Contrairement au profil dose-réponse classique attendu, où la lyse décroît progressivement avec la dilution, les diamètres observés ici restent quasiment constants, suggérant que le titre phagique effectif reste suffisant pour produire une lyse détectable, mais de faible amplitude, tout au long de la gamme de dilutions testée. Cette stabilité à un diamètre restreint est compatible avec une efficacité d'infection intrinsèquement plus faible sur cette souche – possiblement liée à une densité réduite de récepteurs phagiques de surface ou à un mécanisme de résistance partiel (système de restriction-modification, mutation des récepteurs) – plutôt qu'avec un simple effet de concentration virale (Abedon, 2011). Une titration complète par la méthode des doubles couches d'agar permettrait de déterminer précisément le titre effectif du phage sur cet hôte et de confirmer si cette efficacité restreinte se maintient au-delà de la dilution 10^{-3} (Kropinski et al., 2009).

Souche 3P (*Klebsiella* sp.)

La souche 3P a présenté le profil de lyse le plus marqué et le plus stable des trois isolats, avec des diamètres de 24 à 25 mm pour la suspension mère et le phage pur, se maintenant entre 22 et 23 mm jusqu'à la dilution 10^{-3} . L'absence de décroissance nette du diamètre de lyse sur trois ordres de grandeur de dilution peut s'expliquer par un titre phagique initial très élevé dans le filtrat, la zone de lyse demeurant en régime de confluence (lyse complète du tapis bactérien) sur l'ensemble de la gamme testée ; la relation entre titre viral et diamètre de lyse n'étant véritablement linéaire qu'à des dilutions plus élevées, où des plages individualisées apparaissent (Kropinski et al., 2009). Une hypothèse alternative, à ne pas exclure en l'absence de titrage quantitatif, est un phénomène de « lyse from without » (lyse sans infection productive), où une forte densité de particules phagiques – même partiellement inactives ou défectueuses – provoque une déstabilisation directe de la membrane bactérienne sans réplication virale complète (Abedon, 2011). Des essais complémentaires (titrage par double couche d'agar avec dilutions plus poussées, traitement du filtrat par DNase pour exclure une contamination par des acides nucléiques libres, contrôle par chauffage du filtrat pour inactiver spécifiquement les protéines phagiques) permettraient de trancher

entre ces deux hypothèses et de confirmer la nature strictement phagique de l'activité lytique observée sur cette souche.

Souche 1V (Entérobactérie non identifiée)

La souche 1V a présenté un profil globalement comparable à celui de 3P, avec des diamètres élevés pour la suspension mère (22 mm) et le phage pur (26 mm), ainsi qu'aux dilutions 10^{-2} (23 mm) et 10^{-3} (25 mm). Le résultat obtenu à la dilution 10^{-1} (absence totale de lyse, 0 mm), encadré par des zones de lyse franches aux dilutions immédiatement inférieure et supérieures, est incompatible avec une cinétique d'infection continue et doit être considéré comme un artefact technique probable (dépôt manqué, contamination ponctuelle du puits, ou erreur de lecture) plutôt que comme un phénomène biologique réel. Une répétition de l'essai à cette dilution spécifique est nécessaire avant toute conclusion définitive. En excluant cette valeur aberrante, le profil de 1V rejoint celui de 3P : une activité lytique forte et stable sur l'ensemble de la gamme de dilutions testée, cohérente avec un titre phagique initial élevé et une bonne efficacité d'infection sur cet hôte.

5.6.3 Discussion sur le potentiel thérapeutique et antibiofilm des bactériophages isolés

Les résultats obtenus démontrent que des bactériophages actifs sur des Entérobactéries multirésistantes isolées de litière avicole sont présents dans les eaux usées de la région de Saïda, confirmant le potentiel de cet environnement comme réservoir de phages à visée biotechnologique, comme cela a été largement rapporté dans la littérature (Sulakvelidze et al., 2001 ; Loc-Carrillo et Abedon, 2011). Il est notable que les souches les plus fortement ciblées par les phages isolés (3P et 1V) figurent également parmi les souches les plus résistantes aux antibiotiques caractérisées précédemment : 1V est en effet classée XDR, n'étant sensible qu'aux carbapénèmes (Tableau 5.10), tandis que 3P présente un profil MDR marqué par une résistance combinée au cotrimoxazole, à l'amoxicilline-clavulanate et aux céphalosporines de 3^e génération. Cette convergence positionne ces deux souches comme des candidats particulièrement pertinents pour une approche de phagothérapie ou de combinaison phage-antibiotique, à un moment où l'arsenal antibiotique conventionnel apparaît fortement compromis à leur égard.

À l'inverse, la souche 4R, bien que classée MDR, présente la sensibilité phagique la plus restreinte des trois isolats testés, illustrant l'absence de corrélation systématique entre le niveau de résistance aux antibiotiques d'une

souche et sa sensibilité aux phages – ces deux propriétés reposant sur des mécanismes moléculaires indépendants (récepteurs de surface pour les phages, cibles enzymatiques ou modifications de perméabilité pour les antibiotiques).

Au-delà de leur action sur les cellules planctoniques, l'intérêt majeur de ces phages réside dans leur aptitude potentielle à agir sur les biofilms modérément producteurs mis en évidence chez l'ensemble des six isolats de l'étude (section 5.5). Il a en effet été démontré que certains bactériophages peuvent dégrader la matrice extracellulaire des biofilms par la production de dépolymérase virales, facilitant l'accès aux cellules sessiles et restaurant leur sensibilité aux traitements antimicrobiens (Harper et al., 2014; Pires et al., 2017). Cette propriété reste toutefois à démontrer expérimentalement pour les phages isolés dans la présente étude et constitue une perspective naturelle de ce travail.

La variabilité du spectre lytique observée entre les trois souches testées reflète la spécificité d'hôte étroite caractéristique des bactériophages, qui constitue à la fois un avantage – permettant de cibler sélectivement les pathogènes sans affecter la flore commensale environnante – et une limite pour une application décontaminante à large spectre en filière avicole (Loc-Carrillo et Abedon, 2011). Le recours à des cocktails de phages polyvalents, approche recommandée dans les applications de biocontrôle alimentaire et environnemental (Endersen et al., 2014), représente ainsi une perspective importante pour élargir la couverture à l'ensemble des isolats problématiques identifiés dans cette étude, notamment ceux pour lesquels aucune activité lytique n'a encore été testée (2P, 5S, 6V).

5.7 Cinétique de lyse bactérienne par les bactériophages

5.7.1 Dispositif expérimental

La cinétique de lyse a été évaluée en microplaque 96 puits selon trois conditions testées en triplicat : un témoin bactérien sans phage (S_1 + solution physiologique), une condition avec phage pur non dilué (S_1 + Solution F) et une condition avec phage dilué au 1/10 dans du CaCl_2 10 mM. La densité optique à 600 nm a été mesurée toutes les 30 minutes pendant 3 h 30 (0 à 210 min), suivie d'une incubation prolongée jusqu'à 24 heures avec une mesure finale unique à cet horizon. Les cinq isolats testés correspondaient aux puits A (2P), B (3P), C (1V), D (Ec) et E (4R).

Étant donné le faible nombre de réplicats biologiques ($n=3$) mais un suivi temporel dense (8 points cinétiques sur la phase 0–210 min), l'effet du trai-

tement phagique a été évalué par une ANOVA à mesures répétées en plan mixte (condition en facteur inter-sujets, temps en facteur intra-sujet), plutôt que par des comparaisons ponctuelles à un seul temps, afin de maximiser la puissance statistique disponible. La condition de sphéricité a été vérifiée par le test de Mauchly et s'est révélée respectée dans tous les cas. Les résultats sont présentés dans le Tableau 5.15 et la Figure 5.12.

Tab. 5.15 : Résultats de l'ANOVA à mesures répétées (plan mixte) sur la cinétique de croissance (0–210 min).

Souche	p(condition) – Pur	p(condition × temps) – Pur	p(condition) – Dil 1/10	p(condition × temps) – Dil 1/10
2P	0,180	0,562	0,891	0,417
3P	0,776	0,077	0,030*	0,001**
1V	0,583	0,145	0,527	0,254
Ec	0,081	0,003**	0,051	0,002**
4R	0,246	0,141	0,221	0,012*

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ns : non significatif. Le terme d'interaction condition × temps

teste si la trajectoire de croissance diffère entre témoin et phage.

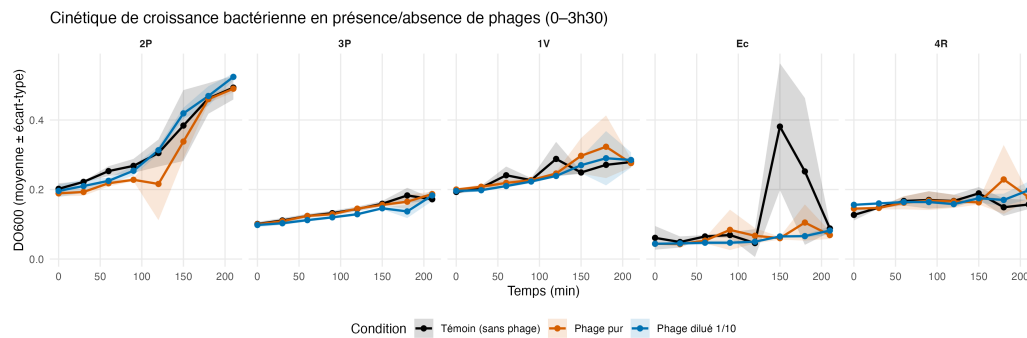


FIG. 5.12 : Cinétique de croissance bactérienne (DO_{600} , moyenne $\pm$ écart-type, $n=3$) de t_0 à t_{3h30} . Les astérisques indiquent une interaction condition × temps significative (ANOVA à mesures répétées).

5.7.2 Résultats et interprétation

L'ANOVA à mesures répétées révèle des profils de réponse contrastés selon les isolats. Pour la souche **Ec**, une interaction condition × temps hautement significative a été détectée aussi bien avec le phage pur ($p=0,003$) qu'avec le phage dilué au 1/10 ($p=0,002$), indiquant une divergence progressive et statistiquement robuste entre les trajectoires de croissance témoin et traitée au cours du temps, malgré une variabilité importante du témoin. La souche **3P** présente un effet significatif du phage dilué au 1/10, à la fois sur la moyenne globale ($p=0,030$) et sur la trajectoire temporelle ($p=0,001$) – un

résultat notable, la dilution du phage montrant ici un effet plus détectable que le phage pur ($p=0,077$ pour l'interaction), possible signe d'un phénomène de MOI (multiplicité d'infection) sous-optimal à concentration non diluée. La souche **4R** montre également une interaction significative avec le phage dilué ($p=0,012$), sans effet détectable du phage pur. En revanche, aucun effet significatif, ni sur la moyenne ni sur la trajectoire temporelle, n'a été détecté pour les souches **2P** et **1V** dans cette fenêtre de 3 h 30, quelle que soit la concentration de phage testée.

Ces résultats nuancent l'interprétation d'un effet phagique uniforme : la lyse bactérienne, lorsqu'elle est statistiquement détectable dans les 3 premières heures, l'est davantage à travers l'évolution temporelle de la croissance (interaction) qu'à travers un simple écart de moyenne globale – ce qui est cohérent avec une action lytique cumulative qui s'installe progressivement plutôt qu'un effet immédiat et constant.

À titre exploratoire et descriptif, les réductions de densité optique mesurées au point unique à 24 heures (Figure ??) sont importantes pour l'ensemble des cinq isolats (46 à 83 %), mais ne peuvent être testées avec la même robustesse statistique, s'agissant d'une mesure unique en fin de cinétique, hors du cadre de l'ANOVA à mesures répétées appliquée à la phase 0–210 min. Ces valeurs restent néanmoins cohérentes avec les effets significatifs détectés en ANOVA pour Ec, 3P et 4R, et suggèrent une poursuite de l'activité lytique au-delà de la fenêtre d'observation continue pour l'ensemble des isolats, y compris 2P et 1V.

5.7.3 Activité antibiofilm des bactériophages

L'évaluation de l'activité antibiofilm a été réalisée par la méthode du cristal violet sur la même microplaque 96 puits, après incubation de 18 heures à 37 °C en conditions statiques (Tableau 5.16, Figure 5.13). S'agissant d'une mesure unique par réplicat ($n=3$ par condition, sans dimension temporelle), le test de Mann-Whitney a été conservé pour cette analyse, conformément à l'approche non paramétrique utilisée dans le reste de ce mémoire pour les données de biofilm.

Tab. 5.16 : Réduction du biofilm (DO_{570}) en présence de phages par rapport au témoin positif (T+), et significativité statistique.

Souche	% réduction biofilm	Mann-Whitney (T+ vs Phage)
2P	−12,0 %	ns (p = 1,000)
3P	−168,2 %	ns (p = 0,100)
1V	−23,3 %	ns (p = 0,400)
Ec	0,0 %	ns (p = 1,000)
4R	−17,9 %	ns (p = 0,700)

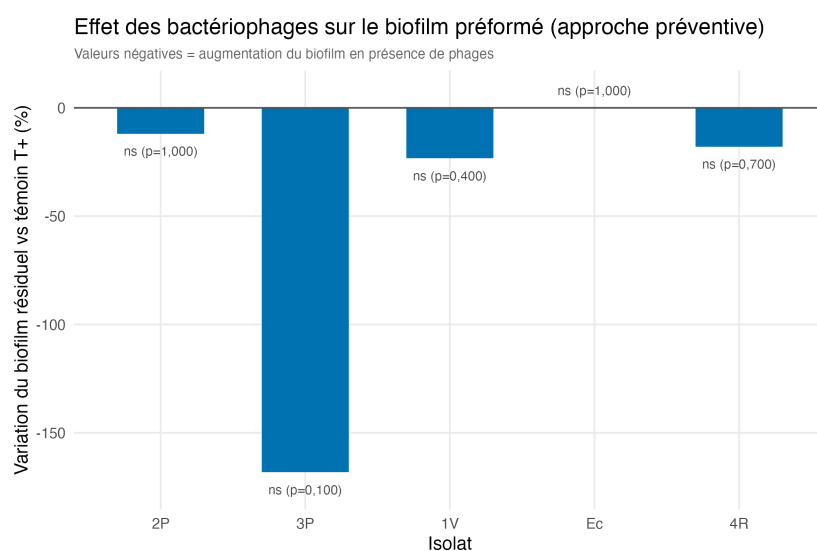


FIG. 5.13 : Variation du biofilm résiduel (DO_{570}) en présence de phages par rapport au témoin positif, par isolat.

Aucune réduction significative du biofilm n'a été détectée pour aucun des cinq isolats, et une tendance à l'augmentation du biofilm résiduel en présence de phages est même observée pour quatre isolats sur cinq. Le cas de 3P est particulièrement marqué (−168,2 %), pouvant s'expliquer par la libération de débris cellulaires lors de la lyse phagique, augmentant la coloration non spécifique au cristal violet (Chibeu et al., 2012) – une hypothèse cohérente avec l'effet lytique significatif détecté pour cette même souche en cinétique planctonique (Tableau 5.15). L'absence d'effet antibiofilm significatif, malgré une activité lytique démontrée sur cellules planctoniques pour Ec, 3P et 4R, souligne la difficulté d'une approche préventive par rapport à un biofilm déjà établi, et appelle à des essais complémentaires sur biofilms préformés (24 h d'adhésion avant ajout des phages), avec un nombre accru de réplicats.

5.7.4 Perspectives thérapeutiques et lutte contre le bio-film

Nos investigations confirment que les eaux usées de Saïda représentent un réservoir de phages dotés d'un potentiel de biocontrôle vis-à-vis des isolats multirésistants de litière avicole caractérisés dans les sections précédentes. La capacité de ces phages à cibler efficacement plusieurs des isolats étudiés — notamment les souches 1V et 2P, classées XDR en antibiogramme (Tableau 5.10) — les positionne comme des outils biotechnologiques prometteurs pour des stratégies de lutte alternative, à un moment où l'efficacité des antibiotiques conventionnels sur ces mêmes souches apparaît fortement compromise.

Au-delà de leur action sur les bactéries planctoniques, l'intérêt de ces entités réside également dans leur aptitude potentielle à démanteler la structure des biofilms modérément producteurs mis en évidence chez l'ensemble des six isolats (section 5.5). Par le biais de dépolymérases virales, certains phages sont en mesure de dégrader la matrice extracellulaire, facilitant l'accès aux cellules sessiles et restaurant leur vulnérabilité aux traitements antimicrobiens — un mécanisme qui reste toutefois à démontrer expérimentalement pour les phages isolés dans la présente étude, et qui constitue une perspective naturelle de ce travail.

Bien que la sélectivité d'hôte soit une caractéristique intrinsèque des bactériophages — offrant l'avantage de préserver le microbiote non ciblé —, elle nécessite, pour une application élargie, le recours à des cocktails de phages polyvalents couvrant l'ensemble des isolats problématiques, y compris ceux pour lesquels aucune activité lytique n'a encore été démontrée (5S, 6V). Cette approche constitue une voie prometteuse pour le biocontrôle des Entérobactéries multirésistantes dans la filière avicole de la région de Saïda.

5.8 Développement d'un outil numérique d'aide à la décision vétérinaire

5.8.1 Justification stratégique dans le cadre du projet PHAGOTECH AI

La stratégie globale de ce travail, articulée autour du concept PHAGOTECH AI (section 3.6), repose sur l'hypothèse qu'une lutte efficace contre l'antibiorésistance en aviculture algérienne ne peut se limiter à la seule mise à disposition d'un agent de biocontrôle — aussi performant soit-il —, mais doit également s'attaquer aux facteurs comportementaux et structurels qui

retardent la détection des épisodes infectieux et favorisent le recours tardif, inapproprié ou non supervisé aux antibiotiques (Chapitre I, section 2). Parmi ces facteurs figure en bonne place le déficit d'accès rapide à un avis vétérinaire ou à un laboratoire d'analyse dans de nombreuses zones d'élevage algériennes, en particulier semi-intensives ou familiales (Bensahla Tani et al., 2020).

C'est pour répondre à ce maillon précis de la chaîne – la détection précoce et l'orientation de l'éleveur – qu'un prototype d'application numérique, *Animal Health Assistant*, a été développé en parallèle du volet expérimental de ce mémoire. Son rôle n'est pas de se substituer à l'analyse microbiologique de laboratoire, mais de réduire le délai entre l'apparition des premiers signes cliniques chez l'animal et la consultation d'un professionnel compétent – délai pendant lequel se prennent le plus souvent, sur le terrain, des décisions d'automédication antibiotique inadaptées (Hammoudi et al., 2022).

5.8.2 Objectifs de l'outil

Trois objectifs opérationnels ont guidé le développement de cette application :

- Permettre à un éleveur, à partir d'une simple description des symptômes observés (et, le cas échéant, d'une photographie), d'obtenir une orientation diagnostique préliminaire immédiate, disponible à toute heure et sans délai d'attente.
- Réduire le recours à l'automédication antibiotique non supervisée en encourageant explicitement, dans chaque rapport généré, la consultation d'un professionnel et la réalisation d'examens complémentaires adaptés.
- Faciliter la mise en relation effective entre l'éleveur et l'offre de soins vétérinaires disponible localement, via un annuaire consultable de vétérinaires et de laboratoires d'analyses.

5.8.3 Fonctionnement du système

Le parcours utilisateur, illustré schématiquement en Figure 5.14, se déroule en cinq étapes :

1. **Saisie clinique.** L'utilisateur renseigne l'espèce animale concernée, une description libre des symptômes observés, et de manière optionnelle l'âge,

le poids, le sexe, la durée d'évolution des symptômes, la localisation de l'élevage, ainsi qu'une photographie de l'animal.

2. **Construction de la requête.** Ces informations sont assemblées selon un gabarit de requête (*prompt*) structuré, conçu pour orienter le modèle de langage vers une réponse cliniquement pertinente, spécifique à l'espèce concernée, et strictement formatée. Le texte des symptômes constitue la base quasi-exclusive du diagnostic (99 % du poids décisionnel selon la conception du système) ; l'image, lorsqu'elle est fournie, ne sert qu'à extraire des signes visuels complémentaires (plumage, écoulements, posture, etc.), sans jamais modifier à elle seule les probabilités diagnostiques calculées.
3. **Interrogation du modèle de langage.** La requête est transmise à un modèle de langage multimodal externe (par défaut Gemini 2.5 Flash), interrogé via son interface de programmation (API). Le modèle retourne une évaluation structurée comprenant : les maladies possibles, les agents pathogènes envisageables (bactéries, virus, parasites) avec leurs probabilités respectives, un niveau de sévérité, une liste d'examens complémentaires recommandés et de mesures de prise en charge, ainsi qu'une évaluation générale de l'état de santé.
4. **Enrichissement et traduction.** Le rapport généré est automatiquement décliné en trois langues (anglais, français, arabe), afin de s'adapter au contexte linguistique algérien, puis mis en forme sous la forme d'un rapport vétérinaire structuré, exportable au format PDF.
5. **Orientation.** En complément du rapport, l'éleveur est mis en relation avec l'annuaire des vétérinaires et laboratoires disponibles dans sa région, consultable directement depuis l'interface.

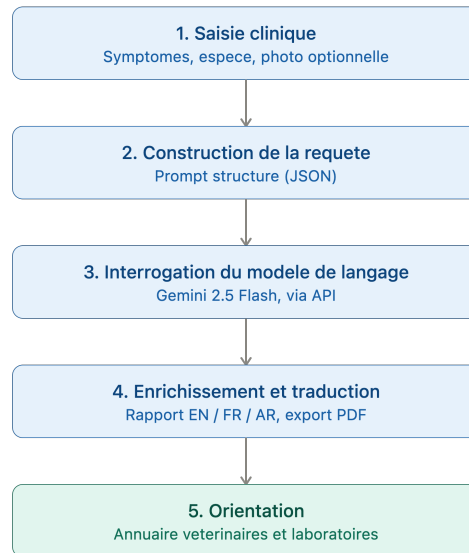


FIG. 5.14 : Flux de traitement de l'application Animal Health Assistant, de la saisie des symptômes à l'orientation vers un professionnel.

5.8.4 Articulation avec le volet microbiologique du mémoire

Dans sa version actuelle, l'outil fonctionne de manière indépendante du volet expérimental (Chapitres IV et V) : il ne s'appuie pas sur les données phénotypiques (antibiogramme, CMI, biofilm) ou sur les résultats d'activité phagique générés au cours de ce travail. Cette articulation constitue une perspective de développement explicitement identifiée en conclusion de ce mémoire : à terme, les profils de résistance caractérisés pour les isolats de la région de Saïda pourraient enrichir la base de connaissances mobilisée par le système, en orientant par exemple les recommandations d'examen complémentaires vers une antibiogramme ciblé, ou en signalant à l'éleveur la prévalence locale de multirésistance déjà documentée par ce travail.

Conclusion Générale

Ce travail avait pour objectif d'isoler et de caractériser les entérobactéries présentes dans la litière avicole de la région de Saïda, d'évaluer leur profil de résistance aux antibiotiques ainsi que leur capacité à former des biofilms, et d'explorer le potentiel lytique de bactériophages isolés à partir d'eaux usées locales.

L'ensemencement sur milieu MacConkey a permis d'isoler six morphotypes bactériens distincts (1V, 2P, 3P, 4R, 5S et 6V) à partir d'échantillons de litière présentant un pH globalement alcalin, compris entre 7,59 et 8,37. La caractérisation biochimique, complétée par la galerie API 20E, a permis d'identifier avec certitude la souche 4R comme *Enterobacter cloacae* (probabilité de 83,2 %), tandis que les cinq autres isolats n'ont pu être identifiés qu'au niveau présumptif du genre, faute d'identification API 20E complémentaire – une limite qu'il conviendra de lever dans la suite de ce travail.

L'antibiogramme a révélé un phénomène de multirésistance généralisé et préoccupant : l'ensemble des six souches s'est révélé résistant à l'amoxicilline-acide clavulanique et au cotrimoxazole (100 %), avec une résistance marquée aux céphalosporines de 3^e génération (83 % pour la céfotaxime, 67 % pour la ceftazidime) et à la ciprofloxacine (67 %). Seuls les carbapénèmes et, dans une moindre mesure, les aminoglycosides ont conservé une efficacité satisfaisante. L'ensemble des isolats répond aux critères de multirésistance (MDR), dont deux (1V et 2P) atteignent le statut de résistance étendue (XDR). La détermination des CMI vis-à-vis de l'amoxicilline et de l'amoxicilline-clavulanate a confirmé ces niveaux de résistance élevés et mis en évidence un phénomène d'hyperproduction enzymatique probable chez la majorité des isolats, la présence de l'acide clavulanique n'entraînant paradoxalement pas de restauration de la sensibilité.

L'évaluation de la formation de biofilm par la méthode au cristal violet a classé l'ensemble des isolats comme producteurs modérés, avec des valeurs de densité optique comprises entre 0,082 et 0,111 à 492 nm, soit 2,2 à 3 fois la valeur du contrôle négatif. Cette capacité biofilmogène, bien que modérée, constitue un facteur de persistance supplémentaire dans l'environnement avi-

cole.

Concernant les bactériophages, les filtrats issus des eaux usées de Saïda ont démontré une activité lytique confirmée par spot test sur trois souches représentatives (4R, 3P, 1V), avec des zones de lyse nettes mais des profils contrastés selon l'hôte bactérien. Le suivi cinétique de la lyse, réalisé sur cinq isolats (2P, 3P, 1V, Ec, 4R) et analysé par ANOVA à mesures répétées, a révélé un effet phagique statistiquement significatif pour trois d'entre eux (3P, Ec et 4R), tandis qu'aucun effet détectable n'a pu être mis en évidence pour 2P et 1V dans la fenêtre d'observation testée – une absence d'effet qui coïncide notablement avec le statut de résistance étendue (XDR) de ces deux souches, suggérant l'existence possible de mécanismes de défense bactérienne partagés entre résistance aux antibiotiques et résistance aux phages. En revanche, aucune activité antibiofilm significative n'a été détectée dans les conditions préventives testées, soulignant la nécessité d'évaluer ces phages sur des biofilms préformés.

En complément de ce volet microbiologique, un prototype d'application numérique d'aide à la décision vétérinaire, exploitant des modèles de langage multimodaux par ingénierie de requêtes, a été développé dans le cadre de la stratégie PHAGOTECH AI. Cet outil, conçu pour réduire le délai entre l'apparition des symptômes chez l'animal et la consultation d'un professionnel, constitue une contribution complémentaire et exploratoire, dont l'articulation avec les données phénotypiques caractérisées dans ce travail représente une perspective de développement à part entière.

Ces résultats, bien que devant être confortés par un nombre accru de répliquats et l'extension des tests aux souches 5S et 6V non encore évaluées vis-à-vis des phages, positionnent les bactériophages isolés localement comme des candidats prometteurs pour le développement d'une stratégie de biocontrôle complémentaire aux approches conventionnelles. En perspective, ce travail ouvre la voie à la confirmation moléculaire des identifications présumptives, au séquençage des gènes de résistance impliqués, à la constitution d'un cocktail phagique polyvalent couvrant l'ensemble des isolats caractérisés – y compris les souches XDR pour lesquelles l'activité phagique reste à démontrer –, et à des essais en conditions terrain adaptées au contexte des élevages avicoles algériens, dans une perspective résolument ancrée dans l'approche *One Health*. ““

Bibliographie

- [1] Abedon, S. T. (2011). Lysis from without. *Bacteriophage*, 1(1), 46–49.
- [2] Abedon, S. T., García, P., Mullany, P., & Aminov, R. (2017). Phage therapy : Past, present and future. *Frontiers in Microbiology*, 8, 981. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00981>
- [3] Adeolu, M., Alnajjar, S., Naushad, S., & Gupta, R. S. (2016). Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales' : Proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(12), 5575–5599.
- [4] Aggad, H., Mimoune, N., & Khelef, D. (2021). Avian pathogenic *Escherichia coli* in Algerian broiler farms : Prevalence, antimicrobial resistance profiles and virulence genes. *Veterinary World*, 14(3), 612–619.
- [5] Andreatti Filho, R. L., Higgins, J. P., Higgins, S. E., Gaona, G., Wolfenden, A. D., Tellez, G., & Hargis, B. M. (2007). Ability of bacteriophages isolated from different sources to reduce *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in vitro and in vivo. *Poultry Science*, 86(9), 1904–1909.
- [6] Belhout, C., Tali-Maamar, H., Lasri, S., Grimont, F., Satta, D., & Rahal, K. (2021). Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from poultry in Algeria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 57(4), 106310.
- [7] Bensahla Tani, A., Satta, D., & Ouzrout, R. (2020). Aviculture en Algérie : état des lieux, contraintes et perspectives. *Revue des Sciences Agronomiques et Forestières*, 3(1), 1–15.

-
- [8] Bjarnsholt, T., Alhede, M., Alhede, M., Eickhardt-Sørensen, S. R., Moser, C., Kühl, M., ... & Høiby, N. (2013). The in vivo biofilm. *Trends in Microbiology*, 21(9), 466–474.
 - [9] Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., & Dubois-Brissonnet, F. (2015). Resistance of bacterial biofilms to disinfectants : A review. *Biofouling*, 27(9), 1017–1032.
 - [10] Brives, C., & Pourraz, J. (2020). Phage therapy as a potential solution in the fight against AMR : Obstacles and possible futures. *Palgrave Communications*, 6(1), 100.
 - [11] Chibeu, A., Lingohr, E. J., Masson, L., Manges, A., Harel, J., Ackermann, H.-W., Kropinski, A. M., & Boerlin, P. (2012). Bacteriophages with the ability to degrade uropathogenic *Escherichia coli* biofilms. *Viruses*, 4(4), 471–487.
 - [12] Chua, S. L., Liu, Y., Yam, J. K. H., Chen, Y., Vejborg, R. M., Tan, B. G., ... & Tolker-Nielsen, T. (2016). Dispersed cells represent a distinct stage in the transition from bacterial biofilm to planktonic lifestyles. *Nature Communications*, 5, 4462.
 - [13] Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms : A common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318–1322.
 - [14] De Reu, K., Messens, W., Heyndrickx, M., Rodenburg, T. B., Uyttendaele, M., & Herman, L. (2018). Bacterial contamination of table eggs and the influence of housing systems. *World's Poultry Science Journal*, 64(1), 5–19.
 - [15] Djahoudi, A., Ramdani-Bougues, N., & Achour, W. (2022). First detection of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in poultry in Algeria. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 28, 147–149.
 - [16] Donado-Godoy, P., Gardner, I., Byrne, B. A., León, M., Calle, S., Tafur, M. A., ... & Woutersen, M. (2021). The diversity of resistance patterns and mechanisms in antimicrobial-resistant *Salmonella* from poultry in Colombia. *Zoonoses and Public Health*, 68(3), 267–280.
 - [17] European Food Safety Authority (EFSA). (2020). Opinion on the use of bacteriophage preparations in food and feed. *EFSA Journal*, 18(12), 6367.

-
- [18] European Food Safety Authority (EFSA) & European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2022). The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 20(12), 7666.
- [19] European Medicines Agency (EMA). (2022). Reflection paper on phage therapy. EMA/CHMP/167235/2022.
- [20] Endersen, L., O'Mahony, J., Hill, C., Ross, R. P., McAuliffe, O., & Coffey, A. (2014). Phage therapy in the food industry. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5, 327–349.
- [21] Facklam, R., & Elliott, J. A. (1995). Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(4), 479–495.
- [22] FAO. (2022). Gateway to poultry production and products. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/poultry-production-products>
- [23] Food and Drug Administration (FDA). (2019). Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 834 — *Listeria*-specific bacteriophages. U.S. FDA.
- [24] Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms : An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563–575.
- [25] Founou, L. L., Founou, R. C., & Essack, S. Y. (2016). Antibiotic resistance in the food chain : A developing country-perspective. *Frontiers in Microbiology*, 7, Article 1881.
- [26] Górski, A., Międzybrodzki, R., Łobocka, M., Głowacka-Rutkowska, A., Bednarek, A., Borysowski, J., ... & Weber-Dąbrowska, B. (2020). Phage therapy : What have we learned ? *Viruses*, 10(6), 288.
- [27] Guo, W., Shan, K., Xu, B., & Li, J. (2020). Determining the resistance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* to common disinfectants and elucidating the underlying resistance mechanisms. *Pathogens and Global Health*, 109(4), 185–192.
- [28] Hammoudi, A., Benlahcen, K., & Aggad, H. (2022). Antibiotic use practices in poultry farming in western Algeria : A survey study. *Veterinary Medicine and Science*, 8(1), 98–108.

- [29] Harper, D. R., Parracho, H. M. R. T., Walker, J., Sharp, R., Hughes, G., Werthén, M., Lehman, S., & Morales, S. (2014). Bacteriophages and biofilms. *Antibiotics*, 3(3), 270–284.
- [30] Huff, W. E., Huff, G. R., Rath, N. C., Balog, J. M., & Donoghue, A. M. (2006). Evaluation of aerosol spray and intramuscular injection of bacteriophage to treat an *Escherichia coli* respiratory infection. *Poultry Science*, 82(7), 1108–1112.
- [31] International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). (2023). ICTV Virus Taxonomy : 2023 Release. <https://ictv.global/taxonomy>
- [32] Jarlier, V., Nicolas, M. H., Fournier, G., & Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae* : Hospital prevalence and susceptibility patterns. *Reviews of Infectious Diseases*, 10(4), 867–878.
- [33] Jault, P., Leclerc, T., Jennes, S., Pirnay, J. P., Que, Y. A., Resch, G., ... & Ravat, F. (2019). Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn) : A randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(1), 35–45.
- [34] Kathayat, D., Lokesh, D., Ranjit, S., & Rajashekara, G. (2021). Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) : An overview of virulence and pathogenesis factors, zoonotic potential, and control strategies. *Pathogens*, 10(4), 467.
- [35] Khennouchi, N. C., Lezzar, N., Aberkane, S., Bouaziz, A., Bouzid, K., Djara, S., & Benmansour, R. (2023). Characterization of *mcr-1* positive *E. coli* in broiler farms in eastern Algeria. *Letters in Applied Microbiology*, 76(2), ovac049.
- [36] Kortright, K. E., Chan, B. K., Koff, J. L., & Turner, P. E. (2019). Phage therapy : A renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria. *Cell Host & Microbe*, 25(2), 219–232.
- [37] Kraemer, S. A., Ramachandran, A., & Perron, G. G. (2021). Antibiotic pollution in the environment : From microbial ecology to public policy. *Microorganisms*, 7(6), 180.
- [38] Kropinski, A. M., Mazzocco, A., Waddell, T. E., Lingohr, E., & Johnson, R. P. (2009). Enumeration of bacteriophages by double agar overlay

- plaque assay. In M. R. J. Clokie & A. M. Kropinski (Eds.), *Bacteriophages : Methods and protocols*, Volume 1 (pp. 69–76). Humana Press.
- [39] Leung, S. S. Y., Parumasivam, T., Nguyen, A., Gengenbach, T., Carter, E. A., Carrigy, N. B., ... & Chan, H. K. (2018). Effect of storage conditions on the stability of spray dried, inhalable bacteriophage powders. *International Journal of Pharmaceutics*, 521(1–2), 141–149.
- [40] Loc Carrillo, C., & Connerton, I. F. (2011). *Campylobacter* phage therapy : A potential solution to the zoonotic problem. *Microbial Biotechnology*, 4(3), 352–363.
- [41] Loc-Carrillo, C., & Abedon, S. T. (2011). Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, 1(2), 111–114.
- [42] Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., ... & 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.
- [43] Malik, D. J., Sokolov, I. J., Vinner, G. K., Mancuso, F., Cinquerrui, S., Vladisavljevic, G. T., ... & Stapley, A. G. F. (2017). Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. *Advances in Colloid and Interface Science*, 249, 100–133.
- [44] Meredith, H., Hargreaves, K. R., Hughes, S., Smith, D. L., Clokie, M. R. J., & Atterbury, R. J. (2022). Efficacy of a bacteriophage mixture to control *Salmonella* in artificially contaminated chicken meat. *Viruses*, 14(9), 2051.
- [45] Ministère de l’Agriculture et du Développement Rural (MADR). (2022). Plan d’Action National sur la Résistance aux Antimicrobiens (PAN-RAM). République Algérienne Démocratique et Populaire.
- [46] Ministère de l’Agriculture et du Développement Rural (MADR). (2023). Tableau de bord de la filière avicole algérienne. Direction des Statistiques Agricoles et des Systèmes d’Information (DSASI).
- [47] Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>

- [48] Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., ... & Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655.
- [49] Nhung, N. T., Chansiripornchai, N., & Carrique-Mas, J. J. (2017). Antimicrobial resistance in bacterial poultry pathogens : A review. *Frontiers in Veterinary Science*, 4, Article 126.
- [50] O'Toole, G. A. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments*, 47, e2437.
- [51] Pires, D. P., Melo, L., Vilas Boas, D., Sillankorva, S., & Azeredo, J. (2017). Phage therapy as an alternative or complementary strategy to prevent and control biofilm-related infections. *Current Opinion in Microbiology*, 39, 48–56.
- [52] Poirel, L., Madec, J. Y., Lupo, A., Schink, A. K., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, S. (2018). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017>
- [53] Principi, N., Silvestri, E., & Esposito, S. (2019). Advantages and limitations of bacteriophages for the treatment of bacterial infections. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 513.
- [54] Rahal, K., Boudjemâa, B., Marniche, F., & Ouchetati, I. (2020). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from poultry meat in Algeria. *African Journal of Microbiology Research*, 14(11), 462–470.
- [55] Reguera, J. A., Baquero, F., Pérez-Díaz, J. C., & Martínez, J. L. (1991). Factors determining resistance to beta-lactam combined with beta-lactamase inhibitors in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 27(5), 569–575.
- [56] Schooley, R. T., Biswas, B., Gill, J. J., Hernandez-Morales, A., Lancaster, J., Lessor, L., ... & Hamilton, T. (2017). Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(10), e00954-17.
- [57] Stapleton, P., Wu, P. J., King, A., Shannon, K., French, G., & Phillips, I. (1995). Incidence and mechanisms of resistance to the combination of

- amoxicillin and clavulanic acid in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(11), 2478–2483.
- [58] Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukić, S., Ćirković, I., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates : Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, 115(8), 891–899.
- [59] Stewart, P. S., & Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, 358(9276), 135–138.
- [60] Sulakvelidze, A., & Barrow, P. (2005). Phage therapy in animals and agribusiness. In E. Kutter & A. Sulakvelidze (Eds.), *Bacteriophages : Biology and Applications* (pp. 335–380). CRC Press.
- [61] Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., & Morris, J. G. (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), 649–659.
- [62] Tiseo, K., Huber, L., Gilbert, M., Robinson, T. P., & Van Boeckel, T. P. (2019). Global trends in antimicrobial use in food animals from 2017 to 2030. *Antibiotics*, 8(3), 44.
- [63] Tsonos, J., Vandenheuvel, D., Briers, Y., De Greve, H., Hernalsteens, J. P., & Lavigne, R. (2014). Hurdles in bacteriophage-based treatment of poultry : A systematic review. *Veterinary Microbiology*, 171(3–4), 275–282.
- [64] Van Boeckel, T. P., Pires, J., Silvester, R., Zhao, C., Song, J., Criscuolo, N. G., ... & Laxminarayan, R. (2019). Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- and middle-income countries. *Science*, 365(6459), eaaw1944.
- [65] World Bank. (2022). *Drug-Resistant Infections : A Threat to Our Economic Future*. World Bank Group.
- [66] World Health Organization (WHO). (2019). *Critically important antimicrobials for human medicine* (6th revision). WHO Press.
- [67] World Health Organization (WHO). (2021). *Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2021*. WHO Press.

Annexe 1 : Milieux de culture

Gélose nutritive

- 5 g/L de peptone ;
- 1 g/L d'extrait de viande ;
- 2 g/L d'extrait de levure ;
- 5 g/L de chlorure de sodium (NaCl) ;
- 15 g/L d'agar ;
- 1 L d'eau distillée.

Bouillon nutritif (BN)

- 5 g/L de peptone ;
- 1 g/L d'extrait de viande ;
- 2 g/L d'extrait de levure ;
- 5 g/L de chlorure de sodium (NaCl) ;
- 1 L d'eau distillée.

Bouillon Luria-Bertani (LB)

- 10 g/L de tryptone ;
- 5 g/L d'extrait de levure ;
- 10 g/L de chlorure de sodium (NaCl) ;
- 1 L d'eau distillée.

Eau peptonée

- 10 g/L de peptone ;
- 5 g/L de chlorure de sodium (NaCl) ;
- 1 L d'eau distillée.

Eau physiologique stérile

- 9 g/L de chlorure de sodium (NaCl) ;
- 1 L d'eau distillée.

Annexe 2 : Les étapes de la coloration de Gram

Préparer un frottis bactérien sur une lame propre et stérile. Déposer une goutte d'eau distillée (ED) sur la lame, puis prélever une colonie bactérienne isolée et l'étaler uniformément. Laisser sécher à l'air libre, puis procéder à la coloration selon les étapes suivantes :

1. Recouvrir le frottis de violet de gentiane (cristal violet) pendant 1 minute, puis rincer à l'eau distillée.
2. Recouvrir le frottis de lugol pendant 1 minute, puis rincer à l'eau distillée.
3. Décolorer à l'aide d'un mélange alcool-éthanol pendant 15 à 30 secondes, puis rincer immédiatement à l'eau distillée. Cette étape est critique : une décoloration insuffisante entraîne de faux Gram positifs, tandis qu'une décoloration excessive entraîne de faux Gram négatifs.
4. Recouvrir le frottis de safranine (ou de fuchsine) pendant 30 à 60 secondes. Rincer à l'eau distillée puis laisser sécher la lame.
5. Déposer une goutte d'huile à immersion et observer au microscope avec l'objectif $\times 100$ (grossissement total $\times 1000$).

Interprétation des résultats

- **Bactéries Gram positives** : apparaissent en violet foncé.
- **Bactéries Gram négatives** : apparaissent en rose à rouge (coloration à la safranine).