

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة سعيدة الدكتور مولاي الطاهر
Université de Saida Dr MOULAY Tahar



كلية علوم الطبيعة والحياة

Faculté des Sciences de la nature et de la Vie

قسم البيولوجيا

Département de Biologie

N° d'Ordre

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master

En Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

Résistance aux antibiotiques et biofilm des bactéries à Gram négatif de viande hachée bovine : potentiel des bactériophages locaux

Présenté par :

- Melle : KAID Mokhtaria Amira
- Melle : AOUIMEUR Khadidja Chahinez

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

Président

Me. BENMEHIEDDINE Assia

MCB Université UMTS

Examineur

Me. BOURIAH Nacera

MCB Université UMTS

Rapporteur

Mr. BENABBOU Taha Ahmed

MCA Université UMTS

Année universitaire 2025/2026

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة سعيدة الدكتور مولاي الطاهر
Université de Saida Dr MOULAY Tahar



N° d'Ordre

كلية علوم الطبيعة والحياة
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
قسم البيولوجيا
Département de Biologie

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master

En Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

Résistance aux antibiotiques et biofilm des bactéries à Gram négatif de viande hachée bovine : potentiel des bactériophages locaux

Présenté par :

- Melle : KAID Mokhtaria Amira
- Melle : AOUIMEUR Khadidja Chahinez

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

Président	Me. BENMEHIEDDINE Assia	MCB Université UMTS
Examineur	Me. BOURIAH Nacera	MCB Université UMTS
Rapporteur	Mr. BENABBOU Taha Ahmed	MCA Université UMTS

Année universitaire 2025/2026

Dédicaces

Avant tout, je remercie Allah le Tout-Puissant pour la santé, la force et la réussite qu'Il m'a accordées tout au long de ce parcours.

Je dédie ce travail à ma grand-mère. Qu'Allah lui fasse miséricorde et l'accueille dans Son vaste Paradis.

À ma mère, ma force et ma plus belle bénédiction. Merci pour ton amour infini, tes sacrifices, ton soutien et tes prières qui m'ont accompagnée à chaque étape. Cette réussite est autant la tienne que la mienne.

À celui qui a toujours cru en moi, qui m'a soutenue et encouragée tout au long de mon parcours, mon père. Merci pour tous tes efforts, ta confiance et ta présence. Que Dieu te protège et te récompense pour tout ce que tu as fait pour moi.

À mes chères sœurs, Fatima, Safa et Wissam, merci pour votre affection et votre présence. Que Dieu vous accorde bonheur et réussite.

À mes cousines, Bakhta, Abir et Amina.

À Amira, ma compagne de route dans cette aventure. Nous avons commencé ce chemin ensemble, partagé les mêmes défis, les mêmes inquiétudes et les mêmes espoirs. Merci pour ton aide précieuse et tous les souvenirs que nous avons construits.

À Nesrine et Meriem, merci pour votre amitié sincère et pour tous les beaux souvenirs partagés.

À tous ceux qui ont cru en moi et m'ont soutenue de près ou de loin.

Khadija

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à :

Mes très chers parents, aucun mot ne pourrait exprimer réellement votre juste valeur, mon profond amour, mon respect et ma vive gratitude. En hommage à tous les sacrifices que vous avez consentis pour moi durant mes longues années d'études. Je vous remercie de m'avoir fait ce que je suis aujourd'hui et de m'avoir appris à vivre dans l'honneur et dans la dignité. Votre confiance et vos encouragements m'ont toujours donné la force de persévérer et d'avancer. Quoi que je fasse, je ne pourrai jamais vous rendre ce que vous avez fait pour moi. J'espère avoir été digne de votre confiance. Puisse Dieu vous accorder santé, bonheur et longue vie.

À mon très cher frère Islam, je te souhaite une vie pleine de bonheur, de santé et de réussite.

À mes très chères sœurs, Lamis, Chourouk et Racha, je vous souhaite un avenir plein de joie, de réussite et surtout de santé.

À ma jumelle et chère binôme Khadidja, merci de partager cette merveilleuse aventure avec moi. Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.

À mes chères amies Nesrine et Meriem, merci pour tous les moments que nous avons partagés ensemble.

À tous ceux que j'aime, et à tous ceux qui m'aiment...

Amira

Remerciements

Avant tout, nous remercions Allah le Tout-Puissant de nous avoir accordé la santé, la patience et la volonté nécessaires pour mener à bien ce travail.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à notre encadreur, Monsieur BENABBOU Taha Ahmed, pour son accompagnement, sa disponibilité, ses précieux conseils ainsi que son soutien tout au long de la réalisation de ce mémoire. Son expertise et son engagement ont grandement contribué à l'aboutissement de ce travail.

Nous adressons également nos sincères remerciements aux membres du jury, Madame Benmehieddine Assia et BOURIAH Nacera, pour l'honneur qu'elles nous font en acceptant d'évaluer ce travail et pour l'intérêt qu'elles lui portent.

Nos remerciements s'étendent à l'ensemble des enseignants qui ont contribué à notre formation universitaire et nous ont transmis leurs connaissances tout au long de notre parcours académique.

Nous exprimons également notre reconnaissance à tous ceux qui ont participé, de près ou de loin, à la réalisation de ce mémoire.

Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à nos familles et à nos proches pour leur soutien moral, leur confiance et leurs encouragements permanents tout au long de nos études.

Liste des abréviations

ADH : Arginine dihydrolase

AMC : Amoxicilline + Acide Clavulanique.

AMP : Ampicilline

AMX : Amoxicilline

AMY : Amygdaline

API 20 E : Appareillage Et Procédé D'Identification

ARA : Arabinose

ATB : antibiotique.

CAZ : Ceftazidime

CIP : Ciprofloxacine

CIT : Tri sodium citrate

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CN : Gentamicine

CTX : Cefotaxime

E. coli : *Escherichia coli*

ECEH : *E. coli* Entéro- Hémorragique

Gel : gelatinase

Glu : glucose

GN : Gélose nutritive

H₂S : Sulfure d'hydrogène

I : Intermédiaire

IND : indole

INO : Inositol

IPM : Imipénème (antibiotique de la famille des carbapénèmes)

ISO : International Standard Organisation

LDC: Lysine decarboxylase

Mac: Mac conkey

Man: mannose

MH : Miller Hinton

ODC : Ornithine Décarboxylase

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONPG : L'orthonitrophényl- β -galactoside

QS : Quorum Sensing

R : Résistante

RHA : Rhamnose

RM : Rouge De Méthyle

S : Sensible

SOR : Sorbitol

SXT : Triméthoprim - sulfaméthoxazole

TDA : Tryptophane

URE : uréase

VP : Réaction de Voges-Proskauer

Liste des tableaux

Tableau 1 : Disques d'antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme.....	42
Tableau 2: Dénombrement des bactéries à Gram négatif sur milieu MacConkey.....	52
Tableau 3: Résultats de l'identification biochimique — Échantillon 1 (KA)	57
Tableau 4: Résultats de l'identification biochimique — Échantillon 2 (KM).....	58
Tableau 5: Résultats de l'identification biochimique — Échantillon 3 (KD)	58
Tableau 6: Résultats de l'antibiogramme — Profils de résistance des isolats bactériens Interprétation selon les recommandations CLSI (2025).....	67
Tableau 7 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI, µg/mL) des isolats déterminés par la méthode Spot	68
Tableau 8: Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'amoxicilline par la méthode de microdilution en microplaque.....	72
Tableau 9: Évaluation de l'activité lytique du bactériophage sur les isolats bactériens par la méthode des spots.....	81
Tableau 10: Activité antibiofilm des bactériophages évaluée par la méthode au cristal violet (DO ₅₇₀ nm)	88

Liste des figures

Figure 1 Structure et aspect microscopique des Enterobacteriaceae (Denis et <i>al.</i> 2007).....	14
Figure 2 : Caractère biochimique des quelques entérobactéries (Benameur, 2011).....	17
Figure 3 : origine et diversité des antibiotiques : des sources naturelles aux dérivés synthétiques (Hutchings et <i>al.</i> , 2019).....	19
Figure 4 Les différentes modes d'action des antibiotique (GPBP ,2017).....	21
Figure 5 classes principales d'antibiotique et leurs structures chimiques générales (Pancu et <i>al.</i> , 2021).....	22
Figure 6 observation microscopique d'un biofilm (Taoufik, 2020).....	26
Figure 7 Les différentes étapes de la formation d'un biofilm bactérien (Lebeaux et Ghigo, 2012).....	27
Figure 8 : Préparation de la suspension mère et réalisation des dilutions décimales	35
Figure 9 : Principe de la coloration de Gram	36
Figure 10 : Étapes de la conservation à long terme des isolats bactériens	37
Figure 11 : Principe et interprétation du test de l'oxydase	38
Figure 12 Principe du test de la catalase.....	38
Figure 13 : Présentation générale de la galerie API 20E.....	40
Figure 14 : Aspect des galeries API20E et API10S avant incubation.....	41
Figure 15 : Principe de la détermination de la CMI par dilution en gélose.....	45
Figure 16 : Aspect des colonies bactériennes développées sur le milieu MacConkey après incubation	51
Figure 17: Aspect microscopique de l'isolat KA2 après coloration de Gram (grossissement $\times 1000$).....	53
Figure 18 : Réaction au test de catalase observée chez les isolats KA3 (3) et KA8 (4).	54

Figure 19 : Résultats du test oxydase pour les isolats KA1 (1) et KA2 (2)	55
Figure 20 : Capture d'écran de l'affichage de grille d'identification de la souche KA 09 par le site web https://lab.upbm.org	60
Figure 21: Profils d'antibiogramme des isolats KD8, KD9 et KD10 illustrant différents niveaux de résistance aux antibiotiques testés	61
Figure 22: (A) Taux de résistance (%) par antibiotique et par boucherie. (B) Significativité statistique des différences entre boucheries KM et KD (test exact de Fisher ; seuil $p = 0,05$ indiqué en pointillé).	62
Figure 23: Distribution du nombre d'antibiotiques résistants par souche selon la boucherie d'origine.	65
Figure 24 : Exemple de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'association amoxicilline-acide clavulanique (AMC) chez les isolats bactériens par la méthode de dilution en gélose (méthode Spot).	69
Figure 25 : Résultats de la formation du biofilm déterminée par la méthode de la microplaque suivie d'une coloration au cristal violet.	75
Figure 26: Capacité de formation de biofilm des 30 isolats mesurée par la méthode du cristal violet (DO_{570} nm).	76
Figure 27: Corrélation entre la capacité de formation de biofilm (DO_{570} nm) et le nombre d'antibiotiques résistants par souche ($n = 22$ souches communes).....	80
Figure 28: Évaluation de l'activité lytique par méthode de <i>spot test</i> sur les souches KD9, KM6 et KA9.....	82
Figure 29: Comparaison de la cinétique de lyse bactérienne des trois souches testées (KA8, KD9, KM6) en présence de bactériophages (phage pur et dilué 1/10) par rapport au témoin sans phage. DO_{600} nm (moyenne $\pm$ écart-type, $n = 3$ réplicats).	85
Figure 30: Densité optique à 570 nm (DO_{570}) mesurée après coloration au cristal violet pour les trois conditions expérimentales	88
Figure 31: Pourcentage de réduction du biofilm	89

Figure 32: Synthèse de l'activité des bactériophages. Ligne supérieure (a) : cinétique de lyse en milieu liquide (DO_{600} nm, 4h + 24h). Ligne inférieure (b) : activité antibiofilm quantifiée par cristal violet (DO_{570} nm, 18h). 90

Résumé

Cette étude vise à caractériser les bactéries à Gram négatif isolées de viande hachée bovine commercialisée dans trois boucheries de la commune d'Aïn El Hadjar (wilaya de Saïda, Algérie), en évaluant leur profil de résistance aux antibiotiques, leur capacité de formation de biofilm et la potentialité des bactériophages comme alternative aux antibiotiques. Au total, 30 souches ont été isolées sur milieu MacConkey à partir de trois échantillons présentant des charges bactériennes allant de $1,44 \times 10^5$ à $5,85 \times 10^6$ UFC/g, dépassant les seuils réglementaires fixés par le Règlement CE n°2073/2005. L'identification biochimique a orienté les isolats vers les genres *Escherichia*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Hafnia* et *Aeromonas*. L'antibiogramme, réalisé sur 24 souches selon les recommandations du CLSI (2025), a révélé une résistance universelle à l'amoxicilline-acide clavulanique (100%), une résistance majoritaire à la pénicilline G (100%) et au cotrimoxazole (54,2%), et une sensibilité totale à la gentamicine (100%). L'analyse statistique par le test de Kruskal-Wallis a mis en évidence une différence significative de la distribution des profils de multirésistance (MDR) entre boucheries ($H = 8,770$; $p = 0,012$, avec un niveau de résistance significativement plus élevé dans la boucherie KD. L'évaluation de la formation de biofilm par cristal violet (microplaque 96 puits, méthode de Stepanović et al., 2007) a révélé que 80% des souches étaient productrices de biofilm, dont 16,7% fortes productrices. Des bactériophages isolés d'eaux usées locales ont démontré une activité lytique significative sur trois souches représentatives, avec des taux de réduction de la croissance bactérienne de 62,5 à 75,9% en cinétique microplaque (DO_{600} nm, 4h et 24h). L'activité antibiofilm, évaluée par cristal violet après 18h d'incubation, n'a pas atteint le seuil de significativité statistique. Ces résultats soulignent la nécessité d'une surveillance renforcée de la résistance aux antibiotiques dans la chaîne alimentaire et confirment le potentiel des bactériophages comme agents de biocontrôle dans un cadre "One Health".

Mots-clés : Bactéries à Gram négatif, viande hachée bovine, résistance aux antibiotiques, multirésistance (MDR), biofilm, cristal violet, bactériophages, phagothérapie, Saïda, Algérie.

Abstract

This study aimed to characterize Gram-negative bacteria isolated from bovine minced meat sold in three butcher shops in the municipality of Aïn El Hadjar (Saïda province, Algeria), assessing their antibiotic resistance profiles, biofilm-forming capacity, and the potential of bacteriophages as an alternative to antibiotics. A total of 30 strains were isolated on MacConkey agar from three samples showing bacterial loads ranging from 1.44×10^5 to 5.85×10^6 CFU/g, exceeding the regulatory thresholds set by European Regulation CE n°2073/2005. Biochemical identification oriented the isolates toward the genera *Escherichia*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Hafnia*, and *Aeromonas*. Antibiotic susceptibility testing, performed on 24 strains according to CLSI (2025) guidelines, revealed universal resistance to amoxicillin-clavulanate (100%), high resistance to penicillin G (100%) and trimethoprim-sulfamethoxazole (54.2%), and complete susceptibility to gentamicin (100%). Statistical analysis using the Kruskal-Wallis test demonstrated a significant difference in the distribution of multidrug resistance (MDR) profiles between butcher shops ($H = 8.770$; $p = 0.013$), with significantly higher resistance levels in butcher shop KD. Biofilm formation assessment using the crystal violet method (96-well microplate, Stepanović et al., 2007) revealed that 80% of strains were biofilm producers, including 16.7% strong producers. Bacteriophages isolated from local wastewater demonstrated significant lytic activity against three representative strains, with bacterial growth reduction rates of 62.5 to 75.9% in microplate kinetic assays (OD_{600} nm, 4h and 24h). Antibiofilm activity, assessed by crystal violet staining after 18h incubation, did not reach statistical significance. These findings underscore the need for enhanced surveillance of antibiotic resistance in the food chain and confirm the potential of bacteriophages as biocontrol agents within a One Health framework.

Keywords: Gram-negative bacteria, bovine minced meat, antibiotic resistance, multidrug resistance (MDR), biofilm, crystal violet, bacteriophages, phage therapy, Saïda, Algeria.

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى توصيف البكتيريا سالبة الغرام المعزولة من اللحم البقري المفروم المُباع في ثلاثة ملاحم بمنطقة عين الحجر (ولاية سعيدة، الجزائر)، من خلال تقييم مقاومتها للمضادات الحيوية، وقدرتها على تشكيل الغشاء الحيوي، فضلاً عن استكشاف إمكانية استخدام العاثيات البكتيرية كبديل للمضادات الحيوية. تم عزل ما مجموعه 30 سلالة على وسط ماکونكي من ثلاثة عينات أظهرت أحياناً بكتيرية تتراوح بين 1.44×10^5 و 5.85×10^6 وحدة مكونة للمستعمرات/غ، متجاوزة الحدود التنظيمية المنصوص عليها في اللائحة الأوروبية CE n°2073/2005. أشارت التعرف الكيموحيوي إلى انتماء العزلات إلى أجناس *Escherichia* و *Shigella* و *Enterobacter* و *Citrobacter* و *Serratia* و *Hafnia* و *Aeromonas*. كشف اختبار حساسية المضادات الحيوية المُجرى على 24 سلالة وفق توصيات CLSI (2025) عن مقاومة شاملة للأموكسيسيلين-حمض الكلافولانيك (100%)، ومقاومة عالية للبنسيلين G (100%) والكوتريموكسازول (54.2%)، وحساسية تامة للجنتاميسين (100%). أثبت اختبار كروسكال-واليس وجود فروق ذات دلالة إحصائية في توزيع ملامح المقاومة المتعددة بين الملاحم الثلاثة ($H = 8.770$; $p = 0.013$). كما كشف تقييم الغشاء الحيوي بطريقة البنفسج الكريستالي (صفحة 96 بئراً، وفق Stepanović et al.، 2007) أن 80% من السلالات قادرة على تشكيل الغشاء الحيوي، منها 16.7% منتجة بشكل مرتفع. أبدت العاثيات البكتيرية المعزولة من مياه الصرف الصحي المحلية نشاطاً تحليلياً ملحوظاً على ثلاث سلالات مختارة، بنسب تخفيض للنمو البكتيري تتراوح بين 62.5% و 75.9% في المقاييس الحركية. تؤكد هذه النتائج ضرورة تعزيز المراقبة الوبائية لمقاومة المضادات الحيوية في السلسلة الغذائية، وترسخ إمكانية توظيف العاثيات البكتيرية كعوامل مكافحة بيولوجية في إطار مقارنة "صحة واحدة."

الكلمات المفتاحية: بكتيريا سالبة الغرام، لحم بقري مفروم، مقاومة المضادات الحيوية، مقاومة متعددة الأدوية، غشاء حيوي، بنفسج كريستالي، عاثيات بكتيرية، علاج العاثيات، سعيدة، الجزائر.

Table des matières

Liste des abréviations	i
Liste des tableaux	iii
Liste des figures.....	iv
Résumé	vii
Abstract.....	viii
ملخص	ix
Table des matières	x

PARTIE I. INTRODUCTION 1

PARTIE II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 6

II.1. GENERALITES SUR LA VIANDE HACHEE BOVINE ET LES ENTEROBACTERIES	7
II.1.1. VIANDE HACHEE BOVINE	7
II.1.1.1. Définition	7
II.1.1.2. Impact du hachage sur la contamination.....	7
II.1.1.3. Conditions d'évolution des germes.....	8
II.1.1.3.1. Facteurs intrinsèques.....	8
II.1.1.3.1.1. Nutriments	8
II.1.1.3.1.2. pH.....	8
II.1.1.3.1.3. Activité de l'eau	9
II.1.1.3.2. Facteurs extrinsèques	9
II.1.1.3.2.1. Température	9
II.1.1.3.2.2. Contamination initiale.....	9
II.1.1.4. Principaux germes contaminant la viande hachée	9
II.1.1.4.1. Flore saprophyte.....	9
II.1.1.4.1.1. Flore aérobie mésophile	10
II.1.1.4.1.2. Levures.....	10
II.1.1.4.1.3. Moisissures	10
II.1.1.4.2. Flore pathogène :.....	10
II.1.1.4.2.1. <i>Escherichia coli</i> (EHEC)	10
II.1.1.4.2.2. <i>Salmonella</i>	11
II.1.1.4.2.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	11

II.2. GENERALITES SUR LES ENTEROBACTERIES	12
II.2.1. HISTORIQUE	12
II.2.2. DEFINITION	12
II.2.3. HABITAT	13
II.2.4. TAXONOMIE	13
II.2.5. CARACTERE BACTERIOLOGIQUE.....	14
II.2.5.1. Caractère morphologique.....	14
II.2.5.2. caractères cultureux	14
II.2.5.3. Caractère antigénique.....	15
II.2.5.4. Caractère biochimique	16
II.2.6. POUVOIR PATHOGENE	17
II.3. ANTIBIOTIQUES ET ANTIBIORESISTANCE	18
II.3.1. ANTIBIOTIQUES.....	18
II.3.1.1. Historique.....	18
II.3.1.2. Définition	19
II.3.1.3. Mode d'action	20
II.3.1.4. Classification des antibiotiques	21
II.3.1.4.1. Critère de classification.....	21
II.3.2. ANTIBIORESISTANCE	22
II.3.2.1. Définition de antibiorésistance	22
II.3.2.2. Types de résistance aux antibiotiques.....	23
II.3.2.2.1. Résistance naturelle	23
II.3.2.2.2. Résistance acquise	23
II.3.2.3. Mécanisme de la résistance.....	23
II.3.2.3.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique.....	23
II.3.2.3.2. Modification de la cible	24
II.3.2.3.3. Imperméabilité membranaire	24
II.3.2.3.4. Efflux actif	24
II.4. BIOFILM.....	24
II.4.1. HISTORIQUE	24
II.4.2. DEFINITION	25
II.4.3. MECANISMES DE FORMATION D'UN BIOFILM BACTERIEN	26
II.4.3.1. Adhésion réversible	27
II.4.3.2. Adhésion irréversible	28

II.4.3.3. Formation de micro-colonies	28
II.4.3.4. Maturation de biofilm	28
II.4.3.5. Dispersion	28
II.4.4. FACTEURS FAVORISANT LA FORMATION D'UN BIOFILM.....	29
II.4.4.1. Propriétés de la surface	29
II.4.4.1.1. Rugosité	29
II.4.4.1.2. Caractéristiques chimiques d'une surface.....	29
II.4.4.1.3. Présence préalable de films protéiques	29
II.4.4.2. Propriétés du milieu	30
II.4.4.3. Caractéristiques des microorganismes	30
II.4.5. QUORUM SENSING ET REGULATION DE LA FORMATION DE BIOFILM	30
II.4.6. EFFETS BENEFIQUES ET NEFASTES DE BIOFILMS	31
II.4.6.1. Biofilms bénéfiques	31
II.4.6.2. Effets néfastes des biofilms	31
<u>PARTIE III. MATERIEL ET METHODES</u>	<u>33</u>

III.1. MATERIEL ET METHODES.....	34
III.1.1. OBJECTIF DE L'ETUDE	34
III.1.2. LIEU ET PERIODE D'ETUDE	34
III.1.3. PREPARATION ET ISOLEMENT BACTERIEN	34
III.1.3.1. Suspension de la solution mère et les dilutions décimales	34
III.1.3.1.1. Suspension mère	34
III.1.3.1.2. Préparation des dilutions	34
III.1.4. ENSEMENCEMENT	35
III.1.5. EXAMEN MACROSCOPIQUE	35
III.1.6. PURIFICATION DES BACTERIES	35
III.1.7. OBSERVATION MICROSCOPIQUE.....	36
III.1.8. CONSERVATION DES ISOLATS.....	36
III.1.8.1. Conservation à court terme.....	36
III.1.8.2. Conservation à long terme.....	36
III.1.9. IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE.....	37
III.1.9.1. Recherche de l'oxydase	37
III.1.9.2. Recherche de la catalase	38

III.1.9.3. Test de l'indole.....	38
III.1.9.4. Test du Rouge de Méthyle (RM).....	39
III.1.9.5. Test de Voges-Proskauer (VP)	39
III.1.9.6. Citrate de Simmons	39
III.1.9.7. Mannitol mobilité	39
III.1.10. IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE PAR LES SYSTEMES API 20E ET API 10S.....	40
III.1.10.1. Préparation de la galerie	40
III.1.10.2. Préparation de l'inoculum	40
III.1.10.3. Inoculation de la galerie	40
III.1.10.4. Lecture et interprétation des résultats	41
III.1.11. ANTIBIOGRAMME.....	41
III.1.12. DETERMINATION DE LA CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE (CMI)	43
III.1.12.1. Préparation des solutions mères d'antibiotiques	43
III.1.12.1.1. Méthode de dilution en gélose.....	43
III.1.12.1.2. Méthode de la microdilution en bouillon	44
III.1.13. TEST DE FORMATION DE BIOFILM (CRISTAL VIOLET – MICROPLAQUE 96 PUIITS).....	45
III.1.14. ISOLEMENT ET EVALUATION FONCTIONNELLE DES BACTERIOPHAGES (ACTIVITE ANTIBACTERIENNE ET ANTIBIOFILM)	46
III.1.14.1. Principes généraux.....	46
III.1.14.2. Culture bactérienne.....	46
III.1.14.3. Isolement des bactériophages	47
III.1.14.4. Protocole de cinétique de lyse en microplaque	48
III.1.14.5. Mesure de l'activité antibiofilm des bactériophages.....	48
III.1.14.5.1. Préparation de l'inoculum bactérien	48
III.1.14.5.2. Mise en place des conditions expérimentales.....	48
III.1.14.5.3. Incubation et quantification	49
III.1.14.5.4. Calcul du pourcentage de réduction du biofilm.....	49
<u>PARTIE IV. RESULTATS ET DISCUSSION.....</u>	50
IV.1. OBJECTIF	51
IV.2. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION	51
IV.2.1. DENOMBREMENT ET ISOLEMENT DES ISOLATS BACTERIENS.....	51
IV.2.2. EXAMEN MICROSCOPIQUE DES ISOLATS	53

IV.2.3. CRITERES BIOCHIMIQUES	54
IV.2.3.1. Test de la catalase.....	54
IV.2.3.2. Test de l'oxydase	54
IV.2.3.3. Tests biochimiques conventionnels.....	56
IV.3. DETERMINATION DES PROFILS DE RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES (ANTIBIOGRAMME)	60
IV.3.1. RESISTANCE A L'AMOXICILLINE-ACIDE CLAVULANIQUE (AMC).....	61
IV.3.2. RESISTANCE A LA PENICILLINE G (P).....	61
IV.3.3. RESISTANCE AU COTRIMOXAZOLE (SXT)	61
IV.3.4. RESISTANCE AUX CEPHALOSPORINES (CTX ET CAZ)	62
IV.3.5. SENSIBILITE A L'IMIPENEME (IPM)	63
IV.3.6. SENSIBILITE A LA GENTAMICINE (CN) ET A LA CIPROFLOXACINE (CIP)	63
IV.3.7. PROFILS DE MULTIRESISTANCE (MDR)	63
IV.4. RESULTATS DE LA DETERMINATION DE LA CMI PAR LA METHODE SPOT.....	69
IV.4.1. PENICILLINE G.....	69
IV.4.2. GENTAMICINE.....	70
IV.4.3. OXYTETRACYCLINE.....	70
IV.4.4. AMOXICILLINE-ACIDE CLAVULANIQUE (AMC)	71
IV.4.5. RESULTATS DE LA DETERMINATION DE LA CMI PAR METHODE DE MICRODILUTION EN MICROPLAQUE (AMOXICILLINE)	71
IV.5. DISCUSSION DES DISCORDANCES ENTRE L'ANTIBIOGRAMME PAR DIFFUSION SUR DISQUE ET LES VALEURS DE CMI	73
IV.6. INTERPRETATION DES RESULTATS DE FORMATION DU BIOFILM	75
IV.6.1. DISTRIBUTION GLOBALE DES PROFILS DE BIOFILM.....	76
IV.6.2. FORTES PRODUCTRICES DE BIOFILM.....	77
IV.6.3. PRODUCTRICES MODEREES	77
IV.6.4. FAIBLES PRODUCTRICES ET NON PRODUCTRICES	78
IV.6.5. VARIABILITE INTRA-TRIPLICAT.....	78
IV.6.6. RELATION ENTRE FORMATION DE BIOFILM ET RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES (CORRELATION BIOFILM × RESISTANCE).....	78
IV.7. ISOLEMENT ET EVALUATION DE L'ACTIVITE LYTIQUE DES BACTERIOPHAGES	80
IV.7.1. MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE LYTIQUE PAR SPOT TEST.....	80
IV.7.2. ANALYSE DES PROFILS DE LYE PAR SOUCHE	82
IV.7.2.1. Souche KD9 (<i>Serratia</i> sp.)	82

IV.7.2.2. Souche KM6 (<i>Citrobacter</i> sp.).....	82
IV.7.2.3. Souche KA9 (<i>Aeromonas hydrophila</i>).....	83
IV.8. CINETIQUE DE LYSE BACTERIENNE PAR LES BACTERIOPHAGES (METHODE MICROPLAQUE)	84
IV.8.1. DISPOSITIF EXPERIMENTAL.....	84
IV.8.2. RESULTATS PAR SOUCHE	85
IV.8.2.1. Souche KA8 (<i>Shigella</i> sp.).....	85
IV.8.2.2. Souche KD9 (<i>Serratia</i> sp.).....	85
IV.8.2.3. Souche KM6 (<i>Citrobacter</i> sp.).....	86
IV.8.2.4. Discussion	86
IV.9. ACTIVITE ANTIBIOFILM DES BACTERIOPHAGES	87
IV.9.1. ANALYSE DES RESULTATS PAR SOUCHE	88
IV.9.2. DISCUSSION.....	89
<u>PARTIE V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</u>	<u>92</u>
<u>PARTIE VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	<u>96</u>
<u>PARTIE VII. ANNEXES.....</u>	<u>106</u>
VII.1. ANNEXE 1 MILIEU DE CULTURE.....	107
VII.1.1.1. Gélose nutritive	107
VII.1.1.2. Bouillon nutritif (BN)	107
VII.1.1.3. Bouillon Luria-Bertani (LB)	107
VII.1.1.4. Milieu de Clark et Lubs	107
VII.1.1.5. Eau peptonée	107
VII.1.1.6. Eau physiologique stérile	108
VII.2. ANNEXE 3 MATERIEL.....	108
VII.3. ANNEXES 3 LES ETAPES DE COLORATION DE GRAM	109

PARTIE I. INTRODUCTION

Introduction

La sécurité sanitaire des denrées alimentaires d'origine animale constitue l'un des enjeux majeurs de santé publique du XXI^e siècle, à l'intersection des préoccupations de santé humaine, animale et environnementale que résume aujourd'hui le concept de "One Health" (OMS, 2014). Parmi les produits carnés, la viande hachée bovine occupe une place particulière en raison de sa vulnérabilité microbiologique intrinsèque : le processus de hachage, en augmentant considérablement la surface de contact et en redistribuant les microorganismes présents en surface vers l'ensemble de la masse charnue, crée des conditions favorables à la prolifération et à la dissémination d'une flore bactérienne diversifiée (Nørrung et Buncic, 2008). Cette caractéristique, combinée aux conditions de conservation et de commercialisation souvent insuffisantes dans les boucheries artisanales des pays en développement, fait de la viande hachée un vecteur privilégié de contamination par des bactéries pathogènes et potentiellement résistantes aux antibiotiques (Biesalski, 2005 ; Warriner et Namvar, 2009).

La résistance aux antibiotiques représente l'une des menaces sanitaires les plus préoccupantes à l'échelle mondiale. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2014), environ 700 000 décès par an sont attribuables aux infections causées par des bactéries résistantes aux antimicrobiens, un chiffre qui pourrait atteindre 10 millions de décès annuels d'ici 2050 si aucune mesure corrective n'est prise (O'Neill, 2016). Les entérobactéries et les bactéries à Gram négatif en général constituent le groupe le plus préoccupant, notamment par leur capacité à acquérir et à transférer horizontalement des déterminants de résistance entre espèces, via des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides, les transposons et les intégrons (Etebu et Ariekpar, 2016 ; Uddin et *al.*, 2021).

Dans la chaîne alimentaire, la viande bovine représente un réservoir important de bactéries résistantes aux antibiotiques (BRA). L'utilisation massive d'antibiotiques en élevage à des fins thérapeutiques, prophylactiques et historiquement promotrices de croissance exerce une pression de sélection considérable sur la flore bactérienne des animaux de rente, favorisant l'émergence et la dissémination de souches résistantes qui peuvent atteindre le consommateur

via la chaîne alimentaire (Van Boeckel et *al.*, 2015 ; Aidara-Kane et *al.*, 2018). Les gènes de résistance identifiés dans les produits carnés, notamment ceux codant pour des bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) et des céphalosporinases de type AmpC, sont fréquemment retrouvés dans des infections humaines d'origine communautaire, établissant un lien épidémiologique direct entre résistance zoonotique et résistance clinique (Paterson et Bonomo, 2005 ; Ewers et *al.*, 2012).

En Algérie, les études portant sur la résistance aux antibiotiques des bactéries isolées des viandes sont encore peu nombreuses malgré l'importance de la consommation nationale de viandes rouges et le développement des boucheries artisanales dans les zones périurbaines. Les travaux disponibles, notamment ceux de Mezali et Hamdi (2012) sur les *Salmonella* de viandes à Sétif, de Moussa et Moussaoui (2016) sur les entérobactéries productrices de BLSE dans les volailles de Tébessa, et de Meguenni et *al.* (2017) sur *Escherichia coli* dans les viandes crues, signalent des prévalences de résistance préoccupantes aux antibiotiques de première intention, soulignant la nécessité d'études locales approfondies.

Au-delà de la résistance intrinsèque aux antibiotiques, les bactéries à Gram négatif possèdent une capacité supplémentaire de résistance phénotypique liée à la formation de biofilm. Le biofilm est défini comme une communauté structurée de microorganismes encapsulés dans une matrice extracellulaire auto-produite composée de polysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques extracellulaires, adhérant à des surfaces biotiques ou abiotiques (Lebeaux et Ghigo, 2012). Dans les environnements de transformation et de commercialisation alimentaires, les biofilms bactériens représentent une source majeure de contamination persistante des équipements, des surfaces de travail et des denrées elles-mêmes (Kregiel, 2014 ; Vestby et *al.*, 2020).

La résistance des bactéries en biofilm aux agents antimicrobiens est considérablement augmentée par rapport aux formes planctoniques, pouvant dépasser de 100 à 1 000 fois les concentrations inhibitrices minimales mesurées en culture liquide (Hoiby et *al.*, 2010 ; Stewart et Costerton, 2001). Ce phénomène s'explique par plusieurs mécanismes complémentaires : la diffusion réduite des antibiotiques à travers la matrice polysaccharidique, l'état métabolique ralenti des cellules profondes en conditions de privation nutritive (phénotype

"persister"), l'expression différentielle de gènes de résistance et de pompes à efflux, et la communication intercellulaire par quorum sensing (McDonnell et Russell, 1999 ; Lebeaux et Ghigo, 2012). La co-occurrence de la formation de biofilm et de la résistance aux antibiotiques dans une même souche représente donc un double facteur de risque sanitaire, particulièrement préoccupant dans le contexte des boucheries artisanales où les surfaces de contact sont difficiles à décontaminer efficacement (Pérez-Rodríguez et *al.*, 2008).

Face à l'impasse thérapeutique que représente la montée en puissance des bactéries multirésistantes, les bactériophages — virus infectant spécifiquement les bactéries et provoquant leur lyse — suscitent un intérêt croissant comme alternative ou complément aux antibiotiques conventionnels (Sulakvelidze et *al.*, 2001 ; Loc-Carrillo et Abedon, 2011). Découverts de manière indépendante par Twort (1915) et d'Hérelle (1917), les bactériophages présentent plusieurs avantages théoriques pour les applications de biocontrôle alimentaire et de phagothérapie : une spécificité d'hôte étroite limitant l'impact sur la flore commensale, une capacité d'auto-amplification *in situ*, une absence d'effets secondaires rapportés chez l'homme et une activité contre les souches résistantes aux antibiotiques (Endersen et *al.*, 2014). Des études récentes ont en outre démontré la capacité de certains phages à dégrader la matrice extracellulaire des biofilms via la production de dépolymérases phagiques, restaurant ainsi la sensibilité des cellules sessiles aux agents antimicrobiens (Pires et *al.*, 2017 ; Harper et *al.*, 2014).

Les eaux usées constituent l'une des sources les plus riches en bactériophages diversifiés, en raison de la coexistence de populations bactériennes denses favorisant les cycles d'infection et de réplique phagique (Doss et *al.*, 2017). Leur utilisation comme source d'isolement de phages thérapeutiques ou de biocontrôle a été validée par de nombreux travaux, notamment pour des pathogènes d'intérêt alimentaire comme *Salmonella*, *Escherichia coli* et *Aeromonas* (Leverentz et *al.*, 2003 ; Galarce et *al.*, 2021).

La wilaya de Saïda, chef-lieu de la steppe algérienne occidentale, est caractérisée par une tradition d'élevage bovin important et un réseau dense de boucheries artisanales dont les pratiques d'hygiène restent hétérogènes. Malgré l'importance sanitaire de ce contexte, aucune étude n'a à ce jour caractérisé de

manière intégrée la flore bactérienne résistante de la viande hachée bovine commercialisée dans cette région, ni exploré le potentiel des bactériophages locaux comme outils de biocontrôle.

C'est dans ce cadre que s'inscrit le présent travail, qui se propose de répondre aux questions scientifiques suivantes : Quelles espèces de bactéries à Gram négatif sont présentes dans la viande hachée bovine commercialisée à Aïn El Hadjar ? Quel est leur niveau de résistance aux antibiotiques d'importance clinique et leur capacité de formation de biofilm ? Existe-t-il des bactériophages dans les eaux usées locales capables de lyser ces bactéries et d'inhiber leur formation de biofilm ?

Pour répondre à ces questions, ce mémoire est structuré en cinq parties. La première partie présente une synthèse bibliographique portant sur les bactéries à Gram négatif dans les produits carnés, les mécanismes de résistance aux antibiotiques et la biologie des bactériophages. La deuxième partie décrit les matériaux et méthodes utilisés. La troisième partie présente et discute les résultats obtenus. La quatrième partie est consacrée à la conclusion générale et aux perspectives de recherche.

PARTIE II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1. Généralités sur la viande hachée bovine et les entérobactéries

II.1.1. viande hachée bovine

II.1.1.1. Définition

La viande hachée bovine correspond à une viande fraîche de bovin obtenu par réduction mécanique de morceaux de viande désossée en particules de petite taille. Selon le règlement CE n° 853/2004, la viande hachée est définie comme étant de la viande qui a été découpée en morceaux et qui ne contient pas plus de 1% de sel (République française, 2015).

Sa composition repose essentiellement sur les muscles squelettiques et les tissus adipeux qui y adhèrent naturellement. En raison de la destruction de l'intégrité des tissus musculaires lors du hachage, ce produit présente une susceptibilité accrue à la prolifération microbienne, ce qui en fait une matrice fréquemment étudiée dans les recherches microbiologiques et de sécurité alimentaire.

II.1.1.2. Impact du hachage sur la contamination

La viande, en termes de composition, n'est pas seulement un aliment équilibré pour les humains, elle sert également de bon milieu de culture pour les micro-organismes (MO).

Dans un morceau de muscle intact, les micro-organismes sont généralement présents uniquement à la surface, tandis que l'intérieur est plus ou moins stérile (Honikel, 2014).

La source de contamination des viandes peut être à la fois endogène et exogène (Jouve, 1966). Ces contaminations entraîneraient manifestement des produits de mauvaise qualité hygiénique des toxi-infections alimentaires sévères et des pertes économiques sérieuses (Oumokhtar et *al.*, 2008). La viande se contamine principalement lors de l'abattage (80 à 90% des micro-organismes présents dans la viande atteignent les consommateurs suite à la contamination dans les abattoirs) et cette contamination se prolonge lors des processus de désossage, découpage et préparation de la viande dans les boucheries. (Oumokhtar et *al.*, 2008 ; Dennaï et *al.*, 2001). Effectivement, le processus de

hachage facilite la dispersion et la prolifération des bactéries de la surface à l'intérieur du produit (Honikel, 2014 ; Oumokhtar et *al.*, 2008).

Le hachage facilite la vie microbienne car l'assemblage histologique cellulaire devient une purée de cellules mortes qui n'offrent aucune résistance aux microbes, ainsi que la sortie de suc musculaire qu'est très riche en substances nutritives crée un environnement idéal pour la prolifération de ces micro-organismes (Jouve, 1966 ; Oumokhtar et *al.*, 2008). Ainsi, la présence de micro-organismes, en particulier des bactéries, dans la viande hachée est généralement influencée par trois éléments majeurs : la qualité bactériologique des viandes destinées à l'abattage, l'hygiène du personnel et des équipements, ainsi que les conditions de stockage en termes de durée et de température (Narasimha et Ramesh, 1988).

II.1.1.3. Conditions d'évolution des germes

Les viandes constituent un environnement idéal pour la croissance des microorganismes. Cette croissance est contrôlée par des facteurs liés à viande elle-même, facteurs mais également par d'autres, liés à l'environnement de conservation de la viande, d'où les facteurs extrinsèques (AKKOLOR, 1997).

II.1.1.3.1. Facteurs intrinsèques

II.1.1.3.1.1. Nutriments

La viande Représente un facteur intrinsèque crucial qui influence la croissance microbienne. Grâce à sa richesse en protéines haute valeur biologiques fait qu'elle constitue un environnement très favorable au développement des micro-organismes (DENNAI, 2000).

II.1.1.3.1.2. pH

Tous les MO réagissent fortement aux changements de pH. En règle générale, toute diminution de ce paramètre entraîne une diminution de leur vitesse de développement. Destin que les bactéries sont les premières à être touchées par ces variations, suivies des levures et des moisissures. (James et James, 2000)

Dans la plupart des muscles, le pH de la viande rassie se situe entre 5,4 et 5,6. Ce dernier oscille entre 5,8 et 5,9. Il s'accroît pendant la phase de stockage. Propose une fourchette bien plus étendue de 5,3 à 6. Ils affirment qu'une viande

avec un pH de 6 se contamine plus vite que celle avec un pH de 5,3. Cela démontre que l'acidité exerce une influence bactériostatique sur le développement des micro-organismes. (CRAPLET, 1966).

II.1.1.3.1.3. Activité de l'eau

L' a_w est l'un des paramètres physico-chimique qui caractérise la teneur en eau des denrées alimentaires. Plus la valeur de a_w est proche de 1, plus l'environnement est propice à la multiplication de la microflore. La viande présente un taux d'activité de l'eau (a_w) d'environ 0.993, ce qui favorise la multiplication de divers micro-organismes. Toute diminution de l' a_w rend le milieu défavorable au développement des MO (Salifou et *al.*, 2013 ; Akollor, 1997).

II.1.1.3.2. Facteurs extrinsèques

II.1.1.3.2.1. Température

La T° est un des facteurs physico-chimiques majeurs qui influencent la croissance des microorganismes, de sorte que plus la température est élevée, plus le taux de croissance est forte. Plusieurs MO de la viande hachée se développent à des températures allant de moins de 0 °C Jusqu'à 65 °C, à savoir : les psychrophiles dont la T° optimale est entre -2 °C à 7 °C, les mésophiles entre 10°C à 40 °C et les thermophiles entre 43 à 66 °C. Par ailleurs, la basse température contribue à l'inhibition du développement des MO (Salifou et *al.*, 2013).

II.1.1.3.2.2. Contamination initiale

Leur nombre fait intervenir les microorganismes. Effectivement, lorsque la quantité de germes est élevée, la phase de latence est courte et l'espèce prédominante s'impose par la loi du plus grand nombre (DEMONT, 1982)

II.1.1.4. Principaux germes contaminant la viande hachée

II.1.1.4.1. Flore saprophyte

Cette flore commune est la plus courante. Il ne provoque ni infection, ni d'intoxication alimentaire. Toutefois, d'après (Fasanmi et al, 2010), si la contamination atteint un certain seuil, elle aura un impact négatif sur la qualité sensorielle et nutritionnelle de la viande et diminuera donc sa durée de

conservation. Nous avons trouvé la flore mésophile totale, ainsi que des levures et des moisissures.

II.1.1.4.1.1. Flore aérobie mésophile

Les aérobies mésophiles ne constituent pas une famille bactérienne spécifique. Ce sont des microorganismes qui, après avoir été multipliés dans des conditions de laboratoire spécifiques, forment des colonies qui peuvent être comptées. D'après l'ISO (2003), l'incubation se fait à 30°C dans un contexte atmosphérique ambiant, mais il arrive que d'autres températures telles que 35°C ou 37°C soient employées. On peut mentionner *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et *Micrococcus* comme les bactéries saprophytes les plus couramment isolées de la viande, suivies par les Entérobactéries, et finalement, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Aeromonas*, *Corynebacterium*, *Clostridium* et *E.coli* (Bouzid et al, 2015).

II.1.1.4.1.2. Levures

Leur présence dans les aliments est relativement limitée, mais certaines d'entre eux ont il y a des rapports de viande. IL s'agit de : *Saccharomyces*, *Candida* *Trichospora* (Nkolo, 2007).

II.1.1.4.1.3. Moisissures

Aspergillus, *Penicillium* et *Mucor* sont plus courants trouvés dans la viande. Au total, la viande étant un substrat favorable au développement des germes, il peut découler de leur multiplication des conséquences hygiéniques graves (Guiraud, 2012).

II.1.1.4.2. Flore pathogène :

II.1.1.4.2.1. *Escherichia coli* (EHEC)

Escherichia coli fait partie des *Enterobacteriaceae*. Ce sont très courts bâtonnets mobiles, peut se déplacer à travers les flagelles péritriches, Gram négatifs, non sporulés, anaérobies facultatifs. Ils peuvent fermenter Plusieurs types de sucre, mais leur processus de fermentation le lactose a la particularité de produire du gaz (Salifou et al., 2013).

En tant que principale espèce bactérienne dans l'intestin et les excréments, la présence d'*E.Coli* dans les aliments et l'eau est considéré signes de

contamination fécale, par conséquent, il peut y avoir des signes de contamination fécale microorganismes pathogènes d'origine fécale (Ghafir et Daube, 2007).

II.1.1.4.2.2. *Salmonella*

La salmonelle est une bactérie à gram négatif, mésophile, desséchante et sensible à la chaleur (OMS, 1988). Détruisez-le pendant 2 minutes à une température de +75° C, et arrêter presque son développement à une température supérieure à 6° C. La salmonelle peut être la cause d'une intoxication alimentaire chez l'homme. La manifestation clinique typique est la gastro entérite hyperthermique, qui apparaît dans les 6 à 72 heures après un repas. Les principaux symptômes sont une forte fièvre (39-40°C), une cautérisation électrique, des douleurs abdominales, des nausées et des vomissements, qui fonctionnent généralement bien en 3 à 5 jours (OMS, 1988).

II.1.1.4.2.3. *Staphylococcus aureus*

C'est une bactérie mésophile qui peut se reproduire à une température comprise entre 4°C et 46 °C, le pH est compris entre 5 et 9, et l'Aw est de 0,86. Cette bactérie est halophile car elle se développe même en présence de sel et de sucre et survivre aux aliments déshydratés, de sorte que sa croissance est possible lorsque la concentration en sel aérobie atteint jusqu'à 18 % (Bailly et *al.*, 2012).

II.2. Généralités sur les entérobactéries

II.2.1. Historique

En 1937, le professeur Otto Rahn a découvert la famille des *Enterobacteriaceae*, lorsqu'il proposa le genre d'*Enterobacter* qui regroupe les microorganismes présentant des propriétés communes biochimiques et morphologiques. Parmi lesquelles on trouve : *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia* et *Shigella* (William et al. 1980).

Avec les travaux d'Edwards et Ewing en 1972 rapportaient 11 genres et 26 espèces dans la famille des *Enterobacteriaceae*. En 1973, 31 genres et 139 espèces étaient caractérisés. En 1985, Farmer et Coll décrivaient 22 genres comprenant 69 espèces et 29 groupes entériques (Habibou, 2019) et ces découvertes ont continué à se développer jusqu'à aujourd'hui.

II.2.2. Définition

Le nom d'entérobactérie est dû au fait que la majorité des espèces sont des hôtes normaux ou pathologiques du tube digestif de l'homme et des animaux (Bouskraoui et al., 2017).

Les entérobactéries sont définies par un ensemble de caractères généraux communs. Ce sont des bacilles à Gram négatif, dont les dimensions varient de 6 µm de long et 0,3 à 1 µm de large, Ces dimensions varient suivant l'âge de la culture, l'espèce, la souche. Certaines espèces peuvent être très polymorphes, notamment le genre *Proteus*. Elles sont non sporulées, le plus souvent mobiles, mais immobiles dans le cas des bactéries des genres *Klebsiella*, *Shigella* et *Yersinia*. Elles sont aérobies-anaérobies facultatives et elles peuvent être cultivées sur les milieux ordinaires. Elles fermentent le glucose avec ou sans production de gaz et réduisent les nitrates en nitrites (sauf certaines souches d'*Erwinia* et *Yersinia*).

Elles n'ont pas d'oxydase et possèdent une catalase (sauf *Shigella dysenteriae* sérotype 1). Ces caractères permettent de différencier les entérobactéries des autres bacilles à Gram négatif pouvant être cultivés sur des milieux ordinaires (Avril et al., 2000 ; Joly et Reynaud, 2002).

Les espèces de cette famille peuvent être retrouvées soit pathogènes, soit à l'état commensal. Elles sont responsables d'infections des voies urinaires, de Ces diverses tribus peuvent être séparées en genres, sous-genres, espèces, sérogroupes et sérotypes.

II.2.3. Habitat

Les Entérobactéries sont ubiquitaires avec un habitat très diversifié. On les trouve dans le sol, dans l'eau, dans certaines denrées alimentaires et aussi dans la cavité buccale, au niveau des voies aériennes supérieures et sur les organes génitaux. Ce sont des hôtes normaux ou pathogènes du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. (Moussa et Moussaoui, 2016). Dans l'intestin terminal, ces bactéries représentent plus de 10% de la flore totale (Guiraud, 2012)

II.2.4. Taxonomie

- Domaine : Bacteria
- Embranchement (Phylum) : Proteobacteria
- Classe : Gammaproteobacteria
- Ordre : Enterobacterales
- Famille : Enterobacteriaceae

Il existe environ une centaine d'espèces d'Entérobactériaceae, mais seulement 23 d'entre elles constituent 99% des souches obtenues dans un cadre clinique (Avril et *al.*, 2000).

Les Entérobactéries qui sont importantes en bactériologie médicale se divisent en quatre tribus :

- . La tribu des Escherichiae ;
- . La tribu des Klebsiellae ;
- . La tribu des Proteae ;
- . La tribu des Yersiniae (Carbonnelle et *al.*, 1987).

Ces diverses tribus peuvent être séparées en genres, sous-genres, espèces, sérogroupes et sérotypes.

II.2.5. Caractère bactériologique

II.2.5.1. Caractère morphologique

Les entérobactéries sont des bacilles Gram-négatifs de forme bâtonnet, mesurant entre 1,0 et 1,6 μm de longueur et entre 0,3 et 1,0 μm de diamètre. La majorité d'entre elles sont mobiles grâce à des cils péritriches tandis que certaines (*Klebsiella*, *Shigella* et *Yersinia*) sont immobiles. Elles ne produisent pas de spores. Ces dernières disposent de fimbriae et de pili lesquels se divisent en deux catégories : les fimbriae communs jouent un rôle essentiel dans la capacité d'adhésion des bactéries à des récepteurs spécifiques de la cellule hôte, ce qui est crucial pour la virulence de pathogènes tel que *Salmonella*. D'autre part les pili sexuels, ils favorisent le transfert génétique entre les bactéries (Patrick et *al.*, 2008). Certaines espèces possèdent de grosses et régulières capsules comme *Klebsiella* et rares chez les autres (Karen et *al.*, 2015).

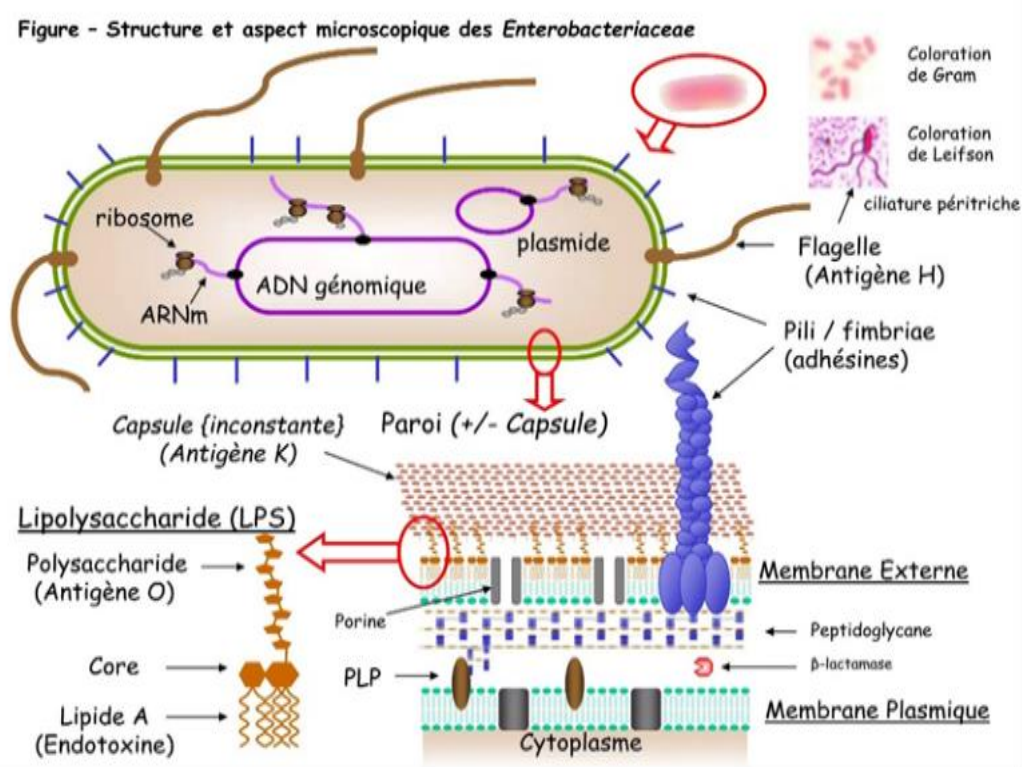


Figure 1 Structure et aspect microscopique des Enterobacteriaceae (Denis et *al.* 2007).

II.2.5.2. caractères cultureux

Les entérobactéries se développent rapidement *in vitro* sur des milieux ordinaires, en 18-24 heures à température optimale de 37°. Leur temps de division

varie de 20 à 40 minutes avec donc un maximum de culture atteint habituellement en moins de 24h d'incubation. Elles sont aérobies-anaérobies facultatives, les espèces forment en général des colonies de 1 à 3 mm de diamètre généralement bombées et lisses. Il y a une exception pour *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi* et *Yersinia* qui forment de très petites colonies (Denis, 2016).

Pour les bactéries comme *Klebsiella pneumoniae* qui génèrent des capsules, les colonies sont grosses, muqueuses et ont une consistance gélatineuse. Dans le cas de *Proteus* il produit un tapis uniforme (Joly et Reynaud, 2002).

Les entérobactéries sont des chimio-organotrophe qui possèdent à la fois un métabolisme respiratoire et fermentaire. Certaines poussent sur du glucose comme seule source de carbone (George et al., 2005).

En milieu liquide, les entérobactéries provoquent une turbidité homogène du bouillon. (Joly et Reynaud, 2002).

II.2.5.3. Caractère antigénique

Les entérobactéries sont caractérisées par une structure antigénique complexe. Ils sont classés selon plus de 150 antigènes somatiques (O), plus de 100 antigènes capsulaires (K) et plus de 50 Antigènes flagellaires (H) (Geo et al., 2007).

Il caractérise et permet aussi de faire le sérodiagnostic des infections à entérobactéries, Il existe plusieurs types d'antigènes :

- **Antigènes O (ou somatiques) :** Ces antigènes de la paroi bactérienne sont présents chez toutes les entérobactéries. Ils sont de nature lipopolysaccharidique (LPS) et thermostable à 100°C (Brenner, 1981). Possède une endotoxine bactérienne complexe, très toxique (Avril et Fauchere, 2002). L'antigène O est constitué d'une mosaïque d'antigènes dont certains sont des constituants communs à toutes les entérobactéries, et d'autres, des constituants spécifiques de chaque espèce. Il comprend trois parties : la paroi lipidique, la partie 'core' et le polysaccharide (Brenner, 1981). Les antigènes O peuvent être associés à des maladies humaines, par exemple, des types O spécifiques d'*Escherichia coli* sont trouvés dans les souches responsables de diarrhée et d'infections urinaires (Geo et al., 2007).

- **Antigènes capsulaires K** : Ce sont des antigènes de l'enveloppe de nature polysaccharidique. Ce sont des antigènes solubles et thermolabiles utilisés dans le diagnostic au laboratoire par des techniques d'agglutinations souvent simples et rapides (Brenner, 1981). Les antigènes d'adhérences, de nature protéique, en relation avec la présence de fimbriae ou pili sont des hétéropolymères d'environ 1µm de longueur et de 5 à 10 nm de diamètre (Kaper et al. 2004). ILS sont classés parmi les antigènes K (Bidet et Bingen, 2007).

- **Antigène H (ou flagellaires)** : sont situés sur les flagelles qui ne sont pas toxiques. Ce sont présents uniquement chez les entérobactéries mobiles. Constitués d'une protéine (flagelline), ils sont thermolabiles et dénaturés ou éliminés par la chaleur ou l'alcool (Geo et al., 2007). Il peut être mis en évidence par agglutination avec des sérums spécifiques (Fatnassi, 2020).

- **Antigène commun** : Cet antigène, appelé « antigène de Kunitz » est présent chez toutes les entérobactéries sauf certaines *Erwinia*. Il est constitué d'un glycophospholipide spécifique des entérobactéries (Douhan, 2021). Il est généralement sous forme hapténique, non immunogène, mais il a cependant la capacité de sensibiliser les hématies. Sa forme immunogène existe chez de rares souches dont *E. coli* O : 14 (Joly et Reynaud, 2002).

- **Antigène d'adhésines (fimbriae ou pili)** sont des hétéropolymères d'environ 1µm de longueur et de 5 à 10 nm de diamètre (Kaper et al. 2004).

II.2.5.4. Caractère biochimique

La distinction entre les genres et les espèces se fait par l'étude des caractères biochimiques). Et utilisent des tests qui étudient le métabolisme protéique (présence d'uréase, production d'indole, dégradation du tryptophane) ou la fermentation des sucres (glucose, lactose, saccharose, etc.), la capacité d'utiliser le citrate, la présence d'enzymes (décarboxylases, désaminases), la production d'hydrogène sulfuré ou la formation de gaz (Kassama et Hamadi, 2013).

Classiquement, l'identification se déroule dans des tubes, assurant à la fois la croissance et la réaction biochimique. De nouvelles approches à cette méthode notamment par l'élaboration des galeries API 20E, premières galeries mises au

	<i>Escherichia</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Serratia</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Providencia</i>	<i>Yersinia</i>
Lactose	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	+	-	+/-	-	-	+
Indole	+	-	-	+/-	-	-	+/-	+/-	+	+/-
VP (Acétoïne)	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+ *
Citrate	-	+	+	+	+	+/-	-	+/-	+	-
Mobilité	+	+	+	-	+	+	-			+ *
Urée	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
TDA	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
H2S	-	+/-	-	-	-	+	-	+/-	-	-

point pour les entérobactéries et aussi la création d'automate comme le MINI API

Figure 2 : Caractère biochimique des quelques entérobactéries (Benameur, 2011).

* à 20°C seulement, (+) : Résultat positif, (-) : Résultat négatif

II.2.6. Pouvoir Pathogène

Les Entérobactéries sont à l'origine de maladies de gravité très variable, en raison de mécanismes pathogéniques distincts (Livermor, 1995).

Chez l'homme, les entérobactéries présentent une pathogénicité élevée. Selon Claire (2011), ces agents infectieux provoquent des maladies qui sont soit spécifiques et atteignent la population générale, soit opportunistes et affectent principalement les patients immunodéprimés en milieu hospitalier. La contamination provient, dans la plupart des cas, de la flore bactérienne du patient lui-même (origine endogène) ou de l'environnement extérieur (origine exogène). En somme, Les entérobactéries sont responsables de nombreuses infections (Anglaret et Mortier, 2002).

Les infections communautaires incluent principalement les infections urinaires, qui sont majoritairement causées par *Escherichia coli*, les intoxications

alimentaires dues aux Salmonelles, ainsi que les infections pulmonaires provoquées par *Klebsiella pneumoniae*. Quant aux infections nosocomiales, celles-ci sont fréquentes et se manifestent sous forme d'infections urinaires de plaies opératoires, d'infections pulmonaires, de septicémies, ainsi que d'infections touchant d'autres localisations. Outre les bactéries associées aux infections communautaires déjà mentionnées et présentant un profil de multirésistance, on retrouve également *Klebsiella pneumoniae* (Bouguenoun, 2017), *Enterobacter* sp et *Serratia* sp. (Avril et al., 2000 ; Joly et Reynaud, 2002).

II.3. Antibiotiques et antibiorésistance

II.3.1. Antibiotiques

II.3.1.1. Historique

Les antibiotiques sont la classe de médicaments la plus importante et l'une des inventions médicales les plus influentes du XXe siècle. Leur découverte a considérablement réduit les maladies et les décès causés par des infections bactériennes (Uddinet al., 2021)

En 1928, le scientifique Ecossais Alexander Fleming a observé un phénomène inhabituel sur une ancienne plaque de culture de *Staphylococcus aureus* qui a été contaminée par un champignon du sol *Penicillium notatum*. Il a remarqué que la bactérie ne se développait pas autour des moisissures et a supposé que le champignon libérait une substance antibactérienne près de sa croissance, qu'il a appelée pénicilline (Fleming, 1929)

Pendant l'âge d'or des antibiotiques entre les années 1940 et 1970, période à laquelle de nombreuses classes ont été découvertes avec divers mécanisme d'action ont été découvertes (Durand et al .2019).

La majorité ont été isolés à partir de sources naturelles. Les principales sources étaient des actinomycètes, des champignons et d'autres bactéries. (Perry, 2021).

Quelques années après le premier essai clinique de la pénicilline sur l'homme, la streptomycine a été découverte (Etebu et Ukpong, 2016).

Depuis lors, la microbiologie, la médecine et la chimie font d'immenses progrès, ce qui permet d'enchaîner les découvertes scientifiques et on découvre de nouvelles thérapies (Fosseprez, 2013).

II.3.1.2. Définition

Le mot antibiotique vient du grec "anti" qui signifie contre et "bios" qui signifie la vie. On peut ainsi traduire celui-ci comme contre la vie. (Konaté, 2021). Le mot antibiotique fut créé en 1889 par Paul Vuillemin

Les antibiotiques sont des substances naturelles biologiques élaborées par un microorganisme comme champignons (ex. *Penicillium* et *Cephalosporium*) ou bactéries (ex. *Streptomyces*, *Micromonospora* et *Bacillus*), ou des substances chimiques synthétiques (ex : les sulfamides et les quinolones) ou semi synthétiques obtenues par modification d'une molécule de base naturelle (ex : l'amoxicilline et l'amikacine) (Muylaert Et Mainil, 2012 ; Caruba Et Jaccoulet, 2015)

Les antibiotiques capables, à faible concentration, d'inhiber la croissance d'un autre organisme (effet bacteriostatique) ou de le détruire (effet bactéricide). Pour exercer leur action, ils doivent se lier à des cibles moléculaires spécifiques le plus souvent intracellulaires (Leclercq et *al.* 2006)

Les antibiotiques les plus utilisés pour lutter contre les infections humaines interfèrent avec les réactions structurales ou physiologiques qui sont particulières aux pathogènes infectieux. (Goro, 2021).

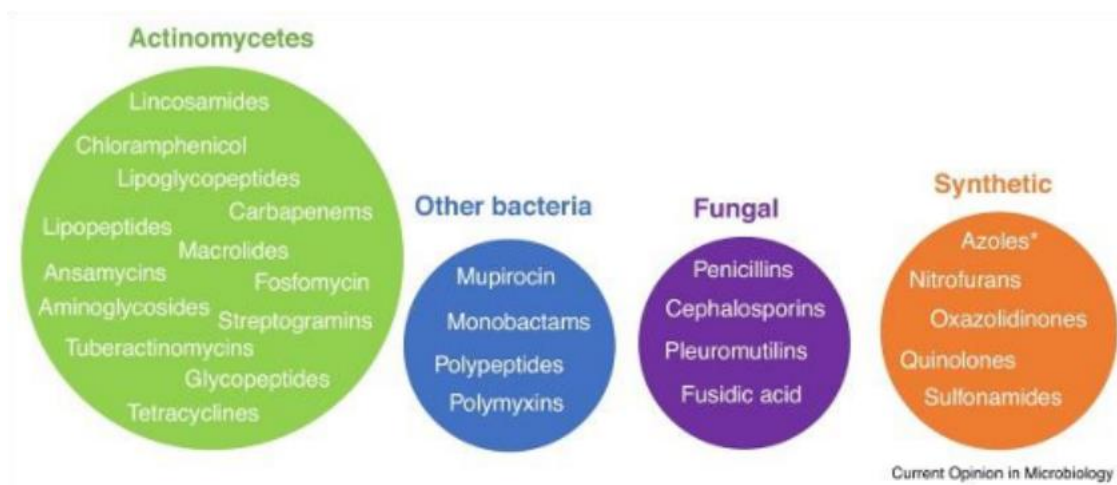


Figure 3 : origine et diversité des antibiotiques : des sources naturelles aux dérivés synthétiques (Hutchings et *al.*, 2019).

II.3.1.3. Mode d'action

La distinction entre les antibiotiques et les antiseptiques repose sur la particularité de leur mode d'action. Effectivement, ils opèrent sur des structures bactériennes spécifiques désignées sous le nom de sites d'action (McDonnell et Russell, 1999).

L'efficacité d'un antibiotique découle de relations complexes entre l'hôte, le médicament et les bactéries visées (Uddin et *al.*, 2021). Pour être efficace, un antibiotique doit satisfaire à plusieurs critères cruciaux. (Gaudy et Buxeraud, 2005), Il doit parvenir à sa cible bactérienne en franchissant les obstacles physiologiques, résister aux processus d'inactivation enzymatique ou chimique et se fixer adéquatement à son lieu d'action. Les antibiotiques, qui n'ont pas tous le même mode d'action, sont catégorisés par les chercheurs selon leurs mécanismes d'action et leur structure chimique (Kaur Sodhi et *al.*, 2023). Dans le développement des médicaments antimicrobiens, cinq cibles bactériennes principales ont été utilisées.

- Action sur la paroi bactérienne (peptidoglycane) ;
- Action sur la structure de la membrane cytoplasmique bactérienne ;
- Action sur la synthèse protéique bactérienne ;
- Action sur la synthèse de l'ADN de la bactérie ;
- Action sur la synthèse des folates (Yala et *al.*, 2001).

La plupart des antibiotiques inhibent des voies métaboliques de la bactérie. Chaque famille d'antibiotique possède son site d'action propre (figure4).

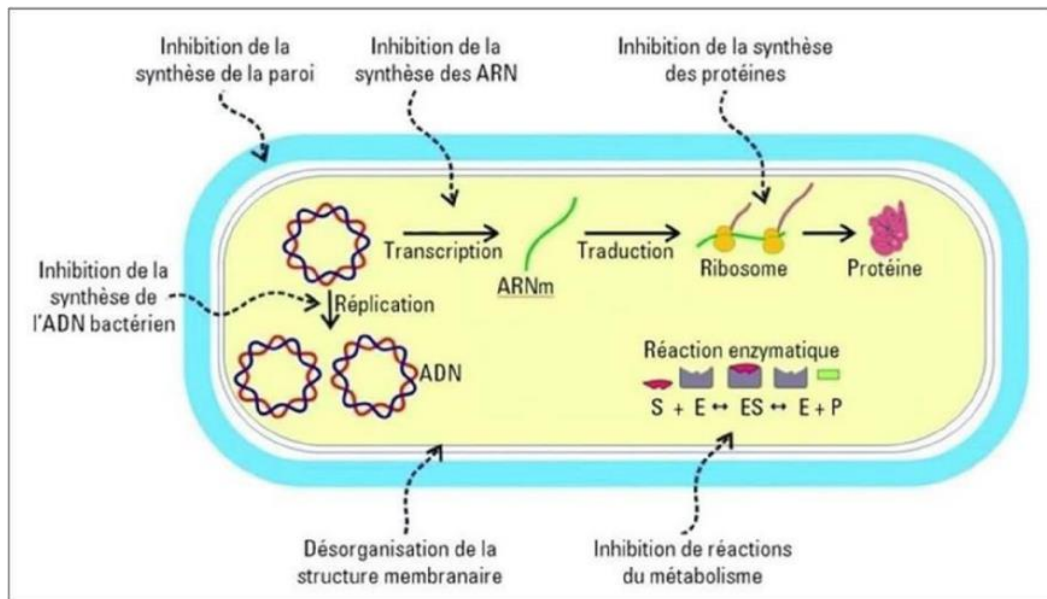


Figure 4 Les différents modes d'action des antibiotique (GPBP ,2017)

II.3.1.4. Classification des antibiotiques

II.3.1.4.1. Critère de classification

La classification des antibiotiques peut se faire selon :

- L'origine : élaboré par un organisme (naturel) ou produit par synthèse (synthétique ou semi synthétique)

- Le mode d'action : paroi, membrane cytoplasmique, synthèse des protéines, synthèse des acides nucléiques

- Le spectre d'activité : selon GAUDY et BUXERAUD (2005), les antibiotiques sont classés :

1. Les antibiotiques à large spectre : actif sur la majorité des bactéries Gram positif et Gram négatif.

2. Les antibiotiques à spectre limité : actif sur les bactéries Gram positif et quelque Gram négatif.

3. Les antibiotiques étroits : actifs uniquement sur certaines bactéries Gram positif ou certaines à Gram négatif.

- La nature chimique : très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (ex : cycle β lactame) sur laquelle il y a hémisynthèse. La classification

selon la nature chimique nous permet de classer les antibiotiques en familles (β lactamines, aminosides, tétracyclines.....etc.) (Yala et *al.*, 2001).

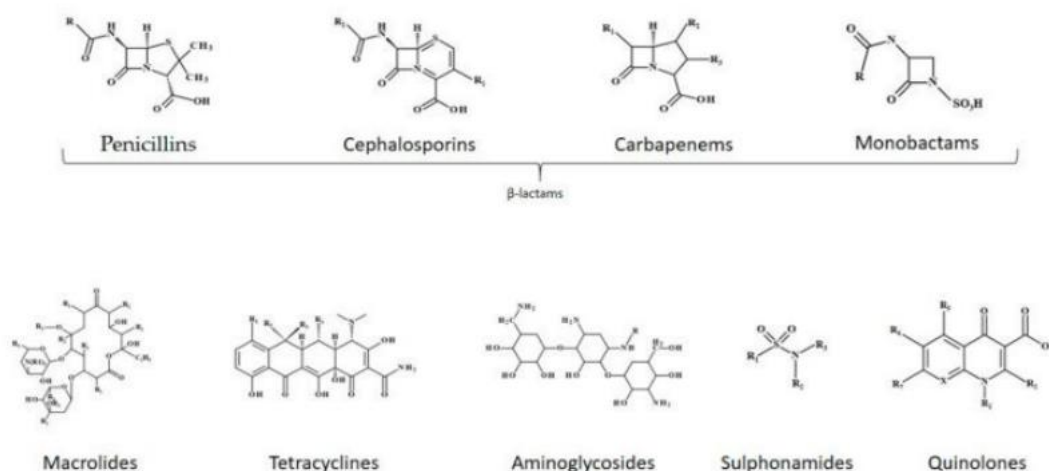


Figure 5 classes principales d'antibiotique et leurs structures chimiques générales (Pancu et *al.*, 2021)

II.3.2. Antibiorésistance

II.3.2.1. Définition de antibiorésistance

La résistance bactérienne aux antibiotiques a rapidement constitué un problème de santé important à l'échelle mondiale.

Une souche bactérienne qui résiste à un antibiotique spécifique, capable de proliférer en présence de cet antibiotique à des concentrations nettement supérieures à celles qui sont généralement efficaces contre les souches sensibles de cette espèce.

Les bactéries emploient l'un des procédés de résistance les plus répandus et performants, qui consiste à altérer la structure de l'antibiotique pour qu'elle perde sa capacité à se lier à leur cible cellulaire et, par conséquent, à inhiber (Djebaili Et Khebbaza ,2024)

Certaines souches bactériennes sont capables de développer une multi résistance, c'est-à-dire celle de résister à plusieurs antibiotiques. Il est constaté que les espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* représentent une véritable menace pour la santé humaine en raison de leur résistance. (Bouyahya et *al.*, 2017).

II.3.2.2. Types de résistance aux antibiotiques

II.3.2.2.1. Résistance naturelle

La résistance naturelle, également désignée sous le terme de résistance intrinsèque, constitue une caractéristique universelle commune à toutes les souches au sein d'une même espèce (Debabza, 2015). Cette spécificité trouve son origine dans la présence d'un gène chromosomique partagé par l'ensemble des bactéries appartenant à une espèce donnée (Lagha, 2015).

Dans chaque classe d'antibiotiques (ATB), il existe des espèces bactériennes intrinsèquement non sensibles en raison soit de l'absence de cible spécifique, soit d'un défaut d'accès à cette dernière. Par exemple, chez les mycoplasmes, l'absence de paroi cellulaire empêche l'action des β -lactamines sur ces micro-organismes (Meskine et Benabdelkader, 2016).

Ce type de résistance est stable et héréditaire, se transmettant verticalement à la descendance. Toutefois, elle est peu ou pas transmissible par transfert horizontal. Inscrite dans le génome bactérien, la résistance naturelle des bactéries sensibles détermine ce que l'on appelle le « spectre d'activité » de l'antibiotique (Nouri et Ziadi, 2015).

II.3.2.2.2. Résistance acquise

La résistance bactérienne aux antibiotiques, acquise par certaines souches appartenant à une espèce normalement sensible à ces traitements, constitue un phénomène préoccupant (Meskine et Benabdelkader, 2016). Bien que cette résistance soit généralement moins stable, elle peut néanmoins se diffuser largement au sein des populations bactériennes. Ce processus repose sur l'acquisition de nouveaux gènes capables de conférer à la bactérie une insensibilité à un antibiotique spécifique ou à une famille d'antibiotiques. Ces gènes peuvent être obtenus par mutation au niveau du chromosome bactérien ou par transfert horizontal d'ADN provenant, par exemple, de plasmides conjugatifs ou de transposons (Nouri et Ziadi, 2015).

II.3.2.3. Mécanisme de la résistance

II.3.2.3.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique

Les mécanismes résistants développés par certaines bactéries incluent la production d'enzymes capables de dégrader ou de modifier chimiquement les antibiotiques. Ces enzymes, par le biais de processus tels que l'hydrolyse, l'acétylation ou la phosphorylation, neutralisent l'efficacité des agents antimicrobiens et constituent ainsi une barrière majeure à leur action.

II.3.2.3.2. Modification de la cible

Les structures moléculaires ciblées par les antibiotiques peuvent subir des mutations génétiques permettant l'émergence de nouvelles cibles non identifiables par ces molécules. Ces mutations confèrent ainsi à la bactérie une résistance spécifique et augmentent sa capacité à survivre en présence de concentrations d'antibiotiques (Rahal, 2013).

II.3.2.3.3. Imperméabilité membranaire

La résistance peut également découler d'une altération de la perméabilité membranaire bactérienne. Cela se manifeste par une réduction quantitative ou une modification structurale des porines, qui jouent un rôle clé dans le passage des antibiotiques à travers la membrane externe des bactéries. Ces modifications entravent la pénétration passive des antibiotiques, limitant leur action (Rahal, 2013)

II.3.2.3.4. Efflux actif

Certains mécanismes de résistance reposent sur les systèmes d'efflux actif, des complexes protéiques situés dans la membrane cytoplasmique externe des bactéries. Ces systèmes agissent comme des pompes capables d'expulser activement les antibiotiques vers l'extérieur de la cellule, en utilisant l'énergie générée par les processus énergétiques de la membrane cytoplasmique pour contrer l'effet thérapeutique des outils antimicrobiens (Rahal, 2013)

II.4. Biofilm

II.4.1. Historique

La découverte du biofilm est attribuée à l'inventeur du microscope Antoni Van Leeuwenhoek qui a utilisé cet appareil pour observer les communautés de micro-organismes au niveau de ses dents vers 1683 (Donlan, 2002).

En 1932, Henrici a mené une expérience pour observer les algues se développer sur des lames de verre à l'intérieur d'un aquarium et a remarqué un dépôt de MO qui s'épaississait progressivement (Henrici, 1933). que la plupart des bactéries vivant en milieu aqueux ne sont pas sous la forme planctonique, mais forment plutôt des communautés fixes attachées aux surfaces (Henerici 1932 ; Trautner et *al.*, 2009).

Le mot « biofilm » a été inventé par Zobell pour la première fois en 1943.

Les biofilms peuvent se présenter sur des matériaux médicaux comme les cathéters, comme le montrent Christensen et *al.*, 1982, qui ont été les premiers à observer la formation de biofilms dans une souche de *Staphylococcus epidermidis* isolée d'un cathéter. De plus, ils ont créé des méthodes pour cultiver le biofilm dans les tubes en plastique et les plaques de micro-titrage, qui sont maintenant des moyens standard de choisir les souches qui forment des biofilms (Planchon 2006).

II.4.2. Définition

Les bactéries sont présentes dans l'environnement sous deux formes : planctonique et sessile. Sous forme planctonique les bactéries sont isolées en suspension dans un milieu liquide. Sous forme sessile elles sont associées en structure complexe appelée biofilm.

Un biofilm est une communauté structurée et dynamique de micro-organismes de la même espèce ou d'espèces différentes qui s'attachent à des surfaces biotiques ou abiotiques et deviennent enfermés dans une matrice auto-produite de substances polymériques extracellulaires (EPS), principalement composée de polysaccharides, de protéines, de lipides et d'ADN extracellulaire. (Flemming et *al.*, 2016). Cette matrice ne se contente pas de maintenir les cellules ensemble, elle les protège également contre les stress environnementaux, y compris les antibiotiques et les défenses immunitaires de l'hôte. (Donlan & Costerton, 2002b).

Le développement d'un biofilm progresse généralement à travers plusieurs étapes : l'attachement initial, la formation de microcolonies, la maturation en une structure tridimensionnelle complexe, puis le détachement ou la dispersion éventuelle. (Vani et *al.*,2023).

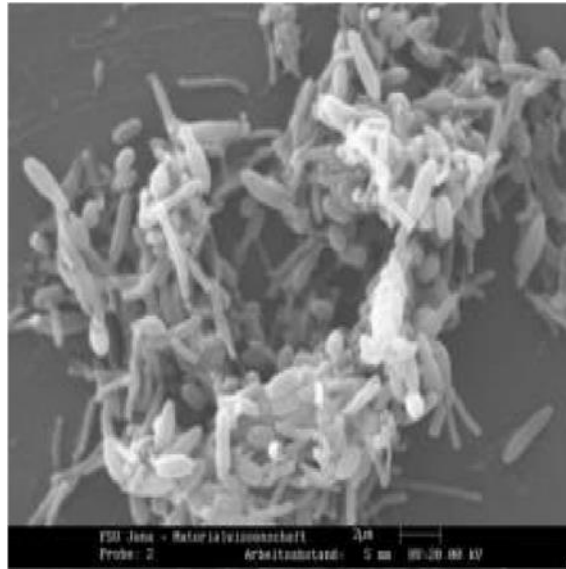


Figure 6 observation microscopique d'un biofilm (Taoufik, 2020).

II.4.3. Mécanismes de formation d'un biofilm bactérien

Les bactéries semblent initier la formation d'un biofilm en réponse à une pression environnementale (Annous et al, 2009) telle que le manque de nourriture, d'oxygène. Ces structures peuvent se développer sur de grandes surfaces, notamment les tissus vivants, les dispositifs médicaux, les canalisations des systèmes d'eau potable ou industriels, ainsi que tout autre support présent dans le sol ou les milieux aquatiques (Talaro, 2008 ; Vu et *al.*, 2009).

Le cycle de vie du biofilm bactérien subdivise en cinq étapes majeures

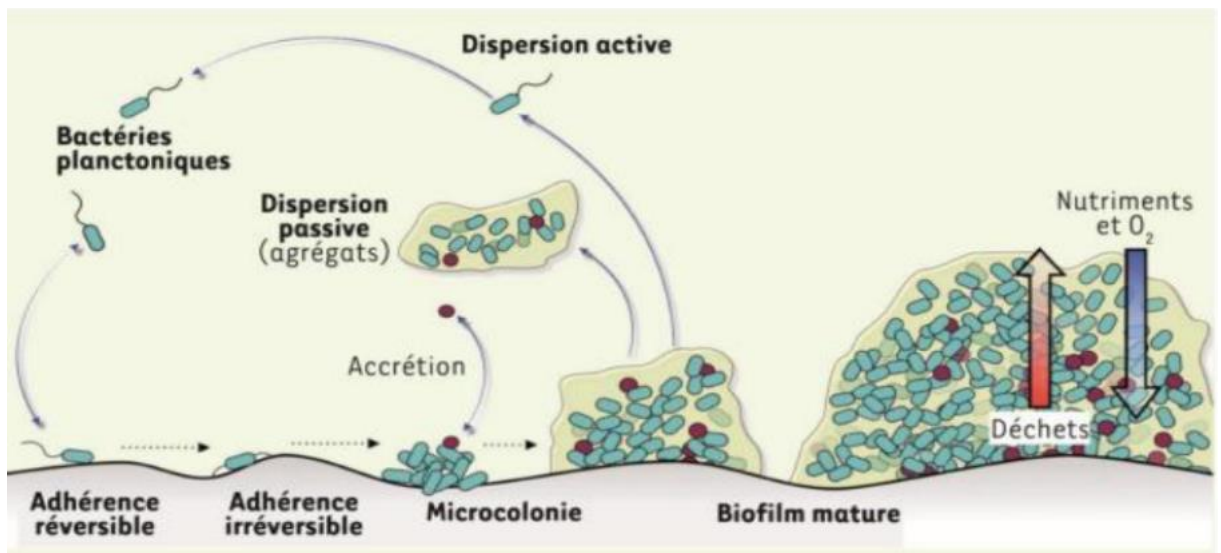


Figure 7 Les différentes étapes de la formation d'un biofilm bactérien (Lebeaux et Ghigo, 2012).

II.4.3.1. Adhésion réversible

Est une étape essentielle pour initier la formation d'un biofilm. Cette étape fait intervenir un phénomène physico-chimique non spécifique. Elle se produit quelques minutes après l'exposition d'une surface nette et propre à un fluide renfermant des microorganismes. Le déplacement de ces derniers découle de divers phénomènes physicochimiques ou biologiques :

- Transport diffusif ou mouvements browniens.
- Sédimentation, qui est associée à la différence de densité entre la cellule bactérienne et le liquide dans lequel elle se trouve.
- Le transport convectif, qui favorise l'adhérence en augmentant la chance de rencontre entre une cellule bactérienne et une surface.
- Le chimiotactisme, la totalité des déplacements par flagelles. (Davey and O'Toole, 2000).

On parle d'une « Adhésion réversible » parce que les cellules peuvent se fixer à une surface pour un certain temps, puis se détacher. L'adhésion des microbes aux surfaces est influencée par plusieurs facteurs, tels que :

1. Les espèces de bactéries.
2. La composition de la surface des cellules.
3. La nature de la surface.
4. Disponibilité des nutriments (Bezoui, 2016).

II.4.3.2. Adhésion irréversible

Un certain nombre de cellules adsorbées de manière réversible restent immobilisées raison de la production d'exopolysaccharides par les bactéries. Au fur et à mesure que les bactéries se multiplient leur adhésion devient plus solide et elles se différencient, en modifiant leur schéma d'expression génique de manière à favoriser leur survie. Ce processus est habituellement le résultat d'un type de communication bactérienne appelée Quorum Sensing (QS) (Garrett et *al.*, 2008 ; Philips et *al.*, 2011).

II.4.3.3. Formation de micro-colonies

Dès que les bactéries se fixent de manière irréversible sur une surface et s'agglomèrent, elles commencent à se multiplier progressivement et produire des EPS pour former des micro-colonies. Qui sont les organismes protégés par la matrice exopolysaccharidique (Jacobsen, et *al.*, 2008).

II.4.3.4. Maturation de biofilm

À mesure que les micro colonies se développent, le biofilm mûrit pour former une structure tridimensionnelle complexe la formation de canaux aqueux et de pores entre les micro colonies, permettant l'acheminement d'oxygène et de nutriments nécessaires à la croissance de micro-organismes, ainsi que l'élimination des déchets (Tenke et *al.*, 2006). La production et la sécrétion d'enzymes ou de toxines provoque la dégradation des résidus présents dans les surfaces environnantes et permet ainsi la libération de nutriments (Jacolosen et *al.*, 2008)

II.4.3.5. Dispersion

Grace à l'état biofilm les cellules bactériennes obtiennent de nombreux bénéfices mais sous l'effet du vieillissement de biofilm le détachement s'avère nécessaire. Une fois les conditions environnementales sont défavorables (Woods et *al.*, 2007). Les bactéries se détachent du biofilm et se dispersent dans le milieu environnant pour repasser dans un mode de vie planctonique afin de trouver des ressources favorables à leur développement en colonisant de nouvelles surfaces et de reformer un biofilm (O'Toole et *al.*, 2000) ; (Sauer et *al.*, 2004) ; (Kaplan, 2010). Elle implique de multiples signaux environnementaux, ainsi la

communication entre les bactéries, notamment par le phénomène mieux connu sous le nom de Quorum Sensing (Karatan et Watnick, 2009). Il existe deux types de dispersion : la dispersion passive se fait par le biais de flux ou les forces ciscaissement en trois types qui sont l'érosion (est un détachement continu des cellules individuelles), relargage (est un détachement massif des bactéries) et l'abrasion (par collision des particules). La dispersion active se fait grâce aux signaux environnementaux (azote, carbone...) elle est effectuée par plusieurs facteurs comme la physiologie des cellules elle-même, modification des propriétés de surface (Bezoui, 2016)

II.4.4. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm

La formation d'un biofilm est un processus complexe, qui fait intervenir de nombreux mécanismes physico-chimiques et biologiques, Ce développement est influencé par trois composants : caractéristiques du milieu et propriétés de la surface et les microorganismes ; ainsi que les interactions existantes entre ces composants (Branger, 2007)

II.4.4.1. Propriétés de la surface

L'interaction d'un matériau avec un fluide contenant des bactéries peut potentiellement favoriser la formation d'un biofilm :

II.4.4.1.1. Rugosité

Plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des micro-colonies est importante.

II.4.4.1.2. Caractéristiques chimiques d'une surface

Peuvent exercer une influence sur le taux d'attachement. Les micro-organismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisées comme le Téflon et le plastique.

II.4.4.1.3. Présence préalable de films protéiques

Comme le sang, les larmes, l'urine.....etc. influencent l'attachement de bactéries à cette surface, et favorise la formation de biofilm (Bellifa, 2014).

II.4.4.2. Propriétés du milieu

Le mode de culture est une caractéristique importante qui peut modifier fortement l'adhésion des organismes et les conditions environnementales telles que :

- La disponibilité de nutriments : abondance ou carence.
- Les différents stress physicochimiques : pH, température, présence de substances bactéricidesetc.
- Composition de milieu : présence de calcium, magnésium, phosphate, glucose ...etc semble faciliter l'adhésion à un support (Marchal, 2010)

II.4.4.3. Caractéristiques des microorganismes

Les pili, produits par les bactéries, jouent un rôle dans l'adhésion des bactéries aux cellules, et les EPS synthétisés par les bactéries, favorisent leur attachement aux surfaces. L'adhésion est aussi influencée par l'état physiologique de la bactérie, son caractère hydrophobe, de sa charge électrique globale et l'énergie libre de la surface (Hygic, 2010).

II.4.5. Quorum Sensing et régulation de la formation de biofilm

Le QS est un processus de communication inter-microbienne, contrôlant l'expression de gènes particuliers au sein d'une population microbienne, en fonction de la densité cellulaire. Quand le signal atteint une certaine concentration critique, il active un régulateur transcriptionnel qui induit des gènes cibles spécifiques (comme la production d'EPS) (Jayaraman et Wood, 2008 ; Basseler, 2009).

Le QS aura une influence sur les différentes étapes de la formation du biofilm. Il implique la production, la sécrétion et la détection, par les bactéries, de petites molécules signal appelées auto-inducteurs, comme l'homoserine lactone. Chez les bactéries à Gram négatif, (Roux et *al.*, 2006 ; Tremblay et *al.*, 2014)

Le QS intervient également dans l'épaisseur du biofilm en activant ou en inhibant certains caractères comme la motilité et les facteurs de virulence extracellulaires (protéases) (Tomlin et *al.*, 2005 ; Clutterbuck et *al.*, 2007; Irie and

Parsek, 2008). Il participe aussi à la défense des bactéries contre d'autres organismes vivants, tels que les protozoaires.

II.4.6. Effets bénéfiques et néfastes de biofilms

Les biofilms sont regroupés en deux principales catégories : bénéfiques, et nocifs, en fonction de leur impact sur divers aspects de la vie humaine, tels que l'environnement, la sécurité alimentaire, la production agricole et médicale, entre autres (Yin et *al.*, 2021).

II.4.6.1. Biofilms bénéfiques

Ont essentiels à de nombreuses fonctions, tel le traitement des eaux usées, la dégradation biologique et la réhabilitation écologique des cycles chimiques. On pourrait dire Au cours des processus de dégradation et de réhabilitation, ces biofilms créent des communautés microbiennes spécifiques capables de décomposer diverses substances telles que les herbicides, les pesticides, les antibiotiques et les plastiques, Cela contribue à la purification des sols et de l'eau contaminée (Yin et *al.*, 2021). Il est important de noter que le biofilm pourrait potentiellement préserver les aliments contre l'oxydation des lipides, ainsi que contre les gaz, l'eau et les odeurs (Olanbiwoninu et Popoola, 2023).

II.4.6.2. Effets néfastes des biofilms

Une estimation a montré que 80% des infections dans le corps humain sont dues à de microbes impliqués dans la formation de biofilms (HØIBY, 2017). Il peut provoquer des infections courantes jusqu'à des infections dangereuses, telles que la fibrose kystique (KAPLAN, 2010) et représente une menace pour la sécurité alimentaire et sont responsables de maladies animales et végétales. Leur présence est courante dans les processus de transformation, d'emballage et de stockage des aliments, ce qui peut entraîner une détérioration notable de leur qualité (Garcia-Sanchez et *al.*, 2019 ; Ripolles-Avila et *al.*, 2019 ; Sternisa et *al.* 2019 ; Ng et *al.* 2017). De plus, les maladies végétales et animales causées par ces biofilms nocifs sont souvent difficiles à maîtriser, ce qui peut entraîner une diminution significative des rendements et de la qualité des cultures (Yaron et Römling, 2014)

PARTIE III. MATERIEL ET METHODES

III.1. Matériel et méthodes

III.1.1. Objectif de l'étude

L'objectif de cette étude est d'isoler et d'identifier les entérobactéries à partir de la viande hachée bovine prélevée dans plusieurs boucheries de la région de Saïda, d'étudier leur profil de résistance aux antibiotiques, d'évaluer leur capacité de formation de biofilm, et de tester in vitro l'activité antibiofilm de bactériophages dirigés contre ces souches.

III.1.2. Lieu et période d'étude

L'étude a été réalisée sur une période de cinq mois au niveau du laboratoire de microbiologie de l'Université de Saïda Dr Moulay Tahar. Les échantillons de viande hachée bovine ont été collectés de manière aléatoire dans trois boucheries situées dans la wilaya de Saïda, commune d'Aïn El-Hadjar. Chaque échantillon (environ 100 à 200 g) a été placé dans un sachet stérile, puis transporté au laboratoire dans une glacière à 4 °C pour une analyse immédiate, dans un délai ne dépassant pas deux (02) heures après le prélèvement.

III.1.3. Préparation et isolement bactérien

III.1.3.1. Suspension de la solution mère et les dilutions décimales

III.1.3.1.1. Suspension mère

Pour chaque échantillon, 25 g de viande hachée bovine ont été prélevés aseptiquement et transférés dans un flacon contenant 225 mL d'eau peptonée stérile. Le mélange a été homogénéisé jusqu'à obtention d'une suspension uniforme. Cette suspension constitue la dilution mère (DM), correspondant à une dilution 1/10 (10^{-1}). À partir de cette dilution mère, des dilutions décimales successives ont été préparées.

III.1.3.1.2. Préparation des dilutions

Une série de tubes contenant chacun 9 mL d'eau peptonée stérile a été préparée. Un volume de 1 mL de la dilution mère (10^{-1}) a été transféré dans le premier tube, afin d'obtenir la dilution 10^{-2} , puis le mélange a été homogénéisé. Ensuite, 1 mL de cette dilution 10^{-2} a été transféré dans le tube suivant pour

obtenir la dilution 10^{-3} , et ainsi de suite jusqu'à la dilution souhaitée (généralement jusqu'à 10^{-5} voire 10^{-7} , selon les besoins).

III.1.4. Ensemencement

L'ensemencement a été réalisé par la méthode de l'étalement en surface. Un volume de 0,1 mL de chaque dilution a été déposé à la surface de la gélose MacConkey, puis étalé à l'aide d'un étaleur stérile. Les boîtes ont ensuite été incubées à 37 °C pendant 24 heures.



Figure 8 : Préparation de la suspension mère et réalisation des dilutions décimales

III.1.5. Examen macroscopique

Après incubation, l'observation macroscopique des colonies constitue un premier critère d'orientation pour l'identification bactérienne. Elle permet une caractérisation préliminaire des isolats à partir de l'aspect visible à l'œil nu.

Selon Joffin et Leyral (2006), les principaux caractères morphologiques à observer sont : la forme des colonies, leur taille, leur couleur, leur relief, leur opacité ainsi que l'aspect de leur surface. Ces caractères peuvent être ronds ou irréguliers, convexes, concaves ou plats, opaques, translucides ou transparents, lisses, rugueux, secs ou dentelés.

III.1.6. Purification des bactéries

Après incubation, les colonies suspectes ont été purifiées par repiquages successifs sur le même milieu de culture ou sur gélose nutritive, afin d'obtenir des cultures pures. À chaque repiquage, une colonie isolée a été prélevée puis réensemencée. L'opération a été répétée jusqu'à l'obtention de colonies

homogènes en taille, en forme et en couleur, traduisant la pureté de la souche (Idoui et *al.*, 2009).

III.1.7. Observation microscopique

La coloration de Gram constitue une étape essentielle dans l'identification des souches bactériennes. Elle permet de distinguer les bactéries Gram positives, qui prennent une coloration violette, des bactéries Gram négatives, qui apparaissent roses. Cette technique renseigne également sur la morphologie bactérienne, notamment la forme des cellules et leur mode de regroupement. Elle représente ainsi une étape fondamentale de la caractérisation bactérienne (Boutadjine et Boultif, 2019).

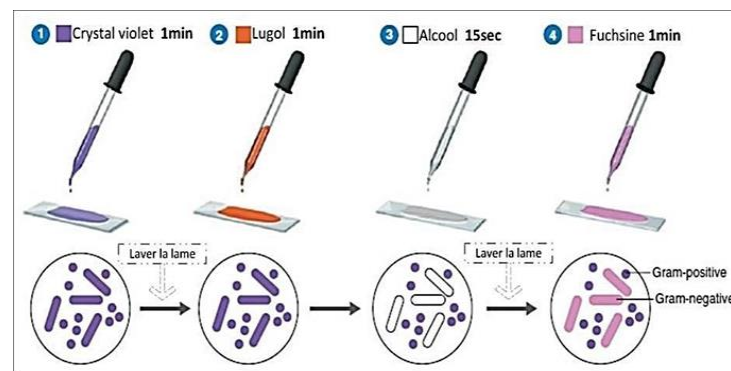


Figure 9 : Principe de la coloration de Gram

Les différentes étapes de la coloration de Gram sont détaillées en annexe.

III.1.8. Conservation des isolats

III.1.8.1. Conservation à court terme

La conservation à court terme des isolats purifiés a été réalisée par ensemencement des souches pures sur gélose nutritive inclinée, à l'aide d'une anse de platine stérile. Après incubation à 37 °C pendant 24 h, les tubes ont été conservés à 4 °C pendant plusieurs semaines. Cette méthode permet de maintenir la viabilité des souches bactériennes sur une durée limitée (Saldi et *al.*, 2002).

III.1.8.2. Conservation à long terme

Après 18 h de culture en milieu liquide, les cellules bactériennes ont été récupérées par centrifugation à 4 000 tr/min pendant 10 min. Le surnageant a ensuite été éliminé et le culot a été remis en suspension dans un milieu de conservation composé de 60% de bouillon nutritif (BN) et de 40% de glycérol.

Les suspensions ont été transférées dans des microtubes Eppendorf, puis conservées à -20°C . Cette méthode permet de préserver les cultures pendant plusieurs mois tout en maintenant leur viabilité et leurs caractéristiques biologiques (Badis et *al.*, 2005).

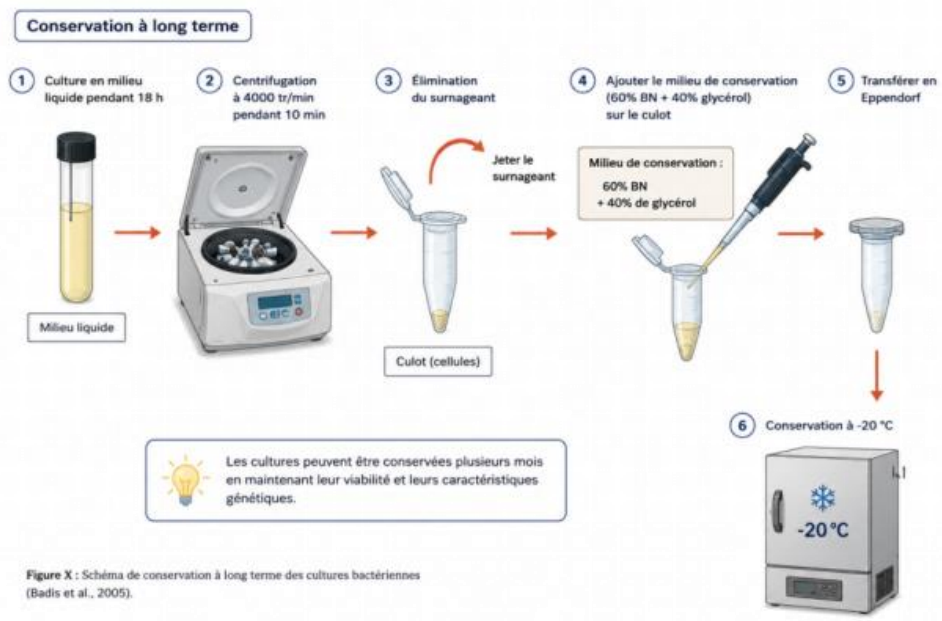


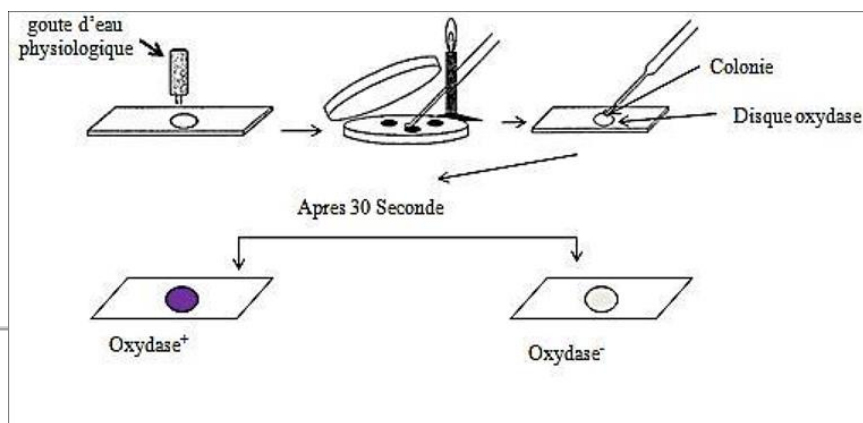
Figure 10 : Étapes de la conservation à long terme des isolats bactériens

III.1.9. Identification biochimique

III.1.9.1. Recherche de l'oxydase

Un disque d'oxydase a été déposé sur une lame propre. Une colonie bactérienne a ensuite été prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, puis étalée sur le disque. La lecture du test a été effectuée dans un délai maximal de 60 secondes (Delarras, 2007).

Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration rouge violacé en quelques secondes. Une réaction tardive, apparaissant entre 10 et 60 secondes, doit être interprétée avec prudence, tandis qu'une absence de coloration



après 60 secondes correspond à un résultat négatif.

Figure 11 : Principe et interprétation du test de l'oxydase

III.1.9.2. Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme qui dégrade le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène, selon la réaction suivante : $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$. Ce test permet donc de mettre en évidence la présence de cette enzyme chez les bactéries aérobie ou facultativement anaérobies.

Le test a été réalisé sur une lame propre en déposant une goutte d'eau oxygénée, puis en y émulsionnant une petite quantité de colonie bactérienne à l'aide d'une anse stérile (Delarras, 2007).

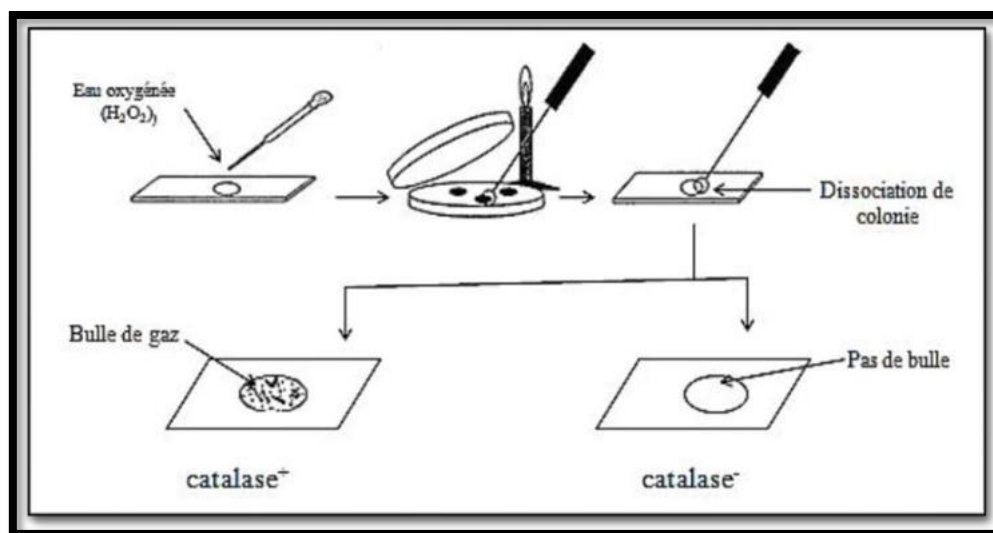


Figure 12 Principe du test de la catalase

III.1.9.3. Test de l'indole

Le test de l'indole permet de déterminer la capacité d'une souche bactérienne à dégrader le tryptophane en indole grâce à l'enzyme tryptophanase.

La production d'indole a été recherchée à partir d'une culture bactérienne incubée dans un milieu contenant du tryptophane, tel que l'eau peptonée. Après incubation à 37 °C pendant 24 h, quelques gouttes de réactif de Kovacs ont été ajoutées à la surface du milieu.

- La formation d'un anneau rouge à la surface du milieu indique un résultat positif.
- L'absence de coloration rouge indique un résultat négatif.

III.1.9.4. Test du Rouge de Méthyle (RM)

Le test au rouge de méthyle permet de détecter la capacité d'une bactérie à utiliser la voie de fermentation des acides mixtes à partir du glucose. Les souches bactériennes sont ensemencées dans un bouillon Clark et Lubs (bouillon MR-VP) et incubées à 37 °C pendant 24 heures. Après incubation, quelques gouttes de rouge de méthyle ont été ajoutées au milieu.

- Coloration rouge persistante : indique une production importante d'acides stables issus de la fermentation du glucose (résultat positif).
- Coloration jaune/orange : résultat négatif.

III.1.9.5. Test de Voges-Proskauer (VP)

Le test au rouge de méthyle permet de mettre en évidence la capacité d'une bactérie à produire des acides stables à partir de la fermentation du glucose. Les souches bactériennes ont été ensemencées dans un bouillon Clark et Lubs (MR-VP), puis incubées à 37 °C pendant 24 h. Après incubation, quelques gouttes de rouge de méthyle ont été ajoutées au milieu.

- Une coloration rouge persistante indique un résultat positif, traduisant une production importante d'acides stables.
- Une coloration jaune ou orange indique un résultat négatif.

III.1.9.6. Citrate de Simmons

Le citrate de Simmons est un milieu différentiel utilisé pour l'identification des bactéries Gram négatives sur la base de leur capacité à utiliser le citrate comme seule source de carbone (Camille, 2006).

- Les bactéries citrate positives provoquent un virage du milieu au bleu.
- Les bactéries citrate négatives laissent le milieu vert.

III.1.9.7. Mannitol mobilité

Le milieu mannitol-mobilité est un milieu semi-solide permettant d'étudier simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité bactérienne. L'ensemencement a été réalisé par piqure centrale à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, suivi d'une incubation à 37 °C pendant 24 h.

- Un milieu rouge indique l'absence de fermentation du mannitol.

- Un milieu jaune indique une fermentation du mannitol.

Pour la mobilité :

- L'absence de diffusion autour de la piqure indique une bactérie immobile.
- La diffusion du développement autour de la piqure indique une bactérie mobile.

III.1.10. Identification biochimique par les systèmes API 20E et API 10S

L'identification biochimique des isolats a été réalisée à l'aide de deux systèmes miniaturisés et standardisés de tests biochimiques, à savoir l'API 20E et l'API 10S. Ces systèmes sont utilisés pour l'identification des bacilles à Gram négatif et permettent une identification rapide et fiable des souches bactériennes isolées (bioMérieux, 2019).

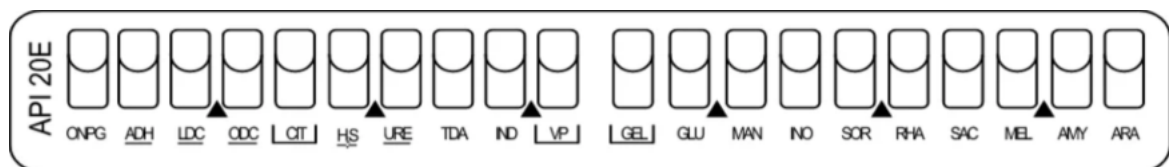


Figure 13 : Présentation générale de la galerie API 20E

III.1.10.1. Préparation de la galerie

Le fond et le couvercle de la boîte d'incubation ont été assemblés. Environ 5 mL d'eau distillée stérile ont été répartis dans les alvéoles afin de créer une atmosphère humide. Les galeries API ont ensuite été déposées stérilement dans la boîte d'incubation.

III.1.10.2. Préparation de l'inoculum

À l'aide d'une anse stérile, une colonie isolée issue d'une culture fraîche sur milieu gélosé a été prélevée, puisensemencée dans un tube stérile contenant 5 mL d'eau physiologique afin d'obtenir une suspension bactérienne homogène de turbidité équivalente à 0,5 McFarland (Jorgensen et *al.*, 2009).

III.1.10.3. Inoculation de la galerie

Les microtubes des galeries API 20E et API 10S ont été remplis avec la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette Pasteur ou d'une micropipette. Afin d'éviter la formation de bulles d'air au fond des tubes, la pointe de la pipette a été

placée contre la paroi de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant.

Les règles de remplissage ont été respectées selon la nature des tests :

Tests CIT, VP et GEL : remplir le tube et la cupule.

Tests ADH, LDC, ODC, H₂S et URE : remplir le tube et la cupule, puis recouvrir la cupule d'huile de paraffine stérile afin de créer une anaérobiose.

Autres tests : remplir uniquement le tube, la cupule restant vide.

La boîte d'incubation a ensuite été refermée et incubée à 37 °C pendant 18 à



24 h.

Figure 14 : Aspect des galeries API20E et API10S avant incubation

III.1.10.4. Lecture et interprétation des résultats

Après incubation, les réactifs spécifiques nécessaires à la révélation des tests indirects ont été ajoutés, notamment pour les tests TDA, VP et IND. La lecture des réactions colorimétriques a été effectuée après le temps de révélation recommandé, puis les résultats ont été interprétés à l'aide du site <https://lab.upbm.org>.

III.1.11. Antibiogramme

L'antibiogramme est une étape essentielle permettant d'évaluer la sensibilité ou la résistance des souches bactériennes vis-à-vis de plusieurs antibiotiques. Dans ce travail, la méthode utilisée est celle de la diffusion sur

disques en gélose Mueller-Hinton, un milieu standardisé pour la majorité des bactéries, à l'exception de certaines souches exigeantes (Diallo et Kanté, 2019).

La préparation de l'inoculum a été réalisée à partir d'une culture pure âgée de 18 h. Quelques colonies ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine stérile, puis mises en suspension dans 5 à 10 mL d'eau physiologique stérile à 0,9%. La suspension a été homogénéisée jusqu'à obtention d'une turbidité équivalente à 0,5 McFarland. L'ensemencement a été effectué dans les 15 minutes suivant la préparation de l'inoculum.

Un écouvillon stérile a été trempé dans la suspension bactérienne, puis pressé contre la paroi interne du tube afin d'éliminer l'excès d'inoculum. La gélose a ensuite été ensemencée en stries serrées sur toute sa surface. L'opération a été répétée trois fois en tournant la boîte de 60° à chaque passage, afin d'assurer une répartition homogène de l'inoculum (Rahal et *al.*, 2011).

Les disques d'antibiotiques ont été déposés à la surface de la gélose en respectant un espacement d'environ 24 mm entre eux. À l'aide de pinces bactériologiques stériles, chaque disque a été délicatement appliqué sur la surface du milieu afin d'assurer une bonne adhérence. Une fois déposés, les disques n'ont plus été déplacés (Rahal et *al.*, 2008). Les boîtes ont ensuite été incubées à 37 °C pendant 24 h.

La lecture a consisté à mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition, puis à classer chaque souche en catégorie S (sensible), I (intermédiaire) ou R (résistante) selon les seuils d'interprétation recommandés selon les recommandations du CLSI (2025).

Tableau 1 : Disques d'antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme

Antibiotique	Abréviation	Concentration du disque
Pénicilline	P	10 µg
Amoxicilline + acide clavulanique	AMC	20/10 µg
Cefotaxime	CTX	30 µg
Ceftazidime	CAZ	30 µg
Gentamicine	GEN	10 µg

Antibiotique	Abréviation	Concentration du disque
Ciprofloxacine	CIP	5 µg
Cotrimoxazole	SXT	25 µg
Imipénème	IPM	10 µg

III.1.12. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) correspond à la plus faible concentration d'un antibiotique capable d'inhiber visiblement la croissance d'un micro-organisme après incubation de 18 à 24 h à 35–37 °C. Sa détermination in vitro constitue une étape fondamentale pour évaluer le niveau de sensibilité ou de résistance d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un antibiotique (ISO 20776-1, 2019 ; EUCAST, 2023).

Dans cette étude, la CMI a été mesurée pour cinq antibiotiques : ampicilline, amoxicilline, amoxicilline + acide clavulanique, tétracycline et gentamicine.

III.1.12.1. Préparation des solutions mères d'antibiotiques

Les solutions mères des antibiotiques ont été préparées à partir de poudres de référence, en respectant les recommandations du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Chaque antibiotique a été dissous dans le solvant approprié afin d'obtenir une concentration initiale de 5120 µg/mL. Des dilutions successives au demi ont ensuite été réalisées dans de l'eau distillée stérile ou dans le diluant recommandé, afin d'obtenir une gamme de concentrations comprise entre 1,25 et 5120 µg/mL.

Les solutions préparées ont été conservées à 4 °C, à l'abri de la lumière lorsque cela était nécessaire, et utilisées dans les délais recommandés afin de préserver leur stabilité et leur activité antimicrobienne.

III.1.12.1.1. Méthode de dilution en gélose

La méthode de dilution en gélose consiste à incorporer différentes concentrations d'antibiotiques dans un milieu Mueller-Hinton fondu, puis homogénéisé et réparti dans des boîtes de Pétri stériles. Les suspensions

bactériennes standardisées ont ensuite été déposées à raison de 2 µL par spot à la surface de la gélose, à l'aide d'une micropipette.

Les spots ont été laissés à sécher à température ambiante pendant 15 à 30 min, puis les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 18 à 24 h. La CMI correspond à la plus faible concentration d'antibiotique inhibant complètement la croissance bactérienne au niveau du spot ensemencé.

III.1.12.1.2. Méthode de la microdilution en bouillon

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été réalisée par la méthode de microdilution en bouillon dans des microplaques stériles à 96 puits. Une suspension bactérienne a été préparée à partir de colonies fraîches âgées de 18 à 24 h et ajustée à une densité correspondant à 0,5 McFarland. Des dilutions successives au demi de l'antibiotique ont été effectuées dans du bouillon Mueller-Hinton afin d'obtenir une gamme de concentrations comprises entre 128 et 0,125 µg/ml. Cent microlitres (100 µL) de chaque dilution ont été distribués dans les puits de la microplaque, puis 100 µL de l'inoculum bactérien ont été ajoutés à chaque puits. Un contrôle de croissance contenant uniquement l'inoculum bactérien et un contrôle de stérilité contenant uniquement le milieu de culture a été inclus. Après incubation à 37 °C pendant 18 à 24 h, la CMI a été définie comme la plus faible concentration d'antibiotique capable d'inhiber complètement la croissance visible de la souche bactérienne testée.

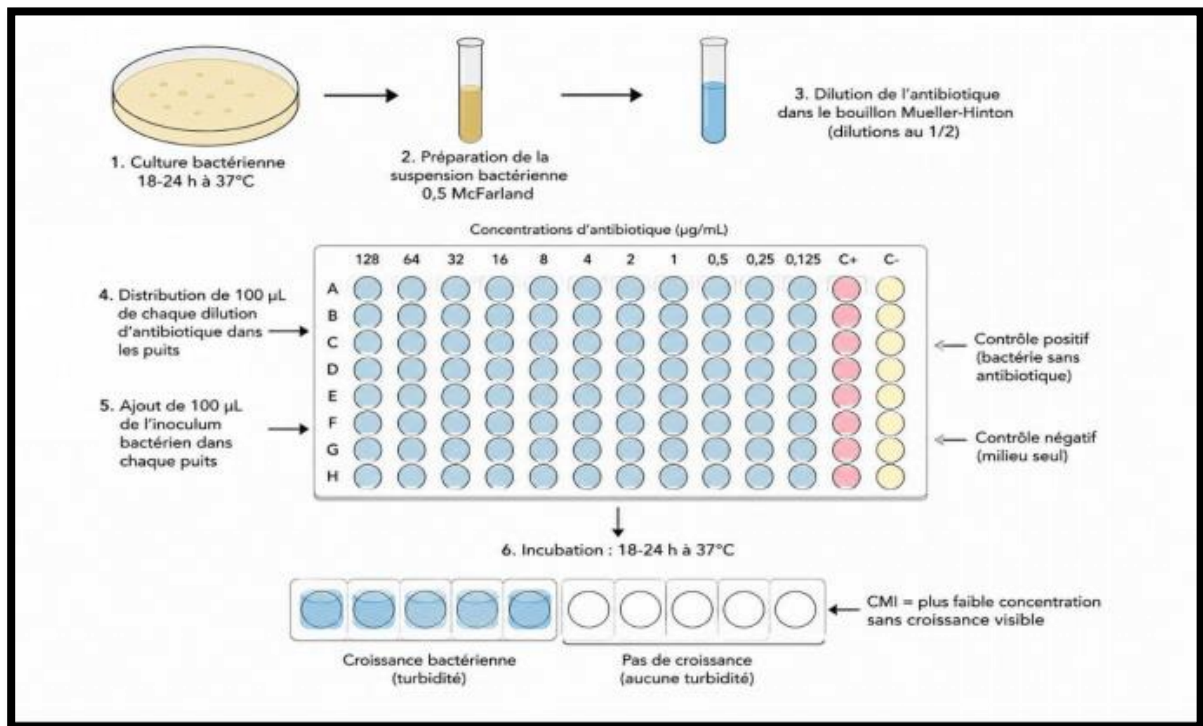


Figure 15 : Principe de la détermination de la CMI par dilution en gélose

III.1.13. Test de formation de biofilm (Cristal violet – microplaque 96 puits)

La détermination quantitative de la formation de biofilm dans les microplaques à 96 puits repose sur la mesure colorimétrique du cristal violet fixé par les cellules sessiles.

Une colonie prélevée sur gélose nutritive (GN) a été inoculée dans 5 mL de bouillon nutritif (BN), puis incubée à 35–37 °C pendant 18 à 24 h. Une dilution au 1:100 a ensuite été préparée dans du BN frais afin de favoriser l'adhésion bactérienne sans croissance excessive. Pour cela, 100 µL de culture ont été ajoutés à 9,9 mL de BN frais.

Par la suite, 200 µL de la suspension bactérienne diluée ont été transférés dans chaque puits d'une microplaque à 96 puits à fond plat, en triplicat pour chaque souche. Des puits contenant uniquement du BN stérile ont été utilisés comme témoins négatifs. La microplaque a été couverte, puis incubée à 35–37 °C pendant 24 h en conditions statiques.

Après incubation, le contenu des puits a été délicatement éliminé par retournement de la plaque et tapotement sur papier absorbant. Les puits ont ensuite été lavés 2 à 3 fois avec 200 à 250 μ L de sérum physiologique stérile, puis laissés à sécher à l'air libre pendant 10 à 15 min.

Les cellules bactériennes adhérentes ont ensuite été colorées avec du cristal violet à 0,1% (125 à 200 μ L par puits) pendant 10 à 15 min à température ambiante. Trois lavages doux à l'eau distillée ont été effectués afin d'éliminer l'excès de colorant, puis la plaque a été laissée à sécher complètement pendant 20 à 30 min.

Le cristal violet fixé a été solubilisé par l'ajout de 200 μ L d'éthanol à 95% dans chaque puits. La microplaque a été maintenue sans agitation pendant 5 à 10 min. La densité optique a ensuite été mesurée à 570 nm ou 595 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques.

III.1.14. Isolement et évaluation fonctionnelle des bactériophages (activité antibactérienne et antibiofilm)

L'objectif de cette section est d'isoler des bactériophages à partir d'échantillons d'eaux usées, de les enrichir et de les sélectionner en fonction de leur capacité à lyser la bactérie cible, puis d'évaluer leur potentiel comme agent de lutte contre la résistance aux antibiotiques et comme traitement antibiofilm.

III.1.14.1. Principes généraux

Les bactériophages sont des virus infectant spécifiquement les bactéries et provoquant leur lyse, représentant une alternative ou un adjuvant aux antibiotiques. Les phages isolés ont été testés pour (i) leur capacité à réduire la croissance bactérienne en culture liquide (cinétique de lyse), (ii) leur efficacité à former plages de lyse sur lawn bactérien, et (iii) leur activité pour prévenir ou réduire la formation de biofilm (essai cristal violet).

III.1.14.2. Culture bactérienne

La souche bactérienne utilisée pour l'isolement des bactériophages a été cultivée dans du milieu Luria-Bertani (LB). Les colonies isolées ont été inoculées dans ce milieu, puis incubées à 37 °C sous agitation jusqu'à l'obtention d'une

culture en phase exponentielle, correspondant à une densité optique à 600 nm d'environ 0,8. Cette culture a ensuite été utilisée pour les étapes d'enrichissement et de détection des bactériophages.

III.1.14.3. Isolement des bactériophages

Les échantillons d'eaux usées ont été prélevés dans un volume de 50 à 100 mL, puis centrifugés à 7 500 tr/min pendant 10 min à 4 °C. Le surnageant a été récupéré, filtré à l'aide d'une membrane de porosité 0,22 µm, puis conservé à 4 °C jusqu'à utilisation.

Pour favoriser l'adsorption des bactériophages sur les bactéries, une solution de CaCl₂ à 100 mM a été préparée en dissolvant 1,10 g de CaCl₂ dans 100 mL d'eau distillée.

Afin d'amplifier la charge phagique de l'échantillon, 2 mL du filtrat d'eaux usées ont été mis en contact avec 1 mL de culture bactérienne ($DO_{600} = 0,8$), dans un tube contenant 6 mL de milieu LB liquide. Le mélange a été incubé à 37 °C pendant 24 à 72 h, ou jusqu'à l'apparition d'une clarification du milieu, signe probable de lyse bactérienne. Après incubation, le mélange a été centrifugé à 6 000 tr/min pendant 10 min à 4 °C, puis filtré sur membrane de 0,22 µm afin d'éliminer les débris cellulaires.

Les colonies isolées ont ensuite été ensemencées dans un tube contenant 9 mL de milieu LB additionné de 1 mL de CaCl₂. Le tube a été incubé à 37 °C jusqu'à obtention d'une DO_{600} de $0,6 \pm 0,1$, après environ 14 à 16 h. La suspension bactérienne obtenue a ensuite été étalée à l'aide d'un écouvillon sur gélose LB, puis laissée au contact pendant 15 à 20 min afin de constituer un tapis bactérien homogène.

Le filtrat phagique, noté solution F, a été obtenu par centrifugation à 6 000 tr/min pendant 10 min à 4 °C, suivie d'une filtration à 0,22 µm. Une série de dilutions en cascade (10^{-1} à 10^{-5}) a été préparée dans un tampon CaCl₂ 10 mM. Sur le tapis bactérien préalablement préparé, 10 à 20 µL de chaque dilution ainsi que le filtrat non dilué ont été déposés sur des zones distinctes de la boîte de Pétri. Les boîtes ont ensuite été incubées à 37 °C pendant 16 à 24 h, puis examinées afin de détecter la présence de plages de lyse.

III.1.14.4. Protocole de cinétique de lyse en microplaque

Les colonies isolées ont été ensemencées dans 10 mL de milieu LB, puis incubées à 37 °C jusqu'à l'obtention d'une DO_{600} de $0,6 \pm 0,1$, après 14 à 16 h. La cinétique de lyse a été réalisée en microplaque selon quatre conditions testées en triplicat pour la souche 1 :

1. un puits témoin contenant 180 μ L de milieu seul ;
2. 180 μ L de suspension bactérienne (S_1) additionnés de 20 μ L de solution physiologique, correspondant au témoin sans phage ;
3. 180 μ L de S_1 additionnés de 20 μ L du filtrat phagique non dilué (solution F) ;
4. 180 μ L de S_1 additionnés de 20 μ L de phages dilués au 1/10 dans du $CaCl_2$ 10 mM.

La densité optique à 600 nm a été mesurée toutes les 30 min pendant 5 h à 37 °C, puis la microplaque a été incubée pendant 18 h supplémentaires.

III.1.14.5. Mesure de l'activité antibiofilm des bactériophages

L'évaluation de l'activité antibiofilm des bactériophages a été réalisée selon la méthode de coloration au cristal violet sur microplaque 96 puits, adaptée de la méthode de quantification du biofilm décrite à la section précédente, avec intégration d'un groupe traité par les phages.

III.1.14.5.1. Préparation de l'inoculum bactérien

Une culture de la souche cible sélectionnée (souche productrice de biofilm identifiée lors de l'étape précédente) a été préparée dans 5 mL de milieu LB, incubée à 37 °C pendant 18 h sous agitation. La suspension a ensuite été diluée au 1:100 dans du LB frais afin d'obtenir un inoculum standardisé, favorisant l'adhésion sans croissance excessive.

III.1.14.5.2. Mise en place des conditions expérimentales

Quatre conditions ont été testées en triplicat dans une microplaque à 96 puits à fond plat :

- **Témoin milieu (T-)** : 180 µL de milieu seul, sans bactéries ni phages (contrôle de stérilité et de bruit de fond colorimétrique) ;
- **Témoin bactéries (T+)** : 180 µL de suspension bactérienne (S₁) additionnés de 20 µL de solution physiologique stérile, sans phages (contrôle de formation de biofilm sans traitement) ;
- **Condition phage non dilué** : 180 µL de S₁ additionnés de 20 µL du filtrat phagique non dilué (solution F) ;
- **Condition phage dilué** : 180 µL de S₁ additionnés de 20 µL de la suspension phagique diluée au 1/10 dans du CaCl₂ 10 mM.

Les phages ont été ajoutés simultanément aux bactéries afin d'évaluer leur capacité à prévenir la formation de biofilm. Le volume total par puits était de 200 µL dans toutes les conditions.

Les phages ont été ajoutés simultanément aux bactéries afin d'évaluer leur capacité à **prévenir** la formation de biofilm.

III.1.14.5.3. Incubation et quantification

La microplaque a été couverte et incubée à 37 °C pendant **24 h** en conditions statiques. Après incubation, le contenu des puits a été éliminé par retournement et tapotement sur papier absorbant. Les puits ont été lavés 2 à 3 fois avec 200 µL de sérum physiologique stérile (NaCl 0,9%), puis laissés à sécher à l'air libre pendant 10 à 15 min. Les cellules adhérentes ont été colorées avec 125 µL de cristal violet à 0,1% pendant 10 à 15 min à température ambiante. Après trois lavages à l'eau distillée et séchage complet (20 à 30 min), le cristal violet fixé a été solubilisé par l'ajout de 200 µL d'éthanol à 95%, maintenu 5 à 10 min sans agitation. La densité optique a été mesurée à 570 nm à l'aide du lecteur de microplaques.

III.1.14.5.4. Calcul du pourcentage de réduction du biofilm

Le pourcentage de réduction du biofilm induit par le traitement phagique a été calculé selon la formule suivante (Cerca et *al.*, 2005) :

$$\% \text{ réduction} = \frac{DO_{T+} - DO_{T\text{-phage+bact}}}{DO_{T+}} \times 100$$

Où DO_{T+} correspond à la densité optique du témoin bactérien sans phage et $DO_{T\text{-phage+bact}}$ à celle du groupe traité. Une réduction supérieure à 50% a été considérée comme une activité antibiofilm significative.

PARTIE IV. RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1. Objectif

L'objectif de cette étude est d'isoler et d'identifier les entérobactéries présentes dans des échantillons de viande hachée bovine collectés dans trois boucheries de la commune d'Aïn El Hadjar (wilaya de Saïda), d'évaluer leur profil de résistance aux antibiotiques et leur capacité de formation de biofilm, et d'explorer le potentiel antibiofilm de bactériophages isolés à partir d'eaux usées locales. Ces données visent à contribuer à la compréhension des risques microbiologiques liés à la consommation de viande hachée et à la dissémination des bactéries résistantes dans la chaîne alimentaire.

IV.2. Isolement et identification

IV.2.1. Dénombrement et isolement des isolats bactériens

Après incubation, le milieu MacConkey a révélé la présence de colonies présentant des morphologies variées, traduisant une diversité de bactéries à Gram négatif capables de se développer sur ce milieu sélectif et différentiel. L'aspect macroscopique des colonies obtenues est illustré à la Figure 16, tandis que les résultats du dénombrement bactérien sont présentés dans le Tableau 2.

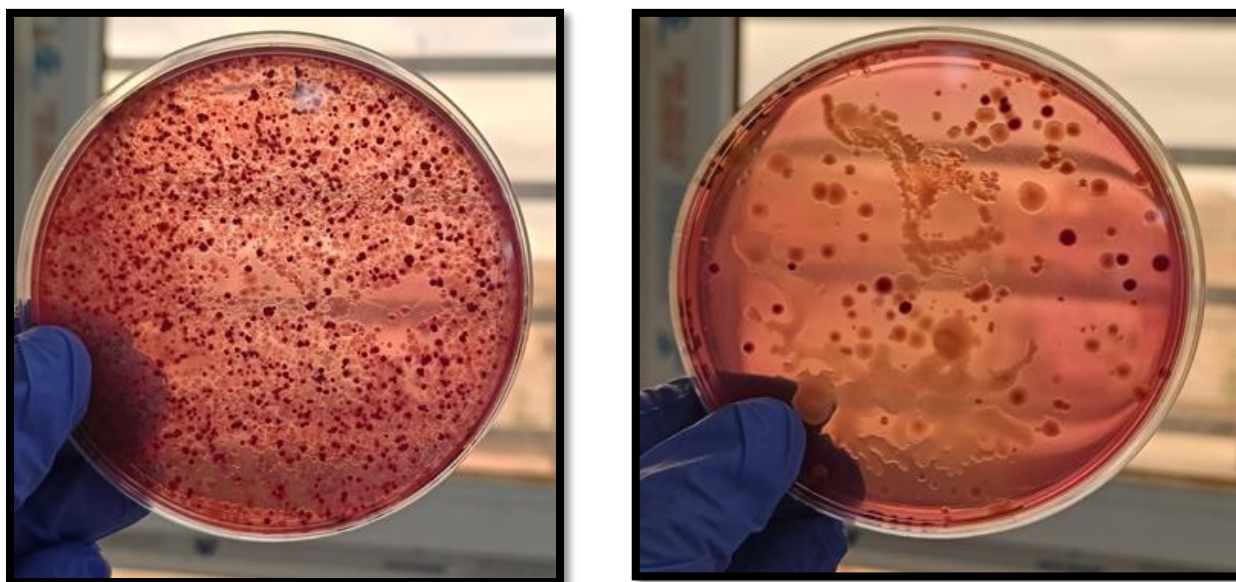


Figure 16 : Aspect des colonies bactériennes développées sur le milieu MacConkey après incubation

Tableau 2: Dénombrement des bactéries à Gram négatif sur milieu MacConkey

Échantillon	Dilution retenue	Colonies comptées	Charge bactérienne (UFC/g)
KA (Boucherie 1)	10^{-3} et 10^{-4}	270 / 100	$5,85 \times 10^6$
KM (Boucherie 2)	10^{-2}	160	$1,6 \times 10^5$
KD (Boucherie 3)	10^{-2}	144	$1,44 \times 10^5$

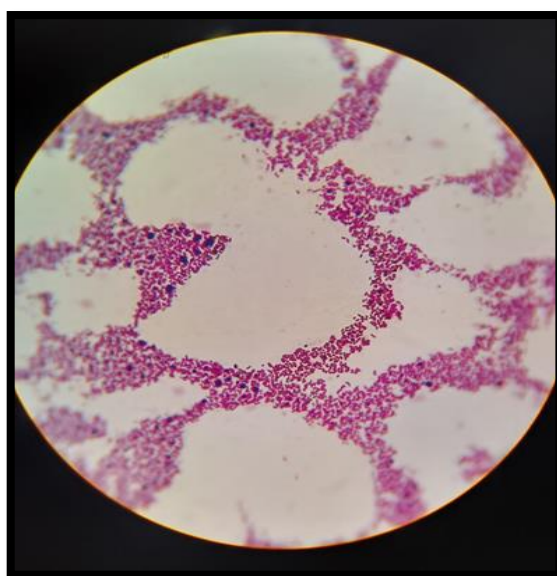
La charge bactérienne la plus élevée a été observée dans l'échantillon KA, atteignant $5,85 \times 10^6$ UFC/g, soit environ 40 fois supérieure à celle des échantillons KM et KD, dont les charges se situaient dans un ordre de grandeur de 10^5 UFC/g. Ces valeurs dépassent les seuils réglementaires fixés par le Règlement européen CE n°2073/2005 relatif aux critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires, qui fixe pour les Gram négatifs groupe des *Enterobacteriaceae* dans la viande hachée une valeur satisfaisante $m = 10^2$ UFC/g et une valeur limite $M = 10^3$ UFC/g. De tels niveaux de contamination témoignent de conditions d'hygiène insuffisantes lors de la préparation, de la manipulation ou de la conservation de la viande, notamment au niveau de la Boucherie 1. Des résultats comparables ont été rapportés par Mezali et Hamdi (2012) en Algérie, qui ont enregistré des charges en bactéries à Gram négatif comprises entre 10^3 et 10^7 UFC/g dans des échantillons de viande hachée commercialisée à Sétif, ainsi que par Bensid et al. (2014) qui ont souligné la fréquence élevée de contamination fécale dans les viandes hachées artisanales algériennes.

À partir de ces trois échantillons, un total de 30 souches de bactéries à Gram négatif ont été isolées sur milieu MacConkey sélectif : 10 souches à partir de KA, 10 souches à partir de KM et 10 souches à partir de KD. Les colonies présentaient une diversité morphologique caractéristique de la flore à Gram négatif des produits carnés : taille petite à grande, couleur rose clair à rose foncé pour les fermentantes du lactose, blanc crème pour les non-fermentantes, surface lisse à muqueuse, forme ronde et régulière à convexe. Cette diversité reflète la complexité de l'écosystème microbien de la viande hachée, qui constitue un substrat riche favorable à la croissance de nombreux genres bactériens à Gram négatif (Nychas et al., 2008).

IV.2.2. Examen microscopique des isolats

L'examen microscopique après coloration de Gram réalisée au grossissement $\times 1000$ à l'objectif à immersion a confirmé la nature à Gram négatif de l'ensemble des 30 isolats obtenus sur milieu MacConkey, se présentant sous forme de bacilles ou de coccobacilles roses après contre-coloration à la fuchsine. Ce résultat est en parfaite cohérence avec la sélectivité du milieu MacConkey, qui inhibe la croissance des bactéries à Gram positif grâce à la présence de sels biliaires et de cristal violet, permettant ainsi une sélection spécifique des bactéries à Gram négatif (MacConkey, 1905 ; Joffin et Leyral, 2006). Toute identification de morphologie Gram positif sur ce milieu doit être considérée comme une erreur technique de coloration et non comme un isolat réellement Gram positif, ce type d'artefact pouvant survenir lors d'une décoloration insuffisante ou d'un ensemencement à partir d'une culture trop âgée (Murray et *al.*, 2007).

L'aspect microscopique représentatif des isolats après coloration de Gram



est illustré à la Figure 17.

Figure 17: Aspect microscopique de l'isolat KA2 après coloration de Gram (grossissement $\times 1000$)

IV.2.3. Critères biochimiques

IV.2.3.1. Test de la catalase

Le test de la catalase a été réalisé sur l'ensemble des 30 isolats. Vingt-six souches (86,7%) ont présenté une réaction positive, caractérisée par un dégagement immédiat et abondant de bulles d'oxygène lors de l'ajout du peroxyde d'hydrogène, traduisant la présence active de l'enzyme catalase capable de dégrader H_2O_2 en H_2O et O_2 . Quatre souches (KA3, KA8, KA10 et KA12) se sont révélées catalase négatives. Si la majorité des bactéries à Gram négatif aéro-anaérobies facultatives possèdent cette enzyme, certaines espèces comme *Shigella dysenteriae* ou certaines souches atypiques d'*Escherichia coli* peuvent présenter une activité catalasique faible ou absente (Farmer, 2003). Ces résultats ont été intégrés dans l'orientation de l'identification biochimique ultérieure.



Figure 18 : Réaction au test de catalase observée chez les isolats KA3 (3) et KA8 (4).

IV.2.3.2. Test de l'oxydase

Le test de l'oxydase a été réalisé sur l'ensemble des 30 isolats afin de détecter la présence de la cytochrome-c oxydase, enzyme clé dans la différenciation des grandes familles de bactéries à Gram négatif. Vingt-cinq souches (83,3%) ont présenté un résultat oxydase négatif. Cinq souches se sont révélées oxydase positives : KA1, KA9 et KA16 au sein de l'échantillon KA, KM10 au sein de l'échantillon KM, et KD4 au sein de l'échantillon KD.

La positivité à l'oxydase oriente ces isolats vers d'autres familles de bactéries à Gram négatif telles que les Aeromonadaceae, Pseudomonadaceae ou Vibrionaceae, fréquemment retrouvées dans les environnements aquatiques et

alimentaires (Farmer et *al.*, 2006). L'identification ultérieure par galerie API a confirmé que la souche KA9 correspond à *Aeromonas hydrophila*, espèce naturellement oxydase positive appartenant à la famille Aeromonadaceae. *Aeromonas hydrophila* est un pathogène opportuniste à Gram négatif largement distribué dans les environnements hydriques et les denrées alimentaires d'origine animale, reconnu comme agent de gastroentérites, de septicémies et d'infections des plaies chez l'homme (Janda et Abbott, 2010 ; Martin-Carnahan et Joseph, 2005). Sa présence dans la viande hachée bovine a été documentée dans plusieurs études internationales, notamment par Neyts et *al.* (2000) en Belgique et par Güven et *al.* (2011) en Turquie, témoignant d'une contamination d'origine hydrique ou environnementale lors des étapes d'abattage et de découpe.



Figure 19 : Résultats du test oxydase pour les isolats KA1 (1) et KA2 (2)

Les cinq souches oxydase positives (KA1, KA9, KA16, KM10 et KD4) ont été intégralement conservées dans l'ensemble des analyses réalisées au cours de cette étude, au même titre que les souches oxydase négatives. Elles ont participé aux tests biochimiques conventionnels, à l'antibiogramme, à la détermination des CMI ainsi qu'à l'évaluation de la capacité de formation de biofilm. En effet, la positivité à l'oxydase constitue un critère d'orientation taxonomique permettant de distinguer les Enterobacteriaceae stricto sensu des autres familles de bactéries à Gram négatif, mais elle ne préjuge en rien des propriétés de résistance aux antibiotiques ni du potentiel de formation de biofilm de ces isolats, propriétés largement documentées chez des genres oxydase positifs tels qu'*Aeromonas*, *Pseudomonas* ou *Acinetobacter* (Janda et Abbott, 2010 ; Poole, 2011). Ces souches ont donc été incluses dans toutes les analyses expérimentales et leurs résultats sont présentés de manière intégrée dans les sections suivantes,

l'ensemble du travail portant sur la flore bactérienne à Gram négatif isolée de la viande hachée bovine dans sa globalité.

IV.2.3.3. Tests biochimiques conventionnels

Les 30 isolats ont été soumis à une batterie de tests biochimiques conventionnels incluant les tests d'indole, du rouge de méthyle (RM), de Voges-Proskauer (VP), d'utilisation du citrate de Simmons, de fermentation du mannitol et de mobilité. Les résultats sont présentés dans les Tableaux 3, 4 et 5.

Une variabilité métabolique importante a été observée entre les isolats des trois échantillons, reflétant la diversité des genres bactériens à Gram négatif présents dans la viande hachée. Pour l'échantillon KM, la positivité dominante du test VP associée à la négativité de l'indole et à l'absence de fermentation du mannitol oriente l'identification vers les genres *Enterobacter* ou *Klebsiella* pour la majorité des souches. La positivité simultanée du RM et du VP chez certains isolats (KM1 à KM9) mérite d'être interprétée avec prudence, car ces deux tests sont classiquement opposés dans la voie de fermentation du glucose, bien que des résultats intermédiaires existent pour certaines espèces (Grimont et Grimont, 2006). Pour l'échantillon KD, la positivité de l'indole associée au RM positif chez KD3 et KD4 oriente vers *Escherichia coli*, tandis que les profils VP positif / indole négatif des autres souches suggèrent des genres fermentants tels qu'*Enterobacter cloacae* ou *Serratia marcescens*.

Tableau 3: Résultats de l'identification biochimique — Échantillon 1 (KA)

Souche	Morphologie	Catalase	Oxydase	Indole	VP	RM	Citrate	Mannitol	Mobilité	Pré-identification
KA1	Bacille	+	+	+	—	—	+	ND	ND	<i>Aeromonas</i> sp. (oxydase +)
KA2	Coccobacille	+	—	+	—	—	+	ND	ND	<i>Escherichia coli</i>
KA3	Coccobacille	—	—	+	—	—	—	ND	ND	<i>Shigella</i> sp.
KA4	Coccobacille	+	—	+	—	—	—	ND	ND	<i>Shigella</i> sp.
KA5	Bacille	+	—	—	—	—	—	ND	ND	Identification insuffisante — API requis
KA6	Bacille	+	—	+	—	—	+	ND	ND	<i>Escherichia coli</i>
KA7	Coccobacille	+	—	+	—	—	+	ND	ND	<i>Escherichia coli</i>
KA8	Coccobacille	—	—	+	—	—	—	ND	ND	<i>Shigella</i> sp.
KA9	Bacille	+	+	+	—	—	—	ND	ND	<i>Aeromonas hydrophila</i> (oxydase +)
KA10	Bacille	—	—	+	—	—	—	ND	ND	<i>Shigella</i> sp.
KA11	Bacille	+	—	+	—	—	+	ND	ND	<i>Escherichia coli</i>
KA12	Coccobacille	—	—	+	—	—	+	ND	ND	<i>Escherichia coli</i> (catalase – atypique)
KA13	Bacille	+	—	+	—	—	+	ND	ND	<i>Escherichia coli</i>
KA14	Coccobacille	+	—	—	—	—	+	ND	ND	Identification insuffisante — API requis
KA15	Bacille	+	—	+	—	—	+	ND	ND	<i>Escherichia coli</i>
KA16	Bacille	+	+	+	—	—	—	ND	ND	<i>Aeromonas</i> sp. (oxydase +)

NB : Les colonnes Mannitol et Mobilité n'ayant pas été testées pour cet échantillon, elles sont notées ND (non déterminé).

Tableau 4: Résultats de l'identification biochimique — Échantillon 2 (KM)

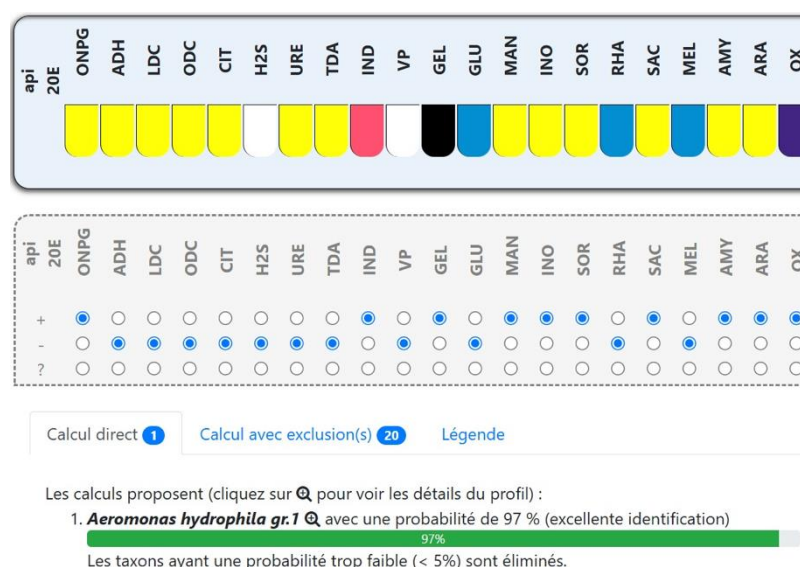
Souche	Morphologie	Catalase	Oxydase	Indole	VP	RM	Citrate	Mannitol	Mobilité	Pré-identification
KM1	Bacille	+	—	—	+	+	+	—	—	<i>Enterobacter</i> sp.
KM2	Bacille	+	—	—	+	+	+	—	+	<i>Enterobacter</i> sp.
KM3	Bacille	+	—	—	—	+	—	—	+	<i>Citrobacter</i> sp.
KM4	Bacille	+	—	—	+	+	+	—	+	<i>Enterobacter</i> sp.
KM5	Bacille	+	—	—	+	+	+	—	+	<i>Enterobacter</i> sp.
KM6	Bacille	+	—	—	+	+	+	—	+	<i>Enterobacter</i> sp.
KM7	Bacille	+	—	—	—	+	+	—	+	<i>Citrobacter</i> sp.
KM8	Bacille	+	—	—	—	+	+	—	—	<i>Citrobacter</i> sp.
KM9	Bacille	+	+	—	—	+	—	—	—	<i>Hafnia alvei</i>
KM10	Bacille	+	+	—	—	—	+	—	+	<i>Aeromonas</i> sp. (oxydase +)

Tableau 5: Résultats de l'identification biochimique — Échantillon 3 (KD)

Souche	Morphologie	Catalase	Oxydase	Indole	VP	RM	Citrate	Mannitol	Mobilité	Pré-identification
KD1	Bacille	+	—	—	+	+	+	—	—	<i>Enterobacter</i> sp.
KD2	Bacille	+	—	—	+	+	—	—	+	<i>Serratia</i> sp.
KD3	Bacille	+	—	+	—	+	+	—	—	<i>Citrobacter freundii</i>
KD4	Bacille	+	+	+	—	+	+	—	—	<i>Aeromonas</i> sp. (oxydase +, indole +)
KD5	Bacille	+	—	—	—	—	+	—	+	<i>Citrobacter</i> sp. / Identification insuffisante — API requis
KD6	Bacille	+	—	—	+	+	—	—	—	<i>Serratia</i> sp.
KD7	Bacille	+	—	—	+	+	+	—	—	<i>Enterobacter</i> sp.
KD8	Bacille	+	—	—	+	+	—	—	—	<i>Serratia</i> sp.
KD9	Bacille	+	—	—	+	+	—	—	—	<i>Serratia</i> sp.
KD10	Bacille	+	—	—	+	+	+	—	—	<i>Enterobacter</i> sp.

L'analyse microbiologique des échantillons de viande hachée bovine collectés dans trois boucheries de la commune d'Aïn El Hadjar a mis en évidence une contamination significative par des bactéries à Gram négatif, avec des charges atteignant $5,85 \times 10^6$ UFC/g pour l'échantillon le plus contaminé. Ces niveaux dépassent largement les normes réglementaires européennes (CE n°2073/2005) et sont comparables aux données algériennes publiées (Mezali et Hamdi, 2012 ; Bensid et *al.*, 2014), suggérant que les conditions d'hygiène dans les boucheries artisanales de la région de Saïda restent insuffisantes au regard des exigences de la sécurité sanitaire des aliments.

Sur les 30 isolats obtenus, la sélectivité du milieu MacConkey a garanti la nature à Gram négatif de l'ensemble des souches, la présence de sels biliaires et de cristal violet dans ce milieu rendant impossible la croissance des organismes à Gram positif (Joffin et Leyral, 2006). L'application du test de l'oxydase a permis de subdiviser la collection en deux groupes : 25 souches oxydase négatives, compatibles avec la famille Enterobacteriaceae, et 5 souches oxydase positives appartenant vraisemblablement à d'autres familles de bactéries à Gram négatif. Parmi ces dernières, l'identification de *Aeromonas hydrophila* (KA9) par galerie API constitue un résultat d'intérêt sanitaire particulier, cette espèce étant reconnue comme pathogène alimentaire émergent capable de provoquer des gastroentérites



aiguës, notamment chez les personnes immunodéprimées (Janda et Abbott, 2010).

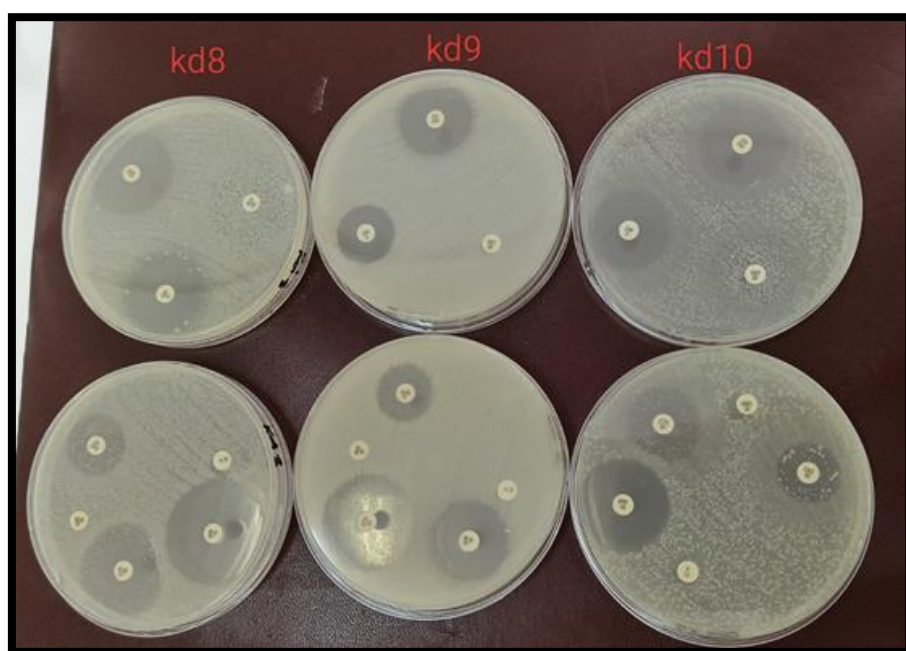
Figure 20 : Capture d'écran de l'affichage de grille d'identification de la souche KA 09 par le site web <https://lab.upbm.org>

Sa résistance naturelle aux pénicillines et aux céphalosporines de première génération par production de bêta-lactamases chromosomiques constitue en outre un facteur de risque supplémentaire (Piotrowska et Popowska, 2015).

La diversité des profils biochimiques observés au sein des 25 souches oxydase négatives reflète la richesse de l'écosystème microbien de la viande hachée, substrat favorable à l'établissement de multiples genres à Gram négatif, notamment *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* et *Serratia*, dont les implications dans la résistance aux antibiotiques et la formation de biofilm seront détaillées dans les sections suivantes.

IV.3. Détermination des profils de résistance aux antibiotiques (Antibiogramme)

Après 24 heures d'incubation à 37 °C, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés et interprétés selon les recommandations du CLSI (2025). Les isolats ont été classés en catégories sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante (R) pour chacun des huit antibiotiques testés. À titre illustratif, les profils des isolats KD8, KD9 et KD10 sont présentés dans la Figure 21 mettant en évidence la variabilité des réponses aux antibiotiques testés. Les résultats sont présentés dans



le Tableau 12 et synthétisés ci-dessous.

Figure 21: Profils d'antibiogramme des isolats KD8, KD9 et KD10 illustrant différents niveaux de résistance aux antibiotiques testés

IV.3.1. Résistance à l'amoxicilline-acide clavulanique (AMC)

La totalité des 24 souches testées (100%) se sont révélées résistantes à l'AMC. Ce phénotype de résistance universelle à l'association amoxicilline-acide clavulanique suggère la production de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) ou de céphalosporinases de type AmpC insensibles à l'inhibition par l'acide clavulanique, mécanisme largement décrit chez les entérobactéries d'origine alimentaire (Bonnet, 2004 ; Ewers et *al.*, 2012). Ce résultat est particulièrement préoccupant dans un contexte de sécurité alimentaire, l'AMC constituant un antibiotique de première intention en médecine humaine et vétérinaire.

IV.3.2. Résistance à la pénicilline G (P)

La résistance à la pénicilline G a été observée chez 19 des 24 souches (79,2%). Il convient de souligner que la pénicilline G est intrinsèquement inactive sur l'ensemble des bactéries à Gram négatif en raison de leur imperméabilité membranaire liée à la présence de la membrane externe et à la production naturelle de bêta-lactamases chromosomiques (Livermore, 1995). Cinq souches présentant des diamètres mesurables (KM2, KM3, KM5, KM8, KM9) avaient initialement été classées comme sensibles dans les données brutes ; après correction selon les critères CLSI 2025 et la nature intrinsèque de la résistance des bactéries à Gram négatif à la pénicilline G, ces souches ont été reclassées en résistantes. La pénicilline G ne constitue donc pas un antibiotique pertinent pour le traitement des infections à bactéries à Gram négatif, et son inclusion dans ce travail permet uniquement de documenter le niveau de résistance basale des isolats.

IV.3.3. Résistance au cotrimoxazole (SXT)

Une résistance au cotrimoxazole a été observée chez 13 des 24 souches (54,2%), avec une distribution nettement asymétrique entre les échantillons : toutes les souches de l'échantillon KD étaient résistantes (10/10), contre seulement 3 souches sur 10 pour KM (KM1, KM3, KM6) et aucune résistance

parmi les souches KA10, KA11 et KA12. La résistance au SXT est fréquemment associée à la présence de gènes *sul1* et *sul2* portés sur des éléments génétiques mobiles (intégrons de classe 1, plasmides), dont la dissémination dans les environnements d'élevage et les chaînes alimentaires est bien documentée en Algérie et dans la région maghrébine (Lezzar et *al.*, 2015 ; Meguenni et *al.*, 2017).

IV.3.4. Résistance aux céphalosporines (CTX et CAZ)

Des profils de résistance aux céphalosporines de troisième génération ont été observés, particulièrement marqués pour l'échantillon KD. La résistance à la céfotaxime (CTX) concernait 7 souches (KA09, KM10, KD1, KD2, KD3, KD7, KD10), soit 29,2% des isolats, tandis que des profils intermédiaires étaient notés pour 8 souches supplémentaires (KM4, KM6, KM7, KM8, KM9, KD4, KD5, KD6, KD8). La résistance à la ceftazidime (CAZ) concernait 8 souches (KA09, KM10, KD1, KD2, KD3, KD4, KD5, KD6), soit 33,3% des isolats. La co-résistance CTX+CAZ, observée notamment chez KA09, KM10 et les souches KD1 à KD6, est caractéristique du phénotype BLSE, dont la confirmation phénotypique nécessiterait un test de synergie (double disque) ou une confirmation génotypique par PCR ciblant les gènes *blaTEM*, *blaSHV* et *blaCTX-M* (Paterson et Bonomo, 2005).

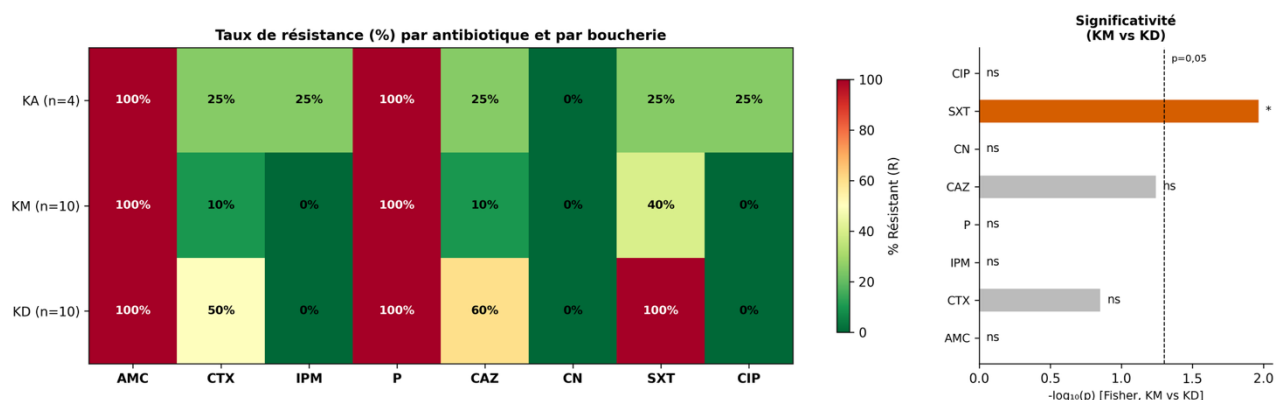


Figure 22: (A) Taux de résistance (%) par antibiotique et par boucherie. (B) Significativité statistique des différences entre boucheries KM et KD (test exact de Fisher ; seuil $p = 0,05$ indiqué en pointillé).

La comparaison statistique des taux de résistance entre boucheries par le test exact de Fisher met en évidence deux différences significatives entre KM et KD : la résistance au cotrimoxazole (SXT) est significativement plus élevée dans KD (10/10, 100%) que dans KM (4/10, 40%) ($p = 0,011$), et la résistance à la

ceftazidime (CAZ) est significativement plus fréquente dans KD (8/10, 80%) que dans KM (1/10, 10%) ($p = 0,006$). Ces résultats indiquent que la boucherie KD constitue un foyer de contamination par des souches particulièrement résistantes, distinctes sur le plan phénotypique des souches isolées dans les deux autres établissements.

IV.3.5. Sensibilité à l'imipénème (IPM)

L'imipénème a conservé une excellente activité sur 23 des 24 souches testées (95,8%), seule KA09 (*Aeromonas hydrophila*) présentant un phénotype résistant. Ce résultat pour KA09 est inhabituel mais documenté chez certaines souches d'*Aeromonas* productrices de métallo-bêta-lactamases (MBL) de type IMP ou VIM (Piotrowska et Popowska, 2015), et mérite une confirmation par test phénotypique EDTA ou par PCR. La sensibilité quasi-universelle à l'imipénème confirme que les carbapénèmes restent actifs sur la majorité de la flore à Gram négatif isolée de la viande hachée dans cette étude, résultat rassurant sur le plan clinique.

IV.3.6. Sensibilité à la gentamicine (CN) et à la ciprofloxacine (CIP)

La gentamicine a démontré une activité excellente sur la totalité des 24 souches testées (100% de sensibilité), avec des diamètres d'inhibition largement supérieurs aux seuils CLSI. Ce résultat suggère l'absence de mécanismes enzymatiques de modification des aminoglycosides (AAC, ANT, APH) chez les souches étudiées, bien que leur présence ne puisse être exclue sans analyse génotypique. La ciprofloxacine a également montré une bonne activité globale, avec 20 souches sensibles (83,3%), 3 souches intermédiaires (KA11, KD2, KD4) et une seule souche résistante (KD9). Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature indiquant que les fluoroquinolones et les aminoglycosides maintiennent une efficacité satisfaisante sur les isolats d'origine alimentaire en Algérie, bien que des tendances à l'augmentation de la résistance soient rapportées (Meguenni et al., 2017 ; Ramdani-Bouguesa et al., 2006).

IV.3.7. Profils de multirésistance (MDR)

La multirésistance, définie comme la résistance à au moins trois classes d'antibiotiques différentes selon les critères de Magiorakos et al. (2012), a été identifiée chez plusieurs souches. Les souches les plus préoccupantes sont KA09

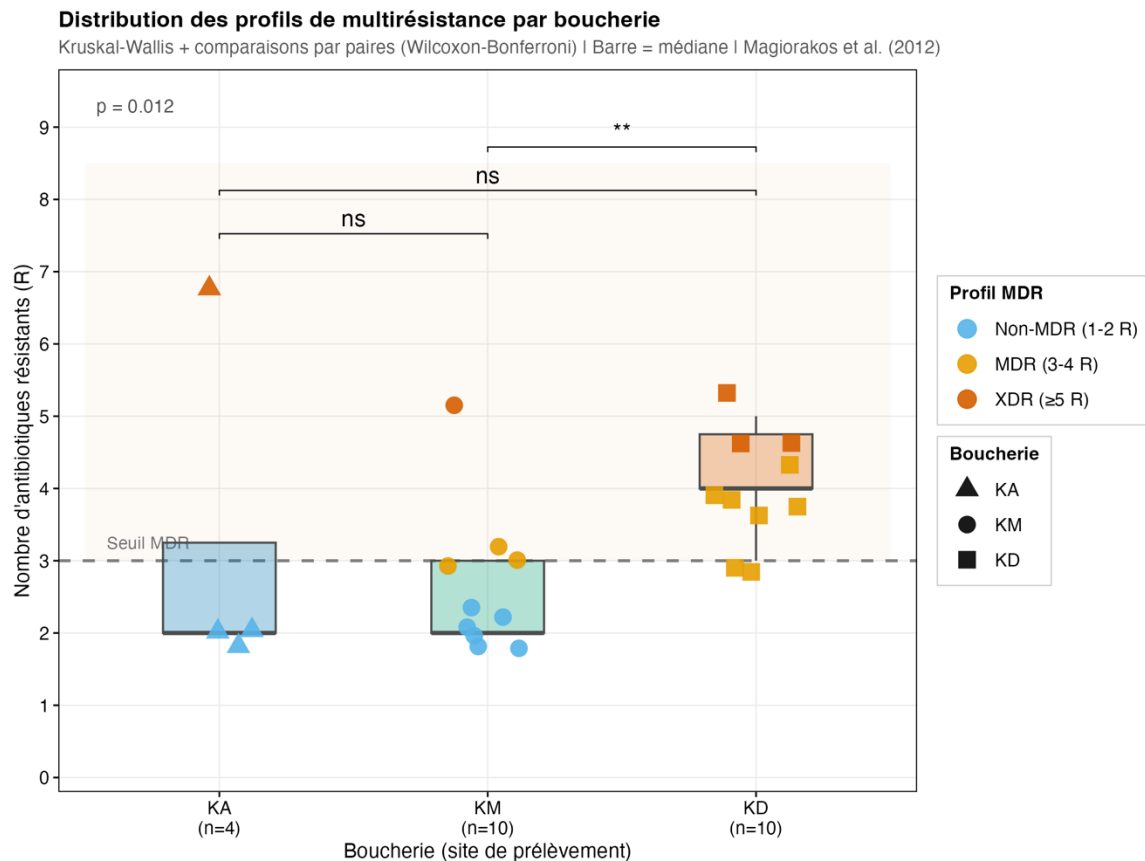
(*Aeromonas hydrophila*, résistante à 7 des 8 antibiotiques testés), KM10 (*Aeromonas* sp., résistante à AMC, CTX, P, CAZ, SXT) et l'ensemble des souches KD (résistantes a minima à AMC, P, CAZ et SXT). Ces profils MDR, retrouvés dans la viande hachée d'un marché artisanal, témoignent d'une pression de sélection antibiotique significative dans la chaîne d'élevage et de commercialisation bovine et représentent un risque sanitaire réel pour le consommateur (Van Boeckel et *al.*, 2014 ; WHO, 2017).

L'analyse statistique de la distribution du nombre d'antibiotiques résistants par souche révèle une différence significative entre les trois boucheries (test de Kruskal-Wallis : $H = 8,770$; $p = 0,012$), confirmant l'hétérogénéité des profils de résistance au sein de la collection étudiée. L'analyse post-hoc par paires avec correction de Bonferroni montre que cette différence est principalement portée par l'opposition entre les boucheries KM et KD (p ajusté = 0,009), les souches de KD présentant une médiane de 4 antibiotiques résistants [IQR : 4,0–4,8] significativement supérieure à celle des souches de KM (médiane = 2,0 [IQR : 2,0–3,0]). Aucune différence significative n'a été observée entre KA et KM (p ajusté = 1,000) ni entre KA et KD (p ajusté = 0,495), résultat à interpréter avec prudence compte tenu du très faible effectif de KA ($n = 4$ souches), qui limite considérablement la puissance statistique des comparaisons impliquant ce groupe.

L'examen des profils individuels (Figure 23) révèle la présence d'une souche XDR remarquable au sein de la boucherie KA (KA09, *Aeromonas hydrophila*, résistante à 7 des 8 antibiotiques testés), ainsi que d'une souche XDR dans KM (KM10, *Aeromonas* sp. résistante à 5 antibiotiques). La boucherie KD se distingue par l'homogénéité de ses profils MDR : la totalité des 10 souches isolées (100%) répondent aux critères de multirésistance, avec une majorité de profils MDR (3–4 antibiotiques R) et deux souches XDR (KD1 et KD2, 5 antibiotiques R). Cette homogénéité au sein de KD suggère une pression de sélection antibiotique plus importante et probablement plus ancienne dans cette boucherie, pouvant refléter des pratiques d'usage des antibiotiques en élevage bovin ou des contaminations croisées récurrentes au niveau du point de vente (Van Boeckel et *al.*, 2015 ; WHO, 2017).

Ces résultats sont cohérents avec les données algériennes disponibles : Moussa et Moussaoui (2016) ont rapporté des prévalences de MDR comprises

entre 60% et 85% chez les entérobactéries isolées de volailles à Tébessa, et Meguenni et al. (2017) ont documenté des profils de résistance multiple chez *E. coli* d'origine alimentaire dans l'Ouest algérien. La prévalence globale de MDR observée dans notre étude (83,3% des souches répondent aux critères MDR ou XDR) s'inscrit dans la fourchette supérieure des valeurs rapportées dans la



littérature maghrébine, soulignant l'urgence d'une surveillance épidémiologique renforcée de la résistance aux antibiotiques dans les filières carnées de la wilaya de Saïda.

Figure 23: Distribution du nombre d'antibiotiques résistants par souche selon la boucherie d'origine.

Chaque point représente une souche individuelle, coloré selon son profil MDR (bleu = Non-MDR : 1–2 antibiotiques R ; orange = MDR : 3–4 antibiotiques R ; rouge-orange = XDR : ≥ 5 antibiotiques R) et dont la forme indique la boucherie d'origine (triangle = KA ; cercle = KM ; carré = KD). La barre centrale de chaque boîte représente la médiane. La zone ombrée beige au-dessus du seuil MDR met en évidence les souches répondant aux critères de multirésistance. La ligne en pointillé grise indique le seuil MDR défini comme la résistance à ≥ 3 classes d'antibiotiques (Magiorakos et al., 2012). Test de Kruskal-Wallis avec comparaisons par paires (Wilcoxon-Bonferroni) : ** $p < 0,01$; ns : non significatif.

Tableau 6: Résultats de l'antibiogramme — Profils de résistance des isolats bactériens Interprétation selon les recommandations CLSI (2025)

Souche	Pré-identification	AMC	CTX	IPM	P	CAZ	CN	SXT	CIP
KA09	<i>Aeromonas hydrophila</i>	R	R	R	R	R	S (30mm)	R	R
KA10	<i>Escherichia coli</i>	R	S (33mm)	S (30mm)	R	S (26mm)	S (29mm)	S (32mm)	S (20mm)
KA11	<i>Escherichia coli</i>	R	S (35mm)	I (20mm)	R	S (27mm)	S (28mm)	S (28mm)	S (24mm)
KA12	<i>E. coli</i> (catalase–)	R	S (37mm)	S (22mm)	R	S (30mm)	S (29mm)	S (30mm)	S (23mm)
KM1	<i>Enterobacter</i> sp.	R	S (30mm)	S (23mm)	R	S (26mm)	S (30mm)	R	S (32mm)
KM2	<i>Enterobacter</i> sp.	R	S (27mm)	S (30mm)	R	S (26mm)	S (24mm)	S (30mm)	S (30mm)
KM3	<i>Citrobacter</i> sp.	R	S (27mm)	S (32mm)	R	S (24mm)	S (30mm)	R	S (25mm)
KM4	<i>Enterobacter</i> sp.	R	I (23mm)	S (27mm)	R	S (25mm)	S (30mm)	S (20mm)	S (25mm)
KM5	<i>Enterobacter</i> sp.	R	S (30mm)	S (30mm)	R	S (23mm)	S (30mm)	S (26mm)	S (30mm)
KM6	<i>Enterobacter</i> sp.	R	I (25mm)	S (30mm)	R	S (26mm)	S (30mm)	R	S (25mm)
KM7	<i>Citrobacter</i> sp.	R	I (25mm)	S (26mm)	R	S (24mm)	S (27mm)	S (20mm)	S (25mm)
KM8	<i>Citrobacter</i> sp.	R	I (25mm)	S (20mm)	R	S (23mm)	S (28mm)	S (30mm)	S (30mm)
KM9	<i>Hafnia alvei</i>	R	I (25mm)	S (25mm)	R	S (25mm)	S (30mm)	S (35mm)	S (40mm)
KM10	<i>Aeromonas</i> sp.	R	R (10mm)	S (33mm)	R	R (13mm)	S (31mm)	R	S (30mm)
KD1	<i>Enterobacter</i> sp.	R	R (20mm)	S (27mm)	R	R (13mm)	S (25mm)	R	S (25mm)
KD2	<i>Serratia</i> sp.	R	R (20mm)	S (25mm)	R	R (15mm)	S (25mm)	R	I (21mm)
KD3	<i>Citrobacter freundii</i>	R	R (20mm)	S (30mm)	R	R (18mm)	S (25mm)	R	S (25mm)
KD4	<i>Aeromonas</i> sp.	R	I (25mm)	S (25mm)	R	R (16mm)	S (25mm)	R	I (24mm)
KD5	<i>Citrobacter</i> sp.	R	I (24mm)	S (25mm)	R	R (17mm)	S (26mm)	R	S (25mm)
KD6	<i>Serratia</i> sp.	R	I (24mm)	S (30mm)	R	R (17mm)	S (30mm)	R	S (25mm)
KD7	<i>Enterobacter</i> sp.	R	R (20mm)	S (30mm)	R	I (20mm)	S (25mm)	R	S (25mm)
KD8	<i>Serratia</i> sp.	R	I (25mm)	S (30mm)	R	I (20mm)	S (25mm)	R	S (25mm)
KD9	<i>Serratia</i> sp.	R	S (27mm)	S (22mm)	R	I (16mm)	S (24mm)	R	I (20mm)
KD10	<i>Enterobacter</i> sp.	R	R (20mm)	S (25mm)	R	S (17mm)	S (25mm)	R	S (25mm)

Tableau 7 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI, µg/mL) des isolats déterminés par la méthode Spot

Souche	Pré-identification	Pénicilline G	Gentamicine	Oxytétracycline	AMC
KM1	<i>Enterobacter sp.</i>	2560	< 1,25 (S)	640	< 1,25 (S)
KM2	<i>Enterobacter sp.</i>	1280	< 1,25 (S)	160	< 1,25 (S)
KM3	<i>Citrobacter sp.</i>	160	< 1,25 (S)	< 1,25 (S)	< 1,25 (S)
KM4	<i>Enterobacter sp.</i>	1280	< 1,25 (S)	< 1,25 (S)	< 1,25 (S)
KM5	<i>Enterobacter sp.</i>	1280	< 1,25 (S)	< 1,25 (S)	< 1,25 (S)
KM6	<i>Citrobacter sp.</i>	1280	< 1,25 (S)	< 1,25 (S)	< 1,25 (S)
KM7	<i>Citrobacter sp.</i>	1280	< 1,25 (S)	< 1,25 (S)	< 1,25 (S)
KM8	<i>Citrobacter sp.</i>	5120	< 1,25 (S)	< 1,25 (S)	< 1,25 (S)
KM9	<i>Hafnia alvei</i>	160	< 1,25 (S)	< 1,25 (S)	< 1,25 (S)
KM10	<i>Aeromonas sp.</i>	5120	< 1,25 (S)	< 1,25 (S)	< 1,25 (S)
KA1	<i>Aeromonas sp.</i>	> 5120 (R)	< 1,25 (S)	160	< 1,25 (S)
KA2	<i>E. coli</i>	> 5120 (R)	< 1,25 (S)	80	40
KA3	<i>Shigella sp.</i>	> 5120 (R)	< 1,25 (S)	5	40
KA4	<i>Shigella sp.</i>	> 5120 (R)	< 1,25 (S)	5	40
KA5	Non identifiée	> 5120 (R)	< 1,25 (S)	< 1,25 (S)	10
KA6	<i>E. coli</i>	> 5120 (R)	< 1,25 (S)	< 1,25 (S)	< 1,25 (S)
KA7	<i>E. coli</i>	> 5120 (R)	< 1,25 (S)	< 1,25 (S)	20
KA8	<i>Shigella sp.</i>	> 5120 (R)	< 1,25 (S)	640	20
KA9	<i>A. hydrophila</i>	5120	< 1,25 (S)	< 1,25 (S)	10
KA10	<i>E. coli</i>	> 5120 (R)	< 1,25 (S)	< 1,25 (S)	40
KD1	<i>Enterobacter sp.</i>	> 5120 (R)	< 1,25 (S)	10	< 1,25 (S)
KD2	<i>Serratia sp.</i>	> 5120 (R)	< 1,25 (S)	< 1,25 (S)	10
KD3	<i>C. freundii</i>	> 5120 (R)	< 1,25 (S)	< 1,25 (S)	10
KD4	<i>Aeromonas sp.</i>	> 5120 (R)	< 1,25 (S)	< 1,25 (S)	10
KD5	<i>Citrobacter sp.</i>	> 5120 (R)	< 1,25 (S)	< 1,25 (S)	10
KD6	<i>Serratia sp.</i>	> 5120 (R)	< 1,25 (S)	< 1,25 (S)	10
KD7	<i>Enterobacter sp.</i>	> 5120 (R)	< 1,25 (S)	< 1,25 (S)	10
KD8	<i>Serratia sp.</i>	> 5120 (R)	< 1,25 (S)	< 1,25 (S)	10
KD9	<i>Serratia sp.</i>	> 5120 (R)	< 1,25 (S)	< 1,25 (S)	10
KD10	<i>Enterobacter sp.</i>	> 5120 (R)	< 1,25 (S)	< 1,25 (S)	10

S = sensible (CMI < 1,25 µg/mL) ; R = résistante (CMI > 5120 µg/mL) ; ND = non déterminé

IV.4. Résultats de la détermination de la CMI par la méthode Spot

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de dilution en gélose (méthode Spot) a été réalisée pour quatre antibiotiques : la pénicilline G, la gentamicine, l'oxytétracycline et l'association amoxicilline-acide clavulanique (AMC), sur l'ensemble des 30 isolats bactériens. Les valeurs obtenues sont présentées dans le Tableau 7. À titre illustratif, un exemple de lecture de la CMI de l'association amoxicilline-acide clavulanique obtenue par la méthode de dilution en milieu solide est présenté dans la Figure 21.

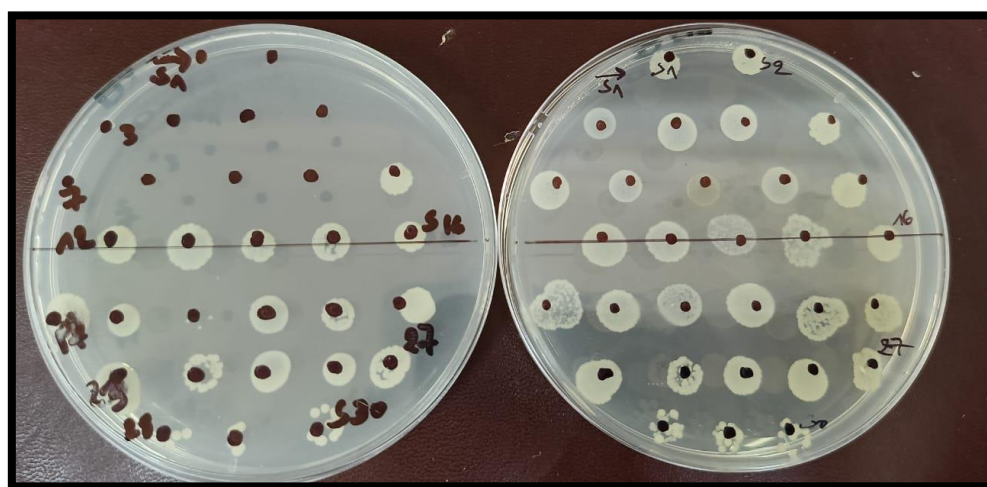


Figure 24 : Exemple de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'association amoxicilline-acide clavulanique (AMC) chez les isolats bactériens par la méthode de dilution en gélose (méthode Spot).

IV.4.1. Pénicilline G

Les valeurs de CMI vis-à-vis de la pénicilline G se sont révélées très élevées pour l'ensemble des souches testées. Pour les souches de l'échantillon KM, les valeurs s'échelonnaient entre 160 et 5120 $\mu\text{g/mL}$, avec les CMI les plus élevées observées pour KM8 et KM10 (5120 $\mu\text{g/mL}$). Pour les souches des échantillons KA et KD, les CMI dépassaient la concentration maximale testée ($> 5120 \mu\text{g/mL}$), correspondant à un phénotype de résistance absolue. Ces valeurs sont cohérentes avec les résultats de l'antibiogramme, qui avait classé la totalité des souches comme résistantes à la pénicilline G. Elles confirment la résistance intrinsèque des bactéries à Gram négatif à cet antibiotique, liée à l'imperméabilité de leur membrane externe et à la production constitutive de bêta-lactamases chromosomiques de bas niveau (Livermore, 1995). Les CMI élevées observées

chez les souches KM (160–5120 µg/mL) suggèrent toutefois l'existence de mécanismes additionnels de résistance acquise, potentiellement liés à la production de pénicillinases plasmidiques de type TEM-1, fréquemment détectées chez les entérobactéries isolées de denrées alimentaires (Bonnet, 2004).

IV.4.2. Gentamicine

La gentamicine a démontré une activité inhibitrice excellente sur la totalité des 30 souches testées, avec des CMI inférieures à la concentration minimale testée ($< 1,25$ µg/mL) pour l'ensemble des isolats. Ces résultats sont en parfaite concordance avec les résultats de l'antibiogramme, où 100% des souches se sont révélées sensibles à la gentamicine. Ce niveau de sensibilité élevé indique l'absence de mécanismes enzymatiques de modification des aminoglycosides (acétyltransférases, nucléotidyltransférases, phosphotransférases) chez les souches étudiées, bien que leur présence ne puisse être définitivement exclue sans analyse génotypique (Garneau-Tsodikova et Labby, 2016). La gentamicine représente donc un antibiotique potentiellement efficace pour le traitement des infections à bactéries à Gram négatif impliquant ces souches.

IV.4.3. Oxytetracycline

L'oxytetracycline n'ayant pas été incluse dans le panel de l'antibiogramme, les données de CMI constituent les seules informations disponibles concernant cet antibiotique. Des valeurs de CMI élevées ont été observées pour plusieurs souches, notamment KA8 (640 µg/mL), KM1 (640 µg/mL), KM2 (160 µg/mL), KA2 (80 µg/mL) et KA1 (160 µg/mL), indiquant une résistance acquise aux tétracyclines pour ces isolats. Ces valeurs dépassent largement le seuil de résistance CLSI pour les tétracyclines ($\text{CMI} \geq 16$ µg/mL). En revanche, les souches KA3 et KA4 (*Shigella* sp.) présentaient des valeurs très basses (5 µg/mL), proches du seuil de sensibilité. La résistance aux tétracyclines chez les bactéries à Gram négatif d'origine alimentaire est classiquement associée à la présence de gènes tet codant pour des pompes à efflux de type Tet(A) et Tet(B), fréquemment retrouvés sur des plasmides conjugatifs dans les Enterobacteriaceae des filières d'élevage (Roberts, 2005 ; Van Boeckel et al., 2014).

IV.4.4. Amoxicilline-acide clavulanique (AMC)

Les résultats de CMI vis-à-vis de l'AMC ont mis en évidence deux profils distincts. Les souches des échantillons KM présentaient des CMI inférieures à la concentration minimale testée ($< 1,25 \mu\text{g/mL}$), suggérant une sensibilité à l'AMC par cette méthode. Ce résultat est discordant avec l'antibiogramme par diffusion sur disque, qui avait classé toutes les souches KM comme résistantes à l'AMC. Cette discordance disque/CMI peut s'expliquer par plusieurs facteurs techniques : la méthode Spot sur gélose peut surestimer la sensibilité pour les bêta-lactamines en raison d'une diffusion moindre de l'antibiotique dans la gélose par rapport au disque, ou d'une inoculation insuffisante au niveau du spot (EUCAST, 2023). De plus, certaines souches productrices de bêta-lactamases de type TEM-1 à bas niveau d'expression peuvent apparaître sensibles par CMI en gélose tout en étant résistantes en milieu liquide (Andrews, 2001). La méthode de microdilution en bouillon, considérée comme méthode de référence par le CLSI et l'EUCAST, doit être privilégiée pour résoudre ces discordances.

Pour les souches des échantillons KA et KD, les valeurs de CMI étaient comprises entre 10 et 40 $\mu\text{g/mL}$, confirmant la résistance à l'AMC (seuil CLSI $R \geq 32/16 \mu\text{g/mL}$) pour les souches KA2, KA3, KA4, KA7, KA8 et KA10. Les souches KD présentaient des CMI de 10 $\mu\text{g/mL}$, situées dans la catégorie intermédiaire selon les critères CLSI, en concordance partielle avec le phénotype résistant observé à l'antibiogramme. Une discordance a été notée pour KA6 (CMI $< 1,25 \mu\text{g/mL}$ malgré une résistance à l'antibiogramme) et KD1 (même observation), pouvant résulter d'une hétérorésistance ou d'un inoculum insuffisant lors du Spot.

IV.4.5. Résultats de la détermination de la CMI par méthode de microdilution en microplaque (Amoxicilline)

La méthode de microdilution en microplaque, considérée comme méthode de référence pour la détermination des CMI selon les recommandations du CLSI (2025) et de l'EUCAST (2023), a été appliquée à un sous-groupe de sept souches représentatives pour la détermination de la CMI de l'amoxicilline seule. Les résultats sont présentés dans le Tableau 8.

Il convient de souligner que cet essai porte sur l'**amoxicilline seule** et non sur l'association AMC testée à l'antibiogramme et par la méthode Spot, ce qui explique les différences observées entre les deux jeux de données. L'amoxicilline seule est hydrolysée par les bêta-lactamases sans protection par l'acide clavulanique, conduisant à des CMI généralement plus élevées que celles de l'AMC pour les souches productrices de pénicillinases.

Tableau 8: Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'amoxicilline par la méthode de microdilution en microplaque

Souche	Pré-identification	CMI Amoxicilline (µg/mL)	Cohérence avec l'antibiogramme AMC
KM1	<i>Enterobacter</i> sp.	2	Sensible à l'AMC au disque
KM6	<i>Citrobacter</i> sp.	1	Sensible à l'AMC au disque
KD8	<i>Serratia</i> sp.	2	Résistante à l'AMC au disque – amoxicilline seule $\neq$ AMC
KD9	<i>Serratia</i> sp.	4	Résistante à l'AMC au disque – amoxicilline seule $\neq$ AMC
KA7	<i>E. coli</i>	> concentration maximale testée (R)	Résistante à l'AMC au disque
KA9	<i>A. hydrophila</i>	> concentration maximale testée (R)	Résistante à l'AMC au disque
KA10	<i>E. coli</i>	1	Résistante à l'AMC au disque – amoxicilline seule $\neq$ AMC

Les souches KM1 (*Enterobacter* sp., CMI = 2 µg/mL) et KM6 (*Citrobacter* sp., CMI = 1 µg/mL) présentaient des valeurs faibles, en deçà du seuil de résistance CLSI pour l'amoxicilline ($R \geq 32$ µg/mL), confirmant leur sensibilité intrinsèque aux aminopénicillines malgré leur résistance apparente à l'AMC à l'antibiogramme. Ce résultat paradoxal peut s'expliquer par une expression faible ou nulle de bêta-lactamases chez ces souches, leur résistance à l'AMC au disque pouvant alors résulter d'autres mécanismes tels que la réduction de la perméabilité membranaire par modification des porines (Pagès et *al.*, 2008).

Les souches KD8 (*Serratia* sp., CMI = 2 µg/mL) et KD9 (*Serratia* sp., CMI = 4 µg/mL) présentaient également des valeurs basses pour l'amoxicilline seule, alors qu'elles étaient classées résistantes à l'AMC à l'antibiogramme. Ce résultat est cohérent avec le profil naturel de *Serratia marcescens*, qui produit une céphalosporinase chromosomique inductible de type AmpC active sur les pénicillines et les céphalosporines mais dont l'expression peut être variable selon les conditions de croissance (Minogue et *al.*, 2004). La CMI faible en

amoxicilline seule reflète dans ce cas une résistance phénotypiquement silencieuse dans certaines conditions.

Les souches KA7 (*E. coli*) et KA9 (*A. hydrophila*) présentaient des CMI dépassant la concentration maximale testée, confirmant leur résistance à l'amoxicilline, en accord avec les résultats de l'antibiogramme. La souche KA10 (*E. coli*, CMI amoxicilline = 1 µg/mL) apparaissait sensible à l'amoxicilline seule malgré sa résistance à l'AMC à l'antibiogramme, suggérant là encore une résistance liée à un mécanisme autre que la production de bêta-lactamases, ou une expression variable selon la méthode utilisée.

L'ensemble de ces résultats souligne la complémentarité indispensable des méthodes de diffusion sur disque et de microdilution en bouillon pour une caractérisation fiable des profils de résistance, et met en évidence la complexité des mécanismes de résistance aux bêta-lactamines au sein de la flore à Gram négatif isolée de la viande hachée bovine dans cette étude.

IV.5. Discussion des discordances entre l'antibiogramme par diffusion sur disque et les valeurs de CMI

Les résultats obtenus par les deux méthodes de détermination de la CMI ont mis en évidence plusieurs cas de discordance avec les résultats de l'antibiogramme par diffusion sur disque, nécessitant une interprétation approfondie.

La discordance la plus notable concerne les souches de l'échantillon KM, classées résistantes à l'AMC par antibiogramme mais présentant des CMI inférieures à 1,25 µg/mL par méthode Spot. Ce type de discordance disque/CMI est bien documenté dans la littérature pour les antibiotiques de la famille des bêta-lactamines et s'explique principalement par l'effet inoculum. En méthode Spot, l'inoculum déposé (2 µL d'une suspension à 0,5 McFarland) représente environ 10^3 à 10^4 UFC, soit une densité nettement inférieure aux 5×10^5 UFC/mL de la microdilution de référence. Les bêta-lactamases étant des enzymes dont la production est proportionnelle à la densité bactérienne, un inoculum faible engendre une quantité insuffisante d'enzyme pour dégrader l'acide clavulanique et l'amoxicilline avant que l'inhibition ne soit observée, masquant ainsi la résistance réelle de la souche (Andrews, 2001 ; EUCAST, 2023). De plus, l'acide

clavulanique est une molécule thermolabile dont la stabilité peut être partiellement compromise lors de son incorporation dans la gélose Mueller-Hinton fondue, réduisant artificiellement la concentration inhibitrice effective dans la méthode Spot (Livermore et Winstanley, 2000).

Pour les souches *Enterobacter* sp. (KM1, KM4, KM5, KD1, KD7, KD10) et *Citrobacter* sp. (KM3, KM6, KM7, KM8), un mécanisme additionnel doit être envisagé : la production d'une céphalosporinase chromosomique AmpC inducible. Cette enzyme, naturellement présente chez ces genres bactériens, n'est exprimée à niveau élevé qu'en présence d'un inducteur bêta-lactamine et après une période de contact suffisante. La méthode de diffusion sur disque, qui implique une exposition prolongée à l'antibiotique diffusant graduellement dans la gélose, favorise l'induction maximale de l'enzyme et révèle ainsi la résistance phénotypique, alors que la méthode Spot, par sa cinétique différente, peut sous-estimer cette résistance inducible (Jacoby, 2009 ; Livermore, 1995).

Les souches *Serratia* sp. (KD2, KD6, KD8, KD9) présentent quant à elles une situation particulière : leur résistance à l'AMC est d'origine naturelle, liée à la combinaison d'une céphalosporinase chromosomique non inhibée par l'acide clavulanique et d'une réduction de la perméabilité membranaire. Cette résistance intrinsèque explique le phénotype résistant observé à l'antibiogramme, tandis que les CMI faibles en amoxicilline seule (2–4 µg/mL) reflètent le fait que le mécanisme de résistance est spécifiquement dirigé contre l'association AMC et non contre l'amoxicilline en tant que telle (Minogue et *al.*, 2004 ; Pagès et *al.*, 2008).

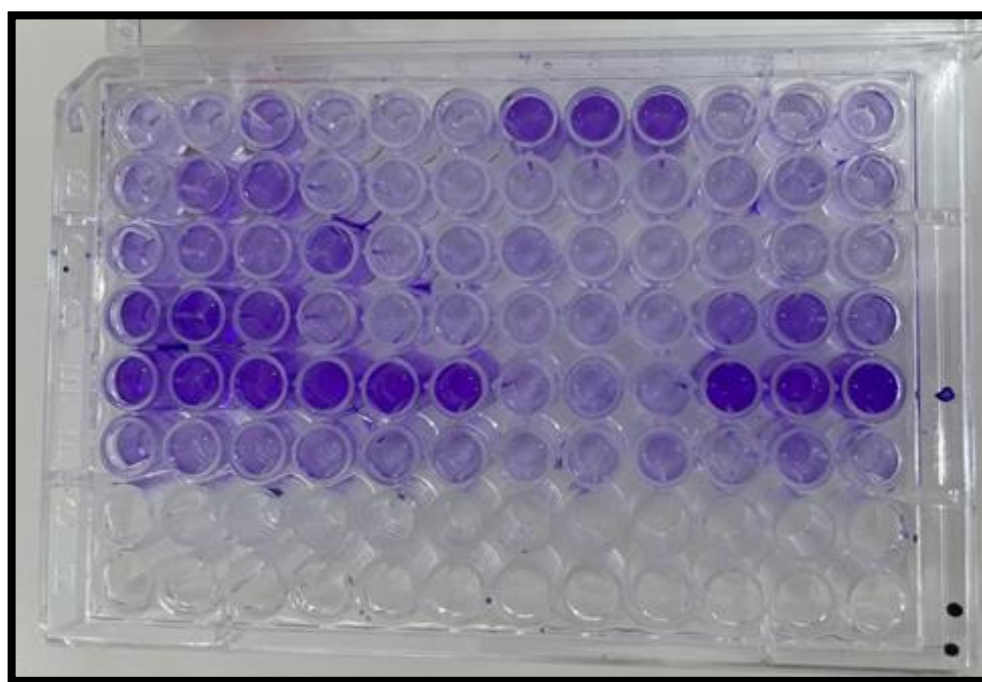
Enfin, les discordances observées pour KA6 (*E. coli*) et KA10 (*E. coli*) entre la résistance à l'AMC au disque et les faibles CMI en amoxicilline seule suggèrent une résistance médiée par réduction de la perméabilité membranaire via la perte ou la modification des porines OmpF et/ou OmpC, mécanisme qui n'implique pas de production de bêta-lactamase et peut donc passer inaperçu selon la méthode utilisée (Pagès et *al.*, 2008 ; Nikaido, 2003).

Ces discordances soulignent l'importance fondamentale d'utiliser la méthode de microdilution en bouillon, considérée comme méthode de référence par le CLSI (2025) et l'EUCAST (2023), pour confirmer les résultats d'antibiogramme

dans les situations cliniques critiques, et illustrent la complexité des mécanismes de résistance aux bêta-lactamines au sein de la flore à Gram négatif isolée de la viande hachée bovine.

IV.6. Interprétation des résultats de formation du biofilm

La capacité de formation de biofilm des 30 isolats bactériens a été évaluée par la méthode de coloration au cristal violet sur microplaque 96 puits, selon le protocole de Stepanović et al. (2007). La densité optique mesurée à 570 nm après solubilisation du cristal violet fixé par les cellules sessiles a été comparée à la valeur seuil $DOc = 0,030$, correspondant à la densité optique moyenne des puits témoins négatifs contenant uniquement du bouillon nutritif stérile. Les souches ont été classées en quatre catégories : non productrices ($DO \leq DOc$), faibles productrices ($DOc < DO \leq 2 \times DOc$), productrices modérées ($2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$) et fortes productrices ($DO > 4 \times DOc$). Les résultats sont présentés dans le Tableau 10, tandis qu'un exemple représentatif de la formation du biofilm après

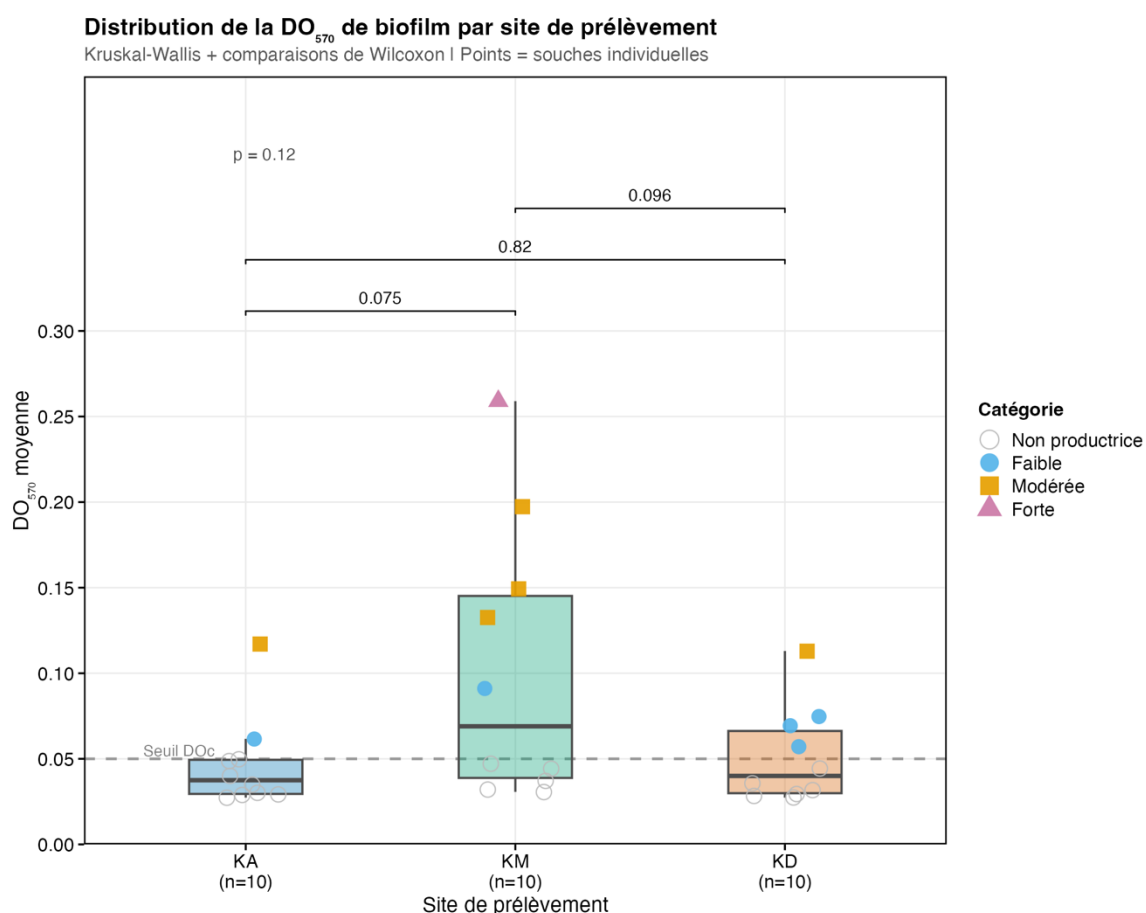


coloration au cristal violet est illustré dans la Figure 25.

Figure 25 : Résultats de la formation du biofilm déterminée par la méthode de la microplaque suivie d'une coloration au cristal violet.

IV.6.1. Distribution globale des profils de biofilm

Sur les 30 souches testées, 80% présentaient une capacité de formation de biofilm détectable, avec une distribution comme suit : 5 souches fortes productrices (16,7%), 6 souches productrices modérées (20,0%), 13 souches faibles productrices (43,3%) et 6 souches non productrices (20,0%). Ces résultats confirment la prédominance de la capacité biofilm au sein des bactéries à Gram négatif isolées de la viande hachée bovine, propriété largement documentée chez



les entérobactéries et genres apparentés dans les environnements alimentaires (Stepanović et al., 2004 ; Shi et Zhu, 2009).

Figure 26: Capacité de formation de biofilm des 30 isolats mesurée par la méthode du cristal violet (DO_{570} nm).

Les barres d'erreur représentent l'écart-type ($n = 3$ triplicats). Les lignes en pointillé indiquent les seuils de Stepanović et al. (2007) : $DOc = 0,030$, $2 \times DOc = 0,060$ et $4 \times DOc = 0,120$.

La comparaison de la capacité de formation de biofilm entre les trois boucheries par le test de Kruskal-Wallis ne révèle pas de différence

statistiquement significative ($H = 4,233$, $p = 0,120$), malgré une tendance à une DO_{570} plus élevée dans l'échantillon KM (médiane = 0,040 ; IQR : 0,032–0,124) par rapport à KA (médiane = 0,044 ; IQR : 0,029–0,055) et KD (médiane = 0,037 ; IQR : 0,028–0,066). L'absence de significativité statistique s'explique en partie par la forte variabilité intra-site, notamment au sein de KM où coexistent des fortes productrices (KM8, $DO = 0,259$) et des souches non productrices (KM2, KM3). Les comparaisons par paires avec correction de Bonferroni confirment l'absence de différence significative entre sites (KA vs KM : $p = 0,227$; KM vs KD : $p = 0,289$; KA vs KD : $p = 1,000$).

IV.6.2. Fortes productrices de biofilm

Les cinq souches fortes productrices (KA3, KM1, KM5, KM6 et KM8) présentaient des valeurs de DO moyenne comprises entre 0,117 et 0,259. La souche KM8 (*Citrobacter* sp.) se distinguait par la valeur la plus élevée ($DO = 0,259$), suivie de KM6 (*Citrobacter* sp. $DO = 0,197$) et KM5 (*Enterobacter* sp., $DO = 0,149$). La forte capacité de formation de biofilm des souches *Citrobacter* sp. est cohérente avec les données de la littérature, qui rapportent que ce genre possède de nombreux facteurs d'adhésion de surface, notamment des fimbriae de type 1 et des curli, favorisant l'attachement initial aux surfaces abiotiques en acier inoxydable et en plastique, matériaux couramment utilisés dans les équipements de boucherie (Olsen et al., 2002 ; Vestby et al., 2020). La souche KA3 (*Shigella* sp., $DO = 0,117$), initialement classée comme modérée, a été reclassée en forte productrice après recalcul selon les seuils de Stepanović, ce qui est notable car la capacité biofilm de *Shigella* sp. Dans les matrices alimentaires est peu documentée et constitue un résultat original de cette étude.

IV.6.3. Productrices modérées

Six souches présentaient une production modérée de biofilm : KA5 (non identifiée, $DO = 0,061$), KM4 (*Enterobacter* sp., $DO = 0,091$), KD1 (*Enterobacter* sp., $DO = 0,113$), KD2 (*Serratia* sp., $DO = 0,069$) et KD5 (*Citrobacter* sp., $DO = 0,074$). La capacité modérée de *Enterobacter* sp. Et *Serratia* sp. à former des biofilms sur les surfaces plastiques est bien établie et représente un facteur de persistance important dans les environnements de transformation alimentaire, où ces genres peuvent coloniser durablement les

équipements et résister aux procédés classiques de nettoyage-désinfection (Kregiel, 2014 ; Douterelo et *al.*, 2013).

IV.6.4. Faibles productrices et non productrices

Les 13 souches faibles productrices et les 6 souches non productrices présentaient des valeurs de DO proches ou inférieures au seuil DO_c, indiquant une capacité d'adhésion limitée dans les conditions expérimentales utilisées. Parmi les non-productrices, on retrouve notamment plusieurs souches *Serratia* sp. (KD8, KD9, KD10) et *E. coli* (KA2, KA6, KA7). L'absence de production de biofilm chez ces isolats ne signifie pas nécessairement l'absence de facteurs de virulence, mais peut refléter des conditions expérimentales non optimales pour l'expression de ces facteurs, notamment la composition du milieu de culture, la température et la durée d'incubation, paramètres connus pour influencer significativement la formation de biofilm (Stepanović et *al.*, 2007 ; O'Toole, 2011).

IV.6.5. Variabilité intra-triplicat

Une variabilité intra-triplicat notable a été observée pour certaines souches, notamment KA1 (CV = 50%), KA5 (CV = 39%), KA10 (CV = 62%), KD1 (CV = 30%) et KD2 (CV = 40%). Cette variabilité élevée, particulièrement pour KA10 et KA5, peut s'expliquer par une adhésion hétérogène des cellules bactériennes aux puits de la microplaque, phénomène fréquemment observé pour les souches à capacité d'adhésion intermédiaire dont l'expression des facteurs de biofilm est variable selon les conditions locales de croissance (Stepanović et *al.*, 2007). Ces résultats doivent être interprétés avec prudence et idéalement confirmés par des expériences complémentaires avec un plus grand nombre de réplicats.

IV.6.6. Relation entre formation de biofilm et résistance aux antibiotiques (Corrélation biofilm × résistance)

L'analyse de la corrélation entre la capacité de formation de biofilm (DO₅₇₀ nm) et le nombre d'antibiotiques résistants par souche a été réalisée par le test de Spearman sur les 22 souches pour lesquelles les deux jeux de données étaient disponibles simultanément. Le coefficient de corrélation obtenu est $\rho = -0,091$ ($p = 0,686$), indiquant l'absence de corrélation significative entre ces deux propriétés

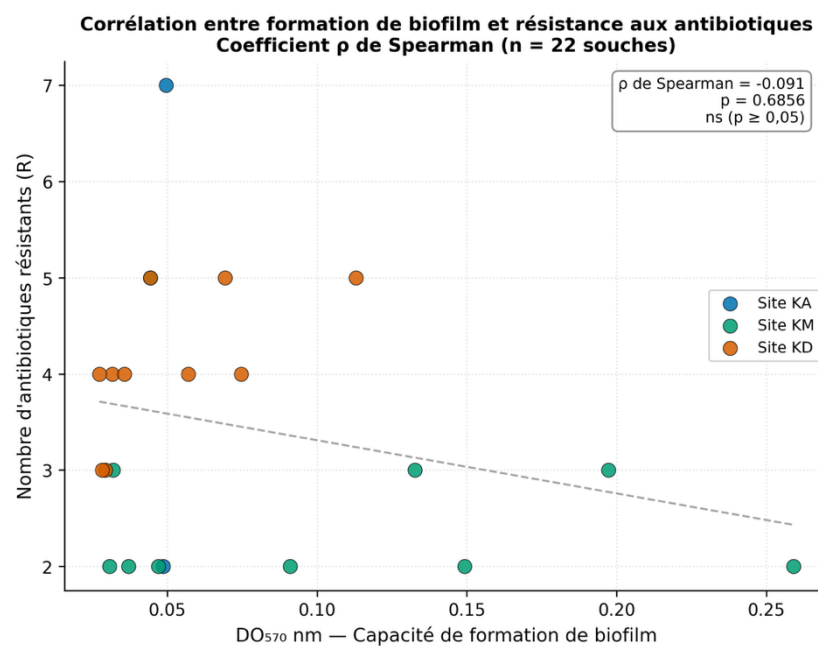
à l'échelle de l'ensemble de la collection (Figure 27). Ce résultat doit cependant être interprété avec prudence, car la faible taille de l'échantillon commun ($n = 22$) et la restriction de l'analyse aux souches testées aux deux méthodes limitent la puissance statistique du test et peuvent masquer des associations réelles au niveau de certains genres bactériens spécifiques.

En effet, l'examen individuel des données révèle une co-occurrence notable entre forte production de biofilm et résistance multiple chez certains isolats, notamment les souches KM6 (*Citrobacter* sp., DO = 0,197 ; profil MDR avec résistance à AMC, P et SXT) et KM8 (*Citrobacter* sp., DO = 0,259 ; profil MDR identique), qui cumulent la capacité biofilm la plus élevée de la collection et un phénotype de résistance multiple. Cette observation suggère que, si la corrélation globale n'est pas statistiquement établie dans notre échantillon, des sous-groupes taxonomiques peuvent présenter une co-régulation des deux propriétés, conformément aux mécanismes moléculaires décrits dans la littérature. En particulier, chez les genres *Citrobacter* et *Enterobacter*, le régulateur global RpoS contrôle simultanément l'expression de gènes impliqués dans la formation de biofilm et dans la résistance aux stress, incluant la résistance phénotypique aux antibiotiques (Kostakioti et al., 2013 ; Beloin et al., 2008).

Sur le plan mécanistique, la résistance phénotypique conférée par le biofilm est indépendante des mécanismes génétiques de résistance aux antibiotiques documentés par l'antibiogramme. Dans la matrice extracellulaire polysaccharidique du biofilm, la diffusion réduite des agents antimicrobiens, l'état métabolique ralenti des cellules profondes en conditions de privation nutritive et l'expression différentielle de pompes à efflux contribuent à une tolérance aux antibiotiques pouvant dépasser de 100 à 1 000 fois les concentrations inhibitrices minimales mesurées sur les formes planctoniques (Hoiby et al., 2010 ; Stewart et Costerton, 2001). Ainsi, même les souches classées sensibles à la gentamicine par antibiogramme standard pourraient s'avérer difficiles à éliminer en contexte de biofilm établi sur les surfaces des équipements de boucherie.

La coexistence, même non corrélée statistiquement au niveau global, de ces deux propriétés — résistance acquise aux antibiotiques et capacité de formation de biofilm — au sein d'une collection bactérienne isolée d'un aliment de grande

consommation représente un double facteur de risque sanitaire d'importance majeure. Les bactéries en biofilm sont à la fois persistantes dans l'environnement des boucheries, résistantes aux procédés classiques de nettoyage-désinfection, et potentiellement protégées vis-à-vis des traitements antibiotiques conventionnels (Pérez-Rodríguez et al., 2011 ; Kregiel, 2014). Ce constat renforce la nécessité



d'explorer des stratégies de décontamination alternatives, dont l'utilisation de bactériophages producteurs de dépolymérase capables de dégrader la matrice extracellulaire des biofilms, comme développé dans les sections suivantes.

Figure 27: Corrélation entre la capacité de formation de biofilm (DO₅₇₀ nm) et le nombre d'antibiotiques résistants par souche (n = 22 souches communes).

La droite en pointillé représente la tendance linéaire (IC 95%). ρ : coefficient de Spearman.

IV.7. Isolement et évaluation de l'activité lytique des bactériophages

IV.7.1. 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 III.1.15. Trois souches représentatives ont été sélectionnées pour cette évaluation : KD9 (*Serratia* sp.), KM6 (*Citrobacter* sp.) et KA9 (*Aeromonas hydrophila*), choisies en raison de leur appartenance à des genres distincts et de leur profil de résistance aux

antibiotiques documenté dans les sections précédentes. Les résultats sont présentés dans le Tableau 9 et illustrés à la Figure 28.

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. Cependant, les profils de lyse observés diffèrent de manière significative entre les souches, reflétant une spécificité d'hôte variable des bactériophages isolés.

Tableau 9: Évaluation de l'activité lytique du bactériophage sur les isolats bactériens par la méthode des spots

Isolat	Pré-identification	Filtrat brut (F)	Phage pur (non dilué)	Dilution 10 ⁻¹	Dilution 10 ⁻²	Dilution 10 ⁻³	Spectre lytique
KD9	<i>Serratia</i> sp.	25 mm	23 mm	16 mm	14 mm	ND	Large – titre élevé
KM6	<i>Citrobacter</i> sp.	17 mm	ND	ND	ND	ND	Étroit – lyse non spécifique probable
KA9	<i>A. hydrophila</i>	10 mm	13 mm	ND	ND	ND	Étroit – titre faible

Note : Les diamètres des plages de lyse sont exprimés en millimètres (mm). ND : non détecté (absence de lyse observée). Le spectre lytique est établi à partir de l'intensité et de la persistance de la lyse observée avec le filtrat brut, le phage pur et les différentes dilutions.

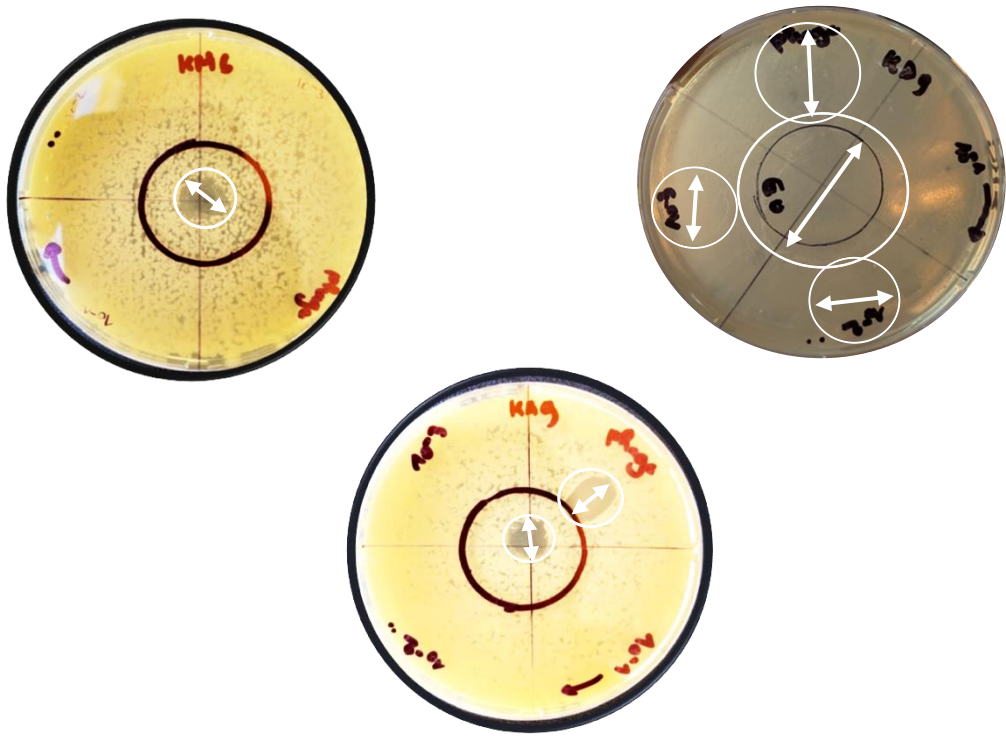


Figure 28: Évaluation de l'activité lytique par méthode de *spot test* sur les souches KD9, KM6 et KA9

IV.7.2. Analyse des profils de lyse par souche

IV.7.2.1. Souche KD9 (*Serratia* sp.)

La souche KD9 a présenté le profil de lyse le plus marqué, avec des zones d'inhibition de 25 mm pour le filtrat brut, 23 mm pour le phage pur non dilué, 16 mm à la dilution 10^{-1} et 14 mm à la dilution 10^{-2} , la lyse n'étant plus détectable à la dilution 10^{-3} . La persistance de zones de lyse significatives jusqu'à la dilution 10^{-2} indique un titre phagique élevé dans le filtrat et une forte efficacité lytique vis-à-vis de cette souche. La diminution progressive et régulière des diamètres avec l'augmentation de la dilution est caractéristique d'une relation dose-réponse typique de l'action phagique, où la réduction de la concentration en particules virales réduit proportionnellement la capacité de lyse du tapis bactérien (Abedon et Thomas-Abedon, 2010). Ce profil est cohérent avec une infection lytique productive, dans laquelle les phages se répliquent efficacement au sein des cellules de *Serratia* sp. Avant de provoquer leur lyse et la libération de nouveaux virions (Loc-Carrillo et Abedon, 2011).

IV.7.2.2. Souche KM6 (*Citrobacter* sp.)

La souche KM6 a présenté un profil atypique : une zone de lyse de 17 mm a été observée uniquement au niveau du filtrat brut (Solution F), aucune lyse n'étant détectable pour le phage pur ni pour les dilutions 10^{-1} à 10^{-3} . Ce profil suggère que l'activité lytique observée avec le filtrat brut pourrait être en partie attribuable à des facteurs non phagiques présents dans le filtrat d'eaux usées, tels que des bactériocines, des lysines extracellulaires ou d'autres enzymes lytiques produites par les microorganismes de la flore des eaux usées (Chibeu et *al.*, 2012). Alternativement, si des phages actifs sur KM6 sont bien présents dans le filtrat brut, leur titre est trop faible pour être détecté après purification et dilution, ce qui indiquerait une spécificité phagique très étroite pour cette souche avec un potentiel de multiplication limité dans les conditions testées. Ces résultats appellent à des expériences complémentaires, notamment des tests de plages de lyse sur agar double couche afin de discriminer l'activité phagique stricte de l'activité lytique non spécifique.

IV.7.2.3. Souche KA9 (*Aeromonas hydrophila*)

La souche KA9 a présenté des zones de lyse de 10 mm pour le filtrat brut et de 13 mm pour le phage pur non dilué, aucune lyse n'étant détectable aux dilutions 10^{-1} et au-delà. Le diamètre légèrement supérieur observé avec le phage pur par rapport au filtrat brut peut s'expliquer par la présence dans le filtrat brut de composants inhibant partiellement la diffusion ou l'adsorption phagique, tels que des débris cellulaires, des protéines ou des mucopolysaccharides issus de la lyse bactérienne lors de l'étape d'enrichissement, réduisant ainsi l'efficacité nette de la lyse (Doss et *al.*, 2017). Le titre phagique apparaît faible pour cette souche, la lyse n'étant plus détectable dès la première dilution. *Aeromonas hydrophila* est une cible documentée pour les bactériophages isolés d'eaux usées, plusieurs études ayant rapporté l'isolement de phages spécifiques de ce pathogène à partir d'effluents aquatiques (Galarce et *al.*, 2021), ce qui conforte la réalité de l'interaction phage-hôte observée ici, même si l'efficacité lytique reste modérée dans les conditions de cette étude.

IV.7.3. Discussion sur le potentiel thérapeutique et antibiofilm des bactériophages isolés

Les résultats obtenus démontrent que des bactériophages actifs sur des bactéries à Gram négatif isolées de viande hachée bovine sont présents dans les eaux usées de la région de Saïda, confirmant le potentiel de cet environnement comme source de phages thérapeutiques, comme cela a été rapporté dans de nombreuses études à travers le monde (Loc-Carrillo et Abedon, 2011 ; Sulakvelidze et *al.*, 2001). La souche KD9 (*Serratia* sp.), forte cible des phages isolés, présentait par ailleurs un profil de résistance aux antibiotiques marqué (R à AMC, P, CAZ, SXT) et une capacité modérée de formation de biofilm, faisant d'elle un candidat particulièrement pertinent pour une approche de phagothérapie ou de combinaison phage-antibiotique. En effet, il a été démontré que les bactériophages peuvent non seulement lyser les cellules planctoniques mais également dégrader la matrice extracellulaire des biofilms via la production de dépolymérases phagiques, restaurant ainsi la sensibilité aux antibiotiques des cellules sessiles (Pires et *al.*, 2017 ; Harper et *al.*, 2014).

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 des pathogènes sans affecter la flore commensale et une limite dans le cadre d'une application thérapeutique ou décontaminante à large spectre (Loc-Carrillo et Abedon, 2011). L'élargissement du spectre d'hôte par l'utilisation de cocktails phagiques, approche recommandée dans les applications industrielles de biocontrôle alimentaire (Endersen et *al.*, 2014), représente une perspective importante pour les travaux futurs issus de cette étude.

Les résultats de l'activité antibiofilm des phages, évaluée par la méthode du cristal violet après incubation de 18 h en présence des phages, seront présentés et discutés dans la section suivante.

IV.8. Cinétique de lyse bactérienne par les bactériophages (méthode microplaque)

IV.8.1. Dispositif expérimental

La cinétique de lyse a été évaluée en microplaque 96 puits selon trois conditions testées en triplicat : un témoin bactérien sans phage (suspension S₁ + solution physiologique), une condition avec phage pur non dilué (S₁ + Solution F) et une condition avec phage dilué au 1/10 dans du CaCl₂ 10 mM (S₁ + phage 1/10). La densité optique à 600 nm a été mesurée toutes les 30 minutes pendant 4 heures à 37 °C, suivie d'une incubation prolongée de 18 heures sans agitation, avec une mesure finale à 24 heures. Les trois souches testées étaient KA8 (*Shigella* sp.), KD9 (*Serratia* sp.) et KM6 (*Citrobacter* sp.), représentant trois genres distincts et présentant des profils de résistance aux antibiotiques et de biofilm différenciés. Les résultats sont présentés dans le panel comparatif figure 29.

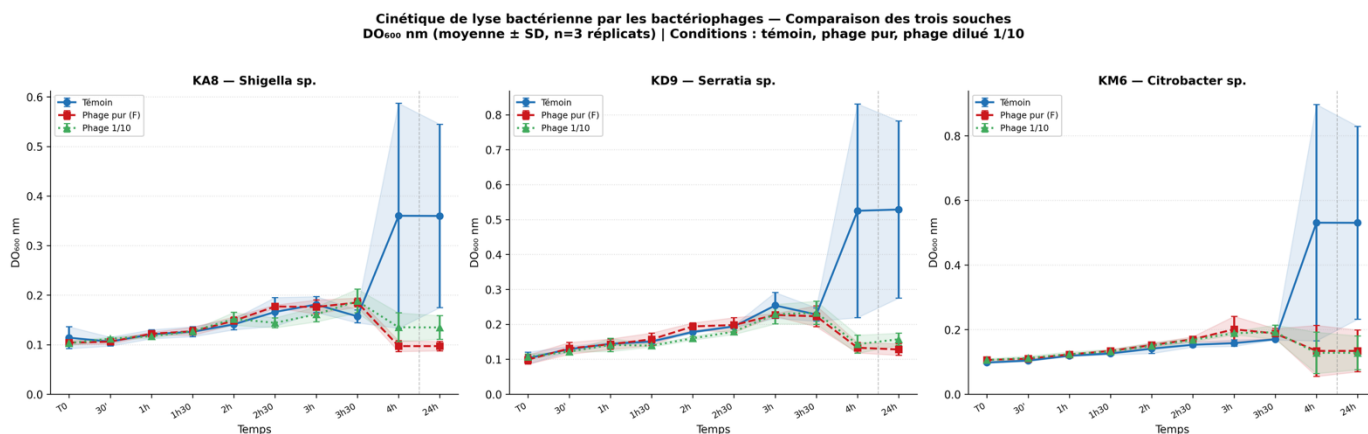


Figure 29: Comparaison de la cinétique de lyse bactérienne des trois souches testées (KA8, KD9, KM6) en présence de bactériophages (phage pur et dilué 1/10) par rapport au témoin sans phage. DO₆₀₀ nm (moyenne ± écart-type, n = 3 réplicats).

IV.8.2. Résultats par souche

IV.8.2.1. Souche KA8 (*Shigella* sp.)

Le témoin bactérien sans phage a présenté une croissance progressive de T0 (DO = 0,114) jusqu'à 4 heures (DO = 0,360), puis une croissance importante à 24 heures (DO = 0,360 ± 0,227), avec une variabilité inter-réplicats élevée à ce point tardif reflétant une hétérogénéité de croissance. En présence de phages non dilués (Solution F), la DO est restée significativement inférieure au témoin dès 2 heures, atteignant 0,097 ± 0,011 à 4 heures, soit une réduction de **73,1%** par rapport au témoin. Cette inhibition a été maintenue à 24 heures (DO = 0,097, réduction de **73,0%**), témoignant d'une activité lytique soutenue et durable. En présence de phages dilués au 1/10, une réduction de **62,5%** a été observée à 4 heures (DO = 0,135 ± 0,029), confirmant une relation dose-dépendante de l'effet lytique.

IV.8.2.2. Souche KD9 (*Serratia* sp.)

La croissance du témoin sans phage de KD9 a suivi une progression régulière de T0 (DO = 0,103) à 3h30 (DO = 0,228), avec un saut important à 24 heures (DO = 0,525 ± 0,306). En présence de phages non dilués, la DO est demeurée nettement inférieure sur l'ensemble de la cinétique, atteignant 0,133 ± 0,015 à 4 heures contre 0,525 pour le témoin, soit une réduction maximale de **75,8% à 24 heures**, la valeur la plus élevée observée parmi les trois souches. Les phages dilués au 1/10 ont produit une réduction comparable (72,8% à 4h, 70,2% à

24h), indiquant que même à concentration réduite les phages conservent une efficacité lytique élevée sur cette souche. Ces résultats sont cohérents avec les diamètres de lyse les plus importants observés pour KD9 lors du spot test (25 mm), confirmant la sensibilité particulière de cette souche aux phages isolés.

IV.8.2.3. Souche KM6 (*Citrobacter* sp.)

Le témoin de KM6 a montré une croissance modérée jusqu'à 3h30 (DO = 0,170) puis un saut notable à 24 heures (DO = 0,531 $\pm$ 0,366). En présence de phages, les deux conditions (pur et dilué 1/10) ont produit des réductions remarquablement stables et similaires : **74,8% et 75,9%** à 4 heures respectivement, maintenues à **74,7% et 75,9%** à 24 heures. Cette stabilité de l'inhibition entre les deux concentrations phagiques suggère un mécanisme lytique saturable pour cette souche, où une concentration phagique relativement faible (dilution 1/10) est suffisante pour induire une lyse maximale, pouvant indiquer un rapport phage/bactérie (MOI) optimal atteint dès la dilution 1/10.

IV.8.2.4. Discussion

Les résultats de la cinétique de lyse démontrent que les bactériophages isolés à partir des eaux usées de la région de Saïda exercent une activité antibactérienne significative et dose-dépendante sur les trois souches testées, avec des taux de réduction de croissance compris entre 62,5% et 75,9% selon la souche et la concentration phagique utilisée. Ces valeurs sont comparables à celles rapportées dans des études similaires utilisant des phages isolés d'eaux usées contre des bactéries à Gram négatif d'origine alimentaire, où des réductions de DO entre 50% et 90% sont typiquement documentées (Leverentz et *al.*, 2003 ; Endersen et *al.*, 2014).

La persistance de l'activité inhibitrice à 24 heures, avec des taux de réduction comparables à ceux observés à 4 heures pour les trois souches, est un résultat particulièrement important sur le plan applicatif. Il indique que les phages maintiennent leur capacité lytique sur une période prolongée, et que les bactéries ne développent pas de résistance phagique rapide dans les conditions expérimentales testées, contrairement à ce qui est parfois observé avec certains phages à spectre étroit (Labrie et *al.*, 2010). Cependant, la forte variabilité inter-réplicats observée dans les puits témoins à 24 heures (SD élevés pour KD9 et

KM6) reflète probablement une hétérogénéité de la croissance bactérienne en conditions statiques prolongées, phénomène classique lié à la formation de biofilm dans les puits ou à l'épuisement des nutriments, et ne remet pas en cause la signification des différences observées entre témoin et conditions phagiques.

La réduction similaire obtenue avec le phage pur et le phage dilué 1/10 pour KM6 (*Citrobacter* sp.) contraste avec l'effet clairement dose-dépendant observé pour KA8 (*Shigella* sp.), où la dilution entraîne une réduction d'efficacité de 10 points de pourcentage. Cette différence inter-souche dans la relation dose-réponse suggère des différences dans les cinétiques d'adsorption phagique (constante k) et dans les taux de burst (nombre de phages libérés par cellule lysée) selon la souche hôte, paramètres qui conditionneront l'optimisation des doses dans toute application de phagothérapie ou de biocontrôle alimentaire (Abedon et Thomas-Abedon, 2010 ; Doss et *al.*, 2017).

Ces résultats, combinés aux données du spot test présentées précédemment, confirment le potentiel des bactériophages isolés comme agents de biocontrôle contre des bactéries à Gram négatif résistantes aux antibiotiques issues de la viande hachée bovine, et justifient des études complémentaires portant sur la caractérisation moléculaire de ces phages, la détermination de leur spectre d'hôte élargi et l'évaluation de leur activité antibiofilm, présentée dans la section suivante.

IV.9. Activité antibiofilm des bactériophages

L'activité antibiofilm des bactériophages a été évaluée par la méthode de coloration au cristal violet sur microplaque 96 puits, selon quatre conditions expérimentales testées en triplicat : témoin milieu seul (T-), témoin bactérien sans phage (T+), condition avec phage pur non dilué et condition avec phage dilué au 1/10 dans du CaCl_2 10 mM. La microplaque utilisée était la même que celle de la cinétique de lyse, les puits correspondant aux lignes F (KA8, *Shigella* sp.), G (KD9, *Serratia* sp.) et H (KM6, *Citrobacter* sp.) ayant été incubés pendant 18 h en conditions statiques à 37 °C avant coloration. Les densités optiques ont été mesurées à 570 nm après solubilisation du cristal violet par l'éthanol à 95%, et le pourcentage de réduction du biofilm a été calculé selon la formule de Cerca et

al. (2005). Les résultats sont présentés dans le Tableau 10 et illustrés aux Figures 30 et 31.

Tableau 10: Activité antibiofilm des bactériophages évaluée par la méthode au cristal violet (DO_{570} nm)

Souche	Pré-identification	DO_{570} Témoin négatif (T-)(Milieu seul)	DO_{570} Témoin positif (T+)(Bactérie seule)	DO_{570} Phage	Réduction du biofilm (%)	Test de Mann-Whitney
KA8	<i>Shigella</i> sp.	$0,085 \pm 0,015$	$0,066 \pm 0,005$	$0,085 \pm 0,025$	-28,6	ns (p = 0,700)
KD9	<i>Serratia</i> sp.	$0,094 \pm 0,006$	$0,063 \pm 0,014$	$0,055 \pm 0,005$	+12,2	ns (p = 0,700)
KM6	<i>Citrobacter</i> sp.	$0,075 \pm 0,010$	$0,056 \pm 0,013$	$0,048 \pm 0,009$	+13,8	ns (p = 0,825)

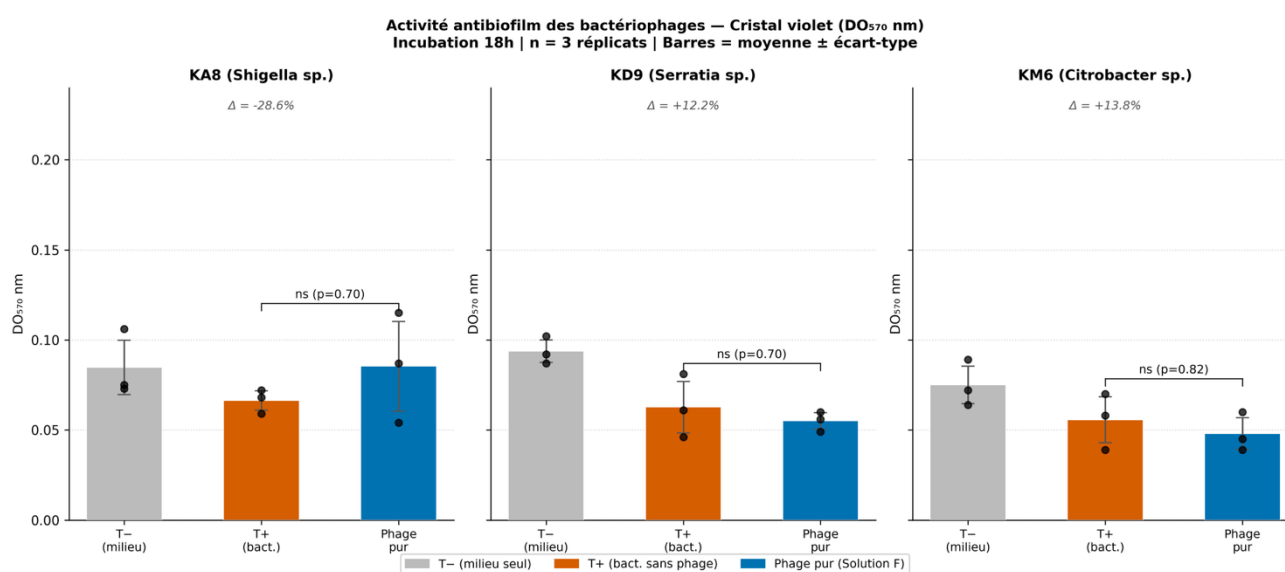


Figure 30: Densité optique à 570 nm (DO_{570}) mesurée après coloration au cristal violet pour les trois conditions expérimentales

(T- = milieu seul, T+ = bactéries sans phage, Phage pur = bactéries + phages) pour les souches KA8, KD9 et KM6. Barres = moyenne $\pm$ écart-type (n = 3). Test de Mann-Whitney : ns = non significatif.

IV.9.1. Analyse des résultats par souche

Pour la souche KA8 (*Shigella* sp.), la densité optique du groupe traité par le phage pur ($0,085 \pm 0,025$) était supérieure à celle du témoin bactérien sans phage ($0,066 \pm 0,005$), conduisant à un pourcentage de réduction négatif (-28,6%). Ce résultat paradoxal, associé à une variabilité inter-réplicats élevée dans le groupe phage (CV = 29%), suggère une hétérogénéité de réponse entre puits, pouvant refléter une adsorption phagique variable selon les conditions locales de croissance du biofilm dans les différents puits de la microplaque. Le test de Mann-Whitney ne révèle pas de différence statistiquement significative entre le groupe T+ et le groupe phage (U = 3, p = 0,700). Pour KD9 (*Serratia* sp.) et KM6

(*Citrobacter* sp.), des réductions modestes ont été observées : +12,2% et +13,8% respectivement, sans significativité statistique (Mann-Whitney : $p = 0,700$ et $p = 0,825$; Kruskal-Wallis : $p = 0,061$ et $p = 0,105$).

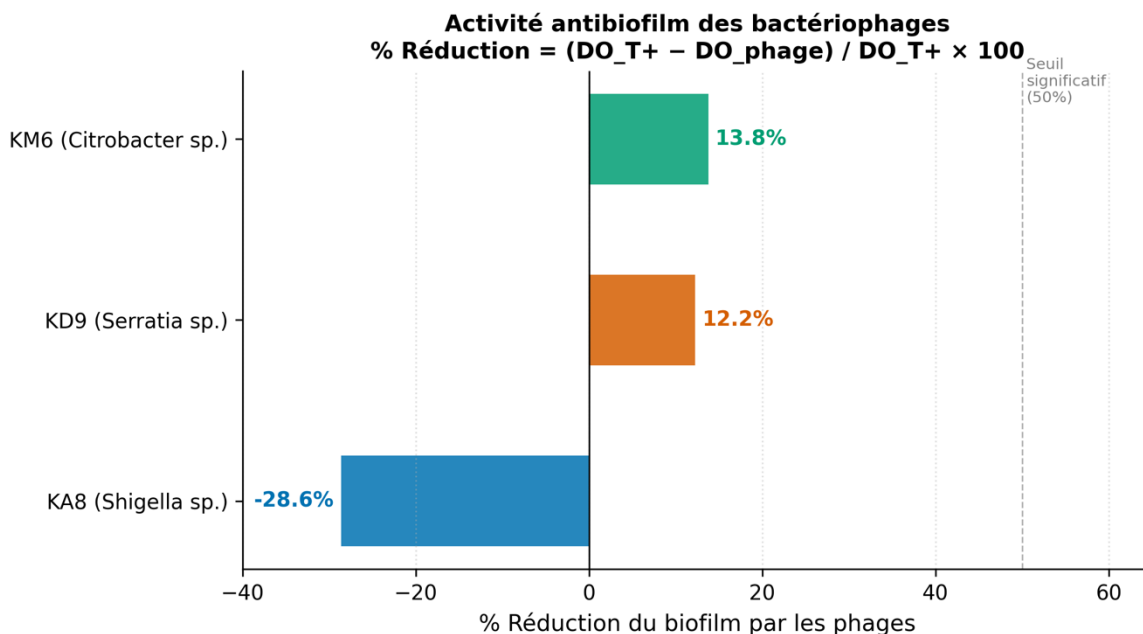


Figure 31: Pourcentage de réduction du biofilm

induit par le traitement phagique, calculé selon la formule de Cerca et al. (2005) : $\% \text{ réduction} = (\text{DO_T+} - \text{DO_phage}) / \text{DO_T+} \times 100$. La ligne en pointillé indique le seuil de significativité (50%)

IV.9.2. Discussion

L'absence d'activité antibiofilm statistiquement significative dans cet essai contraste avec l'activité lytique clairement documentée en cinétique (réductions de 62,5 à 75,9% sur les formes planctoniques). Ce résultat est cohérent avec plusieurs données de la littérature soulignant la difficulté des phages à pénétrer et dégrader la matrice extracellulaire d'un biofilm établi, notamment chez des genres producteurs de polysaccharides abondants comme *Serratia* et *Citrobacter* (Pires et al., 2017 ; Verma et al., 2010).

Plusieurs facteurs expérimentaux doivent être pris en compte dans l'interprétation de ces résultats. Premièrement, les phages ont été ajoutés simultanément aux bactéries (approche préventive), or le biofilm se forme au cours des 18 premières heures d'incubation et les phages peuvent être progressivement piégés ou inactivés dans la matrice en cours de formation (Harper et al., 2014). Deuxièmement, les faibles valeurs de DO observées dans

tous les groupes (y compris T+, $DO \approx 0,06$) indiquent que la formation de biofilm dans ces conditions expérimentales était globalement faible, ce qui rend difficile la mise en évidence d'une réduction supplémentaire (effet plancher). Ces valeurs de DO T+ sont inférieures à celles observées lors de l'essai de biofilm standard réalisé précédemment sur les mêmes souches (KA8 : 0,035, KD9 : 0,028, KM6 : 0,197), suggérant que le changement de milieu (LB au lieu de BN) ou la présence de $CaCl_2$ dans les conditions phages a pu modifier les conditions d'adhésion bactérienne.

Troisièmement, la faible taille des triplicats ($n = 3$) limite fortement la puissance statistique des tests non paramétriques utilisés, ce qui explique que des tendances biologiquement pertinentes (notamment pour KD9, $p = 0,061$ au Kruskal-Wallis, proche du seuil de significativité) ne puissent pas être confirmées statistiquement. L'augmentation du nombre de réplicats à $n \geq 6$ et l'utilisation d'un essai de dégradation de biofilm préformé (plutôt que préventif) constituent des perspectives expérimentales importantes pour les travaux ultérieurs, conformément aux recommandations de l'EUCAST pour l'évaluation de l'activité antibiofilm des phages (EUCAST, 2023 ; O'Toole, 2011).

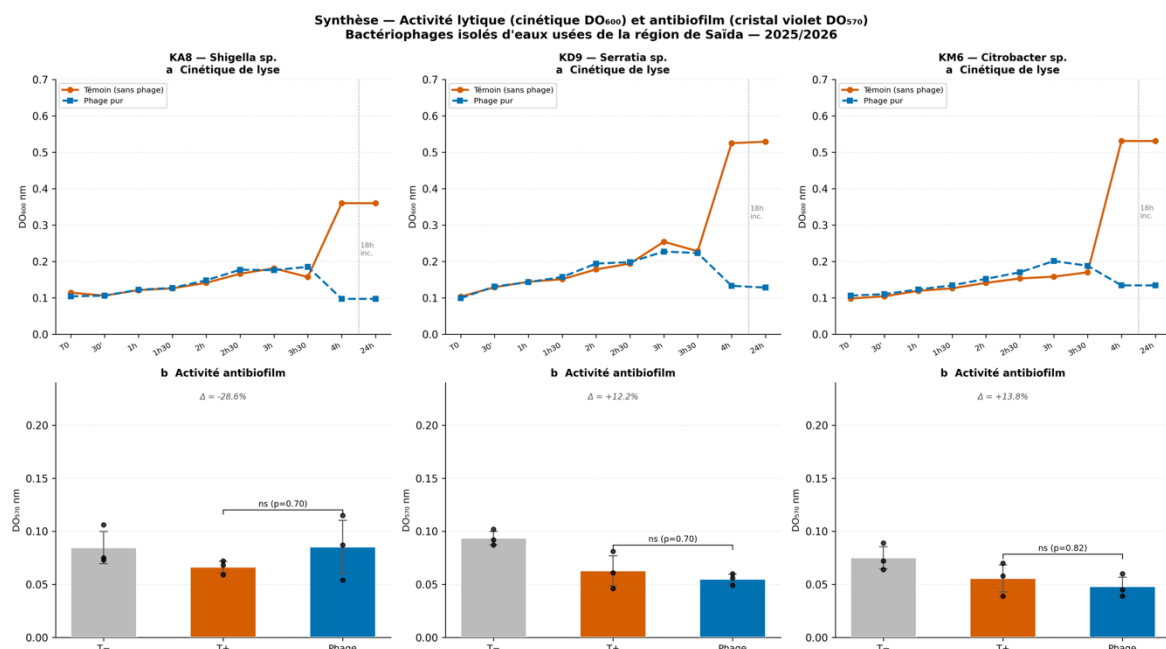


Figure 32: Synthèse de l'activité des bactériophages. Ligne supérieure (a) : cinétique de lyse en milieu liquide (DO_{600} nm, 4h + 24h). Ligne inférieure (b) : activité antibiofilm quantifiée par cristal violet (DO_{570} nm, 18h).

PARTIE V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

L'objectif de ce travail était d'isoler et d'identifier les bactéries à Gram négatif présentes dans des échantillons de viande hachée bovine commercialisée dans trois boucheries de la commune d'Aïn El Hadjar (wilaya de Saïda), d'évaluer leur profil de résistance aux antibiotiques et leur capacité de formation de biofilm, et d'explorer l'activité lytique et antibiofilm de bactériophages isolés d'eaux usées locales.

Sur le plan microbiologique, l'analyse des trois échantillons collectés a révélé des charges bactériennes variables, atteignant $5,85 \times 10^6$ UFC/g pour la boucherie la plus contaminée (KA), dépassant largement les seuils réglementaires fixés par le Règlement européen CE n°2073/2005 ($m = 10^2$ UFC/g). Au total, 30 souches de bactéries à Gram négatif ont été isolées sur milieu MacConkey sélectif et identifiées par une combinaison de tests biochimiques conventionnels et de galeries API 20E et 10S. L'analyse taxonomique préliminaire a mis en évidence une diversité génomique importante au sein des isolats, orientant vers plusieurs genres dont *Escherichia*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Hafnia* et *Aeromonas*, reflétant la richesse de l'écosystème microbien de la viande hachée en conditions de commercialisation artisanale.

L'étude des profils de résistance aux antibiotiques, réalisée par antibiogramme sur 24 souches représentatives, a mis en évidence des résultats préoccupants sur le plan de la santé publique. La résistance à l'amoxicilline-acide clavulanique (AMC) a été universelle (100% des souches), suggérant la production de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) ou de céphalosporinases de type AmpC insensibles à l'inhibition par l'acide clavulanique. La résistance au cotrimoxazole (SXT) a concerné 54,2% des souches, avec une prévalence significativement plus élevée dans la boucherie KD (100%) par rapport à KM (40%) (test exact de Fisher, $p = 0,011$). De même, la résistance à la ceftazidime (CAZ) était significativement plus fréquente dans KD (80%) que dans KM (10%) ($p = 0,006$). L'analyse statistique par le test de Kruskal-Wallis a confirmé une différence significative dans la distribution des profils de multirésistance (MDR) entre boucheries ($H = 8,770$; $p = 0,012$), avec la boucherie KD présentant une médiane de 4 antibiotiques résistants par souche, significativement supérieure à celle de KM (médiane = 2 ; p ajusté = 0,009). En revanche, la gentamicine et

l'imipenème ont conservé une excellente activité sur l'ensemble des isolats (100% et 95,8% de souches sensibles respectivement), constituant des options thérapeutiques potentiellement fiables dans ce contexte.

L'évaluation de la capacité de formation de biofilm par la méthode du cristal violet sur microplaque 96 puits a montré que 80% des 30 isolats testés étaient producteurs de biofilm à des degrés variables. Cinq souches (16,7%) se sont révélées fortes productrices, dont deux *Citrobacter* sp. de la boucherie KM (KM6, DO = 0,197 ; KM8, DO = 0,259) et une *Shigella* sp. (KA3, DO = 0,117), résultat notable car la capacité biofilm de ce dernier genre dans les matrices alimentaires est peu documentée dans la littérature. Bien qu'aucune corrélation statistiquement significative n'ait été établie entre la capacité de formation de biofilm et le niveau de résistance aux antibiotiques (ρ de Spearman = -0,091 ; p = 0,686), la co-occurrence de ces deux propriétés chez certaines souches — notamment les fortes productrices de biofilm résistantes à l'AMC et au SXT — représente un double facteur de risque sanitaire dans l'environnement des boucheries.

L'exploration du potentiel des bactériophages comme agents de biocontrôle a constitué la partie la plus originale de ce travail. Des bactériophages actifs sur des bactéries à Gram négatif isolées de viande hachée bovine ont été isolés à partir d'eaux usées de la région de Saïda. Le spot test a mis en évidence une activité lytique variable selon la souche hôte, avec la réponse la plus marquée pour *Serratia* sp. KD9 (zones de lyse jusqu'à 25 mm en filtrat brut, détectables jusqu'à la dilution 10^{-2}). La cinétique de lyse en microplaque a confirmé des taux de réduction de la croissance bactérienne compris entre 62,5% et 75,9% à 4 heures, maintenus à 24 heures, témoignant d'une activité lytique soutenue et dose-dépendante. En revanche, l'évaluation de l'activité antibiofilm par cristal violet n'a pas mis en évidence de réduction statistiquement significative du biofilm en conditions préventives (Mann-Whitney ; $p > 0,05$), résultat attribuable à la faible formation de biofilm dans les conditions expérimentales testées ainsi qu'à la faible puissance statistique liée aux triplicats.

Ce travail présente néanmoins plusieurs limites qu'il convient de souligner. L'identification des souches par tests biochimiques conventionnels et galeries API, bien que classique, reste moins précise que les méthodes moléculaires telles que le séquençage du gène 16S ARNr ou le séquençage du génome entier (WGS).

La confirmation des phénotypes de résistance suspecte de type BLSE nécessiterait des tests de synergie et une analyse génotypique ciblant les gènes *bla*TEM, *bla*SHV et *bla*CTX-M. Par ailleurs, la faible taille des triplicats dans les essais phagiques limite la puissance des tests statistiques, et l'optimisation du protocole antibiofilm notamment par l'utilisation d'un biofilm préformé et d'un nombre de réplicats plus élevé constitue une priorité pour les travaux futurs.

Les perspectives de cette étude sont multiples. Sur le plan fondamental, la caractérisation moléculaire des bactériophages isolés, détermination du spectre d'hôte élargi, séquençage du génome phagique, identification des dépolymérases extracellulaires permettrait d'évaluer leur potentiel thérapeutique et leur innocuité. Sur le plan appliqué, l'élaboration de cocktails phagiques combinant plusieurs phages à spectre complémentaire, voire leur association à des agents antibiotiques (approche synergie phage-antibiotique), représente une stratégie prometteuse face à la menace croissante des bactéries multirésistantes dans la chaîne alimentaire. Enfin, la mise en place d'une surveillance épidémiologique régulière de la résistance aux antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale, inscrite dans le cadre de l'approche "One Health", s'impose comme une nécessité pour la wilaya de Saïda et plus largement pour l'Algérie, où les données sur la résistance des entérobactéries d'origine alimentaire demeurent encore insuffisantes.

PARTIE VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Abdelwahab, B. A., & Aida, K. (s.d.). Synthèse d'articles sur la capacité de production de biofilms des entérobactéries isolées à partir d'aliments de rue.
- Abedon, S. T., & Thomas-Abedon, C. (2010). Phage therapy pharmacology. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11(1), 28–47.
- Adeolu, Alnajar, Naushad, & Gupta. (2016). Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(12), 5575–5599.
- Aidara-Kane, A., Angulo, F. J., Conly, J. M., et al. (2018). WHO guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 7(1), 1–8.
- AKERMI, A. (2025). Qualité hygiénique de la viande de poulet (Thèse de doctorat, Université Ibn Khaldoun).
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(S1), 5–16.
- ANGAR, F. N. N., ARROUSSI, A., & HAMOUDI, S. K. (2021). Evaluation de la contamination bactérienne de la viande hachée congelée vendue dans la région de Tiaret (Thèse de doctorat, Faculté Sciences de la Nature et de la Vie).
- Aya, F. A. T. N. A. S. S. I. (2025). L'étude de la résistance aux bêta-lactamines des entérobactéries isolées de différents prélèvements pathologiques à l'hôpital El-Hakim Saâdan-Biskra.
- Beloin, C., Roux, A., & Ghigo, J. M. (2008). *Escherichia coli* biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322, 249–289.
- BENAMEUR, Q. (2011). Antibiorésistance des entérobactéries d'origine aviaire (Thèse de doctorat, Tiaret).
- BENMALEK, K., & MEGHZILI, K. (s.d.). Etude de la résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries isolées de différents liquides de ponctions au niveau de l'hôpital pédiatrique El Mansourah Constantine.

- BENTABOUCHE, A. B. A. (2025). Isolement et identification des bactéries responsables des infections nosocomiales.
- Biesalski, H. K. (2005). Meat as a component of a healthy diet – are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet? *Meat Science*, 70(3), 509–524.
- Bio Mérieux. (2019). Notice d'utilisation du système d'identification API 20E. Marcy-l'Étoile, France : bioMérieux SA.
- BOUALLEG, A., & LIMAMI, M. (2022). Résistance bactérienne aux antibiotiques : facteurs favorisants et évaluation de la menace (Thèse de doctorat, Université Larbi Tébessi-Tébessa).
- BOUKADA, F. A., FEDDANE, B., & Y AHMED, A. O. (2025). Antibiorésistance des entérobactéries isolées au niveau des laboratoires d'analyses médicales privés (Thèse de doctorat).
- Boutadjine, H., & Boultif, A. (2019). Identification de 24 souches bactériennes isolées à partir des effluents hospitaliers du CHU Constantine, et essai de l'activité antibactérienne des extraits de *Cynara cardunculus* sur deux de ces isolats. Constantine.
- BOUTAIBA BENKLAOUZ, M. (2017). Antibiorésistance des entérobactéries d'origine aviaire au niveau de l'ouest Algérien (Thèse de doctorat, Université Ibn Khaldoun-Tiaret).
- Bouziane, N., & Hachour, N. (2021). Antibiorésistance et capacité de formation de biofilm in vitro de souches de *Staphylococcus aureus* d'origine alimentaire et animale (Thèse de doctorat, Université Mouloud Mammeri).
- Brahmia, R., & Medareg, N. S. T. I. (2016). La résistance des bactéries aux antibiotiques dans l'hôpital de Oued Zenati.
- Cattoir, V., Denis, F., Martin, C., & Ploy, M. C. (2016). *Bactériologie médicale : techniques usuelles*. Elsevier Health Sciences.
- Cerca, N., Pier, G. B., Vilanova, M., Oliveira, R., & Azeredo, J. (2005). Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic

- surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Research in Microbiology*, 156(4), 506–514.
- Chibeu, A., et *al.* (2012). Bacteriophages with the ability to degrade uropathogenic *Escherichia coli* biofilms. *Viruses*, 4(4), 471–487.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2025). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. CLSI Standard M07, 12e édition. Wayne, PA, USA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2025). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI Supplement M100, 35e édition.
- d'Hérelle, F. (1917). Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 165, 373–375.
- Djabou, F., & R. C. (s.d.). Etude de la qualité microbiologique de viande hachée de boeuf.
- Doss, J., et *al.* (2017). A review of phage selection, amplification, and application methodologies. *Viruses*, 9(4), 70.
- Doukani, N., & Bouhamed, R. (2024). Détermination de la sensibilité aux antibiotiques de la microflore de la surface des carcasses de la filière viande rouge d'un abattoir situé à Alger (Thèse de doctorat, Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire, Alger).
- Endersen, L., et *al.* (2014). Phage therapy in the food industry. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5, 327–349.
- Etebu, E., & Arikekpar, I. (2016). Antibiotics: classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*, 4, 90–101.
- Ewers, C., et *al.* (2012). Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals. *Veterinary Microbiology*, 156(3–4), 294–309.
- Galarce, N., et *al.* (2021). Bacteriophages against *Aeromonas hydrophila* biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 12, 562657.

- Garneau-Tsodikova, S., & Labby, K. J. (2016). Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics. *MedChemComm*, 7(1), 11–27.
- Gaudy, C., & Buxeraud, J. (2005). Antibiotiques : pharmacologie et thérapeutique. Collection Pharma.
- Harper, D. R., et *al.* (2014). Bacteriophages and biofilms. *Antibiotics*, 3(3), 270–284.
- Høiby, N., Ciofu, O., & Bjarnsholt, T. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(4), 322–332.
- Hombach, M., et *al.* (2021). The minimum inhibitory concentration of antibiotics: methods, interpretation, clinical relevance. *Pathogens*, 10(2), 165. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020165>
- Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
- INES, B., MESSAOUDA, D., & IMANE, H. (2020). Recherche et isolement des bactériophages et leur application sur les bactéries résistantes aux antibiotiques.
- ISO 20776-1:2019. Sensibilité in vitro des agents infectieux et évaluation des performances des dispositifs pour antibiogrammes — Partie 1 : méthode de référence de microdilution en bouillon. Organisation Internationale de Normalisation, Genève.
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 161–182.
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2010). The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 35–73.
- Joffin, C., & Leyral, G. (2006). Microbiologie technique. CRDP d'Aquitaine.
- Jorgensen, J. H., & Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49(11), 1749–1755.

- Jorgensen, J. H., Pfaller, M. A., Carroll, K. C., et al. (2015). Manual of clinical microbiology. ASM Press.
- Kassama, M., & Hamadi, S. (2013). Evaluation de la résistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries isolées à l'établissement hospitalier spécialisé de Constantine. Mémoire de Master, Microbiologie et Hygiène Hospitalière, Université des Frères Mentouri, Constantine.
- Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., & Hultgren, S. J. (2013). Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(4), a010306.
- Kregiel, D. (2014). *Enterobacter cloacae* — the emerging nosocomial pathogen with biofilm-forming ability. *Journal of Hospital Infection*, 86(3), 169–179.
- Labrie, S. J., et al. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, 8(5), 317–327.
- Lamis, N. (2025). Etude des *Pseudomonas* isolées de viandes dans la wilaya de Mila (Thèse de doctorat, Université Centre de Abdelhafid Boussouf, Mila).
- LAOUEDJ, D., & FLOUKIL, D. (2022). Formation du biofilm sur les lentilles de contact. Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.
- Larbi, H., & Retimi, H. (2023). Evaluation de la contamination du lait cru de vache par les entérobactéries (Thèse de doctorat, Université Ibn Khaldoun).
- Lebeaux, D., & Ghigo, J. M. (2012). Aux biofilms. *Médecine/Sciences*, 28, 727–739.
- Leverentz, B., et al. (2003). Phage and nisin applications on fresh-cut melon. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4519–4526.
- Livermore, D. M., & Winstanley, T. G. (2000). Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4), 557–590.
- Loc-Carrillo, C., & Abedon, S. T. (2011). Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, 1(2), 111–114.
- MacFaddin, J. F. (2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria (3e éd.). Lippincott Williams & Wilkins.

- Magiorakos, A. P., et *al.* (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281.
- McDevitt, S. (2009). Methyl Red and Voges-Proskauer test protocols. American Society for Microbiology (ASM) MicrobeLibrary.
- McDonnell, G., & Russell, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1), 147–179. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.1.147>
- Meguenni, N., et *al.* (2017). Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from raw meat in Algeria. *African Journal of Microbiology Research*, 11(12), 498–505.
- Mezali, L., & Hamdi, T. M. (2012). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from meat and meat products in Sétif, Algeria. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(6), 522–529.
- Mhaya, A. (2019). Analyse de la résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries et étude d'une potentielle voie alternative aux traitements antibiotiques (Thèse de doctorat, Université de Bordeaux ; Université de Sfax, Tunisie).
- Minogue, T. D., et *al.* (2004). AmpC beta-lactamases in *Serratia marcescens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(4), 1144–1149.
- MOUD, M. (2027). Formation du biofilm sur les matériaux à usage médical et stratégie de lutte. Ecole Nationale Polytechnique, Département Génie de l'Environnement.
- Moussa, N., & Moussaoui, F. Z. (2016). Recherche des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi dans les viandes de volaille (Thèse de doctorat, Université Larbi Tébessi, Tébessa).
- Murray, P. R., et al. (2007). *Manual of clinical microbiology* (9e éd.). ASM Press.
- Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 593–656.
- Nørrung, B., & Buncic, S. (2008). Microbial safety of meat in the European Union. *Meat Science*, 78(1–2), 14–24.

- Nychas, G. J. E., et *al.* (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, 78(1–2), 77–89.
- O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Review on Antimicrobial Resistance, HM Government, Londres.
- O'Toole, G. A. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (47), 2437. <https://doi.org/10.3791/2437>
- Pagès, J. M., et al. (2008). The porin and the permeating antibiotic. *Nature Reviews Microbiology*, 6(12), 893–903.
- Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 657–686.
- Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Carrasco, E., García, R. M., & Zurera, G. (2008). Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 19(3), 131–144.
- Piotrowska, M., & Popowska, M. (2015). Insight into the mobilome of *Aeromonas* strains. *Frontiers in Microbiology*, 6, 494.
- Pires, D. P., et *al.* (2017). Phage therapy as an alternative or complementary strategy to prevent and control biofilm-related infections. *Current Opinion in Microbiology*, 39, 48–56.
- Rahal, K., Benslimani, A., Tali-Maamar, H., Missoum, M., Abdoun, A., & Ammari, H. (2008). Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS (5e éd.). Alger.
- Rahal, K., Benslimani, A., Tali-Maamar, H., Missoum, M., Abdoun, A., & Ammari, H. (2011). Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS (Médecine Humaine et Vétérinaire, 6e éd.). Alger.
- Roberts, M. C. (2005). Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*, 245(2), 195–203.

- Sánchez-Romero, I., & Portillo, M. E. (2014). Heteroresistance to antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44(4), 291–295.
- Savado, M., & Boubkeir, Y. (2016). Isolement et étude de quelques entérobactéries pathogènes dans les eaux usées d'Oued Boumerzoug à Constantine. *Mémoire de Master, Microbiologie générale et biologie moléculaire, Université des Frères Mentouri de Constantine*, 51 p.
- SEBAI, I., & FARI, L. (2025). Etude des caractéristiques biotechnologiques des bactéries lactiques isolées à partir de produits laitiers algériens. *Université Saad Dahleb de Blida*.
- 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.
- Stewart, P. S., & Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, 358(9276), 135–138.
- Sulakvelidze, A., et al. (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), 649–659.
- Twort, F. W. (1915). An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *The Lancet*, 186(4814), 1241–1243.
- Uddin, T. M., Chakraborty, A. J., Khusro, A., Zidan, B. R. M., Mitra, S., Emran, T. B., Dhama, K., Ripon, M. K. H., Gajdács, M., Sahibzada, M. U. K., Hossain, M. J., & Koirala, N. (2021). Antibiotic resistance in microbes: history, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal of Infection and Public Health*, 14(12), 1750–1766. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., ... & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18), 5649–5654.
- Van Boeckel, T. P., et al. (2014). Global antibiotic consumption 2000 to 2010. *Lancet Infectious Diseases*, 14(8), 742–750.

- Vestby, L. K., et *al.* (2020). Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. *Antibiotics*, 9(2), 59.
- Warriner, K., & Namvar, A. (2009). What is the hysteria with *Listeria*? *Trends in Food Science & Technology*, 20(6–7), 245–254.
- Widad, A. B. E. D. L. A. Z. I. Z., & Rachida, L. L. (s.d.). Essai d'inhibition de la formation des biofilms chez les bactéries responsables d'infections nosocomiales : *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.
- World Health Organization. (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Genève : OMS.
- ZIADI, C., & CHATANE, I. (2017). Analyse phénotypique et quantification de la formation de biofilm par les bactéries d'intérêt médical. Université des Frères Mentouri, Constantine.
- Zohra, T. F. (2024). Identification des entérobactéries isolées des produits alimentaires d'origine animale (Thèse de doctorat).

PARTIE VII. ANNEXES

VII.1. Annexe 1 Milieu de culture

VII.1.1.1. 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
- 1L d'eau distille

VII.1.1.2. 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)
- 1L d'eau distille

VII.1.1.3. Bouillon Luria-Bertani (LB)

- 10 g/L de tryptone
- 5 g/L d'extrait de levure
- 10 g/L de chlorure de sodium
- 1L d'eau distille

VII.1.1.4. Milieu de Clark et Lubs

- 7 g/L de peptone
- 5 g/L de glucose
- 5 g/L de phosphate dipotassique (K_2HPO_4).
- 1L d'eau distille

VII.1.1.5. Eau peptonée

- 10 g/L de peptone
- 5 g/L de chlorure de sodium.
- 1L d'eau distille

VII.1.1.6. Eau physiologique stérile

- 9 g de chlorure de sodium (Na Cl)
- 1L d'eau distillée

VII.2. Annexe 3 Matériel

Matériel	Verrerie et outils	Réactifs
• Autoclave • Bain-marie • Balance électronique • Bec bunsen • Étuve microbiologique • Portoirs • Réfrigérateur • Vortex • Microscope • Four pasteur • Lecture de microplaque • micropipettes	• Boîtes de Petri • tubes à essai • pipettes Pasteur • anses de platine • embouts (0,1et 1mL) • spatules • béchers • flacons en verre • lames et lamelles • verres de montre • éprouvettes graduées • pinces • écouvillons stériles • microplaques96 puits	• Cristal violet 0,1% • Lugol • Alcool • Fuchsine • Disques d'oxydase • Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) • Réactif de Kovacs • Rouge de méthyle • Réactifs VP1 et VP2 • Réactif TDA • Réactifs nitrate1 et nitrate 2 • Disques d'antibiotiques • Éthanol 95% • Huile d'immersion • Eau distillée stérile • Glycérol stérile (15–20%)

VII.3. Annexes 3 Les étapes de coloration de Gram

Préparer un frottis bactérien sur une lame stérile, déposer une goutte d'ED sur la lame puis étaler une colonie isolée, puis laisser sécher à l'air libre, après on fait la coloration :

1. Coloration par le violet de gentiane ou cristal violet. Laissez agir pendant 1 minute, puis rincez à l'eau distillée
2. Mordançage au lugol : recouvrez de lugol et laissez agir pendant 1 minute, puis rincez à l'eau distillée
3. Décolorer avec de l'alcool-éthanol pendant 15 à 30 secondes, puis rincer immédiatement à l'eau distillée. Cette étape est critique : une décoloration insuffisante donne de faux Gram positifs, une décoloration excessive donne de faux Gram négatifs.
4. Recouvrir le frottis avec la solution de safranine ou de fuchsine pendant 30 à 60 secondes. Puis Rincer à l'eau distillée et séchez la lame.
5. Observez avec une goutte d'huile à immersion objectif 100(grossissement $\times 1000$).

Interprétation des résultats :

- Bactéries Gram positives : Apparaissent en violet foncé.
- Bactéries Gram négatives : Apparaissent en rose/rouge (couleur de la safranine).