

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



**UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCCEN**

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE DE LA TERRE ET  
DE L'UNIVERS

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à  
l'environnement « LAMAABE »

**THESE**

Présentée par M<sup>elle</sup> CHELAGHMA Widad

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat 3<sup>ème</sup> Cycle en Microbiologie

Isolement et caractérisation des bactéries à Gram négatif  
résistantes aux antibiotiques isolées de quelques produits  
alimentaires et étude de leur sensibilité *vis-à-vis* de certains  
produits naturels

Soutenue le 16/11/2023 Devant le jury :

Président :	Barka Mohammed Salih	Professeur	Université de Tlemcen.
Directeur de thèse :	Loucif Lotfi	Professeur	Université de Batna 2.
Co-directeur de thèse :	Bendahou Mourad	Professeur	Université de Tlemcen.
Examineurs :	Abbouni Bouziane	Professeur	Université de Sidi Bel Abbès.
	Rebiahi Sid Ahmed	Professeur	Université de Tlemcen.
	Khadir Abdelmounaim	Docteur	Université d'Oran 1.

Année universitaire : 2023-2024

# DÉDICACE

*À mes très chers parents*

*Maman, Papa,*

*Ce travail qui vous est personnellement dédié soit le fruit de vos  
sacrifices, votre patience et votre confiance et le modeste*

*témoignage de mon profond*

*Respect et mon plus grand amour.*

*À mes très chères sœurs : KHAOULA, AMEL, NAWEL*

*À mes anges AKRAM, ABD EL RAHMEN, ISHAK ET*

*HYDAYA*

*À mes frères*

*Je ne peux qu'exprimer à travers ses lignes tous mes sentiments  
d'amour envers vous.*

*Je vous souhaite beaucoup de bonheur et de réussite.*

*Merci d'être toujours présents à mes côtés et de m'avoir  
continuellement encouragé.*

# *REMERCIEMENTS*

*Je remercie Dieu pour sa bonté, pour le courage, la force, la volonté et la patience qu'il m'a donné, afin de surmonter toutes les difficultés lors de la réalisation de ce travail de thèse.*

*Je voudrais dans un deuxième temps remercier, mon directeur de thèse Pr. Lotfi LOUCIF pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses précieux conseils qui ont été indispensables à la conduite de cette recherche. Ainsi que mon co-directeur de thèse, Pr. Mourad BENDAHOU, pour son aide*

*Je remercie également les membre du jury, chacun par son nom : Pr. BARKA Mohamed Salih, président, Pr. REBLIAHI Sid Ahmed, Pr. ABBOUNI Bouziane, et Dr. Khadir Abdelmounaim pour avoir accepté d'examiner ce travail et de l'enrichir avec vos commentaires et votre expérience.*

*Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance aux personnes suivantes, pour leur aide dans la réalisation de cette étude :*

*Dr. BENBOUZA Amel, Médecin chef du laboratoire central de lutte contre le cancer (CLCC), Pr. HASSAINE Hafida, directrice du laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à l'environnement (LAMAABE), Dr. Bendjama Esma. Dr. BENMOUSSA Mohammed Tahar pour m'avoir aidé dans la réalisation des tests d'activité. Pr. ROLAIN Jean-Marc pour sa contribution dans la réalisation de certaines parties moléculaires au sein de l'unité de recherche « microbes évolution, phylogénie et infection*

*(MEPHI) à l'institut hospitalier universitaire méditerranée infection  
(IHU) de Marseille, France.*

*A mes collègues et amies, Dr. BOUAZIZ AMIRA, KOUDA AICHA  
et MAAMRI RABAB pour leur aide.*

*Merci à toute personne qui, de près ou de loin, ont contribué à  
l'aboutissement de ce travail.*

# Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

**Introduction**

**Synthèse bibliographique**

**Chapitre 1 : Antibiotiques et antibiorésistance chez les bactéries à Gram négatif**

<b>1. Définition des antibiotiques.....</b>	<b>5</b>
<b>2. Les critères de classification des antibiotiques.....</b>	<b>5</b>
2.1. Classification selon le spectre d'activité.....	5
2.2. Classification selon la modalité d'action.....	5
2.2.1. Antibiotiques à effet bactériostatique.....	5
2.2.2. Antibiotique à effet bactéricide.....	5
2.3. Classification selon la structure chimique.....	6
2.3.1. Les $\beta$ -lactamines.....	6
2.3.1.1. Classification des $\beta$ -lactamines.....	6
2.3.2. Les aminosides.....	8
2.3.3. Les quinolones.....	9
2.3.4. Les polypeptides.....	11
2.4. Classification des antibiotiques selon le mode d'action.....	11
2.4.1. Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne.....	12
2.4.1.1. Les $\beta$ -lactamines.....	12
2.4.2. Antibiotiques ciblant la membrane cellulaire .....	13

2.4.2.1. Les polymyxines.....	13
2.4.3. Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines.....	14
2.4.3.1. Les aminosides.....	14
2.4.4. Antibiotiques inhibant la synthèse des acides nucléiques.....	15
2.4.4.1. Les quinolones.....	15
<b>3. Définition de la résistance aux antibiotiques.....</b>	<b>17</b>
<b>4. Le support génétique du phénomène d'antibiorésistance.....</b>	<b>17</b>
4.1. La résistance naturelle.....	17
4.2. La résistance acquise.....	18
<b>5. Mécanismes de résistance.....</b>	<b>18</b>
5.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique.....	18
5.1.1. Les $\beta$ -lactamines .....	19
5.1.1.1. Histoire de l'évolution de $\beta$ -lactamases.....	20
5.1.2. Mécanisme de résistance aux aminosides.....	23
5.1. 3. Mécanisme de résistance aux quinolones.....	24
5.2. Modification de la cible des antibiotiques.....	25
5.2.1. Mécanisme de résistance à la colistine.....	25
5.2. 3. Mécanisme de résistance aux quinolones.....	26
5.2. 3. Mécanisme de résistance aux aminosides.....	27
5.3. Modification de la perméabilité cellulaire.....	27

## **Chapitre 2 : les conservateurs naturels des produits alimentaires**

<b>1. Les légumes et les fruits.....</b>	<b>29</b>
<b>2. Les poissons.....</b>	<b>29</b>
<b>3. Les méthodes de conservation des produits alimentaires .....</b>	<b>30</b>
3.1. Agents antimicrobiens d'origine microbienne.....	31

3.1.1. Endophytes .....	31
3.1.2. Probiotiques.....	32
3.1.3. Bactériocines.....	32
3.2. Agents antimicrobiens d'origine végétale.....	33
3.2.1. Les huiles essentielles.....	34
3.2.1.1. Huile essentielle de la plante <i>Artemisia campestris</i> .....	35
3.2.1.2. Huile essentielle de la plante <i>Origanum vulgare</i> .....	37
3.2.1.3. Huile essentielle de la plante <i>Brocchia cinerea</i> .....	38
3.3. Agents antimicrobiens d'origine animale.....	39
3.3.1. Les peptides antimicrobiens.....	39
3.3.1.1. Lysozyme.....	40
3.3.1.2. Lactoperoxydase.....	40
3.3.1.3. Chitosane.....	41
3.3.1.4. Lactoferrine.....	41
3.3.1.5. Pleurocidine.....	41
3.3.1.6. Défensines .....	42
3.3.1.7. Lipides.....	42
 <b>Matériel et Méthodes</b>	
<b>1. Échantillonnage.....</b>	<b>43</b>
<b>2. Isolement des bactéries résistantes aux <math>\beta</math>-lactamines et à la colistine.....</b>	<b>45</b>
2.1. Traitement et pré-enrichissement des échantillons.....	45
2.2. Enrichissement sélectif.....	46
2.3. Isolement sélectif .....	46
<b>3. Identification des souches isolées.....</b>	<b>47</b>
3.1. Système VITEK-2.....	47
3.1.1. Préparation de la suspension bactérienne.....	48

3.1.2. Inoculation .....	48
3.1.3. Scellement des cartes et incubation.....	48
3.1.4. Analyse des résultats.....	48
3.2. MALDI-TOF-MS.....	49
3.2.1. Préparation de la matrice.....	49
3.2.2. Dépôt de l'échantillon sur la cible MALDI.....	49
3.2.3. Insertion de la cible et lancement de l'identification par MALDI-TOF MS.....	49
<b>4. Étude de la sensibilité aux antibiotiques.....</b>	<b>50</b>
4.1. Méthode de la diffusion en milieu gélosé.....	50
4.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice de la colistine.....	51
<b>5. Détection phénotypique de <math>\beta</math>-lactamase.....</b>	<b>52</b>
5.1. Test de synergie.....	52
5.2. Test à la cloxacilline.....	52
5.3. Carba NP test modifié.....	53
5.4. Test d'inhibition à l'EDTA.....	53
<b>6. Méthode de conjugaison.....</b>	<b>54</b>
<b>7. Détection moléculaire des gènes d'antibiorésistance.....</b>	<b>54</b>
7.1. PCR en temps réel.....	54
7.1.1. Extraction d'ADN bactérien.....	55
7.1.2. Réaction de polymérisation en temps réel.....	55
7.1.3. Réaction en chaîne par polymérase (PCR) standard.....	55
7.1.4. Électrophorèse et séquençage des produits de PCR standard.....	56
7.1.5. Purification des produits de PCR.....	56
7.1.6. PCR BigDye.....	56
7.1.7. Purification sur gel Séphadex.....	57

7.1.8. Séquençage et analyse des séquences.....	57
<b>8. Typage par séquençage des souches d'<i>E. coli</i>.....</b>	<b>60</b>
<b>9. Analyse statistique.....</b>	<b>62</b>
<b>10. Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles.....</b>	<b>62</b>
10.1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides.....	62
<b>Résultats et discussion</b>	
1. Isolement des bactéries résistantes aux $\beta$ -lactamines et à la colistine.....	65
2. Identification des espèces de BGN isolées .....	70
3. Étude de la sensibilité aux antibiotiques des BGN isolées.....	80
4. Caractérisation phénotypique et moléculaire des gènes de résistance.....	95
5. Typage par séquençage.....	108
6. Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles.....	110
<b>Conclusion.....</b>	<b>119</b>

## **Références bibliographiques**

## **Résumés**

## Liste des abréviations

**AAC** : acétyltransférases.

**ACC** : Ambler class C

**ACT** : AmpC Type.

**ADN** : acide désoxyribonucléique.

**ANT** : adénylation nucléotidyltransférases.

**APH** : phosphotransférases.

**ARNr** : acide ribonucléique ribosomique.

**BCC** : bouillon cœur-cerveille.

**BGN** : bactérie à Gram négatif.

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

**CMB** : concentration minimale bactéricide.

**CMI** : concentration minimale inhibitrice.

**CMY** : céphamycinase.

**CASFM** : comité de l'antibiogramme de la société Française de microbiologie.

**CTAB** : cetyltriméthylammonium bromide

**CTX-M** : cefotaximase-Muenchen.

**C2G** : céphalosporines de deuxième génération.

**C3G** : céphalosporines de troisième génération.

**DHA** : Dharhan hospital.

**EDTA** : éthylène diamine tétra-acétique.

**EMA** : enzyme modifiant les aminoglycosides.

**EUCAST** : European committee on antimicrobial susceptibility testing

**F** : forward (amorce sens)

**FDA** : food and drug administration.

**FOX** : céfoxitinase.

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

**gyrA** : l'ADN gyrase A.

**gyrB** : l'ADN gyrase B.

**HPLC** : high performance liquid chromatography

**IMI** : imipenemase.

**IMP** : imipenem-resistant *Pseudomonas*.

**kDa** : kilodalton.

**KPC** : carbapénémase productrice de *K. Pneumoniae*.

**L-Ara4N** : 4-amino-4-désoxy-L-arabinose.

**LPS** : lipopolysaccharide.

**MALDI-TOF-MS** : Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation-Time-of-Flight-Mass Spectrometry.

**MBL** : métallo- $\beta$ -lactamase.

**MCR** : mobilized colistin resistance

**MH** : Mueller-Hinton

**MIR** : Miriam hospital.

**MOX** : moxalactamase.

**m/z** : masse/charge

**MPOC** : maladie pulmonaire obstructive chronique.

**NDH-2** : oxydoréductases NADH-quinone du type II.

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

**NmcA** : non-métallo carbapenemase class A.

**OXA** : oxacillinase.

**PCR** : polymerase chain reaction

**PEA** : phosphoéthanolamine.

**PEtn** : phosphoéthanolamine.

**PLP** : protéines liées à la pénicilline.

**PSM** : poste de sécurité microbiologique.

**Qnr** : quinolone résistance.

**qPCR** : PCR quantitative

**R** : reverse (amorce antisens)

**SHV** : sulfi hydroxyl variable.

**SME** : *Serratia marcescens* enzyme.

**SPSS**: statistical package for the social sciences

**ST** : séquence type.

**TBE** : tris-borate-EDTA

**TEM** : TEMoniera.

**TFA** : acide trifluoroacétique.

**TSI** : triple sugar iron.

**UV** : ultra-violet

**VIM** : verona integron-encoded.

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> La structure chimique des $\beta$ -lactamines.....	8
<b>Figure 2.</b> Structure chimique des aminosides.....	9
<b>Figure 3.</b> Structure chimique des quinolones.....	10
<b>Figure 4.</b> Structure chimique de la colistine.....	11
<b>Figure 5.</b> Les différents modes d'action des antibiotiques.....	12
<b>Figure 6.</b> Le mécanisme d'action de $\beta$ -lactamines sur le peptidoglycane.....	13
<b>Figure 7.</b> Mécanisme d'action des aminoglycosides contre les bactéries à Gram négatif.....	15
<b>Figure 8.</b> Mécanisme d'action des quinolones.....	17
<b>Figure 9.</b> Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram négatif.....	19
<b>Figure 10.</b> Modification chimique des aminoglycosides par des enzymes modifiant les aminoglycosides (EMA) .....	24
<b>Figure 11.</b> Les différents mécanismes de résistance à la colistine.....	26
<b>Figure 12.</b> <i>Artemisia campestris</i> L.....	36
<b>Figure 13.</b> <i>Origanum vulgare</i> .....	37
<b>Figure 14.</b> Structures chimiques des principaux constituants de l'huile essentielle d' <i>Origanum vulgare</i> .....	38
<b>Figure 15.</b> Parties aériennes de <i>Brocchia cinerea</i> au stade de floraison.....	39
<b>Figure 16.</b> Localisation des différents sites d'échantillonnage avec le nombre des différents types d'échantillons prélevés.....	44
<b>Figure 17.</b> Les différentes étapes d'isolement des BGN résistantes.....	47
<b>Figure 18.</b> Pourcentage d'isolement des BGN résistantes aux $\beta$ -lactamines et/ou à la colistine selon le type d'aliments.....	65
<b>Figure 19.</b> Pourcentage de contamination (positivité) des aliments testés.....	66

<b>Figure 20.</b> Pourcentage de contamination des BGN résistantes aux $\beta$ -lactamines et/ou la colistine en fonction du type des légumes.....	67
<b>Figure 21.</b> Pourcentage de contamination des BGN résistantes aux $\beta$ -lactamines et/ou la colistine en fonction du type des fruits.....	68
<b>Figure 22.</b> Pourcentage de contamination en fonction du site de prélèvement (surface ou interne) au niveau des différents échantillons de fruits par les BGN résistantes aux $\beta$ -lactamines et/ou la colistine.....	68
<b>Figure 23.</b> Pourcentage d'identification des espèces isolées à partir des légumes.....	70
<b>Figure 24.</b> Pourcentage des espèces identifiées dans l'ensemble des prélèvements des fruits.....	73
<b>Figure 25.</b> Pourcentage d'identification des espèces isolées à partir des poissons.....	75
<b>Figure 26.</b> Classification de souches identifiées selon la partie d'isolement.....	77
<b>Figure 27.</b> Clustérisation des espèces bactériennes isolées à partir de chaque type de produits alimentaires en utilisant l'application heatMap.....	78
<b>Figure 28.</b> Pourcentage d'antibiorésistance des souches fermentaires isolées à partir des échantillons de légumes.....	81
<b>Figure 29.</b> Concentration minimale inhibitrice de la colistine déterminée par la méthode des microdilutions pour certains isolats.....	81
<b>Figure 30.</b> Pourcentage de la résistance aux antibiotiques des BGN non fermentaires isolées à partir des échantillons de légumes.....	82
<b>Figure 31.</b> Résultats d'antibiogramme et de l'identification des isolats fermentaires isolés à partir des échantillons de légumes et regroupés à l'aide de la version 4_6_2 du logiciel MultiExperimentViewer (MEV). ....	83
<b>Figure 32.</b> Résultats d'antibiogramme, et de l'identification des isolats non fermentaires regroupés à l'aide du logiciel MultiExperiment Viewer (MEV) version 4_6_2. ....	83
<b>Figure 33.</b> Pourcentage de résistance aux antibiotiques des souches fermentaires isolées à partir des prélèvements de fruits.....	85

<b>Figure 34.</b> Résultats d'antibiogramme des isolats fermentaires isolés à partir des échantillons de fruits et regroupés à l'aide de la version 4_6_2 du logiciel MultiExperimentViewer (MEV).....	86
<b>Figure 35.</b> Pourcentage de la résistance aux antibiotiques des BGN non fermentaires isolées à partir de fruits.....	86
<b>Figure 36.</b> Résultats d'antibiogramme des isolats non fermentaires isolés à partir des échantillons de fruits et regroupés à l'aide de la version 4_6_2 du logiciel MultiExperimentViewer (MEV).....	87
<b>Figure 37.</b> Pourcentage de la résistance aux antibiotiques des BGN fermentaires isolées à partir des échantillons de poissons.....	91
<b>Figure 38.</b> Résultats d'antibiogramme des isolats fermentaires isolés à partir des échantillons de poissons et regroupés à l'aide de la version 4_6_2 du logiciel MultiExperimentViewer (MEV). ....	92
<b>Figure 39.</b> Pourcentage de la résistance aux antibiotiques des BGN non fermentaires isolées à partir des échantillons de poissons.....	92
<b>Figure 40.</b> Résultats d'antibiogramme des isolats non fermentaires isolés à partir des échantillons de poissons et regroupés à l'aide de la version 4_6_2 du logiciel MultiExperimentViewer (MEV).....	93
<b>Figure 41.</b> Résultats de la caractérisation phénotypique des mécanismes de résistance aux antibiotiques détectés chez des BGN isolées.....	96
<b>Figure 42.</b> Résultats de la recherche des gènes codant pour des carbapénémases et <i>mcr</i> par PCR en temps réel.....	97
<b>Figure 43.</b> Résultats de la recherche des gènes BLSE par PCR en temps réel. ....	98
<b>Figure 44.</b> Images des gels de migration des produits de PCR standard ciblant les gènes codant pour des carbapénémases et <i>mcr-1</i> . ....	98
<b>Figure 45.</b> Arbre phylogénétique basé sur la séquence génétique concaténée des MLST de nos isolats d' <i>E. coli</i> producteurs de carbapénémase ou hébergeait le gène <i>mcr</i> avec ceux positifs pour ces gènes présents dans le monde entier et isolés à partir de légumes.....	110

**Figure 46.** Les CMI de l'huiles essentielle de la plante *Brocchia cinerea* vis-à-vis certaines souches isolées.....113

**Figure 47.** Les CMI de l'huiles essentielle d'*Artemisia campestris* et *Origanum vulgare* vis-à-vis certaines souches isolées.....118

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Classification d'Ambller des $\beta$ -lactamases.....	22
<b>Tableau 2.</b> Le nombre des différents types d'échantillons prélevés.....	43
<b>Tableau 3.</b> Correspondance des scores pour MALDI-TOF-MS .....	50
<b>Tableau 4.</b> Les deux gammes d'antibiotiques testés contre les souches isolées .....	51
<b>Tableau 5.</b> Les séquences des différentes amorces et sondes de PCR en temps réel et standard utilisées dans cette étude .....	57
<b>Tableau 6.</b> Les différentes amorces de PCR utilisées pour MLST <i>E. coli</i> .....	60
<b>Tableau 7.</b> Les informations relatives des plantes utilisées.....	63
<b>Tableau 8.</b> Les concentrations minimales inhibitrices de la colistine des souches isolées à partir des échantillons de légumes et fruits.....	87
<b>Tableau 9.</b> Les concentrations minimales inhibitrices de la colistine des souches isolées à partir des échantillons de poissons.....	93
<b>Tableau 10.</b> Les différents gènes codant pour des $\beta$ -lactamases et <i>mcr</i> détectés dans cette étude à partir des échantillons de légumes.....	99
<b>Tableau 11.</b> Les différents gènes codant pour des $\beta$ -lactamases détectés dans cette étude à partir des échantillons de fruits.....	102
<b>Tableau 12.</b> Les différents gènes codant pour des $\beta$ -lactamases et <i>mcr</i> détectés dans cette étude à partir des échantillons de poissons.....	105
<b>Tableau 13.</b> CMI et CMB des souches testées <i>vis-à-vis</i> de l'huile essentielle de <i>Brocchia cinerea</i> .....	111
<b>Tableau 14.</b> CMI et CMB des souches testées <i>vis-à-vis</i> de l'huile essentielle d' <i>Artemisia campestris</i> .....	115
<b>Tableau 15.</b> CMI et CMB des souches testées <i>vis-à-vis</i> de l'huile essentielle d' <i>Origanum vulgare</i> .....	117

# INTRODUCTION

En parallèle de l'ancienneté du phénomène de l'antibiorésistance dans l'environnement comme une résultante des activités d'antagonisme et compétition entre les microorganismes dans différentes niches écologiques confirmée par plusieurs études, la mise en évidence de ce phénomène dans le domaine médical a eu lieu après la découverte de la pénicilline en 1928 par Alexander Fleming suivie de son utilisation en antibiothérapie (**Parsonage *et al.* 2017; Bush 2018**). L'utilisation de la pénicilline a permis de réduire considérablement les taux élevés de mortalités causés par les maladies infectieuses, mais malheureusement peu après cette utilisation, des souches résistantes sont apparues déclenchant une guerre continue d'antibiorésistance contre chaque molécule, génération, classe ou famille d'antibiotique découverte et introduite pour arriver au point de rendre inefficace les antibiotiques de dernier recours (carbapénèmes, colistine et la vancomycine) (**Parsonage *et al.* 2017; Anyanwu *et al.* 2020; Elshamy & Aboshanab 2020**).

La résistance aux antibiotiques comme phénomène qui a toujours été lié au milieu hospitalier représente actuellement un vrai problème de santé à l'interface homme-animal-environnement. La prise en charge de ce problème nécessite une contribution et une collaboration multidisciplinaire, multisectorielle et coordonnée répondant aux directives du concept une seule santé (One Health) recommandé par l'organisation mondiale de la santé (**Lammie & Hughes 2016; Aslam *et al.* 2021**). Ce problème à extension sans limite assurée par différents vecteurs et moyens de transmission potentiels tels que les eaux usées, les oiseaux migrateurs, la monnaie et les produits alimentaires, a pu atteindre différents domaines à savoir ; le domaine médical, pharmaceutique, agrovétérinaire et agroalimentaire avec de graves répercussions sanitaires et économiques (**Touati *et al.* 2017; Bendjama *et al.* 2020; Drali *et al.* 2018; Loucif *et al.* 2022a; Loucif *et al.* 2022b**).

Les produits alimentaires peuvent être contaminés à n'importe quelle étape de transformation du champ à l'assiette par des bactéries résistantes aux antibiotiques leur permettant de jouer un rôle potentiel comme un des maillons de la chaîne de transmission de l'antibiorésistance (bactéries et déterminants génétiques). A côté de cette transmission, ces bactéries menacent la sécurité du consommateur à travers l'atteinte de la qualité marchande (problèmes d'altération et de conservation) et sanitaire des aliments en question, particulièrement lorsque ces derniers sont consommés crus ou mal cuits (**Founou *et al.* 2016; Chelaghma *et al.* 2021**).

L'utilisation anarchique, abusive et inappropriée des antibiotiques sont parmi les causes majeures de la sélection des bactéries résistantes aux antibiotiques, où les milieux communautaires et hospitaliers forment les principaux réservoirs en parallèle de leur utilisation intensive comme agents thérapeutiques, métaphylaxiques, prophylactiques et comme facteurs de croissance chez les animaux dans le cadre de l'augmentation de la production d'animaux destinés à l'alimentation, de l'aquaculture et de l'agriculture (**Founou et al. 2016**).

La consommation de produits frais pour une alimentation saine a augmenté et a gagné en popularité à l'échelle internationale. Par conséquent, la consommation de produits frais contaminés, tels que les légumes et les fruits, a été associée à un nombre croissant d'éclotions de maladies d'origine alimentaire (**Hölzel et al. 2018; Chelaghma et al. 2021**). De plus, les produits frais représentent une voie d'exposition humaine aux bactéries résistantes et ont souvent servi comme un réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques. L'ingestion de bactéries résistantes aux antibiotiques pose un vrai problème de santé car elles peuvent atteindre l'intestin qui pourrait jouer le rôle d'un environnement favorable à la dynamique de diffusion et d'échange des gènes de résistance potentiellement via les éléments mobiles (**Smet et al. 2011; Djordjevic et al. 2013**). Ceci facilite leur dissémination ultérieure dans l'environnement à travers les selles et les eaux usées domestiques.

En outre, les poissons et les produits à base de poisson ont été aussi impliqués dans des éclotions associées à des bactéries pathogènes. En plus des agents pathogènes, les bactéries sont considérées comme la principale cause de détérioration des poissons (**Sheng & Wang 2021**). La consommation des poissons contaminés ou infectés pourrait avoir des répercussions sur la santé publique et pour les prédateurs marins concernés (**Sellera et al. 2018**). De plus, la présence de bactéries multi-résistantes dans les produits de la mer constitue non seulement un risque pour la santé humaine, mais peut également entraîner la propagation de déterminants génétiques de l'antibiorésistance à d'autres bactéries à intérêt clinique (**Sanjit Singh et al. 2017**).

En plus du problème de dissémination de l'antibiorésistance via les aliments, les mécanismes responsables de ce phénomène peuvent être acquis suite à une pression de sélection exercée par des composés chimiques autres que les antibiotiques comme les pesticides et les métaux utilisés à des fins de conservation alimentaire. Ceci a été déjà confirmé par les travaux de Pöppe *et al.* et Seiler *et al.* où ils ont prouvé que l'utilisation

généralisée des pesticides et des métaux peut déclencher la co-sélection des gènes de résistance aux antibiotiques dans le domaine de l'agriculture et d'élevage, respectivement (**Seiler & Berendonk 2012; Pöppe et al. 2020**). Il est donc nécessaire de signaler que ces composés peuvent être une source à ne pas négliger d'émergence des bactéries résistantes aux antibiotiques.

Dans le cadre de la conservation alimentaire on trouve plusieurs types de moyens de lutte antimicrobienne (physique ou chimique) qui peuvent être utilisés seuls ou en association. Parmi les additifs chimiques ceux issus de la synthèse artificielle et qui présentent plusieurs inconvénients sanitaires et organoleptiques en plus de leur inefficacité contre les souches résistantes. Face à ces inconvénients, des alternatives naturelles sont souhaitées à savoir les métabolites bioactifs comme les huiles essentielles issues des plantes médicinales en raison de leurs activités antimicrobiennes, antioxydantes, immunomodulatrices et de conservation élevée ainsi que leur apport organoleptique (**Tiwari et al. 2009; Tongnuanchan & Benjakul 2014**).

Les huiles essentielles sont des liquides concentrés, de mélanges complexes de composés volatils pouvant être extraites de plusieurs organes végétaux. En outre, leurs utilisations ont fait l'objet d'une attention croissante en tant qu'additifs naturels pour la prolongation de la durée de conservation des produits alimentaires (**Tongnuanchan & Benjakul 2014**). Les huiles essentielles et leurs principaux composés ont également été appliqués comme agents antimicrobiens pour la conservation des fruits et des légumes y compris : poire, orange et laitue. Pour parvenir à un traitement plus efficace des produits alimentaires en utilisant les huiles essentielles, plusieurs technologies ont été proposées à savoir : nanoémulsions, nanocapsules, vapeurs, films comestibles en association avec différents polymères (incorporées dans l'emballage « emballage actif ou intelligent »); ou en association avec d'autres technologies de préservation telles que les basses températures, l'emballage sous atmosphère modifiée et l'irradiation (**Tongnuanchan & Benjakul 2014; Rodriguez-Garcia et al. 2016**).

A l'échelle mondiale, peu de rapports ont été publiés sur l'isolement des BGN résistantes aux C3G, aux carbapénèmes et à la colistine à partir de prélèvements de légumes, de fruits et de poissons (**Lv et al. 2018; Brahmi et al. 2018; Hoa et al. 2022**). En Algérie, cinq études ont exploré la résistance aux antibiotiques dans des échantillons de légumes et de poissons dans la ville de Bejaia. Deux d'entre ces études ont rapporté la présence d'isolats de

*K. pneumoniae* producteurs d'OXA-48 et de BLSE (CTX-M-15, SHV-101, SHV-28 et OXA-1) à partir de prélèvement de légumes (Touati *et al.* 2017; Mesbah Zekar *et al.* 2020). Tandis que les trois autres études effectuées sur des prélèvements de poissons ont signalé la détection des entérobactéries et d'*Acinetobacter baumannii* producteurs de BLSE (CTXM-15) et d'OXA-23, respectivement (Brahmi *et al.* 2016; Brahmi *et al.* 2018; Dib *et al.* 2018).

C'est pour cette raison que nous nous sommes intéressés dans ce travail de thèse de doctorat à la recherche des BGN résistantes aux céphalosporines de troisième génération et/ou carbapénèmes et/ou à la colistine à partir de différents produits alimentaires (légumes, fruits et poissons) commercialisés au niveau de la ville de Batna et la caractérisation phénotypique et moléculaire des mécanismes d'antibiorésistance en question ainsi que l'étude de l'efficacité antibactérienne de certaines huiles essentielles issues de plantes aromatiques et médicinales contre ces bactéries.

La partie expérimentale de cette thèse a été réalisée en deux étapes, où la première étape phénotypique (échantillonnage, isolement, et caractérisation) a été réalisée entre le laboratoire pédagogique de microbiologie et le laboratoire de recherche de biotechnologie des molécules bioactives et de la physiopathologie cellulaire (LBMBPC) de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université de Batna 2. La deuxième étape de caractérisation moléculaire a été effectuée entre le laboratoire de l'équipe du Pr. Jean-Marc Rolain travaillant sur les agents antimicrobiens et résistance, surveillance et stratégies thérapeutiques de l'unité de recherche « microbes évolution, phylogénie et infection, (MEPHI) » à l'institut hospitalier universitaire méditerranée infection (IHU) de Marseille, France et le laboratoire central de biologie médicale (LCBM) du centre de lutte contre le cancer (CLCC) de Batna.

**SYNTHÈSE**

**BIBLIOGRAPHIQUE**

## CHAPITRE 1

# ANTIBIOTIQUES ET ANTIBIORESISTANCE CHEZ LES BACTERIES A GRAM NEGATIF

## 1. Définition des antibiotiques

Un antibiotique fait référence au médicament utilisé pour traiter les infections bactériennes. Ce sont des substances produites naturellement par des champignons et d'autres micro-organismes comme les bactéries ou synthétisées chimiquement (semi-synthétique ou synthétique). Ils sont capables d'inhiber la croissance d'une bactérie ou de la tuer à des faibles concentrations (**Bentley & Bennett 2003; Smith *et al.* 2015**).

## 2. Les critères de classification des antibiotiques

La classification des antibiotiques peut se faire selon plusieurs critères : l'origine, la modalité d'action, le spectre d'activité, la structure chimique et le mode d'action des antibiotiques (**Brink *et al.* 2014**).

### 2.1. Classification selon le spectre d'activité

Les antibiotiques peuvent être classés selon leur spectre d'activité en deux classes ; les antibiotiques à spectre étroit qui sont actifs uniquement sur certaines bactéries à Gram positif ou négatif. Tandis que, les antibiotiques à large spectre touchent un plus large éventail de bactéries (la majorité des bactéries à Gram positif et négatif) (**Brink *et al.* 2014**).

### 2.2. Classification selon la modalité d'action

Un antibiotique peut agir selon deux modalités différentes qui correspondent à des degrés dans l'intensité de son action : la bactériostase et la bactéricidie.

#### 2.2.1. Antibiotiques à effet bactériostatique

Un antibiotique bactériostatique inhibe la croissance et la multiplication des bactéries. Lors de l'exposition à un agent bactériostatique, la division des cellules dans une population sensible va être arrêtée. Toutefois si l'agent est éliminé, les cellules se multiplient de nouveau (**Brink *et al.* 2014**).

#### 2.2.2. Antibiotique à effet bactéricide

Un antibiotique bactéricide inhibe non seulement la croissance des cellules bactériennes mais également, déclenche des voies à l'intérieur de la cellule qui conduisent à la mort cellulaire. Les actions d'un antibiotique bactéricide sont irréversibles (**Brink *et al.* 2014**).

## 2.3. Classification selon la structure chimique

Les antibiotiques sont classés en plusieurs familles sur la base de leur structure chimique dont les plus importantes dans le domaine clinique sont : la famille des  $\beta$ -lactamines, les aminosides, les quinolones, les polypeptides et les phénicoles (**Aminov 2017**).

### 2.3.1. Les $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -lactamines demeurent à l'heure actuelle la famille d'antibiotiques la plus importante, aussi bien par le nombre et la diversité des molécules utilisables que par leurs utilisations pour traiter diverses infections bactériennes (**Cavallo 2004; Li et al. 2018**). Cette large utilisation est liée principalement à leur faible toxicité ainsi qu'à leur effet bactéricide (**Robin et al. 2012**). Mais peuvent être associées à des réactions allergiques (**Paradis et al. 2009**).

#### 2.3.1.1. Classification des $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -lactamines qu'elles soient d'origine naturelle, semi-synthétique ou synthétique sont classées en fonction de la nature du noyau  $\beta$ -lactame entrant dans leur structure de base. En se basant sur ce cycle, cinq sous-familles ont été développées : les pénicillines (pénames), les céphalosporines (céphèmes), les monobactames, les carbapénèmes (pénèmes) et les inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases (oxapénames) (**Cavallo 2004; Li et al. 2018**). La structure chimique des différentes classes des  $\beta$ -lactamines est présentée dans la **figure 1**.

#### Les pénicillines (pénames)

Les pénicillines sont caractérisées par une structure commune associant deux cycles condensés : le cycle thiazolidine et le cycle  $\beta$ -lactame auquel est accrochée une chaîne latérale différente d'une pénicilline à l'autre. La structure bicyclique  $\beta$ -lactame-thiazolidine distingue les pénicillines des autres  $\beta$ -lactamines (**Haouichat et al. 2002**).

#### Les céphalosporines (céphèmes)

La structure chimique de base des céphalosporines est constituée de deux noyaux ; un noyau  $\beta$ -lactame et un noyau dihydrothiazine au lieu d'un noyau thiazolidine (**Paradis et al. 2009**). La classification des céphalosporines repose beaucoup plus sur le spectre d'activité que sur la structure chimique commune. Cette classe compte cinq générations (**Mehta & Sharma 2016**).

### Les monobactames

La classes des monobactames se caractérise par la présence du noyau monocyclique, azétidine lié au cycle  $\beta$ -lactame, seul l'aztréonam est prescrit (**Cavallo 2004**).

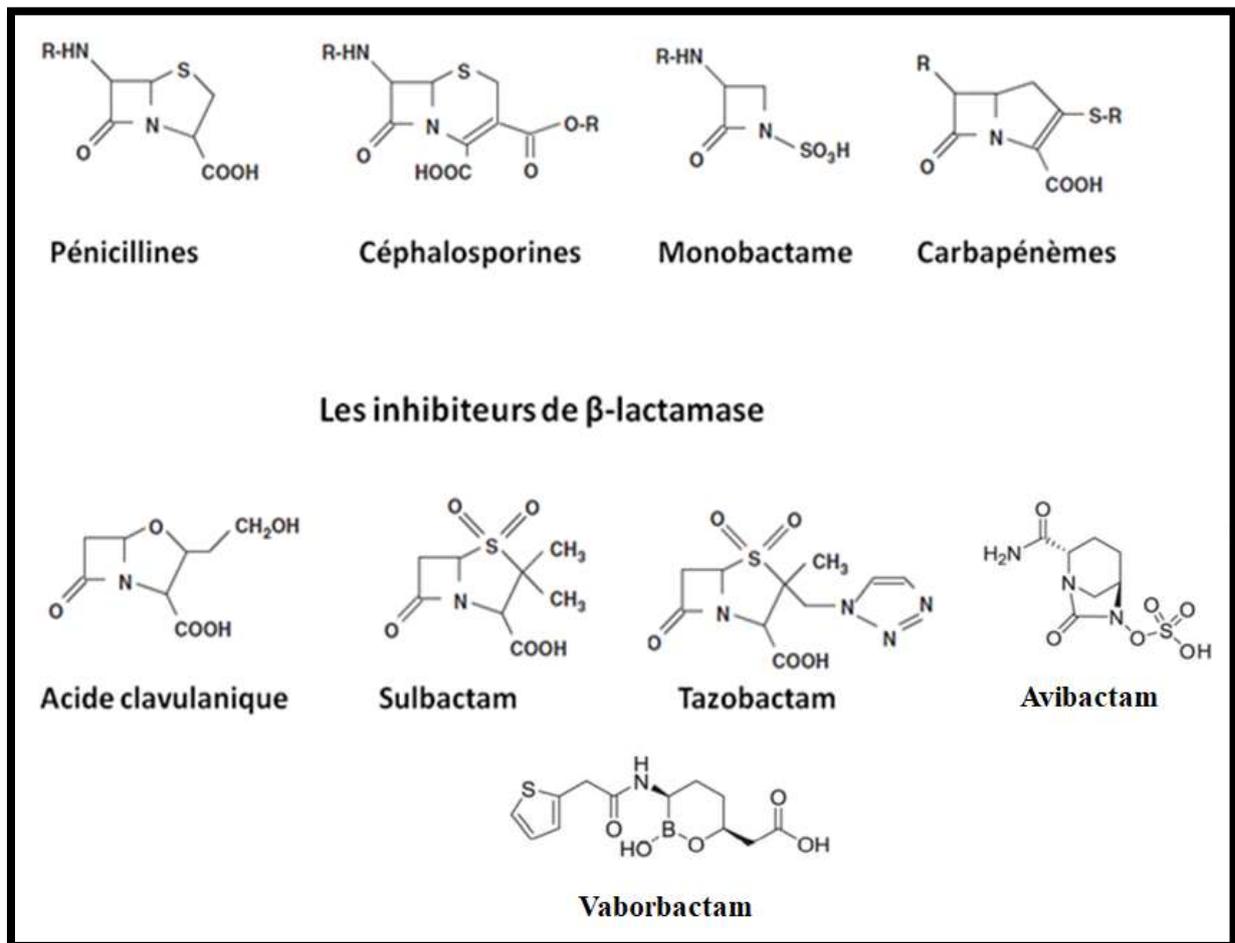
### Les carbapénèmes (pénèmes)

Les carbapénèmes demeurent les  $\beta$ -lactamines dont le spectre d'activité est le plus large. Les molécules de cette classe d'antibiotiques sont utilisées pour traiter de très nombreuses infections liées aux espèces d'entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* (**Touati & Mairi 2020**). Les carbapénèmes sont des  $\beta$ -lactamines qui dérivent de la molécule de thiénamycine, isolée en 1979 à partir d'actinomycètes. Le cycle de base des carbapénèmes diffère de celui des pénicillines par la présence d'une double liaison et l'absence d'atomes de soufre dans le cycle (**Nordmann 2010**).

### Les inhibiteurs de $\beta$ -lactamases (oxapénames)

Les inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases ont une activité antibactérienne intrinsèque faible, bien qu'ils partagent le cycle  $\beta$ -lactame qui est caractéristique des  $\beta$ -lactamines. Toutefois, ces molécules sont des inhibiteurs de différentes  $\beta$ -lactamases sécrétées par la bactérie (**Nordmann et al. 2012**).

Le premier inhibiteur de  $\beta$ -lactamase (inhibiteurs classiques) découvert était l'acide clavulanique (en 1972), suivi du sulbactam (en 1978) et du tazobactam (en 1984). Ces dernières années, de nouveaux groupes d'inhibiteurs sont apparus, et certains ont déjà été approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) en prolongeant l'activité antimicrobienne de certaines  $\beta$ -lactamines. Les principaux nouveaux groupes sont les diazobicyclooctanes (DBO) (l'avibactam et le relebactam ont été approuvés par la FDA) et les dérivés de l'acide boronique à savoir le vaborbactam qui est actuellement le seul inhibiteur approuvé (**Vázquez-Ucha et al. 2020**).



**Figure 1.** La structure chimique des  $\beta$ -lactamines (Nordmann *et al.* 2012; Vázquez-Ucha *et al.* 2020)

### 2.3.2. Les aminosides

L'histoire de la famille d'aminoglycoside remonte à 1943 avec la découverte de la streptomycine. Les molécules de cette famille sont des antibiotiques d'origine naturelle ou semi-synthétique. Elles sont produites par diverses espèces bactériennes du genre *Micromonospora* et *Streptomyces*. Celles qui sont dérivées des espèces du genre *Streptomyces* reçoivent le suffixe « mycine », alors que le suffixe « micin » est attribué aux dérivées du genre *Micromonospora* (Farouk *et al.* 2015).

Les aminoglycosides sont des antibiotiques à effet bactéricide avec un large spectre d'activité contre les bactéries à Gram négatif et à Gram positif, y compris celles qui sont multi-résistantes. Dans l'ensemble, ils ont une activité puissante contre les membres de la famille d'entérobactéries, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis* et sont moins actifs contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter* spp. Les membres du groupe ont aussi une activité puissante contre certaines bactéries à Gram positif telle que *Staphylococcus* spp. (Serio *et al.*

2018), y compris *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) et à la vancomycine ainsi que certains *Mycobacterium* spp. (Serio *et al.* 2018).

La structure chimique des aminoglycosides est caractérisée par la présence d'un anneau d'aminocyclitol 6-carbone (2-deoxystreptamine dans de nombreux cas) lié par des liaisons glycosidiques à deux ou plusieurs dérivés de sucre. La tobramycine, la gentamicine et l'amikacine sont les principaux aminosides utilisés en thérapeutique humaine, alors que l'apramycine et la fortimicine sont réservées au domaine vétérinaire (Lambert 2012; Farouk *et al.* 2015). La structure chimique des principales molécules d'aminoglycosides est résumée dans la figure 2.

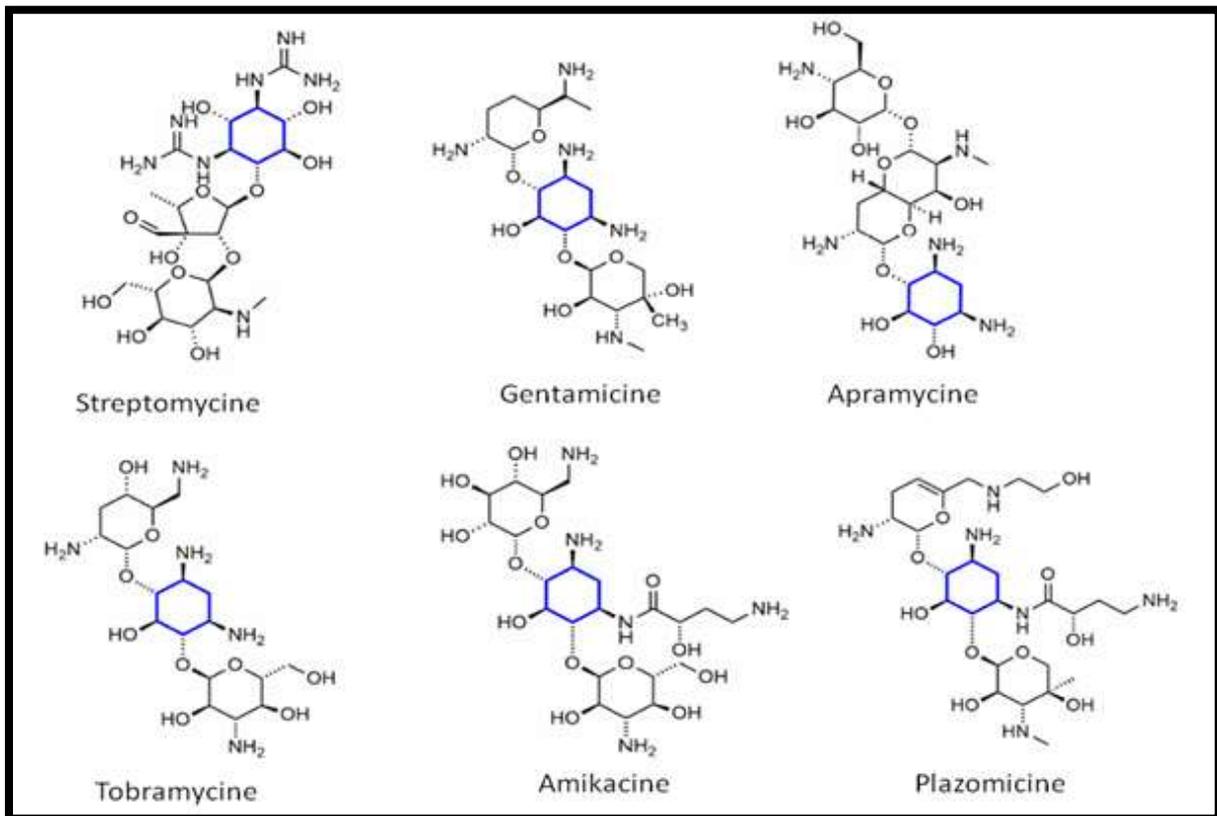


Figure 2. Structure chimique des aminosides (Fair & Tor 2014).

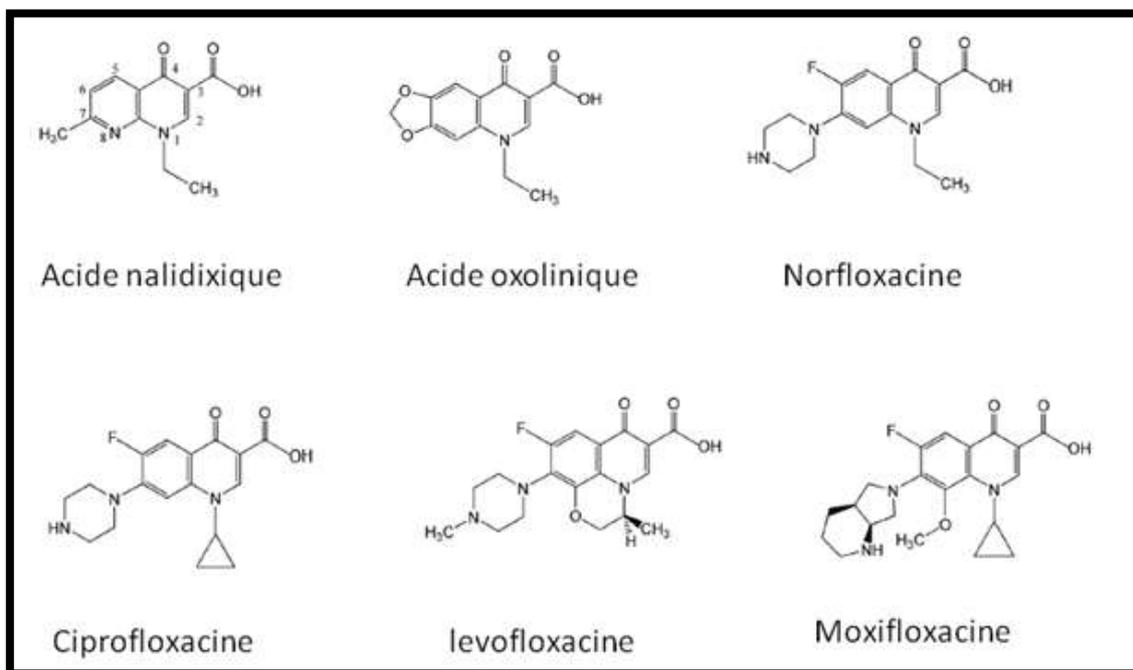
### 2.3.3. Les quinolones

Les quinolones sont des antibiotiques synthétiques plus couramment prescrits dans le monde pour le traitement de diverses infections bactériennes (Aldred *et al.* 2014). Initialement, les quinolones étaient principalement utilisées pour le traitement des infections par des bactéries à Gram négatif, mais elles ont ensuite été modifiées afin d'améliorer leurs propriétés pharmacocinétiques et étendre leur spectre d'activité antibactérien, leur permettant

d'être efficaces contre une grande variété des bactéries à Gram négatif et positif (**Correia et al. 2017**).

Les quinolones sont des molécules dérivées de l'acide nalidixique qui a été isolé par George Lesher et ses collègues en 1962 comme sous-produit de la synthèse de la chloroquine pour le traitement des infections urinaires non compliquées et peut être considéré comme la première génération de quinolones ( **Kohanski et al. 2010; Aldred et al. 2014; Correia et al. 2017**). Cependant, les quinolones ont été considérés comme une classe de médicament largement utilisée à partir des années 1980 avec le développement d'une deuxième génération, les fluoroquinolones, connues par leur activité considérablement améliorée (**Kohanski et al. 2010; Correia et al. 2017**).

Les fluoroquinolones sont le résultat d'une modification apportée à la structure des quinolones par l'introduction d'un fluor en sixième position et d'un substituant d'anneau majeur à la position sept. Le premier représentant de cette deuxième génération était la norfloxacin, cependant, la ciprofloxacin fût la première fluoroquinolone qui a montré une activité importante pour les autres systèmes autres que les voies urinaires (**Correia et al. 2017**). La structure chimique de quelques composées de quinolones est présentée dans la **figure 3**.

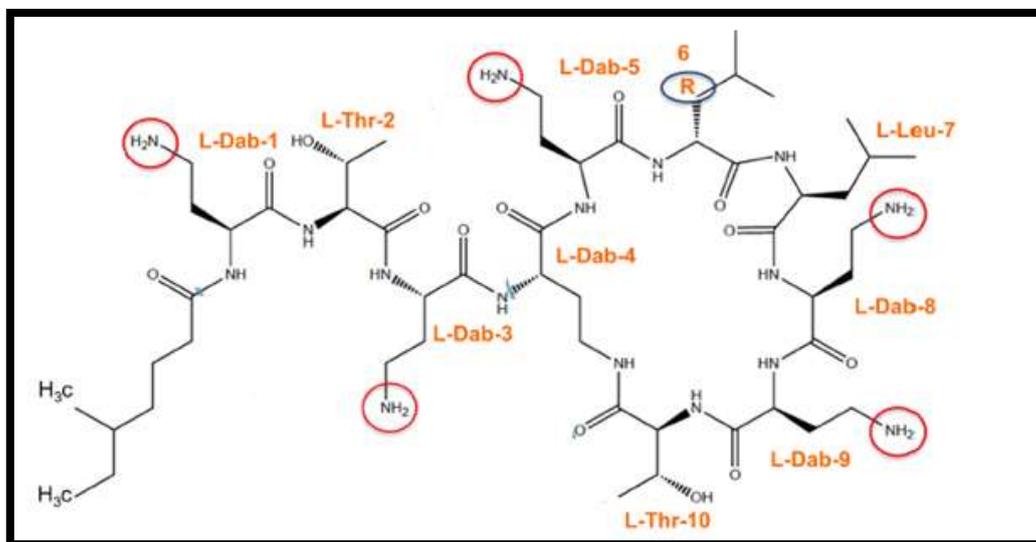


**Figure 3.** Structure chimique de certaines quinolones (**Cheng et al. 2013**).

### 2.3.4. Les polypeptides

Les polymyxines sont des antibiotiques à effet bactéricide produites par *Bacillus* sp. et sont classés en 5 groupes, polymyxine (A, B, C, D et E), mais seulement deux formes (polymyxine B et polymyxine E) ont été largement utilisées en antibiothérapie (**Olaitan et al. 2014; Loho & Dharmayanti 2015**). La polymyxine E (colistine) a été décrite initialement en 1947 comme métabolite secondaire produite par *Paenibacillus polymyxa* et elle est couramment utilisée dans la médecine humaine et vétérinaire ainsi que dans le domaine d'élevage (facteur de croissance). Bien que, dans les années 1970, son utilisation a été interrompue en raison de sa toxicité neurologique et rénale. Elle a été ensuite réintroduite en milieu clinique dans les années 2000 en tant qu'option thérapeutique de dernier recours pour le traitement des infections causées par les bactéries à Gram négatif multi-résistantes, y compris celles résistantes aux carbapénèmes (**Lima et al. 2019; Mendes Oliveira et al. 2019**).

La colistine est un polypeptide composé d'un anneau cyclique heptapeptide avec trois groupements amines chargés positivement, une portion de la queue tripeptidique avec deux groupements amines chargés positivement et une queue de la chaîne acyl hydrophobe (**Rhouma et al. 2016; Caniaux et al. 2017**). La structure chimique de la colistine est présentée dans la **figure 4**.

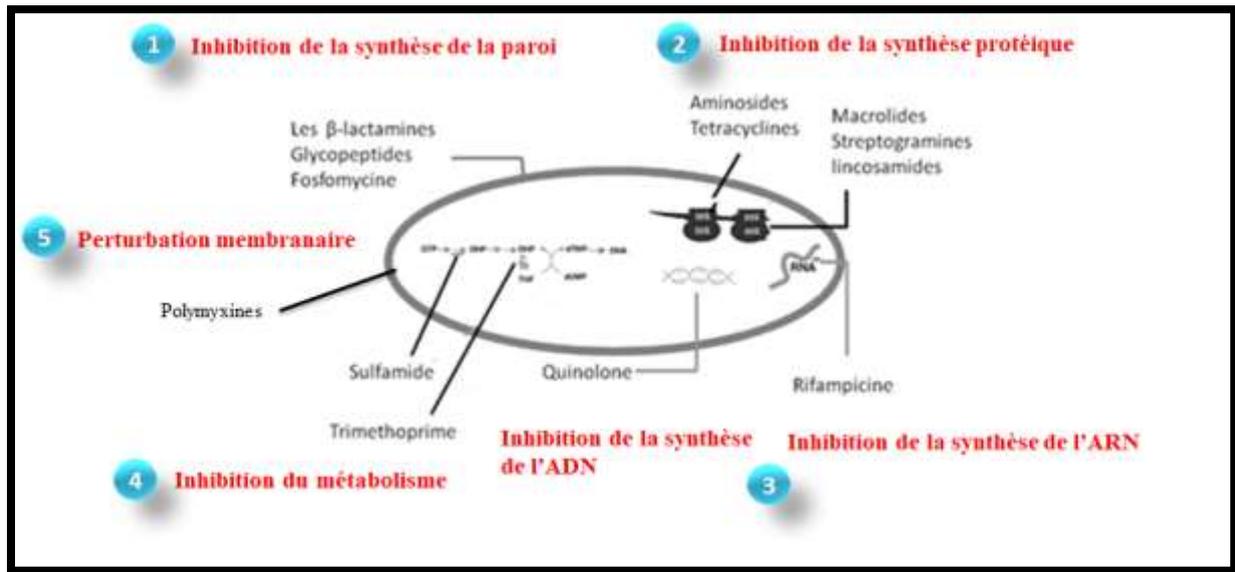


**Figure 4.** Structure chimique de la colistine (**Rhouma et al. 2016**).

### 2.4. Classification des antibiotiques selon le mode d'action

La plupart des antibiotiques utilisés pour le traitement des infections bactériennes peuvent être regroupés en fonction de leur mode d'action en 5 principaux groupes (inhibition

de la synthèse de la paroi, la synthèse protéique, la synthèse d'acides nucléiques et du métabolisme et la perturbation membranaire) résumés dans la **figure 5 (Tenover 2006)**.



**Figure 5.** Les différents modes d'action des antibiotiques (Singh & Barrett 2006).

#### 2.4.1. Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne

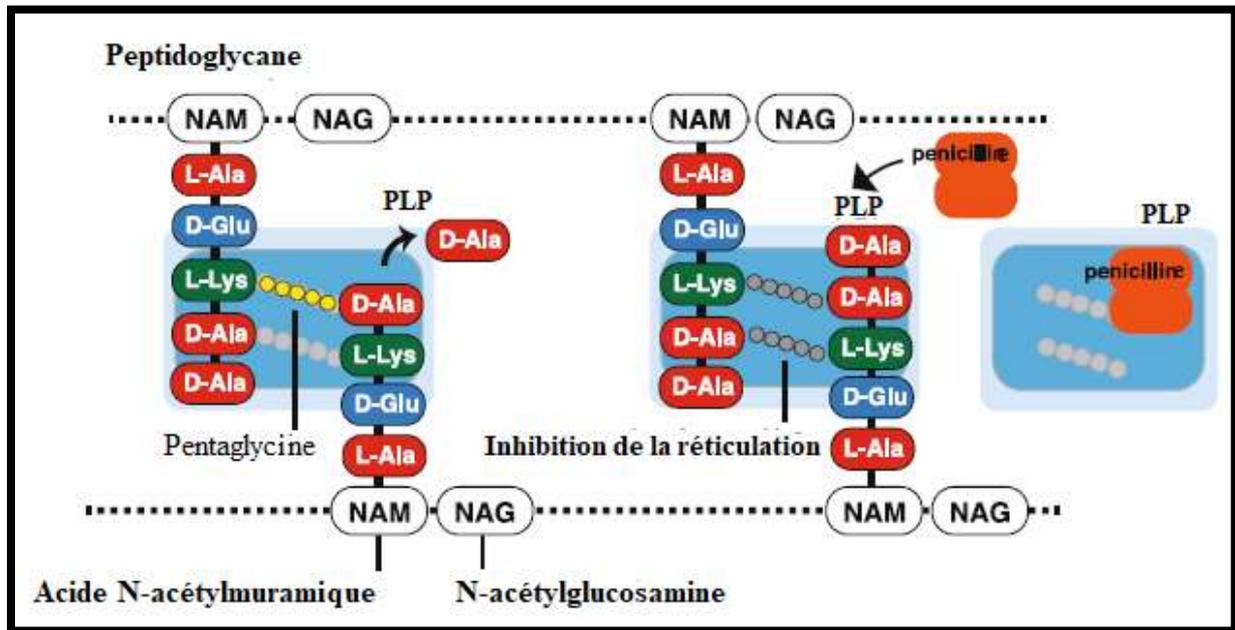
Plusieurs familles d'antibiotiques prennent pour cible des enzymes intervenant dans la synthèse de la paroi bactérienne dont ; les  $\beta$ -lactamines, les glycopeptides et la fosfomycine.

##### 2.4.1.1. Les $\beta$ -lactamines

L'effet antibactérien des  $\beta$ -lactamines est le résultat de l'inhibition du mécanisme de réplication des bactéries par inhibition de la dernière étape de transpeptidation indispensable pour la synthèse du peptidoglycane médiée par des enzymes transpeptidases, connues sous le nom de protéines liées à la pénicilline (PLP) (Bush 2018; Elshamy & Aboshanab 2020; Sawa *et al.* 2020). Bien que les PLP diffèrent structurellement en fonction des espèces bactériennes, leur mécanisme d'inhibition est identique (Bush & Bradford 2020).

La structure des  $\beta$ -lactamines est étroitement liée à celle du dimère alanine D-alanyl-D-alanine (les résidus d'acides aminés terminaux du peptidoglycane), cette similitude structurale permet à ces antibiotiques de reconnaître et de se lier d'une manière irréversible au site actif de l'enzyme bactérienne PLPs, conduisant à l'inhibition des réactions de transpeptidation (réticulation) de la couche du peptidoglycane; ceci perturbe à son tour la synthèse de la paroi bactérienne (Doi & Paterson 2015). La réaction de réticulation est assurée par la formation d'une liaison covalente entre le résidu de sérine dans le centre actif du PLP et le groupement carboxyle produit par clivage hydrolytique de l'acide aminé D-

alanine (Sawa *et al.* 2020). La mort cellulaire bactérienne résulte de l'activité continue des autolysines, ainsi, de l'association entre ce phénomène d'autolyse continue et l'inhibition de la biosynthèse de la paroi cellulaire (Elshamy & Aboshanab 2020). Le mécanisme d'action des  $\beta$ -lactamines est présenté dans la **figure 6**.



**Figure 6.** Le mécanisme d'action des  $\beta$ -lactamines sur le peptidoglycane (Sawa *et al.* 2020).

#### 2.4.2. Antibiotiques ciblant la membrane cellulaire

La membrane cellulaire des bactéries à Gram négatif est une structure indispensable pour leur vitalité. Mais, il existe certains antibiotiques qui peuvent modifier la perméabilité de cette membrane et désorganiser sa structure membranaire c'est le cas des polymyxines.

##### 2.4.2.1. Les polymyxines

Les membres de la famille des polymyxines telle que la colistine sont des antibiotiques cationiques qui ont une action bactéricide en agissant sur la membrane externe des bactéries à Gram négatif chargée négativement (Oliveira *et al.* 2019). La cible initiale de la colistine est le lipopolysaccharide (LPS) et plus précisément le lipide A situé dans la membrane externe. Ce dernier joue un rôle majeur dans la perméabilité membranaire. L'interaction électrostatique entre la région cationique de la colistine composée des résidus de l'acide diamino-butyrique avec les groupes phosphates chargés négativement du lipide A permet de remplacer les ions du magnésium et du calcium précédemment liés au groupement phosphorique. Le déplacement des cations bivalents ( $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ ) qui sont indispensables pour le maintien du LPS conduit à la déstabilisation du lipide A et à l'augmentation de la

perméabilité de la membrane conduisant à la mort bactérienne (**Lima *et al.* 2019; Kai & Wang 2020**).

Le deuxième mécanisme d'action de la colistine est l'inhibition de l'activité de l'enzyme respiratoire cruciale, les oxydoréductases NADH-quinone du type II (NDH-2) dans la membrane cellulaire bactérienne (**Kai & Wang 2020**).

### 2.4.3. Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines

Quatre classes d'antibiotiques sont concernées : les tétracyclines, les macrolides, les phénicolés et les aminosides (**Sánchez-Borges *et al.* 2013**). À l'exception des aminoglycosides, toutes les autres classes d'antibiotiques qui inhibent la synthèse des protéines, y compris le chloramphénicol, la clindamycine, tétracyclines, les macrolides, et les oxazolidinones sont des antibiotiques à effet bactériostatiques. L'activité bactéricide des aminoglycosides est liée au mode de son passage à l'intérieur de la cellule bactérienne (**Fair & Tor 2014**).

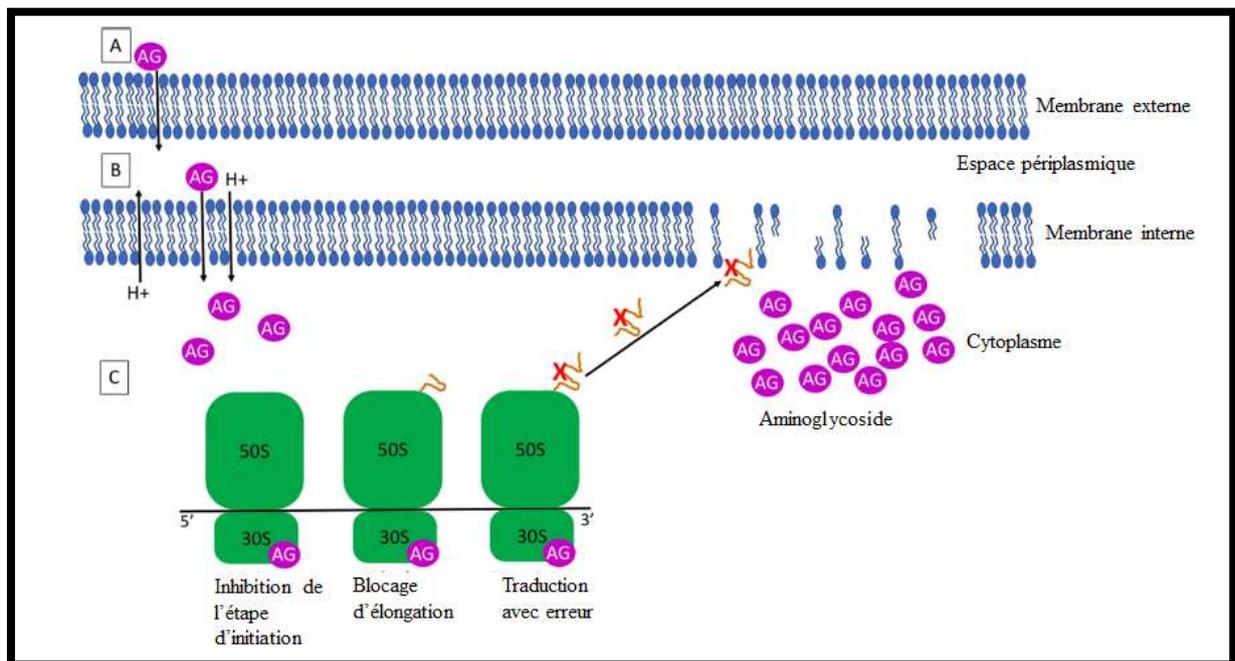
#### 2.4.3.1. Les aminosides

Le principal mécanisme d'action des aminoglycosides est l'inhibition des étapes clés de la synthèse des protéines bactériennes. Ces antibiotiques sont des molécules polycationiques et hydrophobes (généralement avec un poids moléculaire de ~450 à 600 dalton), qui pénètrent dans la cellule bactérienne par un mécanisme spécifique. Les molécules d'aminoglycosides chargées positivement se lient par une liaison électrostatique avec les composants situés à la surface de la cellule bactérienne et qui sont chargés négativement, cette étape est appelée la phase de liaison ionique. Pour les bactéries à Gram négatif, cela inclut la liaison au lipopolysaccharide (LPS) et aux phospholipides présents dans la membrane externe tandis que, chez les bactéries à Gram positif, dépourvues du LPS, cela implique la liaison aux phospholipides et à l'acide teichoïque (**figure 7, A**) (**Serio *et al.* 2018**). Cette réaction entraîne un déplacement des cations divalents et une augmentation de la perméabilité des molécules d'aminoglycosides dans l'espace périplasmique (**Fair & Tor 2014; Serio *et al.* 2018**).

La deuxième phase de l'absorption des aminoglycosides nécessite une force motrice du proton qui pourrait être bloquée par des inhibiteurs du transport d'électrons et de la phosphorylation oxydative. Ce qui permet le passage d'un petit nombre de molécules d'aminoglycoside dans le cytoplasme par un mécanisme consommant de l'énergie (**figure 7, B**) (**Fair & Tor 2014; Serio *et al.* 2018**). Ces molécules agissent au niveau du ribosome bactérien en se liant à la sous-unité ribosomale 30S le plus souvent au site A de l'ARNr 16S

et interfèrent avec la synthèse des protéines, particulièrement en perturbant le processus de la traduction des ARNm (**figure 7, C**) (**Baba Ahmed-Kazi & Arlet 2014; Fair & Tor 2014**).

Les protéines mal traduites sont supposées causer des dommages au niveau de la membrane cytoplasmique à travers la création de canaux membranaires non spécifiques facilitant ainsi l'entrée d'un nombre important de molécules d'aminoglycosides. Au fur et à mesure que ces molécules s'accumulent dans la cellule, les erreurs de traduction s'accroissent. Ce processus aboutit à la destruction bactérienne rapide qui est dépendante de la concentration en aminoglycosides (**Serio et al. 2018**). Un schéma explicatif du principal mécanisme d'action des aminoglycosides est présenté dans la **figure 7**.



**Figure 7.** Mécanisme d'action des aminoglycosides contre les bactéries à Gram négatif (**Serio et al. 2018**).

#### 2.4.4. Antibiotiques inhibant la synthèse des acides nucléiques

Deux familles d'antibiotiques sont concernées : les quinolones et les rifampines (**Aminov 2017**).

##### 2.4.4.1. Les quinolones

Les quinolones sont des antibiotiques qui agissent sur les acides nucléiques précisément l'acide désoxyribonucléique (ADN) en inhibant l'activité de deux enzymes clés ; la topoisomérase bactérienne du type II (ou ADN gyrase) et la topoisomérase IV, qui sont impliquées dans la modulation du super-enroulage chromosomique nécessaire pour la synthèse de l'ADN, la transcription et la division cellulaire. Afin de préserver l'intégrité

génomique au cours de ces processus, l'ADN gyrase et la topoisomérase IV forment des liaisons covalentes entre les résidus de la tyrosine du site actif et l'extrémité 5' du brin de l'ADN clivé, ce qui permet la formation des complexes enzyme-ADN clivé connus sous le nom de complexes de clivage (**Correia et al. 2017; Bush et al. 2020**). En raison du positionnement de l'ADN gyrase avant le complexe de réplication de l'ADN et après la topoisomérase IV, il apparaît que l'interaction des quinolones avec l'ADN gyrase permet une inhibition plus rapide de la réplication d'ADN qu'avec la topo isomérase IV (**Bush et al. 2020**).

Puis, les quinolones interfèrent avec ce processus critique en se liant d'une manière réversible à ces complexes de clivage. Cette liaison permet d'augmenter ainsi la concentration d'équilibre des complexes de clivage en bloquant physiquement la réparation des cassures des brins de l'ADN. La formation du complexe quinolone-topoisomérase-ADN provoque des collisions avec la machinerie et la fourche de réplication, transformant ces cassures transitoires en cassures permanentes, ce qui entraîne une inhibition de la synthèse de l'ADN, en conduisant immédiatement à la bactériostase (à des faibles concentrations de quinolones) et éventuellement à la mort cellulaire (à des concentrations létales) (**Correia et al. 2017**). À des concentrations deux fois supérieures à la concentration minimale inhibitrice (CMI), les bactéries sont tuées après une nuit de traitement à la quinolone; alors qu'à des concentrations de 5 à 10 fois supérieures à la CMI, les bactéries meurent après quelques heures d'exposition à la quinolone (**Bush et al. 2020**). Le mécanisme d'action des quinolones est illustré dans la **figure 8**.

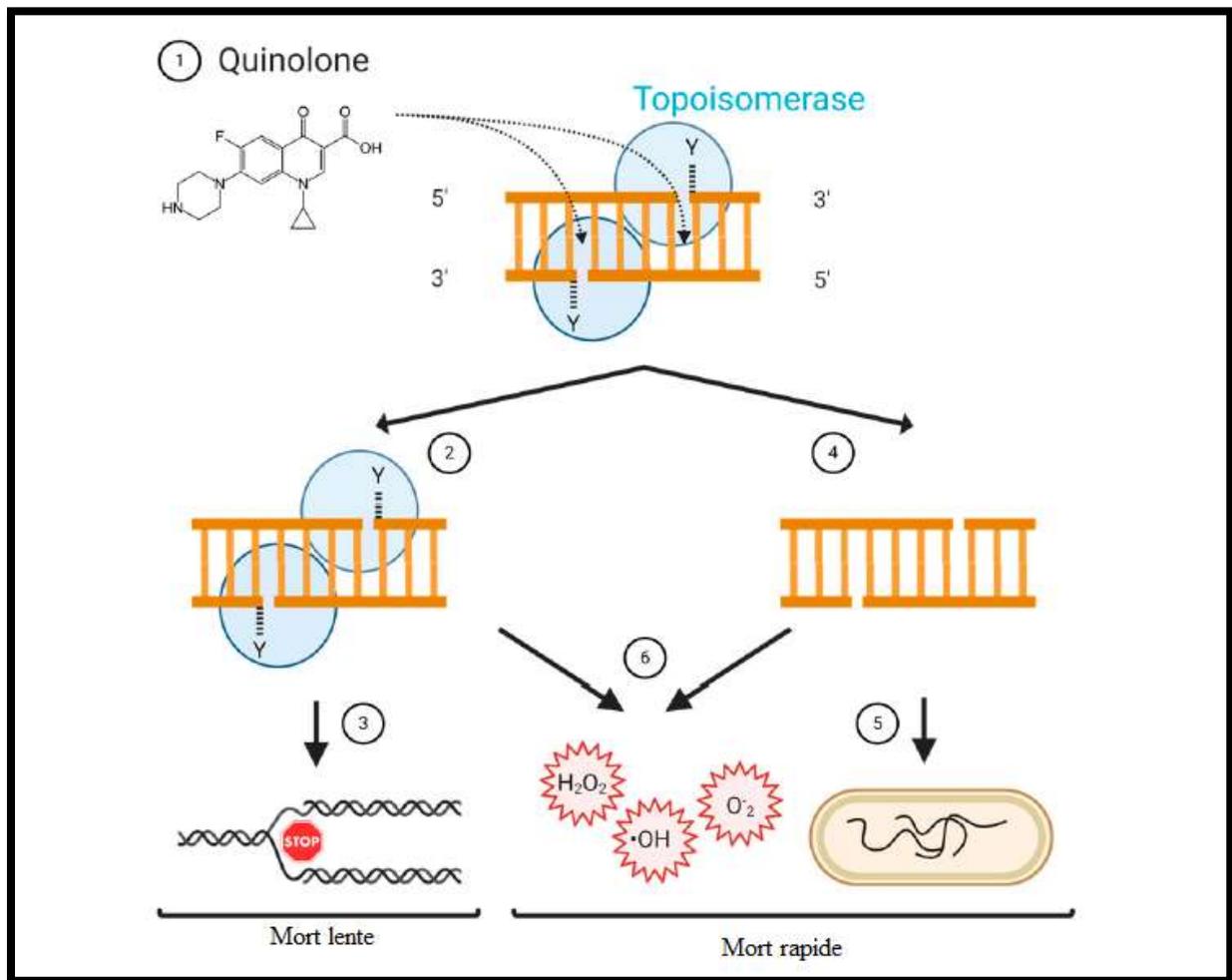


Figure 8. Mécanisme d'action des quinolones (Bush *et al.* 2020).

### 3. Définition de la résistance aux antibiotiques

Il existe plusieurs définitions du phénomène de l'antibiorésistance. Celles qui sont les plus fréquemment employées se fondent sur des critères microbiologiques (résistance *in vitro*) ou sur des critères cliniques (résistance *in vivo*). Selon les critères microbiologiques, une souche bactérienne est considérée résistante à un antibiotique lorsqu'elle peut croître en présence d'une concentration minimale inhibitrice (CMI) plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches sauvages de la même espèce (Carle 2009).

### 4. Le support génétique du phénomène d'antibiorésistance

En fonction du support génétique, il existe deux grands types de résistance aux antibiotiques : la résistance intrinsèque (naturelle) et la résistance acquise.

#### 4.1. La résistance naturelle

Une résistance naturelle (intrinsèque) peut être définie lorsque toutes les souches d'une même espèce sont résistantes à un antibiotique, et elle a le plus souvent comme support

génétique le chromosome bactérien (Normark & Normark 2002). Ce type de résistance peut être dû à l'absence de la cible (l'absence de la paroi chez les mycoplasmes leur conférant une résistance aux  $\beta$ -lactamines) ou à une imperméabilité pour un antibiotique (résistance à la vancomycine chez les bactéries à Gram négatif assurée par leur membrane externe) (Pehrsson *et al.* 2013).

#### 4.2. La résistance acquise

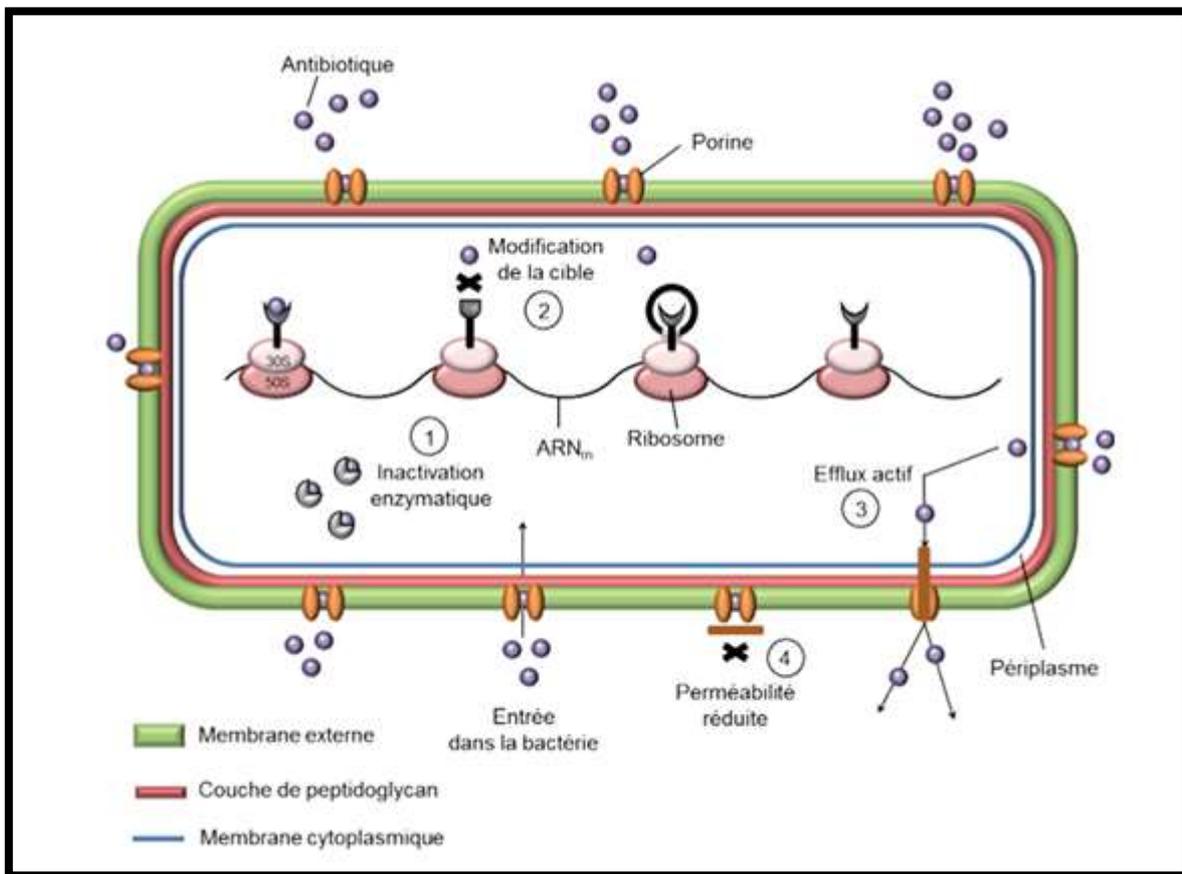
La résistance acquise survient lorsque seules quelques souches d'une même espèce normalement sensibles à un antibiotique deviennent résistantes. Cette résistance peut être due à des mutations affectant des gènes présents sur le chromosome ou à l'acquisition de gènes étrangers portés par des éléments mobiles via plusieurs mécanismes parmi lesquels : la conjugaison, transduction et la transformation (Alanis 2005; Munita & Arias 2016).

#### 5. Mécanismes de résistance

Indépendamment de la manière avec laquelle le gène est transféré à une bactérie, le développement de la résistance aux antibiotiques se produit lorsque le gène est capable de s'exprimer et produire un effet biologique remarquable, ce qui entraîne la perte d'activité de l'antibiotique (Alanis 2005). Ces mécanismes biologiques peuvent être classés en quatre principaux mécanismes incluant : l'inactivation enzymatique, modification de la cible, diminution de la perméabilité et l'augmentation d'efflux (Nordmann *et al.* 2012; Munita & Arias 2016). Les différents mécanismes de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram négatif sont résumés dans la **figure 9**.

##### 5.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique

L'une des stratégies bactériennes les plus efficaces pour faire face à l'action d'antibiotiques est de produire des enzymes qui inactivent l'antibiotique en liant des fractions chimiques spécifiques au composé ou qui détruisent la molécule elle-même, rendant cette dernière incapable d'interagir avec sa cible (Munita & Arias 2016).



**Figure 9.** Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram négatif, 1 : inactivation enzymatique de l'antibiotique, 2 : modification de la cible de l'antibiotique, 3 : efflux actif de l'antibiotique, 4 : perméabilité réduite (Muylaert & Mainil 2012).

### 5.1.1. Les $\beta$ -lactamines

La résistance aux  $\beta$ -lactamines chez les bactéries à Gram négatif peut être attribuée à deux principaux mécanismes, notamment l'acquisition des gènes  $\beta$ -lactamases, ainsi que la diminution de la perméabilité (Bush & Bradford 2020). Les  $\beta$ -lactamases constituent toujours le principal mécanisme de résistance naturelle et acquise aux  $\beta$ -lactamines, en particulier chez les bactéries à Gram négatif (Munita & Arias 2016). Leur activité enzymatique provoque l'ouverture du cycle  $\beta$ -lactame en créant un intermédiaire acyl-enzyme instable, menant à la perte d'un groupement carboxyle (Seiffert *et al.* 2013; Baba Ahmed-Kazi & Arlet 2014).

Ces enzymes ont été classées selon deux schémas connus, la classification fonctionnelle de Bush-Jacoby et Medeiros et la classification d'Ambler. La classification fonctionnelle de Bush-Jacoby et Medeiros décrite depuis plus de 50 ans, elle est basée sur les capacités fonctionnelles liées aux profils de substrat et aux inhibiteurs des enzymes  $\beta$ -

lactamases tandis que, la classification d'Ambler a eu lieu en 1980, elle est basée sur le poids moléculaire et l'homologie entre les motifs d'acides aminés du site actif (**Nordmann 2014; Bush 2018; Bush & Bradford 2020**). La classification d'Ambler permet de décrire trois classes avec une sérine dans le site actif (enzymes de la classe A, C et D) et une classe contenant du zinc au site actif nommée métallo-enzymes ou MBL (classe B) (**Tableau 1**) (**Bush & Bradford 2020; Hammoudi Halat & Ayoub Moubareck 2020**).

#### 5.1.1.1. Histoire de l'évolution de $\beta$ -lactamases

En 1979, Hamilton-Miller a affirmé que les premières enzymes  $\beta$ -lactamases nommées pénicillinase sont nées le 28 décembre 1940, néanmoins, l'âge de  $\beta$ -lactamases à sérines avait plus de 2 milliards d'années, ceci a été confirmé par les analyses phylogénétiques modernes. Dans la littérature, la première enzyme présentant une activité  $\beta$ -lactamase a été identifiée chez *Bacillus coli* en 1940, actuellement supposée être la céphalosporinase chromosomique (classe C) d'*Escherichia coli* (**Bush 2018**).

Dans cette circonstance, diverses céphalosporines à spectre étendu ont été introduites dans les années 1980, qui étaient stables contre l'activité hydrolytique des pénicillinases telles que TEMoniera (TEM-1) et Sulfi Hydroxyl Variable (SHV-1). Quelques années plus tard, plusieurs variants dérivés de TEM-1 et SHV-1 ont été décrits chez des entérobactéries, parmi ces variants on trouve ceux qui ont étendu leur spectre d'hydrolyse pour inclure les oxyimino-céphalosporines pour devenir des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) (**Bush 2018; Nordmann & Poirel 2019**). La différence entre ces enzymes de BLSE est la substitution de deux ou trois acides aminés dans la région codante. Par la suite, une nouvelle BLSE appelée Cefotaximase-Muenchen (CTX-M) a été décrite et qui est devenue par la suite la BLSE prédominante chez les espèces d'entérobactéries dans le monde (**Bush 2018**). En 2000, des enzymes types GES (Guyana Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase) ont été rapportées comme un nouveau groupe de BLSE où tous les variants GES ont acquis l'aptitude à hydrolyser les céphalosporines à large spectre, à l'exception de certains variants avec des substitutions au niveau des acides aminés de leur site actif (positions 104 et 170 selon la classification d'Ambler) ont étendu leur spectre d'activité pour hydrolyser les carbapénèmes, notamment; GES-2, -4, -5, -6, -11 et -14 (**Nordmann et al. 2012**).

Les  $\beta$ -lactamases appartenant à la classe C d'Ambler nommées céphalosporinases sont dérivées du gène *bla*<sub>AmpC</sub> hébergé sur le chromosome de diverses espèces d'entérobactéries (comme, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* et *Enterobacter* spp.) (**Meini et al. 2019**;

**Sawa et al. 2020**). Au début des années 1990, des céphalosporinases types AmpC à médiation plasmidique ont été décrites chez des espèces dépourvues d'une enzyme AmpC inductible par la suite, les céphalosporinases portées par des plasmides, y compris; Dharhan hospital (DHA), AmpC Type (ACT), Cephamicinase (CMY), cefoxitinase (FOX), moxalactamase (MOX), Ambler Class C (ACC) et Miriam hospital (MIR) ont été signalées dans le monde entier (**Hennequin et al. 2018**).

Devant cette situation inquiétante causée par l'émergence d'enzymes  $\beta$ -lactamase capables d'inactiver les oxyimino-céphalosporines et de réduire la sensibilité aux carbapénèmes, les carbapénèmes ont été introduits en antibiothérapie vers la fin des années 1980 et ont montré une efficacité remarquable pour le traitement des infections causées par les bactéries à Gram négatif productrices d'AmpC et de BLSE (**Nordmann et al. 2012; Doi 2019**).

Les premières carbapénémases rapportées chez les entérobactéries étaient du type *Serratia Marcescens* enzyme (SME-1) à Londres en 1982 depuis lors, diverses carbapénémases appartenant à la classe A d'Ambler ont été signalées; imipenemase (IMI-1) aux États-Unis en 1984, non-metallo carbapenemase class A (NmcA) en France en 1990 et le plus souvent trouvé est *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) qui a été rapportée pour la première fois en Caroline du Nord aux États-Unis (**Yigit et al. 2001; Nordmann et al. 2012; Doi & Paterson 2015**).

Alors que la première MBL a été découverte à partir de *Bacillus cereus* en 1966 et a été appelée enzyme BCII. Jusqu'à 1989, seules quatre enzymes MBL étaient identifiées et étaient toutes des carbapénémases à médiation chromosomique et jugées cliniquement négligeables. Ensuite, diverses carbapénémases de la classe B portées sur des plasmides ont été décrites; des carbapénémases du type Imipenem-resistant *Pseudomonas* (IMP) ont été identifiées chez *Pseudomonas aeruginosa* au Japon en 1991, Verona integron-encoded MBL (VIM) ont été signalés pour la première fois à Vérone, en Italie, chez un isolat de *P. aeruginosa* en 1999 et récemment le MBL type New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM) qui a été décrit en 2009 chez un patient suédois d'origine indienne (**Yong et al. 2009; Elshamy & Aboshanab 2020**).

La classe D- $\beta$ -lactamase appelée oxacillinase ayant la capacité de bien hydrolyser l'oxacilline. Cette classe présente un profil de substrat limité aux pénicillines, mais certaines sont devenues capables d'hydrolyser les céphalosporines (**Elshamy & Aboshanab 2020**).

Dans cette classe, plusieurs variants sont classés comme des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu, mais des variants ayant une activité carbapénémase relativement faible ont également été rapportés en tant qu'enzymes carbapénémases, notamment OXA-48, OXA-58, OXA-24/40 et OXA-23 (Elshamy & Aboshanab 2020).

Chez les entérobactéries, les carbapénémases de la classe D sont principalement représentées par les enzymes du type OXA-48, cette enzyme a été décrite pour la première fois chez une souche clinique de *K. pneumoniae* isolée en Turquie en 2001 (Poirel *et al.* 2004). La production d'OXA-48 confère une résistance aux pénicillines et aux carbapénèmes (en particulier à l'ertapénème), mais pas aux céphalosporines à spectre étendu, c'est pourquoi cette enzyme a récemment attiré l'attention des cliniciens (Elshamy & Aboshanab 2020; Lasko & Nicolau 2020).

**Tableau 1.** Classification d'Amber des  $\beta$ -lactamases (Munita & Arias 2016).

Classification d'Amber	$\beta$ -lactamases (exemple)	Phénotype de résistance	Inhibiteurs	
	A	$\beta$ -lactamases à spectre étroit (TEM-1, TEM-2, SHV-1, SHV-11)	Pénicillines, C1G	Acide clavulanique, tazobactam, sulbactam (sauf dans le cas des pénicillinases sensible aux inhibiteurs)
$\beta$ -lactamases à serine	A	BLSE (TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, PME, GES)	Pénicillines, C1G, C3G, monobactame	Acide clavulanique, tazobactam, sulbactam.

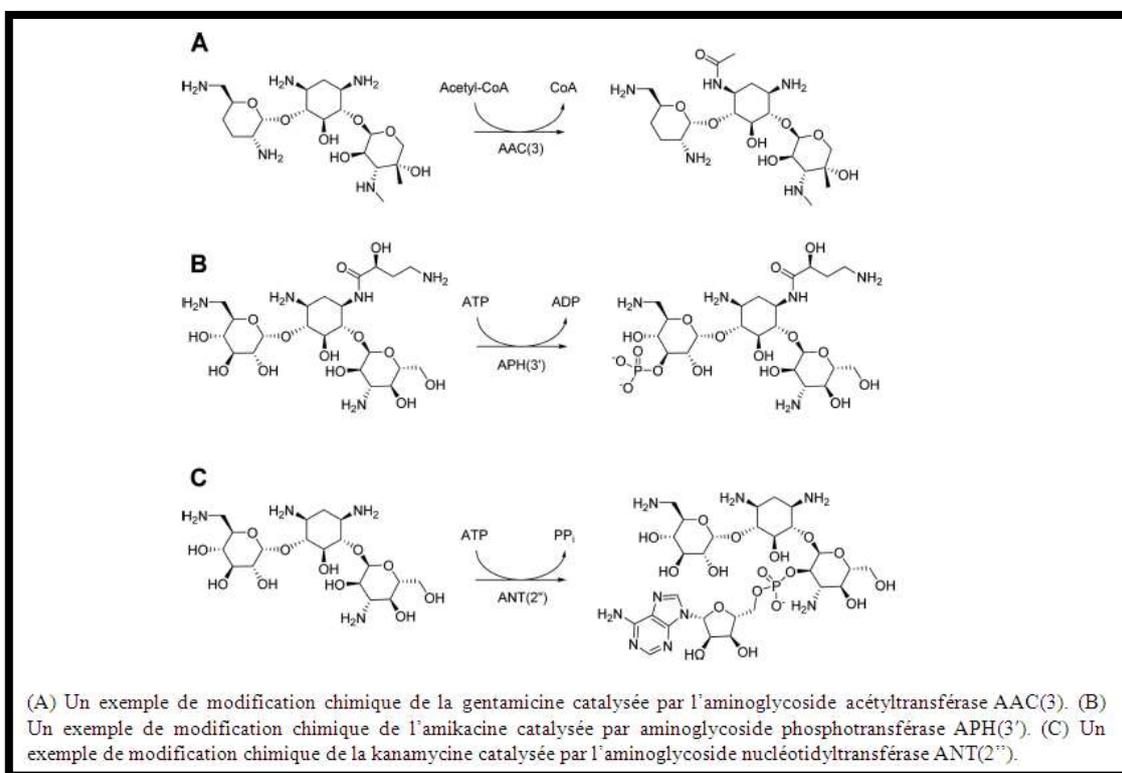
**Suite du tableau 1.** Classification d'Ambller des  $\beta$ -lactamases (Munita & Arias 2016).

Classification d'Ambller	$\beta$ -lactamases (exemple)	Phénotype de résistance	Inhibiteurs	
$\beta$ - lactamases à serine	A	Carbapénémases (KPC, IMI, SME, NMC-A, GES	Toutes les $\beta$ - lactamines  Acide clavulanique, tazobactam, acide boronique.	
	C	Céphalosporinases (AmpC, CMY, FOX, MOX, ACT, DHA, ACC)	Pénicillines, monobactame céphalosporines y compris céphamycines,	Cloxacilline, acide boronique.
	D	Oxacillinases (OXA- 48, OXA-23, OXA- 24, OXA-58)	Pénicillines, variable pour les céphalosporines, faiblement les carbapénèmes	NaCl
Métallo $\beta$ - lactamases	B	Carbapénémases (VIM, IMP, NDM, SIM, GIM, TMB)	Toutes les $\beta$ - lactamines sauf monobactame  EDTA	

### 5.1.2. Mécanisme de résistance aux aminosides

Il existe une variété de mécanismes de résistance aux aminoglycosides, y compris la modification chimique par des enzymes type EMA (enzyme modifiant les aminoglycosides), modification du site cible par méthylation (16SRMTases) ou par mutation chromosomique, et diminution de la perméabilité ou augmentation d'efflux (Serio *et al.* 2018).

Les EMA sont les plus importants mécanismes de résistance aux aminosides, elles modifient les groupements hydroxyles ou amines de la molécule d'aminoglycoside. Ces dernières sont représentées par trois classes qui rendent les aminoglycosides inactifs via acétylation (acétyltransférases; AAC), adénylation (nucléotidyltransférases; ANT), ou phosphorylation (phosphotransférases; APH) (Munita & Arias 2016). Les trois classes EMA incluent plusieurs sous-classes des enzymes y compris des centaines de variants qui ont été rapportées suite à de légères différences dans leur spécificité pour les aminoglycosides cibles comme conséquence de différence au niveau de leur séquence peptidique (Serio *et al.* 2018). Des exemples de modification chimique des aminoglycosides par des enzymes modifiant les aminoglycosides (EMA) sont présentés dans la **figure 10**.



**Figure 10.** Modification chimique des aminoglycosides par des enzymes modifiant les aminoglycosides (EMA) (Serio *et al.* 2018).

### 5.1. 3. Mécanisme de résistance aux quinolones

En 2006, un mécanisme de résistance plasmidique aux quinolones a été décrit chez des souches d'*Escherichia coli* isolées en Chine. Il s'agit d'une inactivation des fluoroquinolones par acétylation au niveau de l'azote aminé du substituant pipérazinyl. Le déterminant de cette résistance est un variant d'un aminoside N acétyltransférase ACC-(60)-Ib-cr, dont le gène codant présente deux mutations spécifiques au niveau des codons 103 et 179 entraînant l'inactivation des fluoroquinolones (Correia *et al.* 2017).

## 5.2. Modification de la cible des antibiotiques

La diminution de l'affinité de l'antibiotique pour sa cible est le second mécanisme de résistance aux antibiotiques. Cette diminution de l'affinité peut être le résultat d'une mutation au niveau du gène codant pour la cible, acquisition des enzymes modifiant la cible comme les méthylases, les ligases et les déshydrogénases, ou d'une substitution et une protection de la cible (**Munita & Arias 2016**). Ce mécanisme de résistance a été observé avec plusieurs antibiotiques en particulier la colistine, quinolones et les aminosides.

### 5.2.1. Mécanisme de résistance à la colistine

La résistance à la colistine est due principalement à des modifications au niveau du LPS précisément la partie lipidique (lipide A) ce qui conduit à une diminution de l'affinité pour la colistine. Ce mécanisme, bien qu'universel chez les bactéries à Gram négatif, peut changer d'une espèce à l'autre. La modification du LPS est le résultat d'un ajout de résidus chargés positivement tels que la phosphoéthanolamine (PEtn) et/ou la 4-amino-4-désoxy-L-arabinose (L-Ara4N). Ces molécules diminuent la charge négative globale du LPS, ce qui conduit à une interaction électrostatique plus faible avec la charge positive de la colistine inhibant l'action de cette dernière (la lyse cellulaire) (**Lima et al. 2019; Anyanwu et al. 2020**).

Depuis longtemps, la plupart de ces ajouts étaient dus à des mutations chromosomiques dans les gènes d'un système de régulation à deux composants tels que *prmAB* et *PhoPQ*, et *mgrB*, qui ne sont pas transférables (**Anyanwu et al. 2020**).

À la fin de l'année 2015, *Liu et al.* ont mis en évidence un nouveau mécanisme de résistance à la colistine à médiation plasmidique (*mcr-1*) chez des souches d'*E. coli* isolées à partir d'animaux destinés à l'alimentation en Chine (**Liu et al. 2016**). MCR-1 confère une résistance en modifiant la cible de la colistine, par l'action de la phosphoéthanolamine transférase, qui assure le transfert de la phosphoéthanolamine (PEA) sur le saccharide (glucosamine) du lipide A de la membrane externe (LPS) conduisant à la réduction de sa charge négative et par conséquent, inhibition de l'interaction électrostatique avec la colistine (**Hinchliffe et al. 2017; Bakthavatchalam et al. 2018**). Après la découverte du gène *mcr-1*, neuf autres variants de ce gène *mcr* (*mcr-2* à *mcr-10*) ont été identifiés à l'échelle mondiale (**Bakthavatchalam et al. 2018; Stefaniuk & Tyski 2019; Wang et al. 2020**). Les différents mécanismes de résistance à la colistine sont résumés dans la **figure 11**.

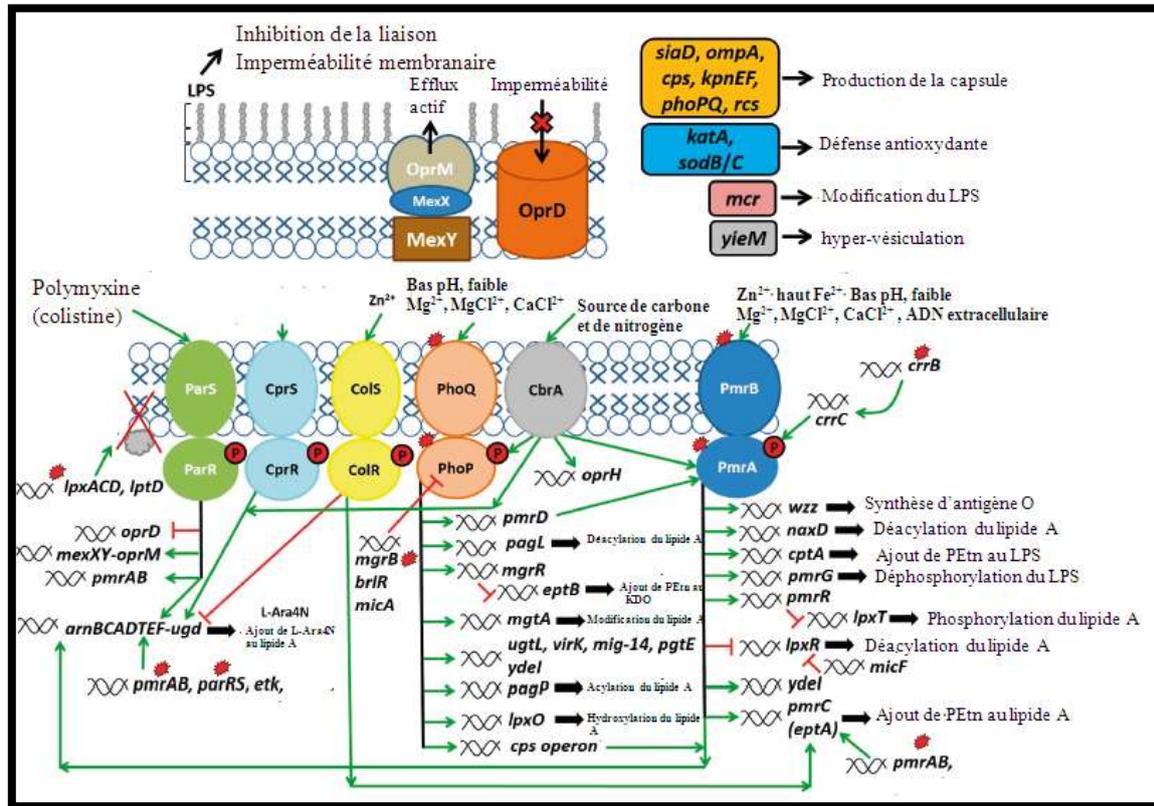


Figure 11. Les différents mécanismes de résistance à la colistine (Mlynarcik & Kolar 2019).

### 5.2. 3. Mécanisme de résistance aux quinolones

L'acquisition d'une résistance à la quinolone peut être associée à trois types de mécanismes : (i) mutations chromosomiques qui modifient les enzymes cibles et leur affinité pour les antibiotiques; (ii) mutations chromosomiques entraînant une réduction de l'accumulation d'antibiotiques soit par une diminution de l'absorption, soit par une augmentation de l'efflux; et iii) des gènes de résistance acquis par les plasmides produisant soit des protéines de protection de la cible, des enzymes modificatrices de quinolones ou par augmentation d'efflux (Correia et al. 2017).

La résistance aux quinolones résulte le plus souvent par des mutations chromosomiques au niveau des gènes qui codent pour la topoisomérase IV (gène *parC*) et l'ADN gyrase principalement le gène *gyrA* (Lupo et al. 2013). Ces mutations se produisent souvent dans une région appelée région déterminante de la résistance aux quinolones (QRDR), qui se trouve entre les acides aminés 67 et 106 de la séquence du GyrA (numérotation *E. coli*) ou 63 et 102 en ParC. Il existe également un QRDR trouvé dans *gyrB* entre les acides aminés 426 et 447 et dans ParE entre les acides aminés 420 et 441. Par ailleurs, il existe des positions où les mutations sont préférentiellement retrouvées comme étant D426N et L447E (séquence chez *E. coli*). Une résistance due à des mutations en dehors

du QRDR traditionnel a également été identifiée (**Bush et al. 2020**). Les mutations au niveau des gènes codant pour ces deux enzymes, bloquent la capacité des quinolones à former des complexes stables en empêchant l'inhibition de la réparation des cassures transitoires de l'ADN (**Correia et al. 2017**).

Par la suite, d'autres déterminants génétiques de résistance aux quinolones transmissibles ont été décrits. Tous ces gènes de résistance plasmidique sont regroupés sous l'appellation PMQR (Plasmid-Mediated Quinolones Resistance). Depuis 1998, des plasmides portant des gènes de résistance aux quinolones qui codent pour des protéines protégeant l'ADN gyrase ont été décrits, ces protéines sont appelées quinolone résistance (Qnr) (**Strahilevitz et al. 2009**). Actuellement, environ 100 variants Qnr ont été identifiés et classés en six familles distinctes : QnrA, QnrB, QnrS, QnrC, QnrD et QnrVC. Il a été signalé que la résistance conférée par les Qnr est de bas niveau ( **Strahilevitz et al. 2009; Correia et al. 2017**).

### 5.2. 3. Mécanisme de résistance aux aminosides

Plus récemment, un nouveau mécanisme de résistance aux aminosides consiste à la protection ribosomale par méthylation enzymatique de l'ARNr 16S a été décrit. Plusieurs types du gène codant pour l'ARNr16S méthylase ont été décrits jusqu'à présent: *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD* et *npmA* (**Delgado-Valverde et al. 2013**).

### 5.3. Modification de la perméabilité cellulaire

La modification de la perméabilité cellulaire peut être le résultat d'une diminution ou inhibition de la perméabilité d'antibiotique à travers la perte ou la modification des porines ou le résultat d'une augmentation des systèmes à efflux où les bactéries peuvent développer un mécanisme de transport actif qui pompe les molécules d'antibiotiques qui ont pénétré dans la cellule vers le milieu extérieur jusqu'à ce qu'ils atteignent une concentration interne inférieure à celle de l'extérieur. Ce mécanisme de résistance est utilisé contre les  $\beta$ -lactamines, fluoroquinolones et aminosides (**Alanis 2005**).

Pour la famille de  $\beta$ -lactamines, ce mécanisme est observé beaucoup plus chez *Pseudomonas aeruginosa* avec une perte ou une modification de la porine OprD suite à des mutation au niveau du gène codant, ce qui confère une résistance accrue aux carbapénèmes (**Nordmann 2010**).

Pour les quinolones, d'autres mutations chromosomiques impliquées dans la diminution de l'absorption de l'antibiotique ou dans l'augmentation des efflux ont été

identifiées. Chez les bactéries à Gram négatif, des modifications structurales de la membrane bactérienne peuvent avoir lieu à travers la réduction du nombre de porines (OmpA et OmpX) dans la membrane cellulaire ou par l'altération des porines elles-mêmes. De plus la surexpression de diverses pompes à efflux déjà décrite chez les bactéries à Gram positif peut entraîner aussi une augmentation de la résistance aux quinolones (**Correia et al. 2017; Bush et al. 2020**).

Pour la famille des aminoglycosides, les données sont encore limitées et suggèrent un rôle potentiel des porines dans le phénomène de résistance aux aminoglycosides (perte de porine OmpF chez *E. coli*), mais cela n'a pas été encore confirmé (**Serio et al. 2018**).

L'implication des systèmes à efflux (famille AdeABC et HlyD) dans la résistance à la colistine a également été signalé chez différentes bactéries à Gram négatif comme *A. baumannii* (AdeABC), *P. aeruginosa* (Mex) et *Vibrio vulnificus* (**Mlynarcik & Kolar 2019**).

## CHAPITRE 2

# LES CONSERVATEURS NATURELS DES PRODUITS ALIMENTAIRES

### 1. Les légumes et les fruits

La consommation de fruits et légumes est liée à une incidence plus faible de maladies cardiovasculaires et d'obésité, ces dernières comprennent un groupe diversifié d'aliments d'origine végétale dont la teneur en énergie et en nutriments varie considérablement. Les fruits et légumes fournissent pour le corps des fibres alimentaires, des minéraux, des vitamines telles que la vitamine C et ils représentent une source importante de composés phyto-chimiques avec des activités telles que antioxydante et anti-inflammatoire (**Slavin & Lloyd 2012**).

Les fruits contiennent principalement des sucres et des fibres, tels que la pectine, qui sont largement fermentés dans le gros intestin. Certains produits, en particulier les pommes et les poires, sont concentrés en fructose, les autres, y compris l'avocat, sont riches en amidon, alors que les patates douces contiennent principalement du saccharose, pas de l'amidon. Les fruits (sauf les bananes) et les légumes verts contiennent peu ou pas d'amidon (**Slavin & Lloyd 2012**).

En tant que l'un des éléments essentiels de l'alimentation humaine, les légumes sont importants pour le maintien de la santé et leur consommation augmente continuellement. En raison de leur nature hautement périssable, la durée de conservation de ces produits frais est considérablement courte nécessitant le développement de moyens de conservation naturels de préférence permettant le prolongement de cette durée (**Zhan et al. 2019**).

### 2. Les poissons

La consommation de poissons est populaire dans les régimes alimentaires quotidiens où ils sont considérés comme une source riche en protéines et en acides aminés essentiels d'origine animale importantes sur le plan nutritionnel et représentant 20% de protéines consommées. Les poissons sont aussi riches en acides gras polyinsaturés « oméga 3 » et ils contiennent également plusieurs macro et micronutriments important pour la santé humaine (**Rathod et al. 2021; Chen et al. 2022**). En outre, plusieurs rapports ont montré que les hydrolysats de protéines et des peptides des poissons sont connus par leur activité antioxydante (**Chen et al. 2022**).

Les poissons sont considérés comme des produits hautement périssables en raison de leur richesse en eau (60% à 80%), en acides aminés libres, en urée ainsi que leur pH neutre, ce qui favorise la croissance des micro-organismes surtout en cas de conditions défavorables de

stockage et de conservation ou mauvaise manipulation entraînant des dommages physiques. Habituellement, le poisson fraîchement pêché est contaminé par un grand nombre de microorganismes présents sur leur surface ou dans l'intestin (**Gokoglu 2019; Rathod et al. 2021**).

### **3. Les méthodes de conservation des produits alimentaires**

Les méthodes couramment utilisées pour lutter et traiter les maladies post-récolte consiste généralement en l'utilisation d'agents chimiques comme les antibiotiques, tandis que l'utilisation à long terme et à grande échelle de ces molécules conduit à la sélection d'agents pathogènes résistants. Ces derniers présentent un sérieux danger pour la santé publique et l'environnement (**Huang et al. 2021**). Dans ce contexte, la conservation des produits hautement sensibles par les moyens naturels reste une préoccupation majeure pour garantir la sécurité du consommateur et réduire les pertes économiques (**Gokoglu 2019; Huang et al. 2021**).

Les conservateurs naturels sont classés en trois groupes; agents antimicrobiens, antioxydants, et des agents anti-brunissement (**Gokoglu 2019**). Les agents antimicrobiens en tant qu'additifs alimentaires sont ajoutés aux aliments pour empêcher leur détérioration microbienne, prolonger leur durée de conservation et inhiber la croissance des microorganismes pathogènes. Cependant, ces agents ont différents modes d'action où certains provoquent l'acidification du cytoplasme cellulaire comme les acides organiques et les produits dérivés. L'acide benzoïque et les benzoates causent une acidification des cellules en activant négativement l'efflux ce qui influence la gestion de l'énergie. L'acide lactique et ses dérivés peuvent perturber le métabolisme cellulaire par accumulation dans la membrane cellulaire conduisant à l'inhibition de la croissance des microorganismes à des concentrations plus faibles (< 0,3 %) et ils peuvent également causer la lyse des cellules microbiennes à des concentrations plus élevées (**Rathod et al. 2021**).

Les agents antimicrobiens peuvent être utilisés seuls ou en combinaison avec d'autres nouvelles technologies de conservation pour faciliter le remplacement des approches traditionnelles. En bio-conservation, la durée de conservation est prolongée, et/ou la sécurité des produits alimentaires est améliorée par l'utilisation de produits naturels principalement ; lactoperoxydase (lait), lysozyme (blanc d'œuf, figues), saponines et flavonoïdes (herbes et épices), bactériocines (bactéries lactiques) et chitosane (coquilles de crevettes) (**Tiwari et al. 2009**).

### 3.1. Agents antimicrobiens d'origine microbienne

Les microorganismes produisent un grand nombre de substances qui peuvent être utilisées contre la détérioration potentielle des aliments ou inhiber la croissance de microorganismes pathogènes présents, ceci est le résultat de l'équilibre naturel de l'écosystème microbien. Les caractéristiques de ces microorganismes sont différentes en fonction du métabolite antimicrobien produit (bactériocines, bactériophages, enzymes et autres métabolites) ainsi que selon la forme du composé (composé purifié, culture protectrice) (Gokoglu 2019).

#### 3.1.1. Endophytes

L'utilisation potentielle des bactéries et champignons endophytes pour améliorer la productivité agricole est devenue ces dernières années une alternative durable qui a attiré l'attention des acteurs de ce domaine. Les endophytes peuvent être définis comme étant un groupe de microbes qui colonisent asymptotiquement l'espace intercellulaire ou les tissus et les organes de cellules végétales, et établir une relation de symbiose avec la plante hôte (Omomowo & Babalola 2019).

Les champignons endophytes sont principalement des ascomycètes alors que les bactéries endophytes appartiennent principalement aux genres suivants ; *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Pantoea*, *Rhizobium*, *Klebsiella*, *Stenotrophomonas*, *Corynebacterium*, *Paenibacillus* et *Rhanella* (Dudeja *et al.* 2021; Huang *et al.* 2021).

Les bactéries et les champignons endophytes peuvent coloniser toutes les plantes et peuvent être isolés à partir de toutes les parties de plantes. Ils favorisent la croissance des plantes où les soutiennent sur le plan nutritionnel en augmentant la disponibilité de la forme assimilable du phosphore, d'azote et d'autres nutriments majeurs et mineurs. Ils protègent aussi l'hôte au cours de tous les stades de croissance depuis le début de la germination en leur conférant une résistance contre les ravageurs, les insectes et les microorganismes phytopathogènes (Omomowo & Babalola 2019; Dudeja *et al.* 2021). En comparaison avec la lutte chimique, l'utilisation des endophytes comme moyen de lutte biologique contre les maladies post-récolte des fruits et légumes présente une haute efficacité, durabilité, et une forte spécificité (Huang *et al.* 2021).

Depuis la mise en évidence de l'activité anticancéreuse de la taxol comme métabolite provenant de l'endophyte *Taxomyces andreana* (Stierle *et al.* 1993), un nombre croissant d'études ont prouvé que les endophytes peuvent produire des métabolites secondaires en abondance avec des propriétés antimicrobiennes comme les antibiotiques. Les endophytes

connus par leur potentiel de production d'antibiotiques sont des bactéries appartenant aux genres suivants : le genre *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Burkholderia*. L'utilisation d'un endophyte antagoniste seul ne peut garantir le contrôle d'une multitude d'agents pathogènes en raison de leur spectre d'activité et dépend aussi de sa stabilité *vis à vis* des facteurs environnementaux. À l'heure actuelle, les travaux de recherche sur le contrôle des maladies post-récolte par endophytes sont encore à l'échelle du laboratoire, et seulement quelques endophytes tels que ceux du genre *Bacillus* ont été utilisés (**Huang et al. 2021**).

La combinaison d'endophytes antagonistes avec d'autres substances bioactives telles que le chitosane, les fongicides à faible concentration, les sels inorganiques et les régulateurs de croissance peut améliorer l'activité biologique des bactéries antagonistes (**Dukare et al. 2019**).

### 3.1.2. Probiotiques

Actuellement, la communauté scientifique s'intéresse de plus en plus à l'utilisation de probiotiques pour restaurer potentiellement la composition du microbiote intestinal. Dans le but de développer des produits sans effet nuisible sur l'environnement, l'ajout de probiotiques aux films de mucilage de graines de coing, de lin et de basilic a été exploré. Ces mucilages sont des mélanges naturels et compatibles de différents polysaccharides présentant un pouvoir antibactérien protecteur (**Davachi et al. 2021**). Les films de mucilage de graines présentent une rétention élevée d'humidité indépendamment de la présence des probiotiques, permettant ainsi la préservation du taux d'humidité et la fraîcheur des aliments (**Elsabee & Abdou 2013; Davachi et al. 2021**).

Les films de mucilage de lin et de coing sont des films très stables thermiquement et mécaniquement robustes par rapport aux films de mucilage au basilic, avec des modules élastiques résistant à la rupture. Ces films protègent efficacement les fruits contre les rayons ultra-violets en maintenant l'activité des probiotiques pendant le stockage. Les fruits et légumes enrobés conserve mieux leur fraîcheur et plus longtemps que les produits non enrobés, tandis que les films probiotiques à base de coing ont présenté la meilleure conservation contre la détérioration physique et bactérienne (**Davachi et al. 2021**).

### 3.1.3. Bactériocines

Les bactériocines sont des peptides cationiques et hydrophobes, avec une longueur de 20 à 60 acides aminés, produites par diverses bactéries, y compris les bactéries lactiques. Elles présentent une activité antibactérienne contre les bactéries à Gram négatif et positif (**Kumariya et al. 2019**). Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont connues par leur potentiel naturel comme conservateurs alimentaires. Ces dernières années, les

produits fruitiers sont de plus en plus associés aux agents pathogènes d'origine alimentaire et aux micro-organismes de détérioration pour lesquels les bactériocines sont le meilleur moyen de lutte naturelle et pouvant être utilisé comme conservateur de ces produits (**Barbosa et al. 2017**).

De nombreuses bactériocines telles que ; la nisine produite par des bactéries lactiques comme *Lactococcus lactis* qui inhibe la germination des spores de *Clostridium botulinum* dans les tartinades de fromage et la pédiocine, un autre peptide produit par *Pediococcus* sp. sont utilisées pour la protection des d'aliments contre les bactéries pathogènes et de détérioration. D'autres bactériocines comprennent la subtiline, l'actagardin, divergicine, mutacine, mundticine, entérocin, sakacine, leucocine, et la lysostaphine ont été aussi rapportées comme conservateurs alimentaires (**Barbosa et al. 2017; Chandrakasan et al. 2019**).

Plusieurs bactériocines possèdent des propriétés de conservateurs des produits fruitiers, mais à ce jour, uniquement la nisine, l'enterocin AS-48, la bovicin HC5, l'enterocin 416K1, et la pédiocine qui ont été testées pour leur activité contre les micro-organismes pathogènes contenus dans ces produits (**Barbosa et al. 2017**).

Actuellement, les peptides antibactériens sont l'une des substances les plus prometteuses pour être utilisées comme antibiotiques ; plus précisément, les peptides contenant lanthionine (lantibiotiques) en raison de leur large spectre d'inhibition contre une variété de bactéries à Gram positif (**Chandrakasan et al. 2019**).

Les bactériocines peuvent être ajoutées directement aux produits fruitiers sous forme purifiée ou semi-purifiée pour leur conservation. Alternativement, ces peptides antimicrobiens pourraient être produits in situ par des cultures probiotiques, ou incorporé dans la surface du fruit sous forme d'enrobage comestible ou dans la matrice des films plastiques utilisés pour l'emballage (**Barbosa et al. 2017**).

### **3.2. Agents antimicrobiens d'origine végétale**

Les extraits de plantes sont généralement obtenus à partir de différentes parties de plantes telles que ; les feuilles, tiges, fleurs, fruits, racines et les écorces. Les plantes contiennent certaines substances chimiques appelées composés phyto-chimiques qui affectent la qualité microbienne, chimique et sensorielle des aliments. Les variations qualitatives et quantitatives de la teneur en composés phytochimiques bioactifs dans les extraits de plantes se traduisent par leur efficacité variable. Ces composés phytochimiques comptent les polyphénols, flavonoïdes, tanins, alcaloïdes, terpénoïdes, isothiocyanates, lectines et les polypeptides, etc. (**Gokoglu 2019**).

### 3.2.1. Les huiles essentielles

Les plantes comestibles, médicinales et leurs dérivés comme les huiles essentielles contiennent un grand nombre de métabolites secondaires connus par leur capacité de retarder ou d'inhiber la croissance des microorganismes. Les composés antimicrobiens dans les matières végétales se trouvent couramment dans la fraction d'huile essentielle des feuilles (romarin, sauge, basilic, origan, thym et marjolaine), de fleurs ou de bourgeons (gousse), de bulbes (ail et oignon), de graines (carvi, fenouil, noix de muscade et persil), de rhizomes (asafoetida), de fruits (poivre et cardamome), ou d'autres parties de plantes (**Tiwari *et al.* 2009**).

Les huiles essentielles peuvent être huileuses ou lipidiques et souvent présentent un fort parfum caractéristique. Elles peuvent contenir jusqu'à 100 composants, bien que beaucoup d'entre elles contiennent environ 20 à 60 composants. Ces derniers sont généralement des composés de faible poids moléculaire avec une solubilité limitée dans l'eau et appartiennent à une variété de classes chimiques, principalement des terpènes (mono-, sesqui- et di-terpènes) ainsi que des composés oxygénés (alcools, oxydes, aldéhydes, cétones, phénols, acides et esters) (**Abelan *et al.* 2021**). Cette diversité est en fonction de plusieurs facteurs à savoir l'espèce, l'origine, le climat, les conditions du sol, la fertilisation et le mode de production (**Ramsey *et al.* 2020**).

Les huiles essentielles, également appelées huiles odoriférantes volatiles, sont des huiles aromatiques liquides extraites de différentes parties de plantes. Elles sont connues pour leur utilisation comme des additifs naturels en tant qu'agent antimicrobiens et antioxydants. Leurs activités varient selon la source de plantes, de la composition chimique et de la méthode d'extraction. L'odeur unique associée aux composées volatiles peut limiter l'utilisation de l'huile essentielle dans certains produits alimentaires car elle peut altérer l'odeur et/ou la saveur typique de ces aliments (qualités organoleptiques) (**Tongnuanchan & Benjakul 2014**).

Elles sont également utilisées pour le traitement des troubles du sommeil, la maladie d'Alzheimer, problèmes cardiovasculaires, cancer et les douleurs d'accouchement. De plus, elles sont également connues par leur activité insecticide et anti-inflammatoire. Il existe de nombreuses méthodes d'application des huiles essentielles y compris ; l'inhalation, l'ingestion, le massage et l'applications cutanée (**Ramsey *et al.* 2020**).

Les huiles essentielles sont généralement des mélanges de plusieurs composants. Les huiles avec des niveaux élevés d'eugénol (piment de la Jamaïque, gousse et feuille, laurier, et feuille de cannelle), d'aldéhyde-cinnamique (écorce de cannelle et huile de cassia) et du citral (Myrte citronné, *Litsea cubeba* et citron vert) sont habituellement des composés

antimicrobiens puissants. Les huiles essentielles de plantes telles que le cumin, le carvi et la coriandre ont un effet inhibiteur sur différents microorganismes tels que ; *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, et *Staphylococcus aureus*, tandis que la marjolaine et le basilic ont une activité élevée contre *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, et *Salmonella*. Les huiles essentielles de mélisse et sauge semblent avoir une activité adéquate contre *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* (Tiwari *et al.* 2009). De plus, le carvacrol qui est le composant principal de l'huile essentielle d'origan (60 % à 74 % de carvacrol) et du thym (45 % de carvacrol) présente un large spectre d'activité antimicrobienne contre la plupart des bactéries à Gram positif et négatif (Tongnuanchan & Benjakul 2014).

### 3.2.1.1. Huile essentielle de la plante *Artemisia campestris*

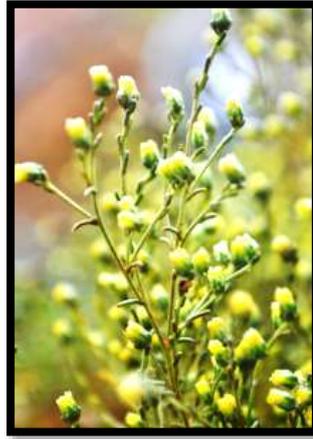
#### Morphologie d'*Artemisia campestris*

*Artemisia campestris* L. est une herbe aromatique, couramment utilisée comme remède à base de plantes contre une variété de maladies en Afrique du Nord (Moalla *et al.* 2021). C'est une plante caméphyte, systématiquement classée dans la famille d'Asteraceae, tribu des Anthemideae, genre *Artemisia* L. (Dib & El Alaoui-Faris 2019; Moalla *et al.* 2021).

*A. campestris* L. est un sous-arbuste vivace, qui peut atteindre 30-150 cm de hauteur, avec tiges ramifiées et ascendantes en forme de panicule ; il est généralement rouge brunâtre et glabre, et acquiert une forme lignifiée dans la partie inférieure et une forme pubescente au sommet. Les feuilles sont vertes, séricées lorsqu'elles sont jeunes, souvent glabrescentes à maturité, tandis que la partie basale des feuilles sont de 2-3 pinnatisect, pétiolées ou même auriculées (Dib *et al.* 2017).

Les principales caractéristiques morphologiques qui distinguent cette espèce des autres est la présence d'un capitule jaune, contenant fonctionnellement un disque mâle fleurons (avec ovaires avortifs), et des fleurons rayonnés pistillés, avec un réceptacle (figure 12) (Akrouit *et al.* 2009).

Le profil phytochimique de *A. campestris* L. a montré une abondance en flavonoïdes, acides phénoliques, coumarines, isocoumarines, acides gras, ainsi qu'une teneur élevée en monoterpènes et sesquiterpènes contenus dans l'huile essentielle (Dib *et al.* 2017).



**Figure 12.** *Artemisia campestris* L. (Dib & El Alaoui-Faris 2019).

### **Caractéristiques éco-géographiques d'*Artemisia campestris* L.**

Sur le plan écologique, *A. campestris* L. est capable de se développer dans une très large gamme d'habitats écologiques, des broussailles thermo-méditerranéennes aux ceintures montagneuses et des zones sahariennes aux zones humides; il a également été signalé que cette espèce peut être trouvée dans l'étage bioclimatique supra-méditerranéen vers le haut, elle préfère les habitats ouverts comme les prairies, les clairières et les lisières de forêt, et pousse principalement sur des sols secs. Géographiquement, *A. campestris* L. prédomine dans les régions arides des pays d'Afrique du Nord comme le Maroc, l'Algérie, la Tunisie et la Libye (Dib *et al.* 2017).

### **Les utilisations de la plante *Artemisia campestris***

*Artemisia campestris* possède de nombreux usages traditionnels, beaucoup d'entre eux ont été pharmacologiquement mis en évidence, comme antihypertenseur, antidiabétique, antihyperlipidémique, antivenin, anti-inflammatoire, anti-Leishmaniose, hépatoprotecteur et protecteur des reins. De plus, cette plante possède des propriétés culinaires, notamment comme conservateur alimentaire (Dib & El Alaoui-Faris 2019).

La partie aérienne de cette plante est utilisée en médecine populaire comme antihelminthique, antiseptique, cholagogue, et emménagogue. Cette plante est utilisable après broyage par application superficielle et locale sur les articulations rhumatismales, eczéma, ecchymoses et plaies. Un cataplasme des feuilles broyées a été appliqué sur les yeux endoloris. L'infusion des racines a été aussi utilisée, en particulier pour les enfants, comme tonique capillaire et pour traiter les infections du cuir chevelu (Dib *et al.* 2017).

### 3.2.1.2. Huile essentielle de la plante *Origanum vulgare*

#### Morphologie

*Origanum vulgare* communément appelé origan, appartient à la famille des *Lamiaceae*. C'est une herbe vivace répartie en Europe, en Afrique du Nord, en Amérique et en Asie (**Zhang et al. 2014**). Étymologiquement, le nom *Origanum* provient du nom grec de la plante (origanon), dérivé des mots (oros = montagne) et (ganos = éclat, beauté), car l'origan pousse à des altitudes comprises entre 400 et 1800 m et dans des endroits ensoleillés (**Sakkas & Papadopoulou 2017**).

Sur le plan botanique, *O. vulgare* est une plante vivace avec une base ligneuse et des tiges herbacées, atteignant une hauteur de 20 à 80 cm. Les feuilles sont opposées, ovoïdes, d'une longueur de 1 à 4 cm et de 0,5 à 2,5 cm de largeur. Les bords des feuilles sont lisse avec une extrémité arrondie à pointue. Les fleurs sont relativement petites, groupées en inflorescences paniculées terminales et latérales. Leur corolle est composée de 5 pétales unis, 0,4-0,8 cm de long, de couleur blanche à pourpre. Les sépales sont également réunis ; la partie interne de la fleur contient quatre étamines et le pistil est constitué de deux carpelles soudés. Les fruits sont de petites noix (**figure 13**) (**Lombrea et al. 2020**).



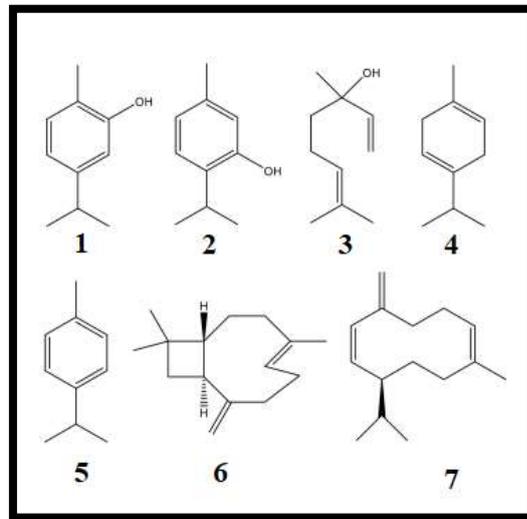
**Figure 13.** *Origanum vulgare* (**Lombrea et al. 2020**).

#### La composition chimique de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*

*Origanum vulgare* est largement utilisée dans la médecine traditionnelle comme lithotriptique, diurétique et antispasmodique, stimulant, expectorant, antibactérien, anticancéreux, anti-inflammatoire, antioxydant et laxatif (**Khan et al. 2011**). Il a été largement utilisé comme herbe culinaire, comme substance aromatique dans les produits

alimentaires, dans les boissons alcoolisées et en parfumerie pour son parfum épicé (**Kaurinovic et al. 2011**).

La teneur en huile essentielle d'*O. vulgare* fluctue de 0,5 à 2 % et même jusqu'à 7 % où les principaux composants sont les isomères phénoliques carvacrol et le thymol, et en quantité moindre leurs précurseurs monoterpènes (p-cymène et  $\gamma$ -terpinène) (**figure 14**). Diverses concentrations des principaux constituants ont été rapportées, allant jusqu'à 64% et 80% pour le thymol et le carvacrol, respectivement, et jusqu'à 52 % pour chacune de leurs molécules précurseurs. La teneur en carvacrol des différents chémotypes d'*O. vulgare* est variable et peut atteindre 95 % (**Sakkas & Papadopoulou 2017**).



**Figure 14.** Structures chimiques des principaux constituants de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* : 1 : Carvacrol, 2 : Thymol, 3 : Linalol, 4 :  $\gamma$ -Terpinène, 5 : p-Cymène, 6 :  $\beta$ -Caryophyllène, 7: Germacrène D (**Lombrea et al. 2020**).

### 3.2.1.3. Huile essentielle de la plante *Brocchia cinerea*

*Brocchia cinerea* (Delile) Vis. ou *Cotula cinera* (Delile) (tribu des Anthemideae) est une plante annuelle herbacée laineuse de 5 à 15 cm de longueur, tomenteuses avec des tiges dressées et des feuilles vertes blanchâtre divisées avec deux ou trois segments, elles sont recouvertes de poils minuscules épais et appartient à la famille d'Asteraceae (**Figure 15**) (**Ben-Moussa et al. 2020**).

Elle est largement distribuée dans le désert du Sahara et représente l'un des genres monotypiques d'Anthemideae, caractérisant la flore nord-africaine. Il a été utilisé, depuis l'Antiquité, à la fois à des fins médicinales et d'élevage (nutrition). *B. cinerea* est traditionnellement utilisé en décoction et infusion pour traiter les coliques, la diarrhée, troubles digestifs, maux de tête, fièvre, migraines, toux, refroidissement broncho-pulmonaire,

polyarthrite rhumatoïde, inflammation, infections urinaires et pulmonaires. Le criblage phytochimique de *B. cinerea* a révélé la présence d'alcaloïdes, flavonoïdes, tanins, saponines, stéroïdes, terpénoïdes et cardénolides. Ces composés peuvent avoir une activité biologique, y compris des propriétés antibactériennes et antioxydantes, qui peuvent justifier l'utilisation traditionnelle de cette plante (Chlif *et al.* 2021).



**Figure 15.** Parties aériennes de *Brochia cinerea* au stade de floraison (Chlif *et al.* 2021).

### 3.3. Agents antimicrobiens d'origine animale

Il existe de nombreux agents antimicrobiens d'origine animale, connus comme mécanismes de défense de l'hôte tels que les peptides antimicrobiens (Rathod *et al.* 2021).

#### 3.3.1. Les peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens ont d'abord été isolés à partir de sources naturelles dans les années 1950, lorsque la nisine a été isolée à partir de bactéries lactiques pour une application en tant qu'agent de conservation alimentaire. Par la suite, les peptides antimicrobiens ont été isolés à partir d'autres sources naturelles, tels que les plantes, les insectes, les amphibiens, les crustacés, ainsi que les organismes marins (Tiwari *et al.* 2009).

Les peptides antimicrobiens sont des molécules naturelles de petite taille avec un large spectre d'activité contre les bactéries, les champignons, les protozoaires et certains virus, on les trouve naturellement dans le cadre du système de défense des organismes vivants (y compris les humains, animaux, plantes et insectes) (Gokoglu 2019). Ces agents d'origine animale peuvent perturber la perméabilité membranaire des microorganismes, endommager le matériel génétique et acidifier le cytoplasme, provoquant ainsi la lyse cellulaire. Certains peuvent être incorporés dans les films pour l'emballage ou utilisés pour le revêtement de la surface de poissons (Rathod *et al.* 2021). Les principaux agents antimicrobiens d'origine

animale sont le lysozyme, la lactoferrine, pleurocidine, défensines et chitosane (**Gokoglu 2019**).

### 3.3.1.1. Lysozyme

Le lysozyme (ou muramidase ou acide N-acétylmuramique hydrolase) est une protéine avec un poids moléculaire de 14 kDa. Il est présent dans de nombreuses sécrétions muqueuses (larmes, salive et mucus). L'action antibactérienne du lysozyme est particulièrement efficace contre les bactéries Gram positif en raison de sa capacité à hydrolyser la liaison glycosidique  $\beta$ -1-4 présente au niveau de la chaîne polysaccharidique de la paroi bactérienne. L'effet du lysozyme contre les bactéries à Gram négatif est significativement plus faible en raison de la présence d'une couche protectrice de lipopolysaccharides sur la membrane externe (**Ferraboschi et al. 2021**).

Le lysozyme, à la place d'antibiotiques traditionnels, peut être utilisé comme conservateur alimentaire avec des effets secondaires pratiquement réduits et limités au déclenchement des réactions allergiques indésirables chez les personnes sensibles. Une bicouche du film comestible, à base de chitosane et d'alginate de sodium et incorporé avec du lysozyme, s'est avérée efficace contre les bactéries de détérioration des poissons telles que *Pseudomonas fluorescens* et *Shewanella putrefaciens* (**Tiwari et al. 2009; Ferraboschi et al. 2021**). De plus, il peut être utilisé avec succès pour prolonger la durée de conservation de divers produits, y compris les viandes crues et transformées, le fromage et autres produits laitiers (**Tiwari et al. 2009**).

### 3.3.1.2. Lactoperoxydase

La lactoperoxydase est une protéine importante du lait ayant une activité oxydoréductase. Les principales fonctions de cette enzyme sont de catalyser l'oxydation des molécules en présence du peroxyde d'hydrogène et de contribuer à la production de molécules ayant une large gamme d'activités antimicrobiennes. Les pseudohalogènes, les thiocyanates ou les halogènes fonctionnent comme des substrats secondaires de l'enzyme avec une activité antimicrobienne similaire. La lactopéroxydase se trouve principalement dans le tissu mammaire, la salive et les glandes lacrymales des mammifères (**Kosal & Alim 2020**).

Les bactéries à Gram positif sont inhibées par l'enzyme lactoperoxydase, cependant, des études ont montré que les bactéries à Gram négatif sont généralement avérées plus sensibles à la conservation alimentaire médiée par cette enzyme que les espèces à Gram positif (**Tiwari et al. 2009**).

La combinaison de lactoperoxydase et des huiles essentielles a montré une importante inhibition de *Pseudomonas* spp., *Shewanella putrefaciens* ainsi que les bactéries mésophiles et psychrotrophes (**Rathod et al. 2021**).

### 3.3.1.3. Chitosane

Le chitosane est un polysaccharide linéaire constitué de D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine liée par une liaison  $\beta$ -(1-4). Il a été proposé comme agent de conservation alimentaire. Il est produit par désacétylation de la chitine présente dans l'exosquelette des crustacés et d'insectes et dans les cellules de la plupart des champignons et de certaines algues. Le chitosane présente un effet bactériostatique ou bactéricide contre un large éventail de microorganismes où il provoque une altération de l'enveloppe cellulaire et perturbe l'intégrité de la membrane cytoplasmique. Pour les applications alimentaires, le chitosane est soit dissous dans l'acide acétique à une concentration de 1 à 2 %, ou appliqué sous forme de film d'emballage à base de chitosane (**Hu & Ganzle 2019**).

### 3.3.1.4. Lactoferrine

La lactoferrine est une protéine multifonctionnelle présente dans de nombreuses sécrétions biologiques, notamment le lait et elle possède une activité antibactérienne, antivirale, antifongique, anti-inflammatoire ainsi qu'anticancérigène. Ces propriétés fonctionnelles dépendent étroitement de son intégrité structurale. Cette dernière est principalement extraite du lait d'origine bovine et elle est ensuite ajoutée à de nombreux produits commerciaux tels que les suppléments nutritionnels et les préparations pour les nourrissons. La lactoferrine a montré un effet bactériostatique contre une variété de bactéries à Gram positif et négatif. Des études antérieures ont proposé que l'activité antibactérienne de lactoferrine est due à sa grande affinité pour le fer causant une carence en fer nécessaire pour la croissance des microorganismes (**Wang et al. 2019**).

### 3.3.1.5. Pleurocidine

La pleurocidine est un peptide antimicrobien qui se trouve dans la plie d'hiver (*Pseudopleuronectes americanus*), une espèce de plie de l'Atlantique, elle est utilisée dans plusieurs applications cliniques, vétérinaires, alimentaires, et aquaculture. Ce peptide est dérivé de la muqueuse cutanée et des sécrétions intestinales de la plie d'hiver avec une large gamme d'activités antimicrobiennes contre les bactéries pathogènes à Gram positif et négatif. La pleurocidine attaque soit la membrane cytoplasmique ou inhibe le processus métabolique interne, ce qui conduit à la mort cellulaire (**McMillan & Coombs 2021**). Ce peptide est très utilisé dans les applications alimentaires et s'est avéré efficace contre les microorganismes

d'origine alimentaire, y compris *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Saccharomyces cerevisiae* et *Penicillium expansum* (Tiwari *et al.* 2009).

### 3.3.1.6. Défensines

Les défensines sont des peptides cationiques et non glycosylés, où l'arginine est le résidu cationique primaire. Ils contiennent six résidus de cystéine qui forment trois ponts disulfures intramoléculaires avec une masse moléculaire d'environ 3,5 à 6 kDa (Khurshid *et al.* 2018). Elles représentent un autre groupe de peptides antimicrobiens largement trouvés dans la nature, y compris les cellules épithéliales de mammifères, de poulets et de dindes (Tiwari *et al.* 2009). Les défensines ont un large spectre d'activité antimicrobienne, y compris les bactéries à Gram positif, à Gram négatif, des champignons et des virus enveloppés (Khurshid *et al.* 2018).

### 3.3.1.7. Lipides

Comme les lipides d'origine végétale, les lipides d'origine animale ont une activité antimicrobienne contre un large éventail de microorganismes. Il a été démontré que les lipides du lait ont enregistré une activité contre les bactéries à Gram positif, y compris *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* ainsi que différentes bactéries à Gram négatif telles que *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Salmonella enteritidis*, et également contre divers champignons tels que *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*. Les lipides peuvent participer à l'inhibition de la prolifération des microorganismes pathogènes ainsi que ceux de la détérioration alimentaire (Tiwari *et al.* 2009).

**MATÉRIEL**

**ET**

**MÉTHODES**

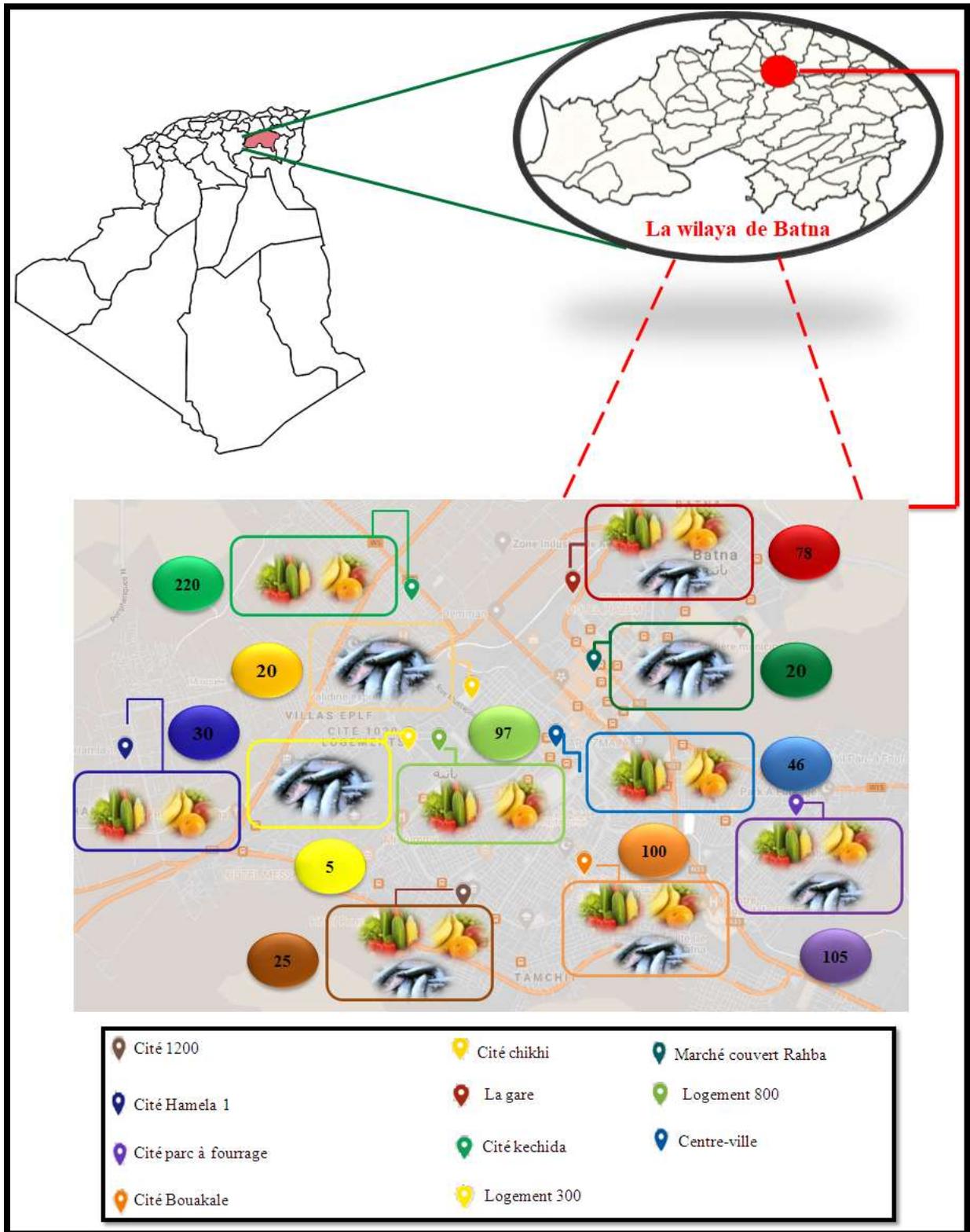
## 1. Échantillonnage

Au cours de la période allant de Mars 2019 à Mars 2020 et de Septembre 2020 à Avril 2021 (21 mois), 746 échantillons de légumes (n=400), de fruits (n=226) et de poissons frais (n=120) ont été collectés (achetés) à partir de différents points de vente au niveau de la ville de Batna à l'Est algérien dont la localisation et la taille de l'échantillonnage sont présentées dans la **figure 16** et le **tableau 2**. Les différentes séries d'échantillonnage ont été effectuées en fonction de la disponibilité des échantillons en question dans le commerce.

Les échantillons prélevés ont été immédiatement emballés aseptiquement dans des sacs en polyéthylène stériles à fermeture hermétique, puis transportés au laboratoire dans une glacière isotherme (4°C) pour analyse dans maximum trois heures qui suivent le prélèvement.

**Tableau 2.** Le nombre des différents types d'échantillons prélevés.

Aliment	Nombre total	Type	Nombre d'échantillon
Légumes	400	Courgette	82
		Carotte	75
		Navet	75
		Concombre	70
		Tomate	45
		Oignon	20
		Laitue	17
		Persil	8
Fruits	226	Coriandre	8
		Dattes	30
		Fraise	30
		Banane	50
		Orange	65
		Raisin	21
		Poire	30
Poissons	120	<i>Sardina pilchardus</i>	50
		<i>Sardinella aurita</i>	70



**Figure 16.** Localisation des différents sites d'échantillonnage avec le nombre des différents types d'échantillons prélevés.

## 2. Isolement des bactéries résistantes aux $\beta$ -lactamines et à la colistine

### 2.1. Traitement et pré-enrichissement des échantillons

Les échantillons ont été traités séparément en fonction de leur provenance. Chaque échantillon de légumes a été coupé aseptiquement en petits morceaux à l'aide d'un couteau stérile, puis une fraction de ce dernier a été placée dans un sac en plastique stérile. Ensuite une solution saline stérile (0,9 % de NaCl) a été rajoutée avec un rapport de 1:4 (p/v). Les mélanges obtenus ont été homogénéisés séparément dans des béchers en verre stériles mis dans un bain de glace en utilisant un broyeur mécanique à hélice stérile, puis incubés pendant quatre heures à 37°C. La désinfection du broyeur a été effectuée à chaque utilisation comme suit : immergé dans de l'eau de Javel pendant 2 min, dans l'eau distillée stérile pendant 2 min (premier rinçage), puis dans de l'éthanol à 70% pendant 5 min et ensuite encore une fois dans l'eau distillée stérile (deuxième rinçage).

L'eau du dernier rinçage de chaque opération a fait l'objet de contrôle de qualité microbiologique en transférant 100 ml dans un flacon contenant 100 ml du bouillon nutritif (double concentration) puis les flacons ont été incubés à 37°C pendant 18 à 24 h. Après incubation, 10  $\mu$ l de chaque flacon ont étéensemencés sur gélose nutritive et MacConkey. Une culture négative de ces derniers confirmerait l'efficacité de la procédure de désinfection. L'étape de pré-enrichissement sert à la revivification des bactéries présentes dans les échantillons prélevés.

Pour les fruits et les poissons, la surface de chaque échantillon a fait l'objet d'écouvillonnage à l'aide d'un écouvillon stérile pré-trempé dans un bouillon cœur-cerveille (BCC) additionné d'une solution de tween 80 à 0,05% comme agent détachant (détergent) permettant une bonne récupération des bactéries présentes, puis incubé pendant 4 heures à 37°C dans le milieu BCC (étape de pré enrichissement). Puis et pour éliminer les contaminants présents à la surface des échantillons, chaque prélèvement de fruits a été immergé dans de l'éthanol à 70% pendant 2 minutes, alors que les prélèvements des poissons ont été stérilisés par traitement thermique par flambage au bec bunsen puis mis dans une solution saline stérile (0,9% NaCl) avec un rapport de 1:4 (p/v). Les mélanges des échantillons de fruits et de poissons obtenus ont été homogénéisés séparément de la même manière que les légumes et incubés pendant quatre heures à 37°C. Les procédés de désinfection suivis dans cette partie d'étude ont fait l'objet de contrôle de qualité par culture sur les mêmes milieux utilisés.

## 2.2. Enrichissement sélectif

Pour l'isolement des bactéries à Gram négatif résistantes aux céphalosporines à spectre étendu, aux carbapénèmes et à la colistine, chaque échantillon homogénéisé et pré-enrichi (de la partie interne et externe) a fait l'objet d'inoculation (à raison de 5 ml par tube) de cinq tubes contenant 10 ml du bouillon cœur-cerveau additionné de 5 différentes combinaisons d'antibiotiques sélectifs comme suit : 64 µg/ml de la vancomycine associée avec cinq autres antibiotiques : i. 2 µg/ml du céfotaxime (CTX), ii. 9 µg/ml de la céftazidime (CAZ), iii. 2 µg/ml d'ertapénème (ETP), iv. 9 µg/ml d'imipénème (IMP) ou v. 3 µg/ml de la colistine (COL), respectivement, puis incubés à 37 °C pendant 24 heures. Les concentrations utilisées dans cette étude sont similaires avec celles du protocole d'isolement suivi par Bendjama *et al.* (2020) et Ghafur *et al.* (2019).

## 2.3. Isolement sélectif

Dix microlitres de chaque tube d'enrichissement sélectif ont étéensemencés par stries à la surface d'une gélose MacConkey avec la combinaison d'antibiotiques sélectifs correspondante et incubés à 37°C pendant 24 heures. Des souches témoins négatifs et positifs ont été utilisées pour le contrôle de qualité de toutes les étapes du protocole expérimental du screening sélectif des bactéries en question. Les différentes étapes d'isolement sélectif des BGN résistantes sont illustrées dans la **figure 17**.

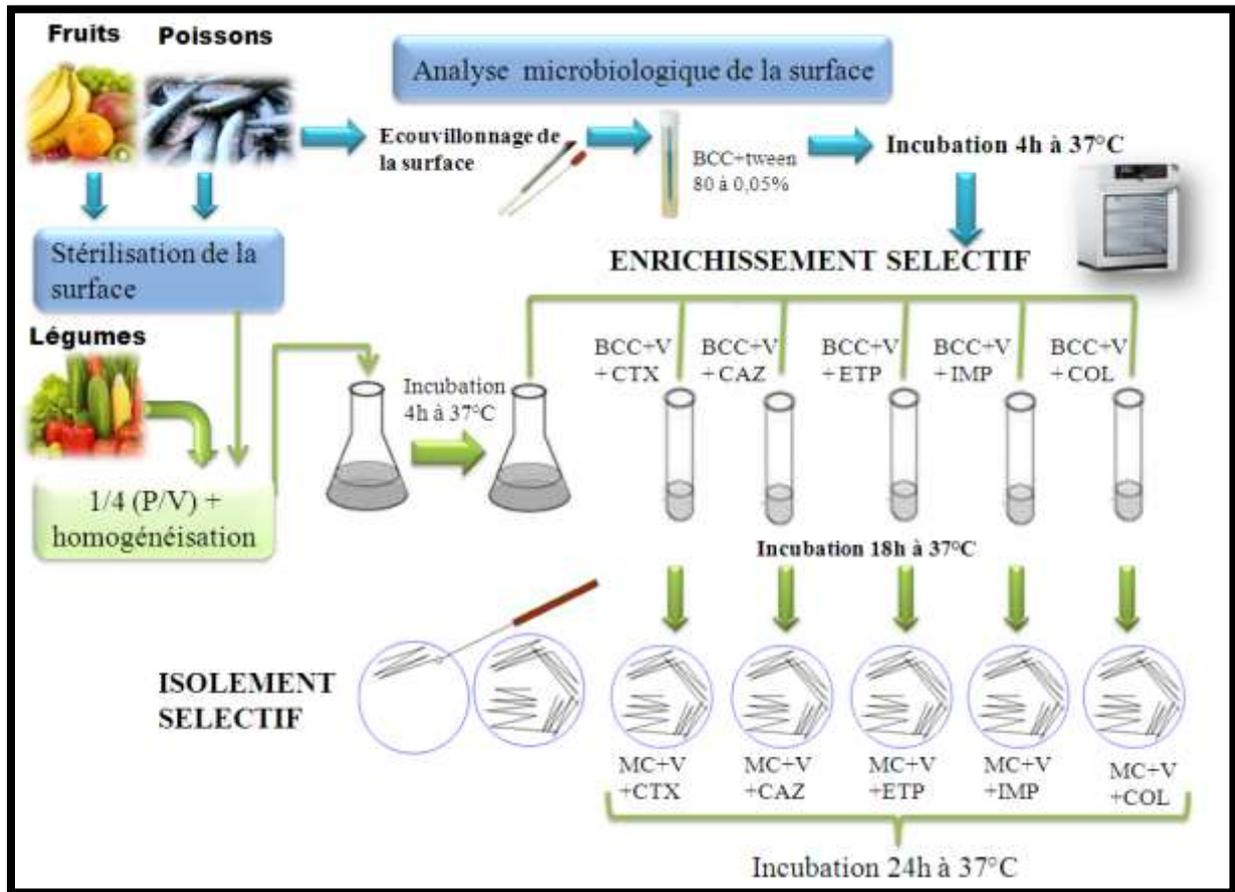


Figure 17. Les différentes étapes d'isolement des BGN résistantes.

### 3. Identification des souches isolées

L'identification à l'échelle de l'espèce des bactéries isolées a été réalisée en plusieurs étapes comme suit : i. étape préliminaire basée sur la coloration de Gram et le test de fermentation des sucres (TSI), ii étape de l'identification par le système VITEK-2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) en respectant les recommandations du fabricant (uniquement pour les souches isolées à partir des fruits et des poissons en raison de la disponibilité des réactifs en question au moment de l'analyse) puis iii. confirmation de l'identification par la méthode de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry) pour toutes les souches obtenues.

#### 3.1. Système VITEK-2

VITEK 2 est un système d'identification des taxons jusqu'à l'échelle de l'espèce (bactéries et levures). La gamme VITEK 2 bénéficie d'une performance accrue en matière d'identification bactérienne grâce à la technologie "Advanced Colorimetry™". Plus de 330

espèces microbiennes peuvent être identifiées grâce à une base de données optimisée (**Pincus 2006**). La réalisation de cette technique s'effectue en plusieurs étapes comme suit :

### 3.1.1. Préparation de la suspension bactérienne

À partir d'une culture jeune et pure, un nombre suffisant de colonies ont été mises en suspension dans trois millilitres d'une solution saline stérile livrée par le fabricant dans un tube en plastique transparent. La turbidité de la suspension bactérienne a été ajustée à l'aide d'un turbidimètre (DensiChek™) à 0,5-0,63 McFarland (**Pincus 2006**).

### 3.1.2. Inoculation

Les cartes d'identification ont été d'abord sélectionnées en fonction du groupe bactérien à identifier (Gram positif ou négatif : fermentaire ou non fermentaire, etc.) puis chaque carte a été inoculée avec la suspension bactérienne préparée préalablement. Le tube contenant la suspension bactérienne a été ensuite placé dans un rack spécial (cassette) et la carte d'identification est placée dans la fente correspondante.

Une fois que le vide a été appliqué et que l'air a été réintroduit dans la station, la suspension bactérienne a été injectée à travers le tube de transfert dans des microcanaux qui remplissent tous les puits d'essai (**Pincus 2006**).

### 3.1.3. Scellement des cartes et incubation

L'appareil est équipé d'un mécanisme qui coupe le tube de transfert et scelle la carte une fois inoculée avant de la charger dans l'incubateur. Ce dernier peut accueillir entre 30 à 60 cartes où tous les types de cartes sont incubés à  $35,5 \pm 1,0^\circ\text{C}$ . Chaque carte est retirée de l'incubateur une fois toutes les 15 minutes, transportée vers le système optique pour réaction, puis retourne à l'incubateur jusqu'à la prochaine heure de la lecture. Les données sont recueillies à des intervalles de 15 minutes pendant toute la période d'incubation.

### 3.1.4. Analyse des résultats

Chacune des valeurs composites est comparée aux autres pour déterminer si les données sont suffisamment uniques ou proches d'un ou de plusieurs des autres taxons de la base de données, et un calcul de probabilité numérique est effectué. Si un modèle d'identification unique n'est pas reconnu, une liste des bactéries possibles est donnée, ou la souche est déterminée comme étant en dehors de la portée de la base de données.

Différents niveaux qualitatifs d'identification sont attribués sur la base du calcul de la probabilité numérique (excellente 96 à 99, très bien : 93 à 95, bien : 89 à 92, acceptable : 85 à

88, faible discrimination, organisme non identifié). La version numérique des résultats est enregistrée sur l'ordinateur de l'appareil (**Pincus 2006**).

### 3.2. MALDI-TOF-MS

Le principe général du MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry) consiste en des ions de masse et de charges différentes soumis à un champ électrique leur permettant de se déplacer le long du tunnel de l'appareil à des vitesses (temps de vol) différentes en fonction du rapport masse sur charge ( $m/z$ ) (**Carbonnelle & Nassif 2011**). Cette technique se déroule en trois principales étapes :

#### 3.2.1. Préparation de la matrice

La préparation de la matrice s'effectue sous hotte chimique dans un microtube (Eppendorf), selon le protocole suivant : une solution saturée en acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique, 250  $\mu$ l d'acide trifluoroacétique (TFA) à 10%, 250  $\mu$ l d'eau HPLC et 500  $\mu$ l d'acétonitrile HPLC. Le mélange obtenu a été ensuite vortexé, soniqué pendant 10 minutes dans un sonicateur (bain à ultrasons) et enfin centrifugé à 1300 g pendant 5 minutes.

Après centrifugation, le surnageant a été récupéré dans un autre tube d'Eppendorf ainsi la matrice est prête à être utilisée où elle doit être conservée à 4°C à l'abri de la lumière.

#### 3.2.2. Dépôt de l'échantillon sur la cible MALDI

Les colonies bactériennes y compris le témoin négatif (matrice seule) et témoin positif (bactérie connue et déjà identifiée) ont été déposées en fine couche homogène en trois exemplaires pour chacune à l'aide d'une pointe de cône de pipette stérile sur les spots de la plaque métallique de l'appareil. Après le dépôt des colonies, 1,5  $\mu$ l de la matrice a été déposé sur chaque spot cela implique le mélange de l'échantillon et de la matrice sur la cible. Puis, le mélange doit être laissé sécher pendant quelques minutes sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) type 2 pour permettre sa co-cristallisation avec l'échantillon bactérien.

#### 3.2.3. Insertion de la cible et lancement de l'identification par MALDI-TOF-MS

Une fois les échantillons et les témoins ont été séchés, la cible est insérée dans le spectromètre type Microflex LTII (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) avec un réglage des paramètres appropriés. L'identification des souches bactériennes est obtenue en utilisant le programme MALDI Biotyper Compass.

Les résultats de l'identification sont exprimés par un score. L'identification est correcte lorsque la valeur du score identifiée par le MALDI-TOF est  $\geq 2$ . Les différentes correspondances des scores pour MALDI-TOF sont présentées dans le **tableau 3** (Seng *et al.* 2010).

**Tableau 3.** Correspondance des scores pour MALDI-TOF-MS.

Valeur	Description	Symboles	Couleur
2.300-3.000	Forte probabilité d'identification à l'espèce	(+++)	Vert
2.000-2.299	Identification du genre sécurisée, identification à l'espèce probable	(++)	Vert
1.700-1.999	Identification au genre probable	(+)	Jaune
0.000-1.699	Degré de confiance insuffisant pour l'identification	(-)	Rouge

#### 4. Étude de la sensibilité aux antibiotiques

##### 4.1. Méthode de la diffusion en milieu gélosé

Les souches isolées ont fait l'objet d'une étude de la sensibilité aux différentes familles d'antibiotique en utilisant la méthode de diffusion en milieu gélosé selon les recommandations de la Société Française de Microbiologie (CASFM, 2019).

À partir d'une culture jeune, une suspension bactérienne de 0,5 McFarland a été préparée dans de l'eau physiologique (0.9%) stérile où elle doit idéalement être employée dans les 15 minutes qui suivent sa préparation. La suspension bactérienne a été écouvillonnée sur la totalité de la surface de la gélose Mueller-Hinton à l'aide d'un écouvillon dans trois directions avec l'angle de 60° puis l'écouvillon a été passé sur la périphérie de la gélose. Il est important d'éliminer l'excès de liquide sur l'écouvillon pour éviter une sur-inoculation des boîtes.

Par la suite, les disques d'antibiotiques ont été déposés sur la surface de la gélose Mueller-Hinton à l'aide d'une pince stérile. En fonction des espèces identifiées, deux gammes d'antibiotiques ont été testées (**tableau 4**). Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 18-24 heures.

**Tableau 4.** Les deux gammes d'antibiotiques testés contre les souches isolées.

Catégorie	Antibiotiques/charge	Catégorie	Antibiotiques/charge
<b>Bactéries fermentaires</b>	Amoxicilline (20 µg)	<b>Bactéries non fermentaires</b>	Ticarcilline (75 µg)
	Amoxicilline-acide clavulanique (20-10 µg)		Ticarcilline-acide clavulanique (75-10 µg)
	Céfoxitine (30 µg)		Céftazidime (30 µg)
	Céfotaxime (30 µg)		Aztreonam (30 µg)
	Céftazidime (30 µg)		Ertapénème (10 µg)
	Aztreonam (30 µg)		Imipénème (10 µg)
	Ertapénème (10 µg)		Tobramycine (10 µg)
	Imipénème (10 µg)		Gentamicine (10 µg)
	Tobramycine (10 µg)		Amikacine (30 µg)
	Gentamicine (10 µg)		Ciprofloxacine (5µg)
	Amikacine (30 µg)		
	Ciprofloxacine (5µg)		

#### 4.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice de la colistine

La concentration minimale inhibitrice de la colistine a été déterminée par la méthode de micro-dilution sur des plaques à 96 puits (alignés en 8 lignes et 12 colonnes), pour chaque souche, dix concentrations ont été testées (256 µg/ml, 128 µg/ml, 64 µg/ml, 32 µg/ml, 16 µg/ml, 8 µg/ml, 4 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml et 0.5 µg/ml). Un volume de 100 µl du bouillon Mueller-Hinton (MH) ajusté en cations ( $\text{Ca}^{+2}$  et  $\text{Mg}^{+2}$ ) a été distribué dans chaque puits (colonne 2 à 12). Cent microlitres de la solution stock de la colistine avec une concentration de 25600 µg/ml ont été mélangés avec 10 ml du bouillon MH en cations  $\text{Ca}^{+2}$  et  $\text{Mg}^{+2}$  pour avoir une concentration finale de 256 µg/ml puis 200 µl de ce mélange ont été ajoutés dans chaque puit de la première colonne (EUCAST, 2019).

Une série de dilution de la colistine à un facteur de 1/2 a été réalisée de colonne en colonne. Ensuite, pour chaque souche bactérienne testée, une suspension de 0.5 Mcfarland puis diluée à  $1/20^{\text{ème}}$  a été préparée, où 10 µl de la suspension préparée ont été ensuite déposés dans tous les puits (sauf pour la colonne 11) (EUCAST, 2019). Un contrôle négatif (bouillon MH non inoculé) et un contrôle positif (MH+ souche bactérienne testée sans antibiotique) ont été préparés pour chaque plaque dans les colonnes 11 et 12 respectivement. Les plaques ont été incubées pendant 24h à 37°C. Après incubation, un révélateur colorimétrique de croissance (couleur

rouge) l'Iodonitrotetrazolium chloride a été utilisé pour faciliter la lecture des résultats comme décrits par Dofini Magnini *et al* (2023) (**Dofini Magnini *et al.* 2023**).

## 5. Détection phénotypique des $\beta$ -lactamases

### 5.1. Test de synergie

Le test de synergie est un test phénotypique qui permet la mise en évidence d'une production de BLSE chez une souche donnée.

Selon la technique d'antibiogramme recommandée par l'EUCAST, une suspension bactérienne de 0.5 McFarland a été préparée à partir d'une culture jeune de 18h. Après ensemencement de la souche testée sur la gélose Mueller-Hinton, deux disques d'antibiotiques l'un contenant l'association amoxicilline-acide clavulanique et l'autre une céphalosporine de troisième génération (céfotaxime et ceftazidime) ont été placés à une distance de 20 à 30 mm centre à centre (**Drieux *et al.* 2008**).

Le test est considéré positif lorsqu'une sensibilité réduite au céfotaxime et/ou la ceftazidime est combinée avec une amélioration nette de la zone d'inhibition au céfotaxime en face du disque contenant du clavulanate, ce qui entraîne souvent une zone de forme caractéristique dénommée « bouchon de champagne » ou « Trou de serrure » (**Drieux *et al.* 2008**).

### 5.2. Test à la cloxacilline

Le test à la cloxacilline est un test phénotypique simple utilisé pour la confirmation de la production d'une céphalosporinase hyperproduite ou acquise (sur un élément mobile) chez les bactéries à Gram négatif. Il a été effectué avec une concentration bien déterminée de la cloxacilline (250  $\mu\text{g/ml}$ ) comme inhibiteur de céphalosporinase (**Drieux *et al.* 2008**). Ce test a été réalisé sur les souches qui ont présenté à l'antibiogramme une résistance à la céfoxitine (C2G).

Le test à la cloxacilline a été réalisé selon la méthode de diffusion en milieu gélosé selon les recommandations de la Société Française de Microbiologie en utilisant le milieu Mueller-Hinton sans et avec cloxacilline (250  $\mu\text{g/ml}$ ). Ensuite un disque de céfoxitine et de céphalosporine de troisième génération (céfotaxime et ceftazidime) ont été placés sur le milieu Mueller-Hinton sans et avec cloxacilline préalablement ensemencé par la souche testée puis les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24h (**CASFM, 2019**).

L'interprétation des résultats a été effectuée en comparant les résultats obtenus en présence et absence de la cloxacilline. Une augmentation de la sensibilité aux céphalosporines (C2G et C3G) au moins de 5 mm en présence de la cloxacilline est considérée comme une confirmation de la production d'une céphalosporinase. Le test de la cloxacilline a été également utilisé pour permettre une meilleure visualisation d'une BLSE cachée (association entre BLSE et céphalosporinase).

### 5.3. Carba NP test modifié

Le Carba NP test modifié est un test rapide basé sur la détection biochimique et rapide d'une acidification du milieu en cas d'hydrolyse du cycle  $\beta$ -lactame d'un carbapénème par une carbapénémase, accompagné par un changement de la couleur d'un indicateur de pH (rouge de phénol) du rouge à l'orange ou jaune. Dans cette étude, la recherche phénotypique des carbapénémases par ce test a été réalisée sur les souches qui ont présenté à l'antibiogramme une sensibilité réduite à une des carbapénèmes testés (**Dortet *et al.* 2012**).

Le test a été réalisé à partir d'une culture jeune obtenue sur la gélose Mueller-Hinton. Quelques colonies ont été prélevées à l'aide d'une öese stérile puis ont été mises en suspension dans 200 $\mu$ L d'une solution de lyse de cétyle tri méthyl ammonium bromide (CTAB) déjà préparé à 0,02% puis le contenu a été vortexé pendant 2 min. Ensuite, 100 $\mu$ L de la suspension bactérienne lysée ont été mélangées dans un microtube de 2 ml avec 100  $\mu$ L d'une solution de rouge de phénol sans imipénème et 0,1 mM de ZnSO<sub>4</sub> (contrôle négatif) et 100  $\mu$ L dans un microtube contient 100  $\mu$ L d'une solution de rouge de phénol avec imipénème (3 mg/ml) et 0,1 mM de ZnSO<sub>4</sub>. Les microtubes en question ont été incubés à 37°C pendant 2 heures (**Bakour *et al.* 2015**).

### 5.4. Test d'inhibition à l'EDTA

Le test d'inhibition à l'EDTA est un test phénotypique permettant la détection d'une carbapénémase type metallo- $\beta$ -lactamase (MBL). Ce test phénotypique a été effectué en utilisant la combinaison cabapénème-EDTA (imipénème-EDTA).

En premier, une solution d'éthylènediaminetétra-acétique (EDTA) de 0,1 M a été préparée puis, 10  $\mu$ l de cette solution ont été déposés sur un disque d'imipénème. Après séchage, un disque d'imipénème seul et d'imipénème-EDTA ont été déposés sur la gélose Mueller-Hinton préalablement inoculée par la souche à tester selon la technique de diffusion en milieu gélosé (les disques d'imipénème-EDTA doivent idéalement être employés dans les 60 minutes qui suivent sa préparation) (**Bartolini *et al.* 2014**).

Après incubation à 37°C pendant 24h, une différence de la zone de croissance supérieure à 5 mm entre celle autour du disque d'imipénème et celle autour du disque d'imipénème-EDTA est considérée comme une confirmation de la présence d'une MBL (Bartolini *et al.* 2014).

## 6. Méthode de conjugaison

La transférabilité des gènes *bla*<sub>OXA-48</sub> et *mcr-1* a été testée par des expériences de conjugaison en utilisant la souche J53 d'*Escherichia coli* résistante à l'azide de sodium comme une souche réceptrice. Brièvement, à partir d'une culture pure et jeune, des colonies isolées de la bactérie donneuse et de la receveuse ont servi pour l'inoculation des tubes contenant du bouillon BCC puis ces derniers ont été incubés pendant 4h à 37°C. Après incubation, les deux bouillons positifs ont été mélangés avec un rapport de 1 :10 volumes (donneur : receveur) puis les tubes ont été incubés pendant 24h à 37°C sans agitation. Les transconjugants ont été sélectionnés en ensemençant 10 µl de chaque tube de conjugaison sur la gélose nutritive additionnée de 200 µg/ml d'azide de sodium et d'ertapénème (2 µg/ml) ou de la colistine (3 µg/ml) (Bendjama *et al.* 2020).

Pour toutes les expériences de conjugaison, les souches donneuses seules et la souche receveuse seule ont été utilisées comme témoins sur la même gélose sélective des transconjugants pour le contrôle de qualité de cette expérience.

Les transconjugants obtenus ont fait objet d'identification bactérienne, tests phénotypiques et moléculaires d'antibiorésistance pour confirmation du transfert du mécanisme en question.

## 7. Détection moléculaire des gènes d'antibiorésistance

Les mécanismes d'antibiorésistance ciblés dans cette étude et mis en évidence phénotypiquement ont été recherchés et caractérisés par les outils de la biologie moléculaire (caractérisation des déterminants génétiques de l'antibiorésistance en question).

### 7.1. PCR en temps réel

La PCR en temps réel est une réaction d'amplification couplée à la détection simultanée de la cible amplifiée de façon exponentielle et la visualisation des réactions des phases d'amplification. Le nombre de cycles nécessaires pour atteindre cette phase exponentielle de croissance dépend souvent de la quantité initiale des cibles présentes dans la réaction (Lupo *et al.* 2013).

### 7.1.1. Extraction d'ADN bactérien

L'extraction génomique de l'ADN a été réalisée en utilisant l'automate EZ1 biorobot (Qiagen, Hilden, Allemagne), à l'aide du kit « tissu EZ1 DNA » (Qiagen) dans un volume final de 200 µl. L'ADN a été ensuite conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

### 7.1.2. Réaction de polymérisation en temps réel

Les gènes codant pour les BLSE (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>), les carbapénémases (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub> et *bla*<sub>OXA-58</sub>) et *mcr* (*mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5* et *mcr-8*) des souches isolées ont été recherchés par PCR en temps réel effectuée avec un système de détection PCR en temps réel CFX96 Touch (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) en utilisant la technologie TaqMan. Les amorces et les sondes utilisées dans cette étude sont énumérées dans le **tableau 5**.

Le mélange réactionnel de la qPCR a été préparé dans un volume final de 20 µl contenant 10 µl de QuantiTect Probe PCR Kit (200) (Qiagen), 1 µl de chaque amorce (forward et reverse) (0,02 nmol/µl), 1 µl de la sonde (0,002 nmol/µl), 5 µl de chaque ADN et 2 µl d'eau distillée ultra-pure. L'amplification a été réalisée comme suit : deux minutes d'incubation à 50°C, 15 minutes d'activation à 95°C, suivies de 35 cycles d'une seconde à 95°C (dénaturation) et 30 secondes à 60°C (hybridation-extension) avec capture de la fluorescence émise à chaque cycle d'amplification de l'amplicon ciblé. Un contrôle négatif (mélange réactionnel de PCR seul) et un contrôle positif (ADN d'une souche positive pour le gène recherché) ont été inclus dans chaque essai expérimental de la PCR.

### 7.1.3. Réaction en chaîne par polymérase (PCR) standard

Les souches avec qPCR positive ont fait l'objet d'une PCR standard (conventionnelle) suivie du séquençage des amplicons détectés. Les mélanges réactionnels des PCR conventionnelles ont été préparés avec un volume final de 25 µl comme suit : 12,5 µl de la Taq polymérase AmpliTaq Gold™ 360 (Applied Biosystems, États-Unis), 0,5 µl de chaque amorce (F et R) (0,02 nmol/µl), 6,5 µl d'eau distillée ultra-pure et 5 µl d'ADN, en utilisant les conditions de PCR suivantes : 15 min à 95°C (activation), suivies de 35 cycles pendant 30 secondes à 95°C (dénaturation), 50 secondes à 55°C (hybridation), 1 min à 72°C (élongation) et une dernière étape d'amplification de 10 min à 72°C (élongation finale). Un contrôle négatif et positif ont été utilisés pour le contrôle de qualité de chaque réaction. Les amorces de PCR standard utilisées dans cette étude sont présentées dans le **tableau 5**.

#### 7.1.4. Électrophorèse et séquençage des produits de PCR standard

Les produits de PCR standards ainsi que les témoins positifs et négatifs ont été analysés par migration sur gel d'agarose à 1,5%, le gel a été préparé en mélangeant 1,5 g d'agarose dans 100 ml du tampon Tris-Borate-EDTA (TBE) 0,5X, puis le mélange a été placé dans un micro-ondes jusqu'à dissolution totale. Ensuite 4 µl du syber-safe ont été ajoutés, puis le gel a été versé dans un support d'électrophorèse muni d'un peigne afin de polymériser à température ambiante. Après polymérisation, il faut retirer le peigne qui laisse des puits dans le gel, puis ce dernier avec son support ont été immergés dans une cuve de migration d'électrophorèse contenant du tampon TBE 0,5X.

Tous les produits de PCR ont été mélangés avec du bleu de charge (BlueJuice loading buffer) avant d'être déposés dans les puits. Quatre microlitres d'un marqueur de poids moléculaire 2kb DNA Ladder ont été déposés dans le premier puit au même temps que les produits de PCR (ADN) chacun dans un puit. Une fois la migration finie, le gel a été placé dans un système d'imagerie à UV (transilluminateur UV) pour la visualisation des bandes.

Après révélation, tous les produits positifs ont été soumis au séquençage afin de déterminer la séquence nucléotidique des amplicons en question.

#### 7.1.5. Purification des produits de PCR

Après électrophorèse, 100 µl d'eau ultra pure ont été ajoutés au produit de PCR, puis le mélange a été déposé sur une plaque à filtre à 96 puits (Machery Nagel). Cette dernière a été mise sous vide pendant 20 minutes, puis 25 µl d'eau ultra pure ont été ajoutés dans chaque puit. Ensuite la plaque a fait l'objet d'une agitation orbitale pendant 20 minutes à 600 tr/min et à la fin chaque produit de PCR pure a été récupéré dans un microtube stérile à part.

#### 7.1.6. PCR BigDye

Cette PCR consiste à amplifier l'amplicon en question avec une seule amorce sens puis antisens séparément en utilisant des bases azotées marquées pour le séquençage. Cette réaction se déroule dans un volume final de 20 µl, avec un mélange réactionnel contenant 3 µl du tampon de réaction et 2 µl de BigDye (Applied Biosystems, Foster city, CA, États-Unis), 10 µl d'H<sub>2</sub>O, 1 µl d'amorce F ou R) et 4 µl du produit de PCR purifié et en utilisant le programme de PCR suivante : 1 min à 96°C, suivie de 25 cycles de 10 secondes à 96°C, 5 secondes à 50°C et une élongation pendant 4 min à 60°C.

### 7.1.7. Purification sur gel Séphadex

Les produits de PCR-BigDye ont été purifiés à l'aide d'une plaque à filtre Sephadex. La plaque a été préparée en déposant la poudre du gel Sephadex dans les puits de la plaque auxquels 300 µl d'eau ultra pure ont été ajoutés, puis le gel a été laissé pour maturation pendant 2 à 3 heures à température ambiante. Avant de déposer les produits de PCR, la plaque Sephadex a été posée sur une plaque de séquençage puis centrifugée à 2500 rpm pendant 2 minutes à 15°C afin d'éliminer l'excès d'eau puis cette opération a été répétée une autre fois après dépôts des produits BigDye purifiés pour les récupérer dans une nouvelle plaque de séquençage.

### 7.1.8. Séquençage et analyse des séquences

Les produits de PCR purifiés ont été séquencés à l'aide d'un séquenceur type ABI 3500xl (Applied Biosystems, Foster City, CA, États-Unis).

Après séquençage, les séquences obtenues ont été traitées et corrigées à l'aide du logiciel CodonCode Aligner (version 4.2.7), puis alignées en utilisant le programme BLAST avec celles de la base de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI) puis confirmées avec celles de la base de données ARG-ANNOT (<https://www.mediterranean-infection.com/acces-ressources/base-de-donnees/arg-annot-2/>).

**Tableau 5.** Les séquences des différentes amorces et sondes de PCR en temps réel et standard utilisées dans cette étude.

Gène	Type de PCR	Amorces	Séquence des amorces (5'→3')	Références
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	Real-time PCR	KPC-F	GATACCACGTTCCGTCTGGA	(Yousfi <i>et al.</i> 2019)
		KPC-R	GGTCGTGTTTCCCTTTAGCC	
		KPC-Probe	6-FAM-CGCGCGCCGTGACGGA AAGC-TAMRA	
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	Real-time PCR	VIM-F	CACAGYGGCMCTTCTCGCGGAGA	(Diene <i>et al.</i> 2011)
		VIM-R	GCGTACGTYGCCACYCCAGCC	
		VIM-Probe	6-FAM-AGTCTCCACGCACTTTCATGA CGACCGCGTCGGCG-TAMR	
<i>bla<sub>NDM</sub></i>	Real-time PCR	NDM-1 F	GCGCAACACAGCCTGACTTT	(Diene <i>et al.</i> 2011)
		NDM-1 R	CAGCCACCAAAGCGATGTC	
		NDM-1-Probe	6-FAM-CAACCGCGCCCAACTTTGGC-TAMRA	
		OXA48-	TCTTAAACGGGCGAACCAAG	

<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	Real-time PCR	RT-F		(Yousfi <i>et al.</i> 2019)
		OXA48-RT-R	GCGTCTGTCCATCCCCTTA	
<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Real-time PCR	OXA48-RT-Probe	6-FAM-AGCTTGATCGCCCTCG ATTTGG-TAMRA	(Mesli <i>et al.</i> 2013)
		OXA-23-F	TGCTCTAAGCCGCGCAAATA	
		OXA-23-R	TGACCTTTTCTCGCCCTTCC	
<i>bla</i> <sub>OXA-24</sub>	Real-time PCR	OXA-23-probe	FAM- GCCCTGATCGGATTGGAGAACCA-TAMRA	(Mesli <i>et al.</i> 2013)
		OXA-24-F	CAAATGAGATTTTCAAATGGGATGG	
		OXA-24-R	TCCGTCTTGCAAGCTCTTGAT	
<i>bla</i> <sub>OXA-58</sub>	Real-time PCR	OXA-24-probe	FAM- GGTGAGGCAATGGCATTGTCAGCA-TAMRA	(Mesli <i>et al.</i> 2013)
		OXA-58-F	CGCAGAGGGGAGAATCGTCT	
		OXA-58-R	TTGCCCATCTGCCTTTTCAA	
<i>mcr</i> -1-2	Real-time PCR	OXA-58-probe	FAM-GGGGAATGGCTGTAGACCCGC-TAMRA	(Ly <i>et al.</i> 2019)
		mcr-1-2-F	CTGTGCCGTGTATGTTTCAGC	
		mcr-1-2-R	TTATCCATCACGCCTTTTGAG	
<i>mcr</i> -3	Real-time PCR	Probe (mcr-1-2)	FAM-TATGATGTCGATACCGCCAAATACC-TAMRA	(Ly <i>et al.</i> 2019)
		Probe (mcr-2)	VIC-TGACCGCTTGGGTGTGGGTA-TAMRA	
		mcr-3-F	TGAATCACTGGGAGCATTAGGGC	
<i>mcr</i> -4	Real-time PCR	mcr-3-R	TGCTGCAAACACGCCATATCAAC	(Ly <i>et al.</i> 2019)
		mcr-3-probe	FAM-TGCACCGGATGATCAGACCCGT-TAMRA	
		mcr-4-F	GCCAACCAATGCTCATACCCAAA	
<i>mcr</i> -4	Real-time PCR	mcr-4-R	CCGCCCCATTCGTGAAAACATAC	(Ly <i>et al.</i> 2019)
		mcr-4-probe	FAM-GCCACGGCGGTGTCTCTACCC-TAMRA	
		mcr-5-F	TATCCCGCAAGCTACCGACGC	

mcr-5	Real-time PCR	mcr-5-R	ACGGGCAAGCACATGATCGGT	
		mcr-5-probe	FAM-TGCGACACCACCGATCTGGCCA-TAMRA	
mcr-8	Real-time PCR	mcr-8-F	TCCGGGATGCGTGACGTTGC	(Nabti <i>et al.</i> 2020)
		mcr-8-R	TGCTGCGCGAATGAAGACGA	
		mcr-8-probe	FAMTCATGGAGAATCGCTGGGGGAAAGC-TAMRA	
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	Real-time PCR	CTX-A-F	CGGGCRATGGCGCARAC	(Roschanski <i>et al.</i> 2014)
		CTX-A-R	TGCRCCGGTSGTATTGCC	
	group A	CTX-A-probe	Yakima Yellow-CCARCGGGCGCAGYTGGTGAC-BHQ1	
	Real-time PCR	CTX-B-F	ACCGAGCCSACGCTCAA	
		CTX-B-R	CCGCTGCCGGTTTTATC	
group B	CTX-B-probe	Yakima Yellow-CCCGCGYGATACCACCACGC-BHQ1		
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	Real-time PCR	SHV-F	TCCCATGATGAGCACCTTTAAA	(Roschanski <i>et al.</i> 2014)
		SHV-R	TCCTGCTGGCGATAGTGGAT	
		SHV-probe	Cy5-TGCCGGTGACGAACAGCTGGAG-BBQ-650	
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	Real-time PCR	TEM-F	GCATCTTACGGATGGCATGA	(Roschanski <i>et al.</i> 2014)
		TEM-R	GTCCTCCGATCGTTGTCAGAA	
		TEM-probe	6-Fam CAGTG CTGCCATAACCA TGAGTGA-BHQ-1	
<i>OprD</i>	Standard PCR	oprD –F	GGAACCTCAACTATCGCCAAG	(Hong <i>et al.</i> 2016)
		oprD –R	GTTGCCTGTCCGGTCGATTAC	
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Standard PCR	VIM-F	ATTGGTCTATTTGACCGCGTC	(Jeon <i>et al.</i> 2005)
		VIM-R	TGCTACTCAACGACTGCGCG	
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	Standard PCR	OXA-48-F	TTGGTGGCATCGATTATCGG	(Mathlouthi <i>et al.</i> 2016)
		OXA-48-R	GAGCACTTCTTTGTGATGGC	
mcr-1	Standard PCR	mcr-1-F	GCAGCATACTTCTGTGTGGTAC	(Chabou <i>et al.</i> 2016)
		mcr-1-R	TATGCACGCGAAAGAACTGGC	
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	Standard PCR	CTX-M-1-F	CCCATGGTTAAAAAATCACTGC	(Carattoli <i>et al.</i> 2008)
		CTX-M-1-R	CAGCGCTTTTGCCGTCTAAG	

		R		
		CTX-M-9- F	GTTACAGCCCTTCGGCGATGATTC	(Yu <i>et al.</i> 2007)
		CTX-M-9- R	GCGCATGGTGACAAAGAGAGTGCAA	
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	Standard PCR	SHV-F	ATTTGTCGCTTCTTTACTCGC	
		SHV-R	TTTATGGCGTTACCTTTGACC	(Yagi <i>et al.</i> 2000)

F : amorce sens, R : amorce antisens ; probe : sonde.

### 8. Typage par séquençage des souches d'*E. coli*

Les souches d'*E. coli* isolées à partir des prélèvements de légumes et présentant une résistance aux carbapénèmes et à la colistine ont fait l'objet d'une étude de la clonalité (les relations génétiques) en utilisant la technique du typage par séquençage (multi-locus sequences typing, MLST). Le typage par séquençage est une méthode basée sur la détermination de courtes séquences nucléotidiques (450-500 pb) de plusieurs gènes de ménage (cinq à sept gène).

MLST des souches d'*E. coli* a été réalisé à l'aide de sept gènes de ménage (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* et *recA*) (**Tableau 6**). Les séquences obtenues ont été analysées via le site Web de la base de données MLST *E. coli* (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>).

**Tableau 6.** Les différentes amorces de PCR utilisées pour MLST *E. coli*.

Gènes	Séquence
Adenylate kinase ( <i>adk</i> )	F 5'-ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG-3'
	R 5'-CCGTCAACTTTCGCGTATTT-3'
	F1 5'-TCATCATCTGCACTTTCCGC-3'
	R1 5'-CCAGATCAGCGCGAACTTCA-3'
Fumarate hydratase ( <i>fumC</i> )	R1 5'-TCCCGGCAGATAAGCTGTGG-3'
	F 5'-TCACAGGTCGCCAGCGCTTC-3' R 5'-GTACGCAGCGAAAAAGATTC-3'

**Suite du tableau 6.** Les différentes amorces de PCR utilisées pour MLST *E. coli*.

Gènes	Séquence
ADN gyrase ( <i>gyrB</i> )	F 5'-TGGGCGACACGGATGACGGC-3' R1 5'-GTCCATGTAGGCGTTCAGGG-3' R 5'-ATCAGGCCTTCACGCGCATC-3'
Isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase ( <i>icd</i> )	F 5'-ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCC GGCACA-3' R 5'-GGACGCAGCAGGATCTGTT-3'
Malate dehydrogenase ( <i>Mdh</i> )	F 5'-ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGC TGCTGGCGG-3' R5'-TTAACGAACTCCTGCCCCAGAG CGATATCTTTCTT-3' F1 5'-AGCGCGTTCTGTTCAAATGC-3' R1 5'-CAGGTTCAGAACTCTCTCTGT-3'
Adenylosuccinate dehydrogenase ( <i>purA</i> )	F1 5'-TCGGTAACGGTGTGCTG-3' F 5'-CGCGCTGATGAAAGAGATGA-3' R 5'-CATACGGTAAGCCACGCAGA-3'
ATP/GTP motif de liaison ( <i>recA</i> )	R 5'-AGCGTGAAGGTAAAACCTGTG-3' F 5'-CGCATTGCTTTACCCTGACC-3' F1 5'-ACCTTTGTAGCTGTACCACG-3' R 5'-TCGTCGAAATCTACGGACCGGA-3'

## 9. Analyse statistique

Le taux d'isolement (positivité des échantillons) des BGN multirésistantes (résistantes aux C3G, aux carbapénèmes et à la colistine) obtenues en fonction du type de légume traité (source) a été analysé en utilisant le test de chi 2 de Pearson à l'aide du logiciel SPSS (version 26.0; SPSS, Inc., Chicago, IL, États-Unis). Le niveau de signification a été fixé à une valeur de  $p < 0,05$ .

## 10. Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles

### 10.1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides

Dans cette partie de notre étude nous avons étudié l'activité antibactérienne des huiles essentielles des parties aériennes des trois plantes médicinales suivantes : *Brocchia cinerea*, *Origanum vulgare*, *Artemisia campestris*. Les huiles de ces plantes nous ont été préparées par Pr. Benmoussa Mohammed Tahar du département de pharmacie de l'université de Batna 2. Les informations relatives des plantes utilisées sont présentées dans le **tableau 7**.

La concentration minimale inhibitrice des trois huiles essentielles a été déterminée par la méthode de micro-dilution en milieu liquide dans des plaques à 96 puits (alignés en 8 lignes et 12 colonnes). Les huiles ont été diluées dans du bouillon Mueller-Hinton additionné d'une solution de tween 80 à une concentration finale de 0,5%, puis ont fait l'objet d'une sonication pendant 30 minutes suivie d'homogénéisation à l'aide d'un vortex pendant 1 minute afin d'obtenir une émulsion stable des huiles essentielles (**Vanegas et al. 2021**). Les huiles ont été diluées avec un facteur de 1/2 dans des microtubes du bouillon Mueller-Hinton à des concentrations allant de 341,44  $\mu\text{g/ml}$  à 0,66  $\mu\text{g/ml}$  et de 288  $\mu\text{g/ml}$  à 0,56  $\mu\text{g/ml}$  pour *Brocchia cinerea*, *Artemisia campestris* et *Origanum vulgare*, respectivement (pour chaque souche, dix concentrations ont été testées). La gamme de concentrations testée pour chaque huile a été définie en se référant aux données de littérature concernant ces plantes médicinales. Un volume de 100  $\mu\text{l}$  de chaque concentration est distribué dans chaque puit de la plaque (colonne 1 à 10).

Pour chaque souche bactérienne testée, une suspension de 0,5 Mcfarland diluée à  $1/20^{\text{ème}}$  a été préparée, puis 10  $\mu\text{l}$  de la suspension bactérienne préparée ont été ensuite déposés dans tous les puits (sauf pour la colonne 11). Un contrôle négatif (bouillon MH) et un contrôle positif (MH+ souche bactérienne testée) ont été préparés pour chaque plaque dans les colonnes 11 et 12 respectivement (**EUCAST, 2019**). Les plaques ont été incubées pendant 24h à 37°C.

Après incubation, un révélateur de croissance (Iodonitrotetrazolium chloride) a été utilisé pour faciliter la lecture des résultats.

La valeur de CMI correspond à la concentration en antibiotique dans les puits de la première colonne (sens du gradient décroissant de la concentration en antibiotique) où aucune croissance bactérienne n'a été détectée. Le choix des souches testées a été effectué en fonction des résultats de l'identification et du gène de résistance détecté.

Pour déterminer la concentration minimale bactéricide (CMB) des huiles testées, 10 µL des puits qui n'ont montré aucune croissance visible après incubation ont été ensemencés sur gélose nutritive puis incubées à 37 °C pendant 24 h. La concentration minimale bactéricide des huiles essentielles (des nano-émulsions) représente la concentration où aucune colonie n'a été trouvée sur la gélose (Mansouri *et al.* 2021).

**Tableau 7.** Les informations relatives des plantes utilisées.

Plante	Période de récolte	Lieu	Composants majeurs	Identification
<i>Artemisia campestris</i> L.	11 Décembre 2016	Tazoult, wilaya de Batna.	5(6H)-benzocyclooctenone - 7,8- dihydro-8,8-dimethyl -1,2,3,4,4a,9,10,10a-(trans-4a,10a)-octahydro-9-oxophenanthrene Germacrène D	Dr. Benmoussa Mohammed Tahar (département de pharmacie de l'université de Batna 2)
<i>Origanum vulgare</i>	Février 2022	Hassi khalifa, wilaya d'El Oued	Thymol	Meklid Sonia, (résidente en pharmacognosie, Université Batna 2)

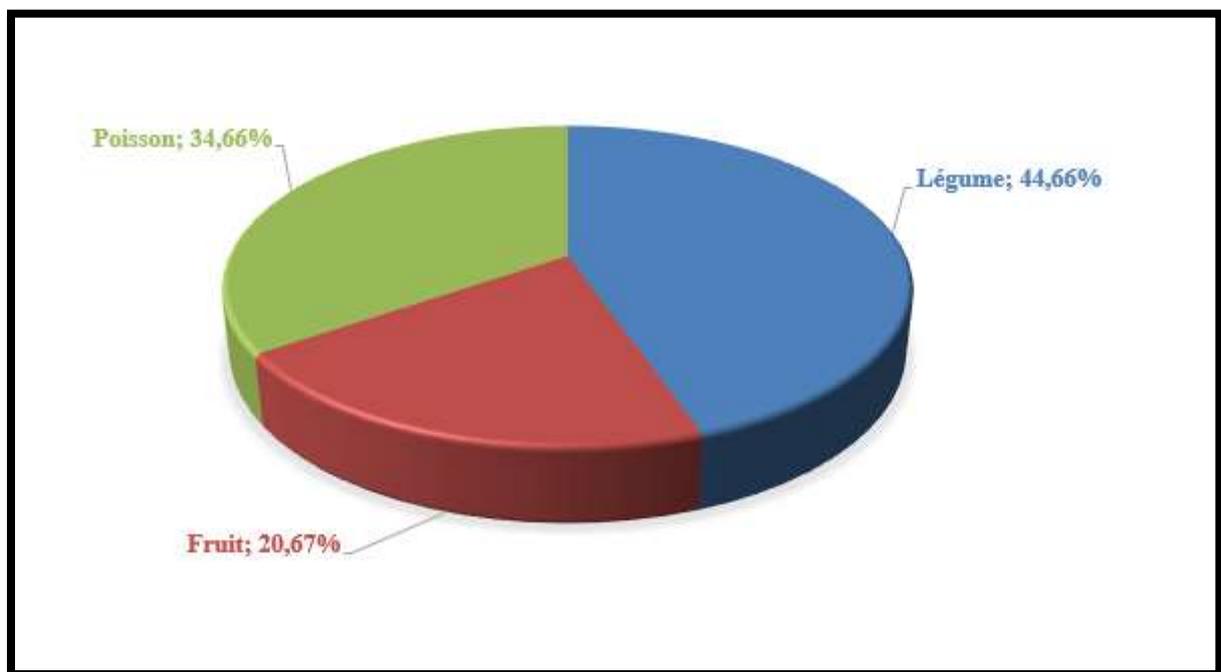
**Suite du tableau 7.** Les informations relatives des plantes utilisées.

Plante	Période de récolte	Lieu	Composants majeurs	Identification
<i>Brocchia cinerea</i>	19 Mars 2016	M'lili, Wilaya de Biskra	- Beta.-Thuyone 1-Methyl-2-(1'- methylethenyl)-3'- ethenylcyclopropylmethanol 1,8-Cineole Limonène-10-ol	Pr. CHEFROUR Azzedine (département de l'Enseignement Fondamentale de Biologie, université de Souk Ahras).

# Résultat et discussion

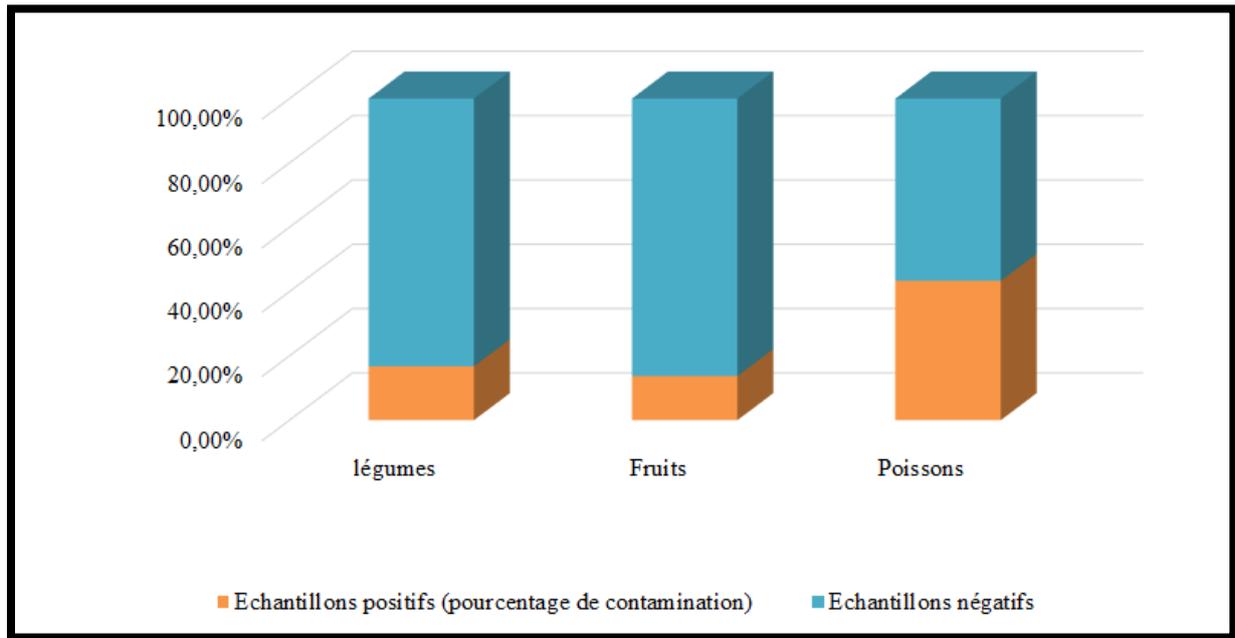
### 1. Isolement des bactéries résistantes aux $\beta$ -lactamines et à la colistine

Au cours de notre étude, 150 bactéries à Gram négatif résistantes aux  $\beta$ -lactamines (céphalosporines de troisième génération et/ou carbapénèmes) et/ou à la colistine ont été isolées à partir des différents produits alimentaires analysés, où 44,66% (67/150) des souches isolées proviennent des échantillons de légumes frais, suivi de poissons avec 52/150 souches et un pourcentage de 34,66%, et en dernière position les échantillons de fruits avec un pourcentage de 20,67% (31/150). Le contrôle de qualité des procédés de désinfection a montré une parfaite efficacité par absence de culture. La répartition des souches obtenues en fonction de leur origine est présentée dans la **figure 18**.



**Figure 18.** Pourcentage d'isolement des BGN résistantes aux  $\beta$ -lactamines et/ou à la colistine selon le type d'aliments.

Selon le type d'aliment, les poissons sont le produit alimentaire le plus contaminé par les bactéries ciblées avec un pourcentage de 43,33% (52/120), suivi par les légumes 16,75% (67/400), tandis que les fruits sont considérés comme l'aliment le moins contaminé dans cette étude avec un pourcentage de 13,72% (31/226) (**figure 19**).



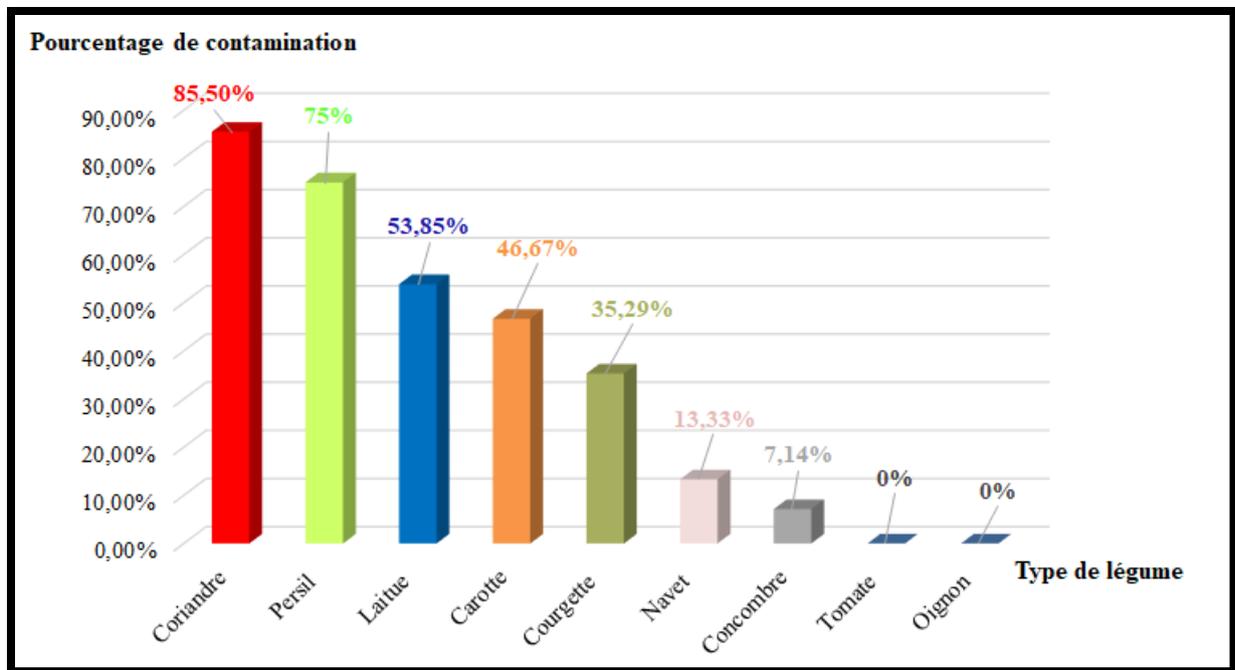
**Figure 19.** Pourcentage de contamination (positivité) des aliments testés.

Les résultats obtenus dans notre étude sont différents de ceux rapportés par une étude Indienne réalisée sur 110 échantillons d'aliments où les légumes étaient le produit alimentaire le plus contaminé avec un pourcentage de contamination de 45,10% suivi des poissons (21,57%) et en dernière position les échantillons de fruits (3,92%) (**Ghafur et al. 2019**). La même observation a été signalée par Ye *et al.*, (2018) en Chine où ils ont signalé un pourcentage de contamination de 13,3% pour les légumes frais suivi de 9,3% des fruits de mer (**Ye et al. 2018**).

Sur l'ensemble des BGN isolées à partir des légumes, la coriandre occupe la première place avec un pourcentage de contamination de 85,50%, suivie du persil (75%), de la laitue (53,85%), de la carotte (46,67%), courgette (35,29%), navet (13,33%) et enfin le concombre avec un pourcentage 7,14% (**figure 20**). Pour les poissons, tous les échantillons testés étaient contaminés au moins par une souche résistante où la moitié des souches isolées (55,77%, 29/52) sont obtenues à partir de l'espèce *Sardina pilchardus* suivie par vingt-trois souches isolées de l'espèce *Sardinella aurita* (44,23%, 23/52).

Les résultats de l'analyse statistique ont montré d'une manière significative ( $\chi^2 = 118,004$ ;  $p < 0.0001$ ) que le type de légume (source) influence la présence et le taux des bactéries résistantes recherchées dans cette étude. C'est le cas de la coriandre et du persil trouvés comme les échantillons les plus contaminés. Cette prévalence enregistrée chez ce type de légumes verts à feuilles pourrait être expliquée par leur richesse en nutriments organiques

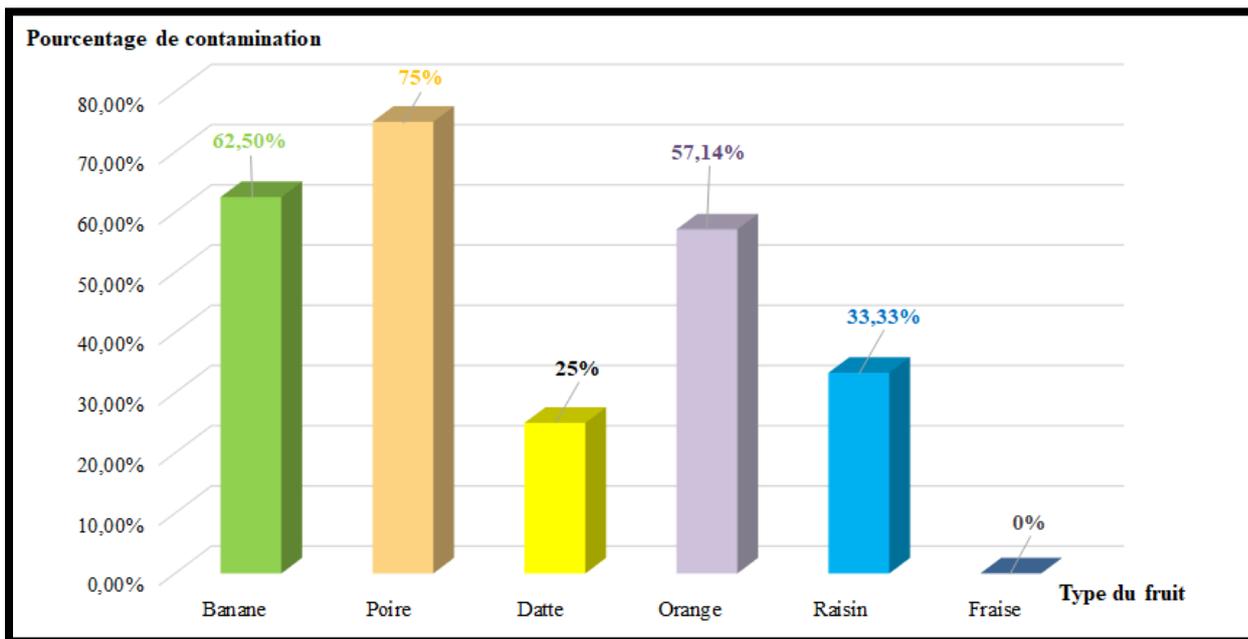
(acides organiques et glucides ; principalement glucose, fructose et saccharose) capables de soutenir facilement la croissance des bactéries entériques comme *E. coli* (Mogren *et al.* 2018).



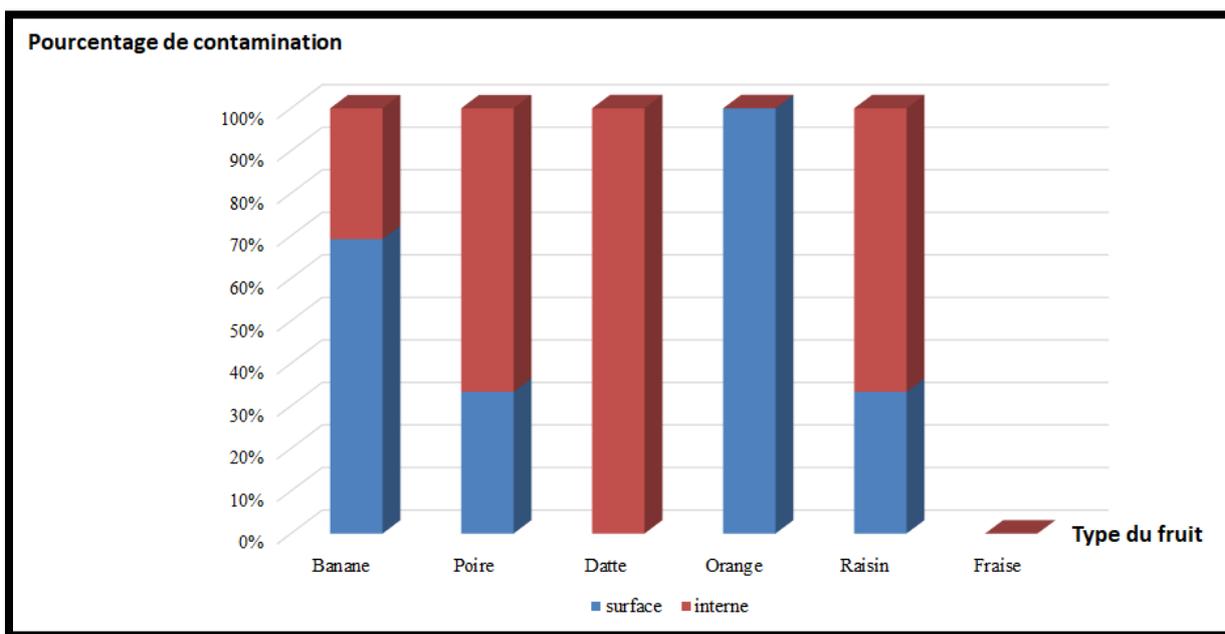
**Figure 20.** Pourcentage de contamination par des BGN résistantes aux  $\beta$ -lactamines et/ou à la colistine en fonction du type des légumes.

Pour les fruits, la poire vient au 1<sup>er</sup> rang avec un pourcentage de 75%, suivie par la banane avec 62,50%, ensuite l'orange 57,14%, le raisin 33,33% et enfin la datte avec un pourcentage de 25%. Les différents pourcentages d'isolement des BGN résistantes aux  $\beta$ -lactamines et/ou à la colistine selon le type d'aliment sont présentés dans la **figure 21**.

Dans la présente étude nous avons remarqué une différence entre les pourcentages de contamination obtenus à partir des prélèvements de fruits testés en fonction de la partie contaminée (surface ou interne). Pour les échantillons d'oranges toutes les souches résistantes obtenues ont été isolées à partir de la surface tandis qu'aucune souche n'a été détectée à l'intérieur du fruit. Par contre seulement les échantillons de dattes qui ont présenté une contamination de la partie interne uniquement. Pour les prélèvements de la banane, la surface a été plus contaminée par rapport à l'intérieur avec un pourcentage de 69,23% (**Figure 22**).



**Figure 21.** Pourcentage de contamination des BGN résistantes aux  $\beta$ -lactamines et/ou la colistine en fonction du type des fruits.



**Figure 22.** Pourcentage de contamination en fonction du site de prélèvement (surface ou interne) au niveau des différents échantillons de fruits par les BGN résistantes aux  $\beta$ -lactamines et/ou la colistine.

Les résultats de l’analyse des échantillons de légumes obtenus au cours de cette étude corroborent avec ceux de plusieurs études rapportant que les légumes à feuilles vertes à savoir ; la laitue, coriandre, persil et épinard sont les échantillons de légumes présentant le

niveau le plus élevé de contamination par des bactéries à Gram négatif résistantes aux antibiotiques (**Zurfluh et al. 2015b ; Touati et al. 2017 ; Wang et al. 2018 ; Liu et al. 2018**).

Les légumes comme les carottes et ceux à feuilles présentent un risque particulier de contamination par les bactéries transmises à travers le sol, soit appartenant à la flore naturelle du sol ou introduites dans le sol via la fertilisation par le fumier (**Hölzel et al. 2018**). Ceci pourrait expliquer le pourcentage d'isolement élevé observé dans notre étude chez la coriandre, le persil, la carotte et la laitue par rapport aux autres types de légumes. La prévalence croissante des agents pathogènes présents sur les légumes à feuilles vertes a déjà été expliquée par la capacité de pénétration des bactéries du fumier ou de l'eau polluée dans les feuilles, plus précisément à l'intérieur des stomates. Bien que les agents pathogènes pour l'homme ne soient pas adaptés à la croissance dans la phyllosphère, il a été démontré qu'*E. coli* O157:H7 et les membres du genre *Salmonella* peuvent survivre à de faibles concentrations pour de longues périodes sur les plantes dans les champs. Dans ce contexte, les légumes à feuilles vertes sont considérés comme des vecteurs et moyens potentiels de transmission de ces agents (**Bhutani et al. 2015**).

Les sources et les voies de contamination des légumes et de fruits varient selon les zones de production en effet, chaque ferme a une combinaison distincte de facteurs de risque environnementaux tels que la topographie ainsi que les interactions entre l'utilisation des terres et le climat. La combinaison de ces facteurs de risque influence la fréquence et la transmission des agents pathogènes via ce type de produit alimentaire (**Alegbeleye et al. 2018**).

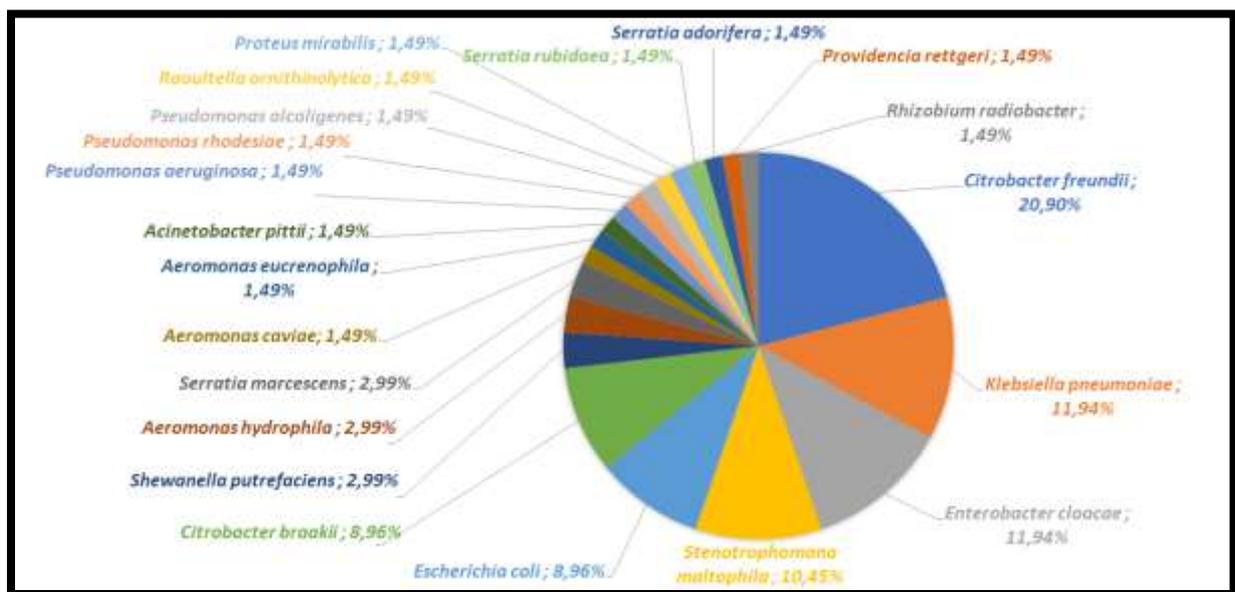
En plus des facteurs cités au-dessus, ces produits alimentaires peuvent être contaminés par des bactéries sur le terrain à travers diverses voies notamment ; le dépôt atmosphérique, l'absorption via les sols et les eaux souterraines contaminées, le transfert par les insectes, ou par contamination fécale générée par les bétails ou les animaux sauvages. Beaucoup de ceux-ci surviennent parce que l'agriculture s'est développée d'une manière plus intensive au cours des années, et les champs de fruits et de légumes sont souvent situés à proximité de zones de production animale (**Alegbeleye et al. 2018**).

En parallèle des facteurs intrinsèques notamment les caractéristiques génétiques des poissons déterminant leur susceptibilité à la contamination et la colonisation microbienne, l'environnement est considéré comme le déterminant le plus important du microbiote des poissons et des produits de la pêche où une variété de sources et de facteurs peut également

contribuer à la contamination bactérienne des poissons dont les plus important l'eau et les sédiments. D'autres facteurs pré-récolte peuvent avoir un impact et contribuer à l'abondance et la composition des populations microbiennes présentes dans les poissons en aquaculture telles que les sources d'eau et les pratiques aquacoles courantes considérées comme facteurs extrinsèques (Sheng & Wang 2021).

## 2. Identification des espèces de BGN isolées

L'identification des isolats obtenus à partir des légumes a montré une prédominance des espèces suivantes : *Citrobacter freundii* (20,90%; n = 14), *Klebsiella pneumoniae* (11,94 %; n = 8), *Enterobacter cloacae* (11,94 %; n = 8), *Stenotrophomonas maltophilia* (10,45 %; n = 7), *Escherichia coli* (8,96 %; n = 6), *Citrobacter braakii* (8,96 %; n = 6). Les autres espèces minoritaires identifiées étaient : *Shewanella putrefaciens* (2,99%; n=2), *Aeromonas hydrophila* (2,99%; n=2), *Serratia marcescens* (2,99%; n=2), *Aeromonas caviae* (1,49%; n=1), *Aeromonas eucrenophila* (1,49%; n=1), *Acinetobacter pittii* (1,49%; n=1), *Pseudomonas aeruginosa* (1,49%; n=1), *Pseudomonas rhodesiae* (1,49%; n=1), *Pseudomonas alcaligenes* (1,49%; n=1), *Raoultella ornithinolytica* (1,49%; n=1), *Proteus mirabilis* (1,49%; n=1), *Serratia rubidaea* (1,49 %; n=1) *Serratia odorifera* (1,49%; n=1), *Providencia rettgeri* (1,49%; n=1) et *Rhizobium radiobacter* (1,49%; n=1). Le pourcentage d'identification des espèces isolées à partir des légumes est présenté dans la **figure 23**.



**Figure 23.** Pourcentage d'identification des espèces isolées à partir des légumes.

Les espèces trouvées comme prédominantes dans notre étude sont différentes de celles trouvées dans plusieurs études, sauf pour quelques espèces mais avec des pourcentages d'abondance différents. En Allemagne entre Avril 2015 à Mai 2016, un total de 681 souches bactériennes ont été isolées à partir de 130 prélèvements de légumes. Cette étude a montré que *Pseudomonas* spp. était le genre prédominant avec un pourcentage de 86% (n=587), suivi d'*Acinetobacter* spp. (n=14, 2,05%), *Rahnella* spp. (n=11, 1,6%), *Enterobacter* spp. (n=4, 0,59%), *Stenotrophomonas* spp. (n=4, 0,59%), *Ochrobactrum* spp. (n=2, 0,29%), *Pantoea* spp. (n=1, 0,15%), et *Serratia* spp. (n=1, 0,15%) (Usui *et al.* 2019). Alors que dans une étude Chinoise (entre 2011 à 2014), *E. coli* était l'espèce prédominante, suivie de *Salmonella* spp. tandis que les autres espèces ont été identifiées avec un pourcentage plus faible à savoir : *Citrobacter freundii*, *C. koseri*, *C. amalonaticus* et *Serratia marcescens* (Ye *et al.* 2018). En Afrique du Sud, une étude réalisée sur un nombre total de 545 échantillons de légumes entre Septembre 2017 à Mai 2018 a montré que toutes les souches isolées ont été identifiées comme des entérobactéries y compris ; *Enterobacter* spp. (28.7%) (*E. cloacae*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter cowanii*, et *Enterobacter ludwigii*); *Serratia fonticola* (18.9%); *E. coli* (18%); *Klebsiella* spp. (14.8%) (*K. pneumoniae*, et *Klebsiella oxytoca*); *Rahnella aquatilis* (9%); *Proteus* spp. (4.9%) (*Proteus penneri*, et *Proteus mirabilis*); *Citrobacter* spp. (2.5%) (*Citrobacter farmer*, et *C. freundii*); *Kluyvera ascorbata* (1.64%); *Achromobacter xylosoxidans* (1.6%), et en dernière position *Raoultella ornithinolytica* (0.8%) (Richter *et al.* 2019). Le même scénario a été remarqué dans une autre étude réalisée au Pays-Bas entre Mars 2012 à Juillet 2013, parmi 91 entérobactéries isolées, *Serratia* spp. (*S. fonticola* et *S. plymuthica*). et *Enterobacter* spp. (*E. aerogenus*, *E. cloacae*, *E. hormaechei*, *E. ludwigii*, *E. amnigenus* et *E. asburiae*) étaient les espèces prédominantes avec un pourcentage de 44,4 % et 33,3 % respectivement suivies par *E. coli*, *Pantoea agglomériens*, *Pantoea ananatis*, *Cedecca* spp., *Hafnia alvei*, *Rahnella aquatilis* et *Serratia* spp. ce qui est différents a ceux rapporté dans notre étude (Van Hoek *et al.* 2015).

En revanche, nos résultats corroborent avec ceux rapportés en Italie, où ils ont signalé que *Citrobacter freundii* occupe la première place avec un pourcentage de 26%, mais ce n'est pas le cas pour les autres espèces identifiées à savoir ; *Enterobacter cloacae* (22%), *Pantoea agglomerans* (16%), *Rahnella aquatilis* (12%), *E. coli* (10%), *Hafnia alvei* (5%), *Enterobacter aerogenes* (5 %) et *Pseudomonas fluorescens* (4 %) (Iseppi *et al.* 2018).

Il est difficile de déterminer sans équivoque les facteurs spécifiques responsables de la divergence entre les bactéries pouvant survivre sur différents types de produits, mais il est probable que plusieurs facteurs contribuent aux tendances observées.

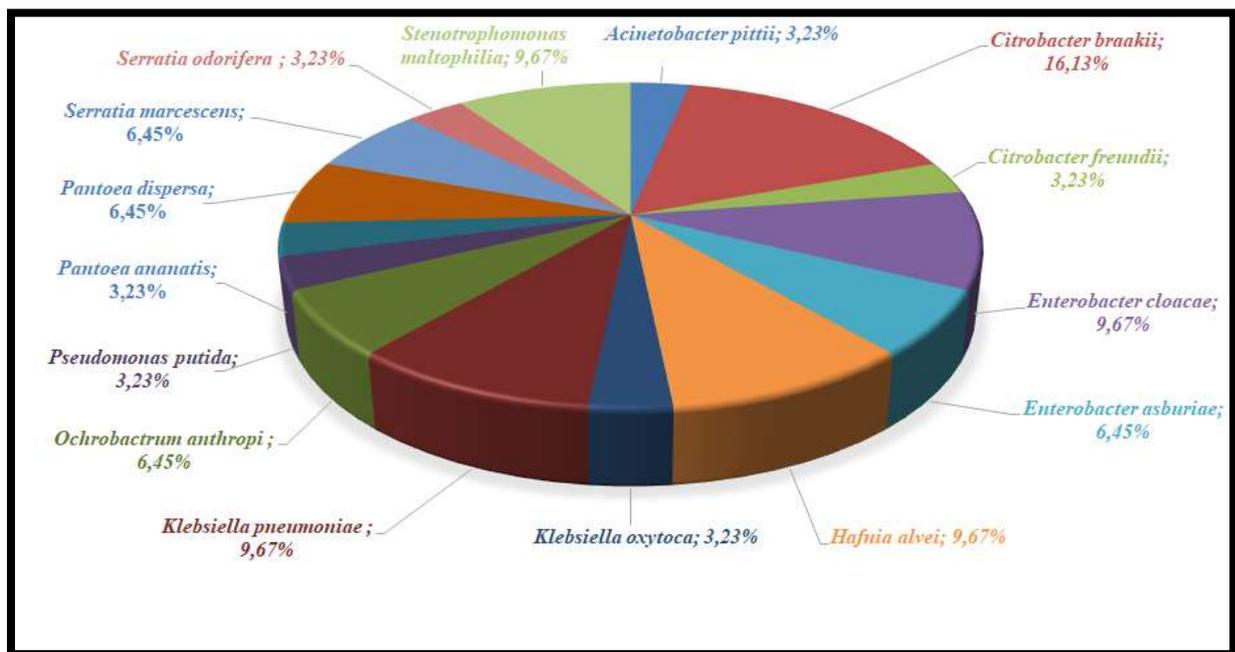
Dans une étude réalisée par Leff et Fierer, (2013) ciblant l'abondance et la diversité des microorganismes contaminant les légumes, ils ont constaté que les légumes abritaient diverses communautés bactériennes dominées par les phylums *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* et *Proteobacteria*, mais leur composition était significativement différente pour chaque espèce végétale. Ces différences étaient souvent attribuables à des distinctions liées à l'abondance des taxons de la famille des Enterobacterales (**Leff & Fierer 2013**). Cette grande famille de bactéries à Gram négatif comprend, en plus de plusieurs symbiotes inoffensifs, beaucoup d'agents pathogènes dits entériques plus familiers jouant aussi un rôle important en tant qu'agents pathogènes opportunistes. Les pratiques agricoles et de transformation ont une forte influence sur la composition des communautés microbiennes associées (**Leff & Fierer 2013**). Des exemples de bactéries bien étudiées sont les espèces à Gram négatif, souvent multirésistantes à savoir ; *Pseudomonas aeruginosa* et *Stenotrophomonas maltophilia*. Ces deux espèces étaient trouvées comme membres abondants de microbiote des plantes, et les souches appartenant à ces espèces sont caractérisées par une grande polyvalence phénotypique et génotypique (exemple niveau d'antibiorésistance) (**Berg et al. 2014**).

Les plantes, en particulier leurs endosphères et rhizosphères sont des réservoirs importants d'agents pathogènes opportunistes émergents (**Mendes et al. 2013; Berg et al. 2014**) où on trouve de nombreux genres associés aux plantes, y compris *E. coli*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Serratia*, *Staphylococcus* et *Stenotrophomonas* qui entrent en interactions bivalentes (bactérie-hôte) (**Berg et al. 2014**).

Dans la présente étude un pourcentage élevé des entérobactéries cliniquement pertinentes telles que *E. coli*, *Citrobacter braakii*, *C. freundii*, *Enterobacter cloacae* et *Proteus mirabilis* a été mis en évidence, tandis que les autres espèces bactériennes identifiées dans notre étude ont déjà été signalées par des études antérieures dans l'environnement, particulièrement le milieu aquatique et/ou le sol, comme *Rhizobium radiobacter*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas eucrenophila*, *Acinetobacter pittii*, *Pseudomonas* spp. et *Shewanella putrefaciens* (**Cui et al. 2015; Popovića et al. 2017**). Malgré cela, la majorité des espèces environnementales identifiées sont également capables de provoquer des infections à savoir; *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas eucrenophila*, *Pseudomonas*

*alcaligenes* et *Shewanella putrefaciens*. La détection de ce profil bactériologique à partir de prélèvements des légumes pourrait être due à une contamination environnementale dans les champs (le sol, système d'irrigation, la fertilisation par des excréments des animaux).

Pour les échantillons de fruits, *Citrobacter braakii* est l'espèce la plus identifiée avec un pourcentage de 16,13% (n = 5) suivie par *Enterobacter cloacae* (9,67%; n = 3), *Klebsiella pneumoniae* (9,67%; n = 3), *Hafnia alvei* (9,67%; n = 3), *Stenotrophomonas maltophilia* (9,67%; n = 3), *Enterobacter asburiae* (6,45%; n = 2), *Ochrobactrum anthropi* (6,45%; n = 2), *Pantoea dispersa* (6,45%; n = 2), et *Serratia marcescens* (6,45%; n = 2). Tandis que, les autres espèces isolées avec une fréquence égale de 3,23% sont les suivantes : *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Pantoea ananatis*, *Serratia odorifera*, *Pseudomonas putida* et *Acinetobacter pittii*. Les pourcentages d'identification des souches isolées des échantillons des fruits sont présentés dans la **figure 24**.



**Figure 24.** Pourcentage des espèces identifiées dans l'ensemble des prélèvements des fruits.

Tous les échantillons de fruits et de légumes testés étaient numériquement dominés par les gammaprotéobactéries où les Enterobacterales étaient la famille la plus abondante sur les navets, persils, coriandres, carottes, poires, bananes et les dattes, mais avaient une abondance minimale sur les échantillons de laitue et de courgette. Pour ces dernières la plupart des souches isolées étaient d'origine environnementale n'appartenant pas au groupe des entérobactéries. Dans notre étude, le persil présentait une grande diversité bactérienne par rapport aux autres types de légumes et de fruits.

En fonction de l'emplacement des microorganismes en surface ou à l'intérieure des aliments analysés nous avons trouvés des différences au niveau de l'abondance et la diversité des bactéries ciblées dans cette étude comme présenté dans la **figure 22**. Pour les échantillons d'oranges toutes les souches résistantes obtenues ont été isolées à partir de la surface tandis qu'aucune souche n'a été détectée à l'intérieur du fruit. Nous avons constaté aussi que les communautés bactériennes de surface de la banane et d'orange étaient numériquement dominées par les espèces de la famille Enterobacterales et l'espèce *Stenotrophomonas maltophilia*, c'est un modèle qui a également été noté dans des études antérieures (**Leff & Fierer 2013**).

Dans l'ensemble, il n'est pas surprenant de trouver une abondance relativement élevée d'entérobactéries dans de nombreux types de produits, car les membres de cette famille sont connus pour coloniser certains fruits et légumes (**Abadias et al. 2008; Leff & Fierer 2013**).

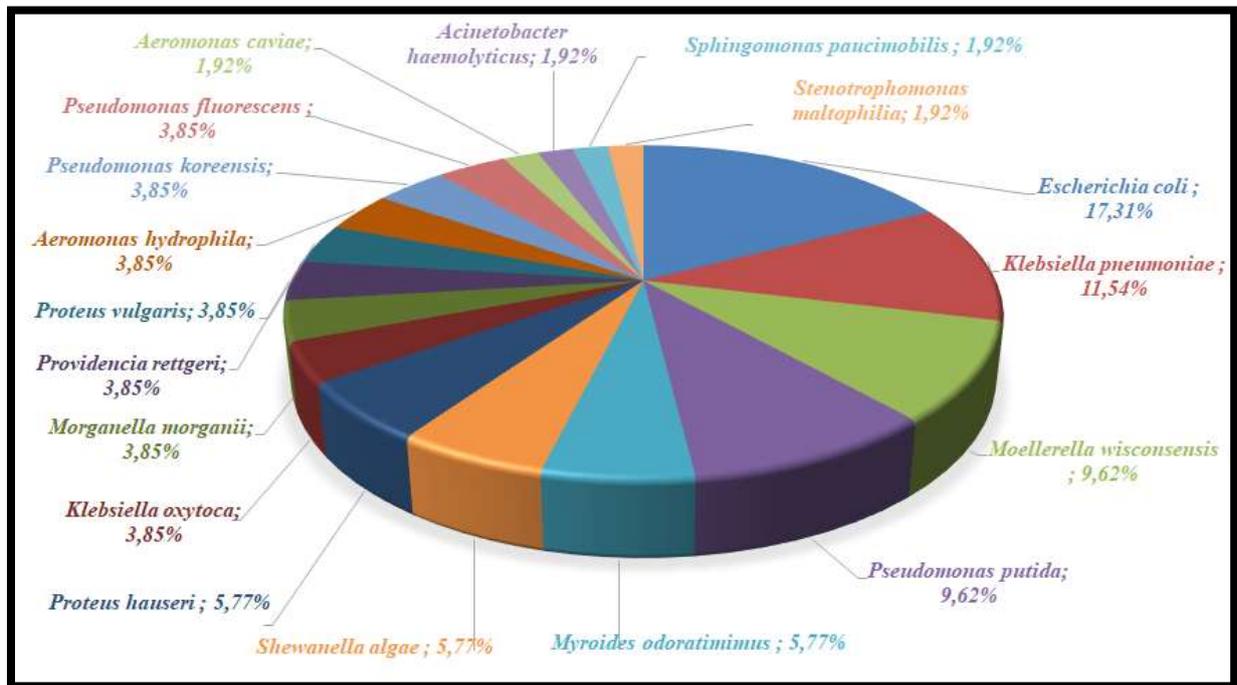
Nos résultats corroborent avec ceux rapporté par Laff et Fierer, (2013), où ils ont démontré que les fruits et légumes hébergent diverses communautés bactériennes, et les communautés de chaque type de produit étaient significativement distinctes les unes des autres. Toutefois, certains types de fruits et de légumes (les épinards, la laitue, les tomates, les poivrons et les fraises) avaient tendance à partager plus de communautés similaires car elles avaient toutes une abondance relativement élevée de taxons appartenant à la famille des Enterobacterales par rapport aux autres types de produits (pommes, pêches, et raisins) qui étaient dominés par les taxons appartenant aux phylums *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, et *Proteobacteria* (**Leff & Fierer 2013**).

Les conditions post-récolte inappropriées à savoir la température, la source d'eau et l'exposition à la lumière sont responsables des dommages affectant la physiologie des fruits et des légumes. De plus, les blessures possibles lors de la récolte, du transport, de la conservation et de la commercialisation permettent aux agents pathogènes d'envahir les hôtes en question. Dans ce contexte, les tissus internes des plantes sont plus favorables à la prolifération des bactéries en les protégeant contre les conditions environnementales extrêmes telles que les rayonnements ultraviolets (**Huang et al. 2021; Rincón & Neelam 2021**).

Les espèces identifiées avec une proportion élevée à partir des échantillons de poissons étaient les suivantes : *Escherichia coli* (17,31%; n = 9), *Klebsiella pneumoniae* (11,54 %; n = 6), *Moellerella wisconsensis* (9,62 %; n = 5), *Pseudomonas putida* (9,62 %; n = 5), *Myroides odoratimimus* (5,77 %; n = 3), *Shewanella algae* (5,77 %; n = 3), *Proteus hauseri* (5,77 %; n = 3), suivies par *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Providencia*

*rettgeri*, *Proteus vulgaris*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas fluorescens* qui partagent le même pourcentage avec 3,85% (n =2).

Les autres espèces identifiées avec un pourcentage équivalent de 1,92% (n=1) étaient *Aeromonas caviae*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Sphingomonas paucimobilis* et *Stenotrophomonas maltophilia*. Les pourcentages des espèces isolées à partir des échantillons de poissons sont présentés dans la **figure 25**.



**Figure 25.** Pourcentage d'identification des espèces isolées à partir des poissons.

Dans notre étude, *Escherichia coli* occupe la première place avec un pourcentage de 17,31% ce qui corrobore avec les résultats rapportés en Inde, où ils ont trouvé que *E. coli* était l'espèce prédominante (30,69%) après analyse de dix-neuf échantillons de fruits de mer y compris ; les poissons (14), les crevettes (3), les palourdes et les calmars. Mais ce n'était pas le cas pour les autres espèces identifiées ; *Klebsiella oxytoca* (15,81%), *K. pneumoniae* (13,95%), *Citrobacter diversus* (13,02%), *Erwinia chrysanthemi* (7,44%), *Proteus vulgaris* (6,05%), *Proteus mirabilis* (3,72%), *Providencia stuartii* (3,72%), *Enterobacter intermedius* (3,26%), *Edwardsiella tarda* (0,93%), *Shigella sonnei* (0,93%), et *Salmonella enterica* (0,47%) (**Sanjit Singh et al. 2017**). Nos résultats corroborent aussi avec ceux rapportés en Algérie par Dib *et al.*, (2018) où *E. coli* était l'entérobactérie la plus répandue chez les sardines et les crevettes (32% et 66%, respectivement) mais différents pour les autres espèces bactériennes trouvées : *Hafnia alvei*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Serratia* spp., et *Salmonella enterica* sérovar *Infantis* (**Dib et al. 2018**). La prédominance d'*Escherichia coli* et

de *Klebsiella pneumoniae* a été aussi signalée dans une étude réalisée en Allemagne. Dans cette dernière, à partir de 160 prélèvements de fruits de mer crus acheté entre Décembre 2015 et Août 2016 y compris ; les crevette à pattes blanches, les crevette noir tigrée, les moules bleues, les palourdes de Vénus, les coquilles de rasoir et des coques ; *K. pneumoniae* et *E. coli* étaient les espèces prédominantes avec un pourcentage de 28,88% et 26,67% respectivement, suivies d'*Enterobacter cloacae* (13,33%), *Citrobacter freundii* (11,11%), *Citrobacter braakii*, *Enterobacter asburiae* et *Hafnia alvei*. Les souches identifiées en proportion moindre étaient : *Enterobacter aerogenes*, *Leclercia adecarboxylata*, *Morganella morganii* et *Pantoea septic* (**Vu et al. 2018**). En revanche, nos résultats sont différents de ceux signalés par plusieurs études autour du monde qui ont rapporté l'isolement des souches de *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, et *Salmonella* à partir de différents types de fruits de mer y compris les poissons (**Deekshit et al. 2013; Fu et al. 2020; Jo et al. 2020; Santajit et al. 2022**).

Dans la présente étude, sur un ensemble de cinquante-deux souches isolées des échantillons de poissons, vingt-neuf (55,78% ; n=29) souches ont été isolées de la chair tandis que vingt-trois souches (44,23% ; n=23) ont été obtenues à partir de la surface externe des poissons. Les espèces bactériennes isolées de la surface sont les suivantes : *Shewanella algae*, *Morganella morganii*, *Myroides odoratimimus*, *Proteus hauseri*, *Providencia rettgeri*, et *Moellerella wisconsensis*. A la différence de celles isolées de la chair : *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Proteus vulgaris*, *Shewanella algae*, *Pseudomonas koreensis*, et *Acinetobacter haemolyticus*. Les espèces restantes présentées dans la **figure 26** ont été isolées à partir des deux parties (surface et interne).

Dans la littérature, il est bien connu que les micro-organismes sont couramment présents sur les surfaces des poissons, tels que la peau et les branchies, et à la partie interne des poissons dans différentes zones comme ; le tube digestif et les organes internes (ex : le rein, le foie et la rate). Ils ont été identifiés comme un réservoir des bactéries pathogènes liées aux maladies humaines, y compris *Escherichia coli*, *Aeromonas* spp., *Salmonella* spp., *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes*, et *Clostridium botulinum* (**Sheng & Wang 2021**). La clustérisation des espèces bactériennes isolées à partir de chaque type de produits alimentaires en utilisant l'application heatMap est présentée dans la **figure 27**.



**Figure 26.** Classification des espèces isolées des poissons en fonction de la partie d'isolement.

Plusieurs études ont révélé que les microbiotes des poissons sont extrêmement divers et semblent être dominés par des bactéries, en particulier celles appartenant à l'embranchement Proteobacteria. Autres embranchements, y compris Fusobacteria, Bactérioidetes, Firmicutes et Actinobacteria peuvent toutefois également présenter des caractéristiques dominantes et reflètent probablement la diversité écologique des poissons. Le microbiote des poissons peut être divisé en deux groupes : les communautés autochtones et transitoires (allochtones). La première catégorie (autochtones) peut survivre dans les tissus épithéliaux dans lesquels elle devient plus intimement associée aux cellules de l'hôte, ou adhérer aux surfaces muqueuses et les coloniser. Tandis que les communautés transitoires sont des microorganismes libres qui sont généralement exclus après une certaine période, bien qu'ils peuvent persister momentanément dans certains habitats pendant les périodes de stress (Legrand *et al.* 2020).

Dans notre étude, nous avons isolé trois souches d'*Aeromonas hydrophila* sur la partie extérieure et intérieure des poissons testés. Cette bactérie est une espèce typique de l'environnement aquatique que l'on trouve également dans l'eau potable, les eaux usées et les aliments (poisson, crustacés, volaille et viande crues). *Aeromonas hydrophila* a attiré l'attention en tant que pathogène humain émergent associé aux milieux aquatiques et aux produits de la mer. Elle est responsable non seulement de la gastro-entérite et des infections cutanées, mais aussi des affections plus systémiques telles que la péritonite, la bactériémie, la méningite, la maladie semblable au choléra, et le syndrome hémolytique et urémique (Citterio & Biavasco 2015; Stratev & Odeyemi 2016).

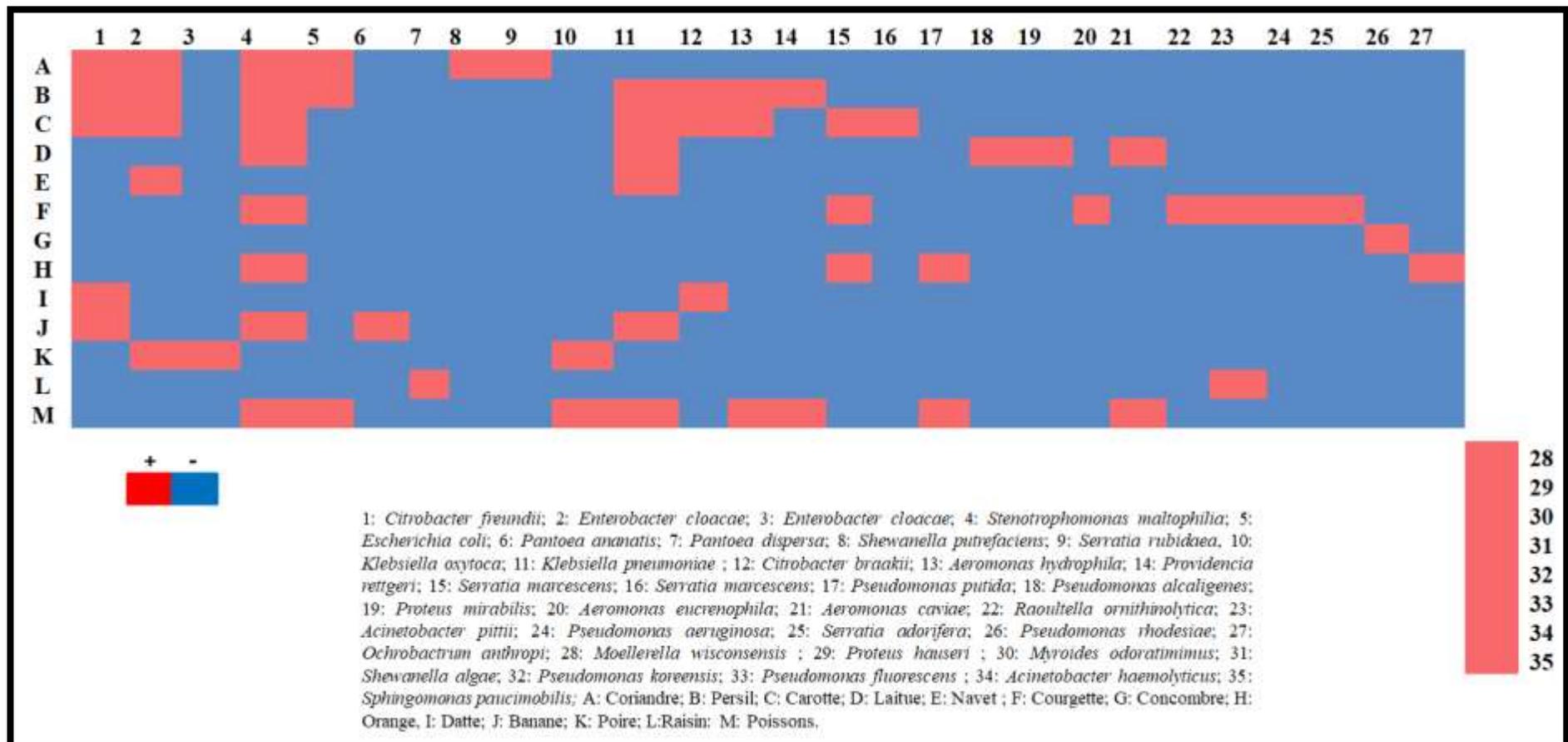


Figure 27. Clustérisation des espèces bactériennes isolées à partir de chaque type de produits alimentaires en utilisant l'application heatMap.

Les autres espèces bactériennes obtenues à partir des prélèvements des poissons dans la présente étude ont été fréquemment rapportées dans les milieux aquatiques en particulier *Shewanella algae*, *Myroides odoratimimus*, *Sphingomonas paucimobilis* et *Moellerella wisconsensis*. L'association des espèces du genre *Shewanella* avec des maladies humaines est connue et bien documentée en particulier, les deux espèces les plus impliquées dans les infections humaines sont *S. algae* et des *S. putrefaciens*. Bien que les infections humaines signalées sont sporadiques et opportunistes, la plupart d'entre elles sont dues à l'association de l'homme à l'environnement marin et au type d'alimentation. Habituellement, l'antibiothérapie adoptée pour le traitement des infections associées à *Shewanella* comprend les  $\beta$ -lactamines, les aminoglycosides et les quinolones (**Zago et al. 2020**).

Les espèces du genre *Myroides* sont aussi des bactéries que l'on trouve couramment dans les sources environnementales, telles que l'eau et le sol. Ils se comportent le plus souvent comme des agents pathogènes opportunistes de bas grade, affectant les sujets immunodéprimés tels que ceux atteints de cirrhose du foie, du diabète sucré et de maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) sous traitement corticostéroïde (**Beharrysingh 2017**). Les membres du genre *Sphingomonas* se trouvent dans plusieurs environnements aquatiques à savoir ; l'eau de mer, la glace de mer, l'eau de rivière, les eaux usées, l'eau minérale, les équipements d'eau utilisés dans les hôpitaux, les systèmes de distribution d'eau potable et peuvent coloniser les invertébrés collectés à partir des milieux aquatiques (**Ryan & Adley 2010**). De plus, l'espèce *Moellerella wisconsensis* même si elle fait probablement partie du microbiote gastro-intestinal normal, son habitat naturel est supposé être associé à l'environnement en particulier aquatique (**Germanou et al. 2022**). L'isolement de ces espèces aquatiques dans cette étude permet de suggérer que la source de contamination la plus probable est l'eau, notamment les eaux usées d'origine humaine, l'eau des rivières, la quantité croissante de déchets non traités provenant d'activités urbaines, industrielles et agricoles rejetés dans la mer près de la côte (**Stalder et al. 2012; Roca et al. 2015**).

Une variété de sources et de facteurs peut également contribuer à la présence des bactéries pathogènes et de détérioration ainsi que celles résistantes aux antibiotiques dans les poissons et les produits de la pêche tout au long de la production et de la chaîne logistique (**Sheng & Wang 2021**). Dans ce contexte, plusieurs études ont rapporté que l'eau façonne le microbiote du poisson où divers agents pathogènes humains et de détérioration ainsi que des bactéries résistantes aux antibiotiques ont été détectés dans des échantillons d'eau collectés dans l'environnement de vie et d'élevage des poissons (**Zeng et al. 2017; Li et al. 2020;**

**Sheng & Wang 2021**). De plus, les poissons malades peuvent transmettre les bactéries pathogènes à d'autres poissons d'élevage ou sauvages sains et à l'environnement (**Zhou et al. 2013; Modarres et al. 2014; Sheng & Wang 2021**).

En revanche, Ringø *et al.*, (2016), ont rapporté que le microbiote intestinal des poissons est impacté et déterminé par de nombreux facteurs, y compris l'alimentation, la saisons, le stress, les méthodes de production et de récolte (cultivés ou sauvage), le genre, les stades de développement et cycles de vie, la vitesse de croissance, la qualité de l'eau et d'autres facteurs agricoles, environnementaux et écologiques (**Ringø et al. 2016**). De plus, de nombreuses pratiques de traitement et de manutention post-récolte jouent ensemble un rôle important dans la contamination des produits de la pêche inclure ; les surfaces en contact avec les poissons (ex : trancheuse, bande transporteuse, et couteau), le personnel (p. ex., tabliers, gants et bottes) et autres (ex : air, glace et eau) (**Sheng & Wang 2021**).

### **3. Étude de la sensibilité aux antibiotiques des BGN isolées**

Les souches fermentaires isolées des échantillons de légumes présentaient une résistance à l'amoxicilline (96,23%; 51/53), à la céfoxitine (60,38%; 32/53), au céfotaxime (75,47% ; 40/53), à la céftazidime (62,26% ; 33/53), au céfépime (39,62%; 21/53), à l'aztréoname (50,94%; 27/53) et à l'amoxicilline-acide clavulanique (79,25%; 42/53). La résistance aux carbapénèmes a été déduite sur la base d'une sensibilité réduite à l'ertapénème (20,75%; 11/53) ou à l'imipénème (1,89%; 1/53). De plus, certains des isolats ont été considérés comme résistants aux aminoglycosides et aux fluoroquinolones, notamment la tobramycine (20,75%; 11/53), la gentamicine (16,98%; 9/53), l'amikacine (3,77%; 2/53) et la ciprofloxacine (26,42%; 14/53). En revanche, dix-neuf isolats étaient résistants à la colistine (35,48%; n = 19), parmi ces derniers cinq isolats avaient un phénotype de résistance sauvage. Les souches résistantes à la colistine ont présenté des valeurs de CMI allant de 4 jusqu'à 256 µg/mL (**figure 29, tableau 8**). Les différents pourcentages d'antibiorésistance des souches fermentaires isolées à partir des légumes sont présentés dans la **figure 28**.

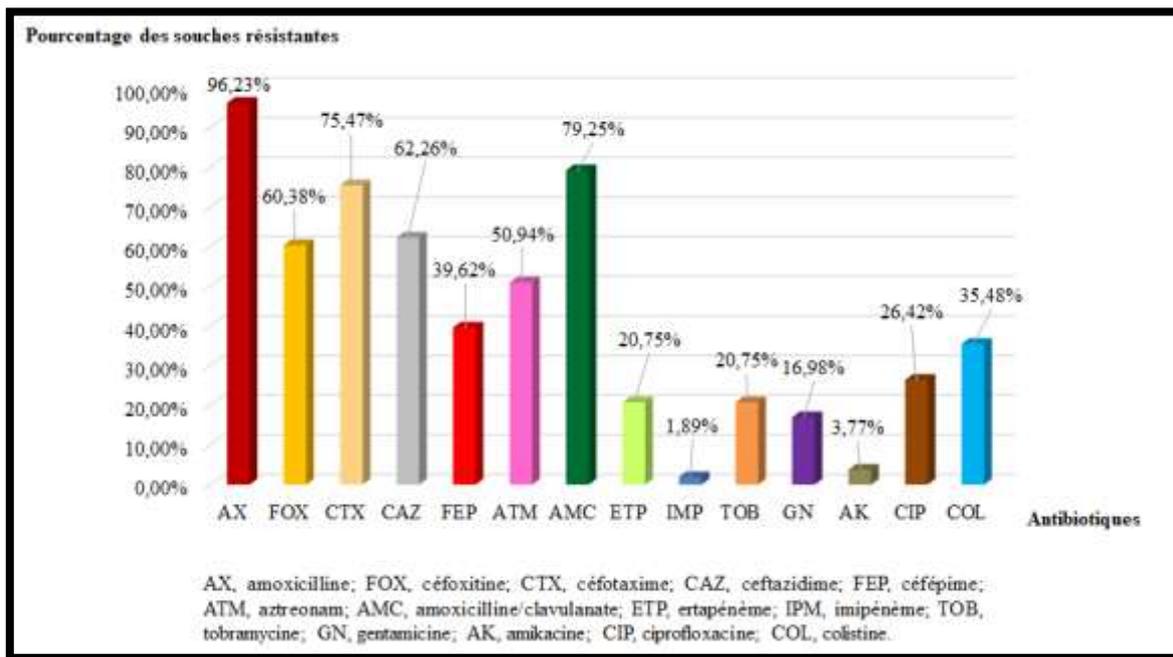


Figure 28. Pourcentage d’antibiorésistance des souches fermentaires isolées à partir des échantillons de légumes.

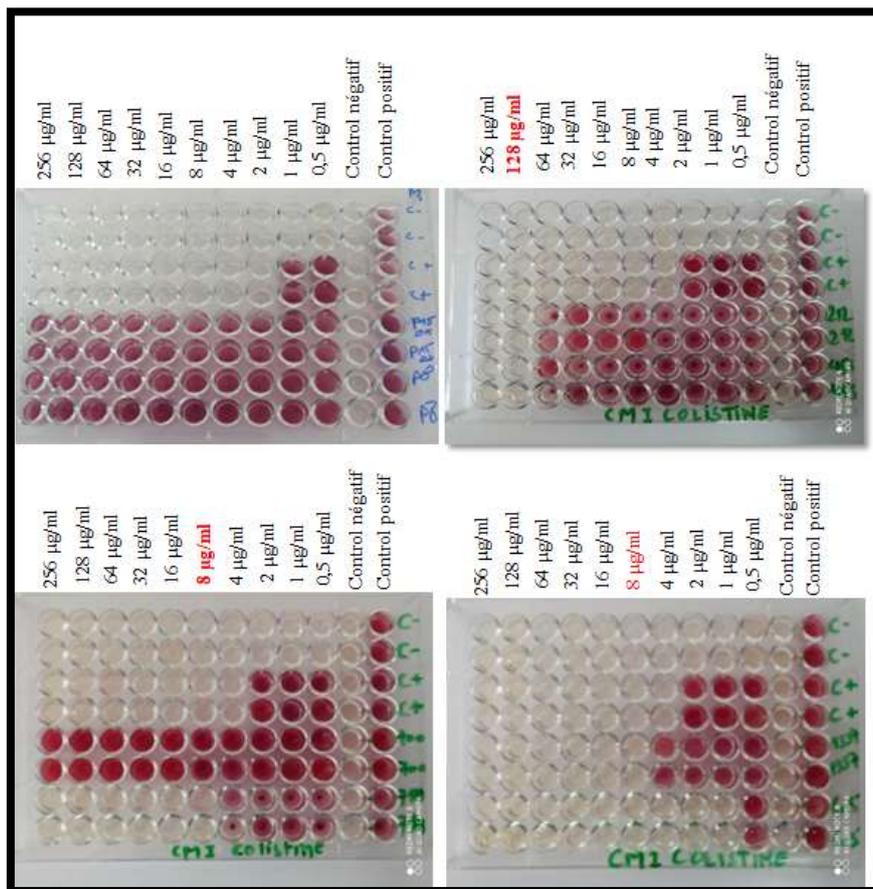
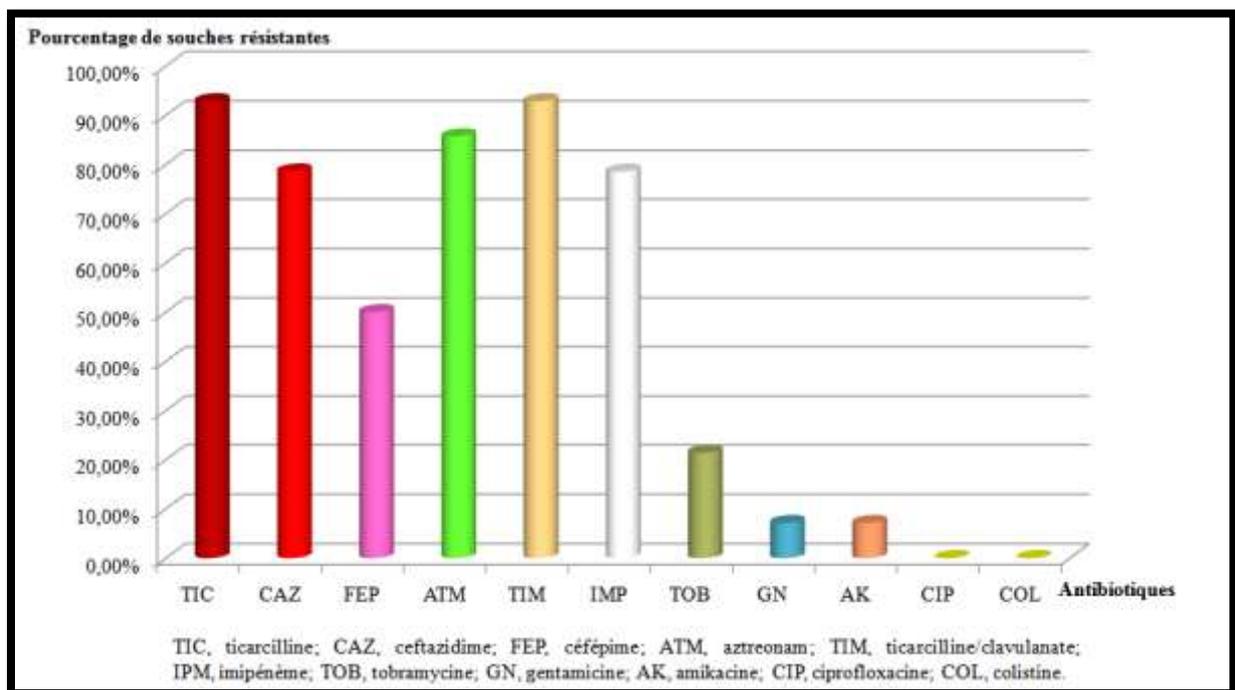


Figure 29. Concentration minimale inhibitrice de la colistine déterminée par la méthode de microdilution pour certains isolats.

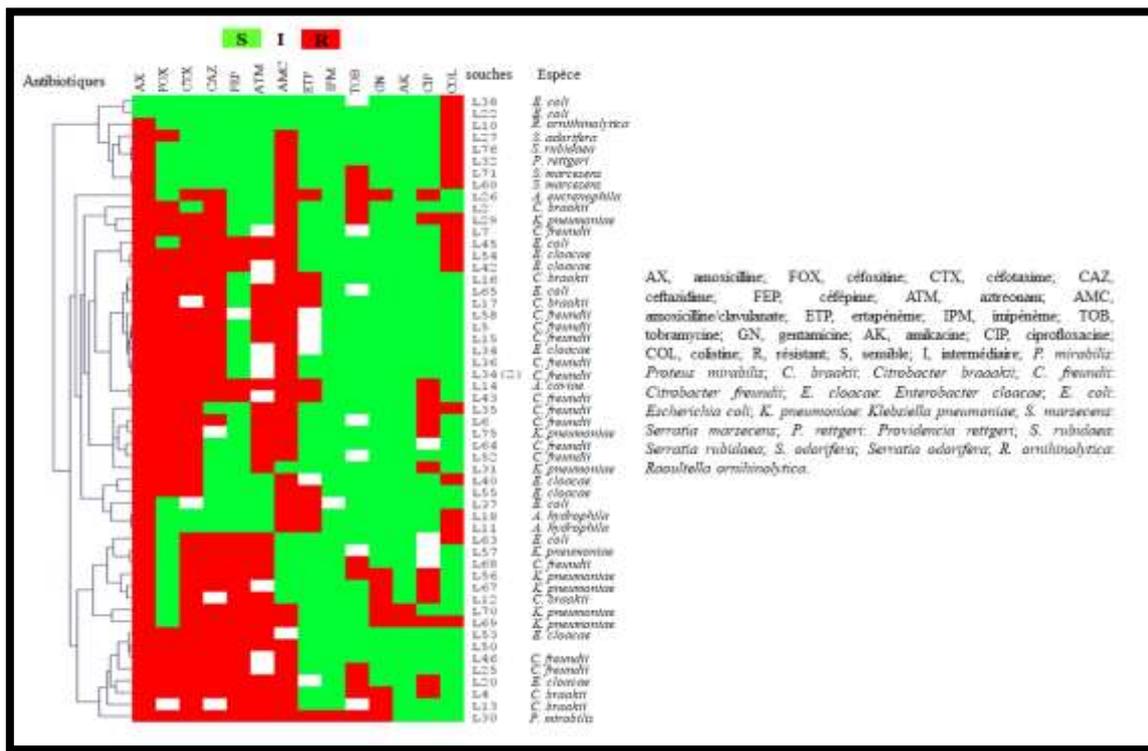
Les quatorze isolats restants identifiés comme BGN non fermentaires étaient résistants à la ticarcilline (92,86%; 13/14), à l'association ticarcilline-acide clavulanique (92,86%; 13/14), suivis de l'aztréonam (85,71% ; 12/14), de la ceftazidime (78,57% ; 11/14), de l'imipénème (78,57%; 11/14) (sept d'entre elles présentaient un phénotype de résistance sauvage à l'imipénème) et du céfépime (50% ; 7/14). Les isolats obtenus présentaient également une résistance à la tobramycine (21,43%; 3/14), à la gentamicine (7,14%; 1/14) et à l'amikacine (7,14%; 1/14). La ciprofloxacine et la colistine sont avérées être les antibiotiques les plus actifs sur l'ensemble (100%) de ces isolats. Les différents pourcentages d'antibiorésistance des BGN non fermentaires isolées à partir de légumes sont présentés dans la **figure 30**.



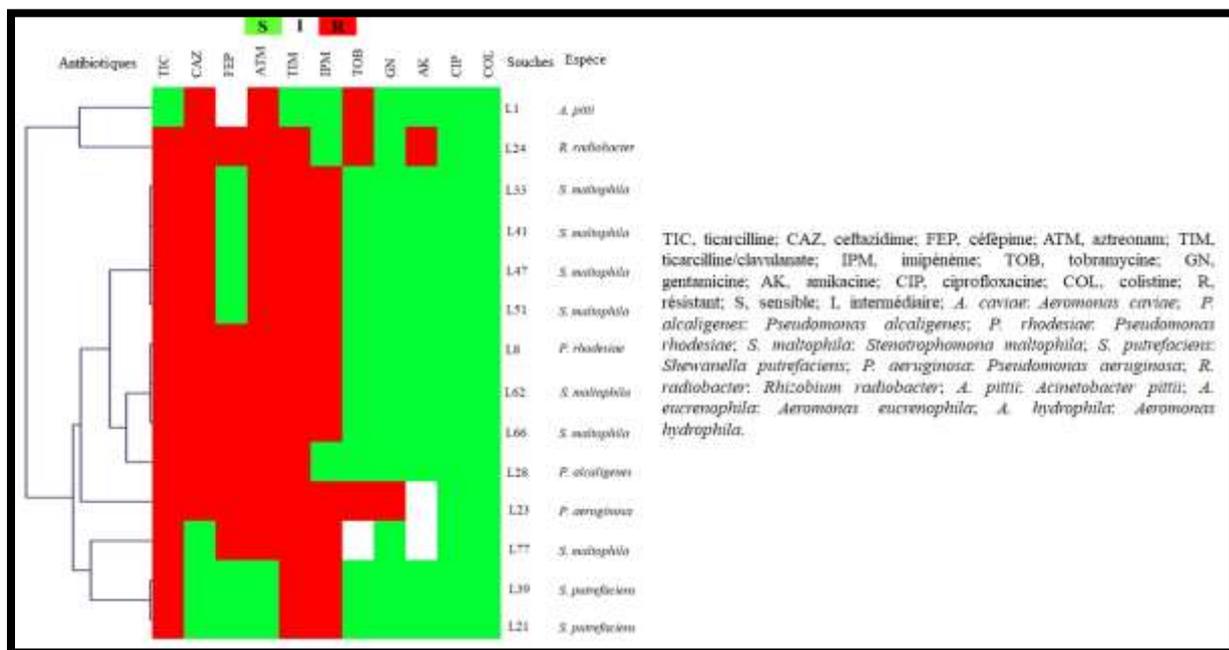
**Figure 30.** Pourcentage de la résistance aux antibiotiques des BGN non fermentaires isolées à partir des échantillons de légumes.

La clustérisation des profils d'antibiorésistance des BGN fermentaires isolées au cours de notre étude à partir des échantillons de légumes en utilisant le logiciel MultiExperimentViewer (MEV) software version 4\_6\_2, a permis l'identification de 48 profils de résistance aux antibiotiques présentés dans la **figure 31**.

En revanche, la clustérisation des données d'antibiogramme des BGN non fermentaires isolées au cours de notre étude à partir de prélèvements de légumes en utilisant le logiciel MultiExperiment Viewer (MEV) software version 4\_6\_2, a permis l'identification de 8 profils de résistance aux antibiotiques (**figure 32**).



**Figure 31.** Résultats d’antibiogramme et de l’identification des isolats fermentaires isolés à partir des échantillons de légumes et regroupés à l’aide de la version 4\_6\_2 du logiciel MultiExperimentViewer (MEV).

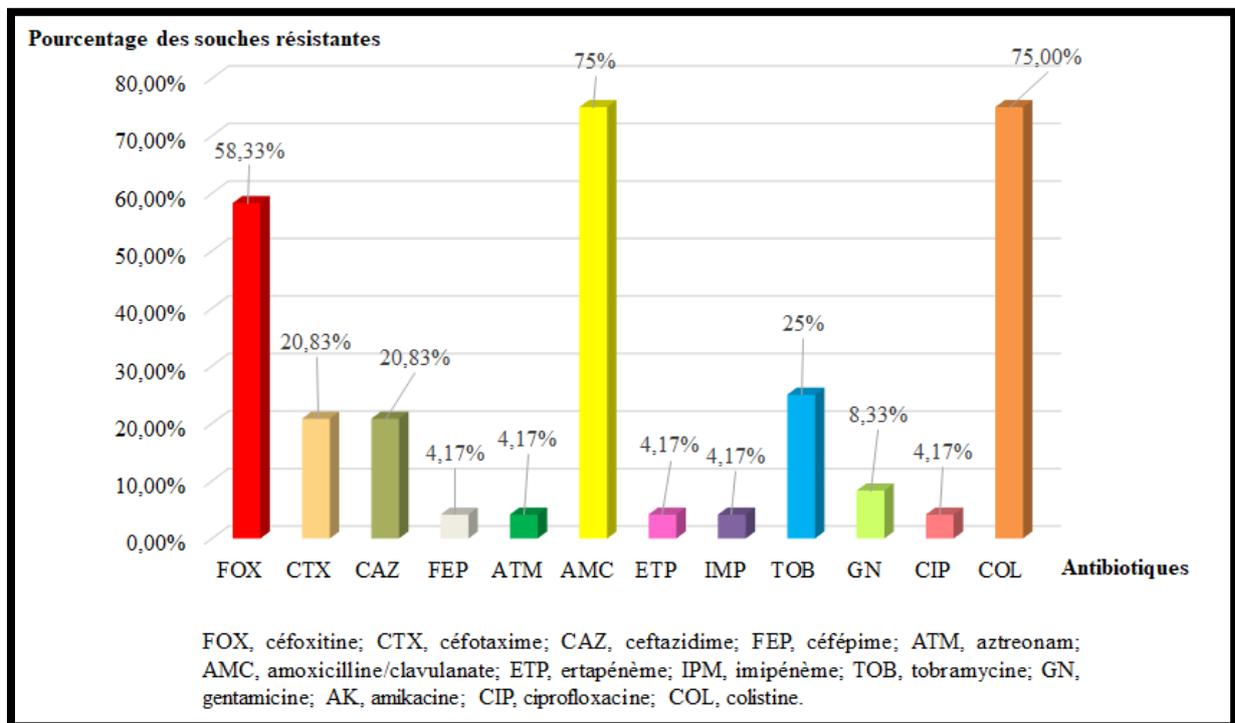


**Figure 32.** Résultats d’antibiogramme, et de l’identification des isolats non fermentaires isolés à partir des échantillons de légumes regroupés à l’aide du logiciel MultiExperiment Viewer (MEV) version 4\_6\_2.

Nos résultats sont différents de ceux rapporté en Chine entre la période allant de 2011 à 2014 où les souches d'entérobactéries isolées (n=164) ont montré un niveau élevé d'antibiorésistance au céfotaxime (97,8%), à l'imipénème (5,2%), à la gentamicine (47,9%), et à la ciprofloxacine (36,5%) malgré que l'isolement utilisé dans cette étude n'était pas sélectif (**Ye et al. 2018**). De plus, nos résultats sont aussi différents de ceux rapporté en Algérie, par Mesbah Zekar *et al.*, (2020) où ils ont rapporté que toutes les souches isolées étaient résistantes au céfotaxime et à la ceftazidime (100%, 13/13); 85% d'entre elles étaient résistantes au céfépime, 69% à l'association amoxicilline-acide clavulanique, 92% à l'aztréonam, 54% à la gentamicine, et à la ciprofloxacine. Tandis que, seulement 15% des isolats étaient résistants à la céfoxitine et aucune des souches obtenues n'étaient résistantes à l'ertapénème et à l'imipénème (**Mesbah Zekar et al. 2020**). En 2015, Zurfluh *et al.* ont trouvé un niveau élevé de résistance au céfotaxime (88,3%) chez les souches d'entérobactéries isolées tandis que 33,3% et 31,7% des souches isolées étaient résistantes à la gentamicine et à la ciprofloxacine respectivement (**Zurfluh et al. 2015a**). Dans la présente étude, 79,25%, 60,38% et 1,89% des souches isolées étaient résistantes à l'association amoxicilline-acide clavulanique, à la céfoxitine et à l'imipénème respectivement, ces pourcentages sont supérieurs à ceux rapportés en Afrique du sud en 2020. Dans cette dernière, un pourcentage de résistance de 52,08%, de 27,08% et de 4,17% contre l'association amoxicilline-acide clavulanique, la céfoxitine et l'imipénème respectivement a été observé chez des souches d'entérobactéries isolées à partir des échantillons d'épinards prélevés au sein de deux productions commerciales d'épinards dans la province du Gauteng (**Richter et al. 2020**). Dans une étude Chinoise, vingt-quatre souches d'entérobactéries isolées à partir de différents types de légumes frais achetés dans 23 villes à 9 provinces en Chine présentaient une parfaite résistance à la colistine (100%), suivie de la gentamicine (91,67%), la ciprofloxacine (66,67%) et le céfotaxime (58,33%), ces niveau d'antibiorésistance restent encore supérieurs à ceux trouvés dans notre étude (**Liu et al. 2019**).

Les souches fermentaires isolées à partir de prélèvements de fruits montrent une résistance presque à tous les antibiotiques testés y compris la céfoxitine (58,33%, 14/24), le céfotaxime (20,83%, 5/24), la ceftazidime (20,83%, 5/24), le céfépime (4,17%, 1/24), l'aztreonam (4,17%, 1/24), l'association amoxicilline-acide clavulanique (75%, 18/24), l'ertapénème (4,17%, 1/24), l'imipénème (4,17%, 1/24), la tobramycine (25%, 6/24), la gentamicine (8,33%, 2/24), la ciprofloxacine (4,17%, 1/24), et la colistine (75%, 18/24) (6 isolats avaient un phénotype de résistance sauvage). Parmi les antibiotiques testés, seule

l'amikacine a montré une efficacité de 100% contre les souches résistantes isolées. Les souches résistantes à la colistine avaient des concentrations minimales inhibitrices mesurées entre 4 et 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (**tableau 8**). Les différents pourcentages des souches résistantes aux antibiotiques sont présentés dans la **figure 33**.



**Figure 33.** Pourcentage de résistance aux antibiotiques des souches fermentaires isolées à partir des prélèvements de fruits.

La clustérisation des profils d'antibiorésistance des BGN fermentaires isolées au cours de notre étude à partir des échantillons de fruits a permis l'identification de 12 profils de résistance aux antibiotiques présentés dans la **figure 34**.

Les BGN non fermentaires isolées à partir de prélèvements de fruits ont montré une haute résistance à la ticarcilline (85,71%, 6/7) et à l'aztréonam (85,71%, 6/7) suivie de la tobramycine (57,14%, 4/7), de l'association ticarcilline-acide clavulanique (57,14%, 4/7), du céfépime (57,14%, 4/7), de la colistine (57,14%, 4/7), de la ceftazidime (42,86%, 3/7), de l'imipénème (42,86%, 3/7, présentaient un phénotype de résistance sauvage à l'imipénème), de l'amikacine (42,86%, 3/7) et de la gentamicine (14,29%, 1/7). La ciprofloxacine a montré une efficacité de 100% contre les souches résistantes isolées (**Figure 35**).

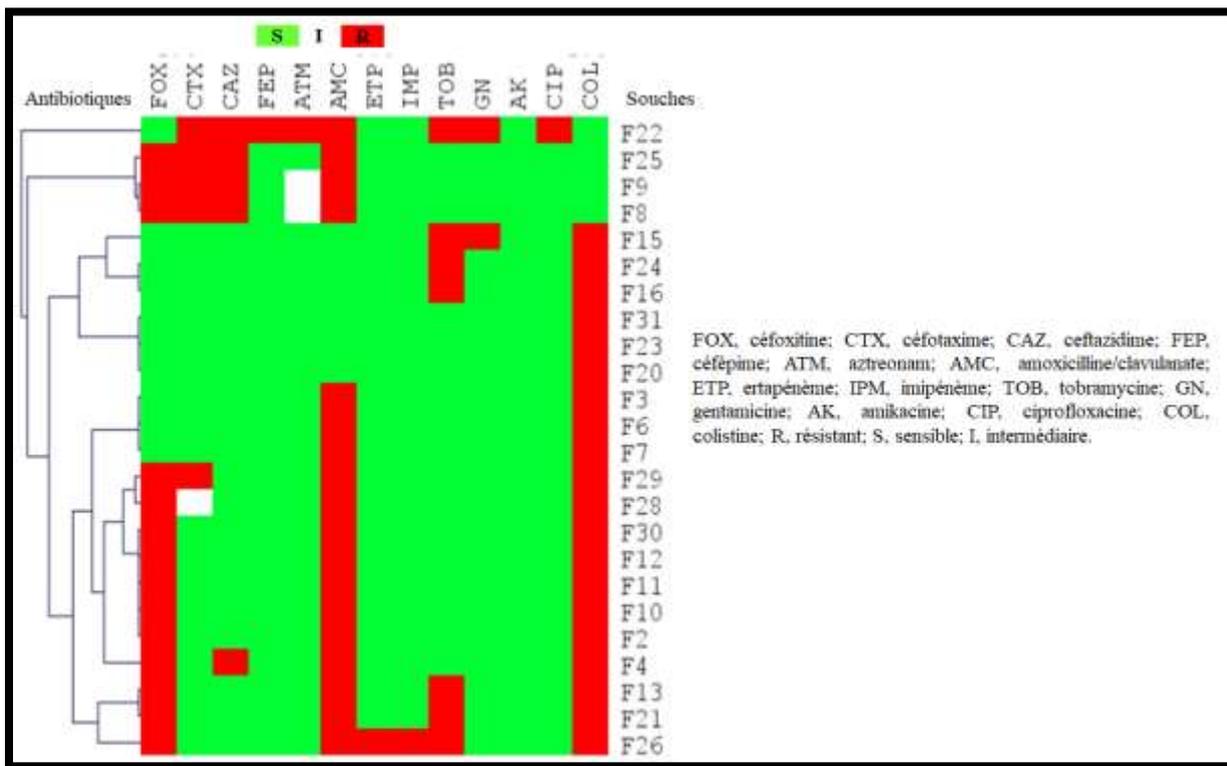


Figure 34. Résultats d’antibiogramme des isolats fermentaires isolés à partir des échantillons de fruits et regroupés à l’aide de la version 4\_6\_2 du logiciel MultiExperimentViewer (MEV).

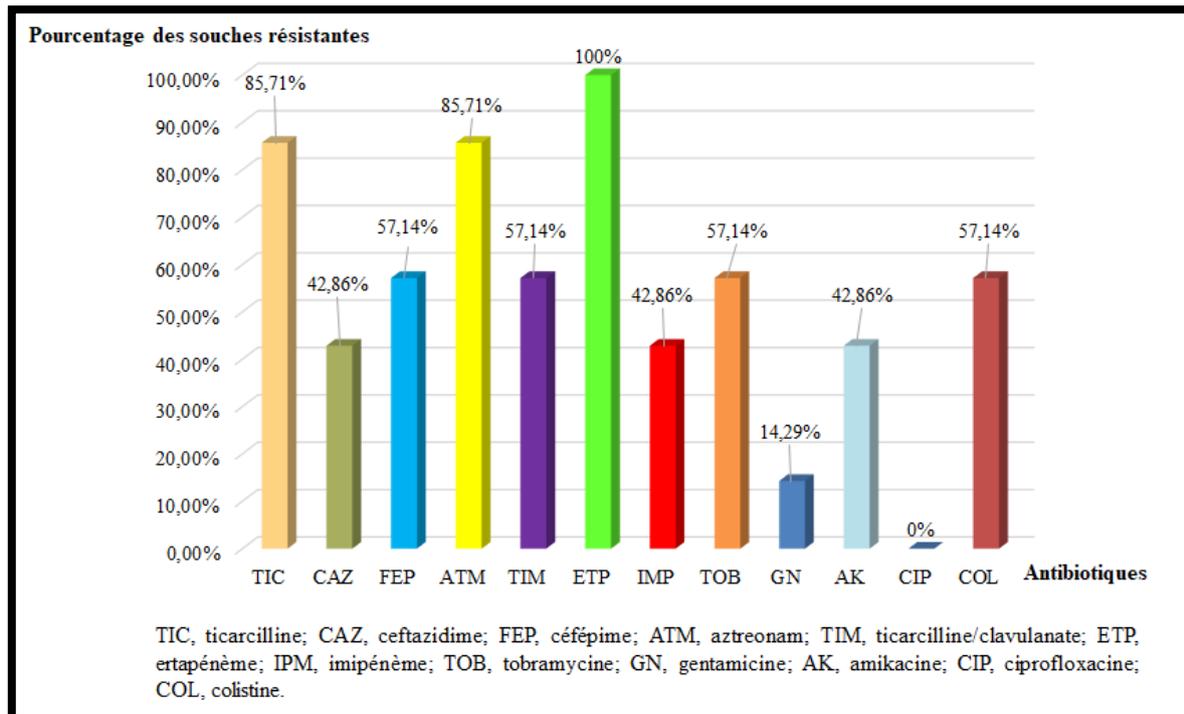
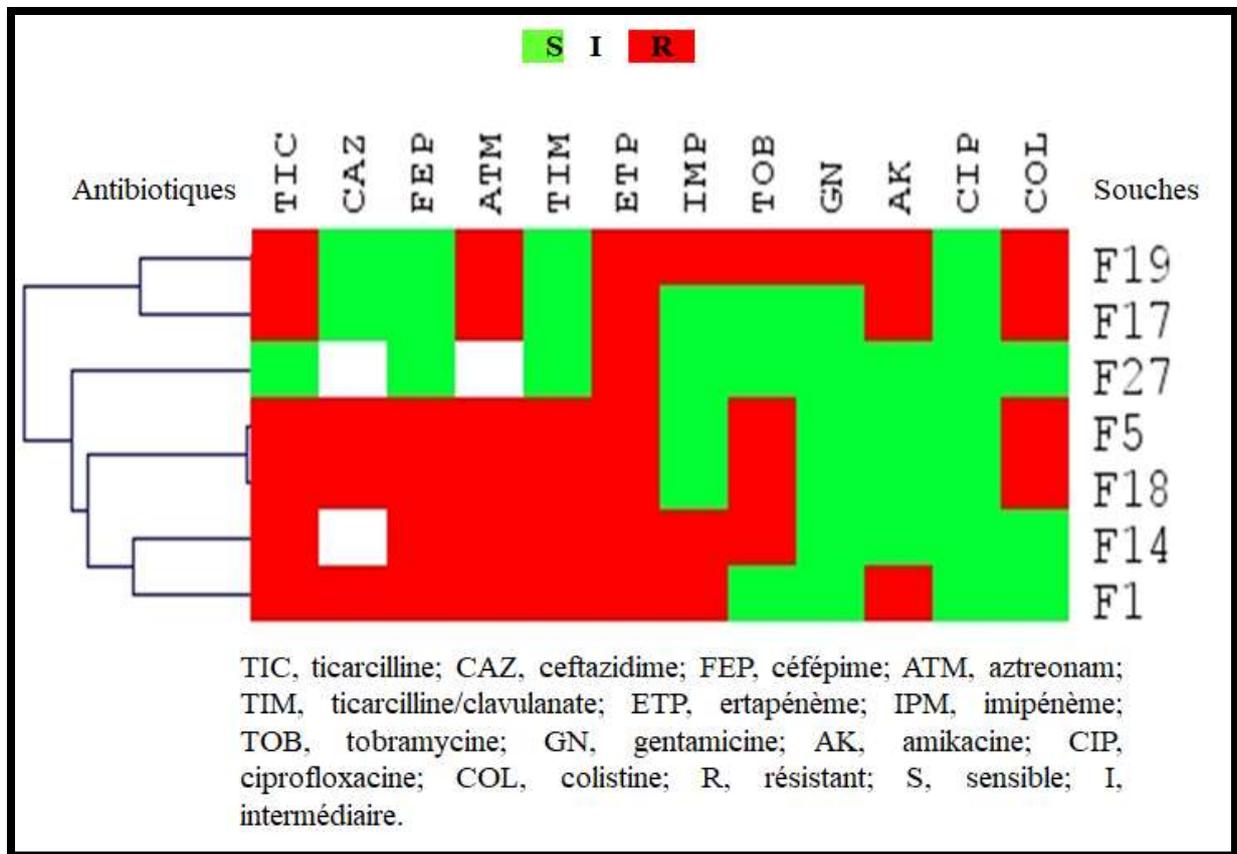


Figure 35. Pourcentage de la résistance aux antibiotiques des BGN non fermentaires isolées à partir des fruits.

La clustérisation des profils d'antibiorésistance des BGN non fermentaires isolées au cours de notre étude à partir des échantillons de fruits a permis l'identification de 6 profils différents de résistance aux antibiotiques présentés dans la **figure 36**.



**Figure 36.** Résultats d'antibiogramme des isolats non fermentaires isolés à partir des échantillons de fruits et regroupés à l'aide de la version 4\_6\_2 du logiciel MultiExperimentViewer (MEV).

**Tableau 8.** Les concentrations minimales inhibitrices de la colistine des souches isolées à partir des échantillons de légumes et fruits.

	Type d'aliment	Souches	Espèce bactérienne	CMI (µg/ml)
Légumes	Coriandre	L7	<i>Citrobacter freundii</i>	8
		L35	<i>Citrobacter freundii</i>	16
		L40	<i>Enterobacter cloacae</i>	8
		L22	<i>Escherichia coli</i>	8
		L38	<i>Escherichia coli</i>	8
	Carotte	L29	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	256
		L54	<i>Enterobacter cloacae</i>	8
Persil	L42	<i>Enterobacter cloacae</i>	8	

**Suite du tableau 8.** Les concentrations minimales inhibitrices de la colistine des souches isolées à partir des échantillons de légumes et fruits.

	Type d'aliment	Souches	Espèce bactérienne	CMI (µg/ml)
Légumes	Persil	L45	<i>Escherichia coli</i>	4
		L63	<i>Escherichia coli</i>	64
		L18	<i>Aeromonas hydrophila</i>	64
	Carotte	L11	<i>Aeromonas hydrophila</i>	64
	Courgette	L10	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	8
Fruits	Datte	F10	<i>Citrobacter braakii</i>	4
		F11	<i>Citrobacter freundii</i>	4
	Banane	F15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8
		F16	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	256
		F4	<i>Citrobacter braakii</i>	4
		F21	<i>Pantoea ananatis</i>	256
	Raisin	F23	<i>Pantoea dispersa</i>	4
	Raisin	F24	<i>Pantoea dispersa</i>	4
	Poire	F25	<i>Enterobacter cloacae</i>	256
	Poire	F28	<i>Enterobacter asburiae</i>	256
	Poire	F29	<i>Enterobacter asburiae</i>	256
	Poire	F28	<i>Enterobacter cloacae</i>	256
	Poire	F31	<i>Klebsiella oxytoca</i>	8

En revanche, les résultats obtenus dans notre étude pour les souches isolées de prélèvements de fruits sont supérieurs à ceux rapportés entre Avril et Septembre 2014 à Oman à partir de différents échantillons de fruits locaux et importés. Les souches d'entérobactéries isolées ont montré un niveau faible d'antibiorésistance à l'association amoxicilline-acide clavulanique (33%), à la céfoxitine (31%) et à l'ertapénème (1%) et aucune souche n'a été résistante à l'aztréonam, au céfotaxime et à la ceftazidime (**Al-Kharousi et al. 2019**). De plus nos résultats sont supérieurs aux résultats rapportés par Yang *et al.*, (2019) où toutes les souches d'*E. coli* isolées étaient sensibles aux antibiotiques testés à l'exception de la colistine et de la polymyxine B (**Yang et al. 2019**). Dans une étude faite en Équateur, 100% des souches isolées à partir de prélèvements de fruits étaient résistantes au céfotaxime, 76% à

l'association amoxicilline-acide clavulanique et au céfépime, 66% à la céftazidime, et 52% à la ciprofloxacine ce qui est supérieure à notre étude (**Montero et al. 2021**). Tandis que le pourcentage des souches résistantes à l'imipenème signalé dans notre étude (4,17%) est supérieur à ce rapporté par yang *et al.*, (2019) (**Yang et al. 2019**).

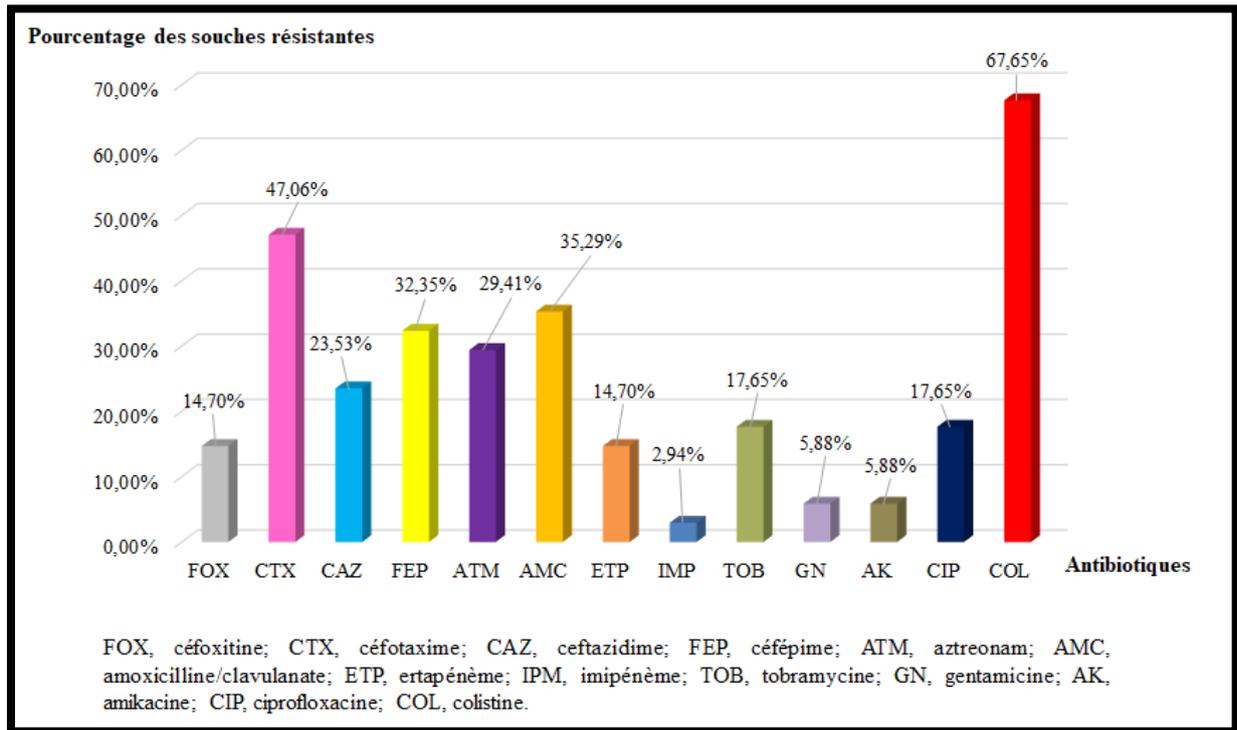
Nos résultats sont en corrélation avec ceux d'autres études indiquant que les légumes et les fruits sont un réservoir de bactéries résistantes aux antibiotiques et un moyen potentiel de leur transmission aux consommateurs (**Touati et al. 2017; Iseppi et al. 2018; Richter et al. 2019; Mesbah Zekar et al. 2020; Colosi et al. 2020**). Ce problème d'antibiorésistance dans ce domaine pourrait être le résultat de l'utilisation des antibiotiques pour la lutte contre les maladies bactériennes (agents phytopathogènes) connues par leur grave répercutions sur la production agricole et l'économie (**Stockwell & Duffy 2012**). Les antibiotiques appliqués aux arbres à l'aide de systèmes conventionnels de pulvérisation peuvent atteindre d'autres surfaces végétales non concernées (non ciblées), telles que les feuilles des herbes, des mauvaises herbes ou d'autres plantes, influençant ainsi les bactéries présentes dans la phyllosphère en question et pouvant même participer à l'apparition de mutants résistants à ces antibiotiques (**Sundin & Wang 2018**). Toutefois il a été spéculé que les éclaboussures d'antibiotiques sur plusieurs hectares de plantes dans l'environnement pourraient augmenter l'incidence de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries existantes sur les surfaces des plantes (**Stockwell & Duffy 2012**).

En plus de leur utilisation pour le contrôle des maladies bactériennes des plantes, les antibiotiques et leurs résidus peuvent être introduits dans l'agriculture via la fertilisation des sols par le fumier naturel issu de l'élevage connu par l'utilisation courante des antibiotiques conduisant ainsi à la sélection des souches résistantes pouvant être transmises par la suite aux plantes (**Berg et al. 2014; Iseppi et al. 2018**). Malgré ces inconvénients, la fertilisation des sols avec du fumier reste une pratique agricole courante dans le monde entier (**Zalewska et al. 2021**).

En outre, le sol pourrait bien représenter une source importante de bactéries résistantes aux antibiotiques pour la plante grâce à la large diversité des bactéries du sol capables de produire des antibiotiques et la dynamique de diffusion des déterminants génétiques de l'antibiorésistance entre les bactéries présentes sur les plantes et ceux du résistome du sol (**Zalewska et al. 2021**).

Les pesticides sont indispensables dans la production agricole pour lutter contre les mauvaises herbes et les insectes indésirables, mais malheureusement leur utilisation abusive déjà signalée par plusieurs études conduit à l'émergence de phénotypes multirésistants aux antibiotiques, cela peut être dû soit à une augmentation de l'expression des pompes d'efflux, soit à une synthèse réduite des porines de la membrane externe, soit aux deux ( **Kurenbach *et al.* 2015; Kurenbach *et al.* 2017**). Les pesticides particulièrement les herbicides pourraient avoir un large spectre d'activité leurs permettant d'exercer une action antimicrobienne sur les microorganismes exposés. Par conséquent, ils peuvent sélectionner des souches résistantes aux antibiotiques utilisés en antibiothérapie courante. Kurenbach *et al.*, (2018) ont démontré que les herbicides couramment utilisés peuvent augmenter ou diminuer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de plusieurs antibiotiques et que le taux d'évolution de la résistance aux antibiotiques dans certaines conditions peut augmenter (**Kurenbach *et al.* 2018**). De plus, une étude en Chine a révélé que les herbicides peuvent accélérer le transfert horizontal des gènes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries du sol (**Li *et al.* 2022**). Il est donc nécessaire de signaler que l'utilisation généralisée des pesticides peut être une source sous-estimée de l'émergence des bactéries résistantes aux antibiotiques pouvant menacer l'efficacité de ces derniers et conduire à l'échec thérapeutique chez l'homme et l'animal (**Pöppe *et al.* 2020**).

A côté des résistances rapportées chez les souches isolées à partir des échantillons de légumes et de fruits, les BGN fermentaires obtenues à partir des échantillons de poissons ont présenté des résistances à plusieurs antibiotiques : 47,06% (16/34) pour le céfotaxime, 35,29% pour l'association amoxicilline-acide clavulanique (12/34), 32,35% pour le céfépime (11/34), 29,41% pour l'aztréonam (10/34) et 23,53% pour la céftazidime (8/34). Seulement 14,70% des souches isolées étaient résistantes à la céfoxitine (5/34). L'ertapénème avait un taux de résistance de 14,70% (5/34) tandis que l'imipénème et la ciprofloxacine ont montré un taux de 2,94% (1/34) et de 17,65% (6/34) respectivement. Les souches fermentaires isolées étaient résistantes aussi à la tobramycine (17,65% ; 6/34), à la gentamicine (5,88% ; 2/34) et à l'amikacine (5,88% ; 2/34), vingt-trois isolats étaient résistants à la colistine (67,65%; 23/34) parmi ces derniers 14 isolats avaient un phénotype de résistance sauvage (**Figure 37**). Les concentrations minimales inhibitrices des souches résistantes à la colistine sont présentées dans le **tableau 9**.

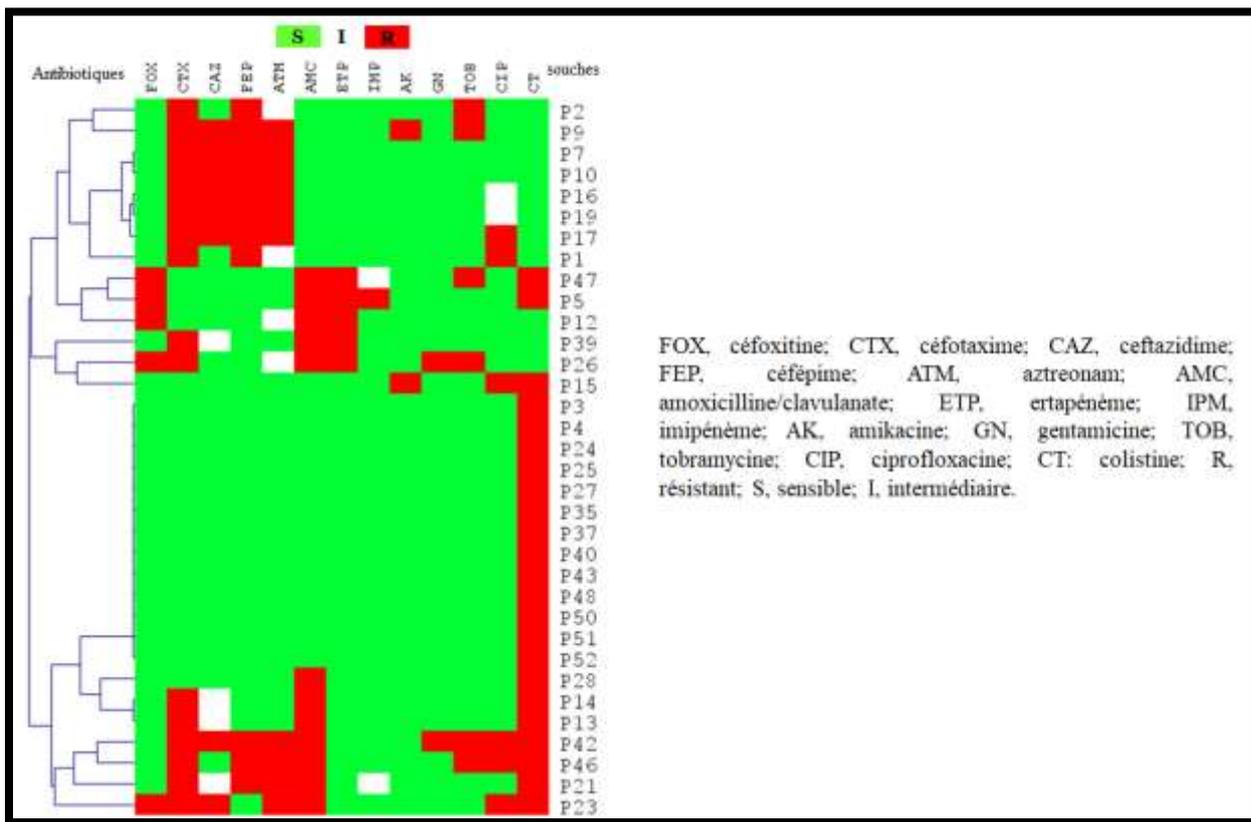


**Figure 37.** Pourcentage de la résistance aux antibiotiques des BGN fermentaires isolées à partir des échantillons de poissons.

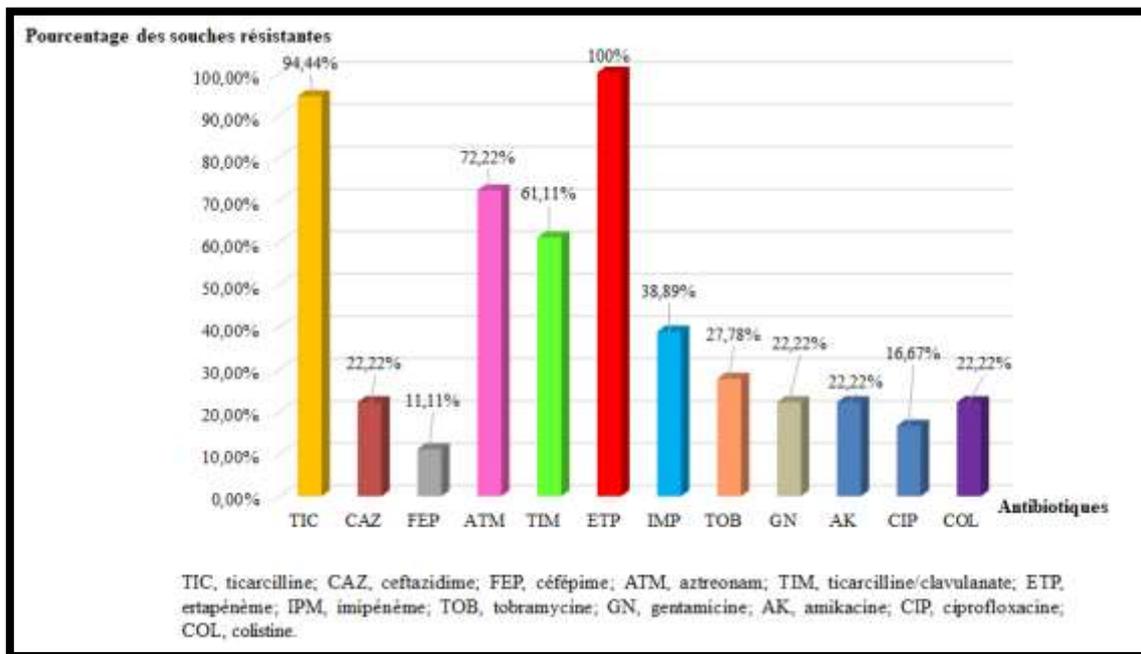
La clustérisation des profils d’antibiorésistance des BGN fermentaires isolées au cours de notre étude à partir des échantillons de poissons a permis l’identification de 19 profils de résistance aux antibiotiques présentés dans la **figure 38**.

Les souches non fermentaires isolées à partir des échantillons de poissons étaient résistantes à la ticarcilline (89,47%; 17/18), à l’aztréonam (72,22%; 13/18), à l’association ticarcilline-acide clavulanique (61,11%; 11/18), à l’imipénème (38,89%; 7/18) (une d’entre elles présentaient un phénotype de résistance sauvage à l’imipénème), à la ceftazidime (22,22% ; 4/18), et au céfépime (11,11% ; 2/18). Les isolats obtenus présentaient également une résistance à la tobramycine (27,78%; 5/18), à la gentamicine (22,22%; 4/18), à l’amikacine (22,22%; 4/18), à la colistine (22,22%; 4/18) et à la ciprofloxacine (16,67%; 3/18) (**Figure 39**).

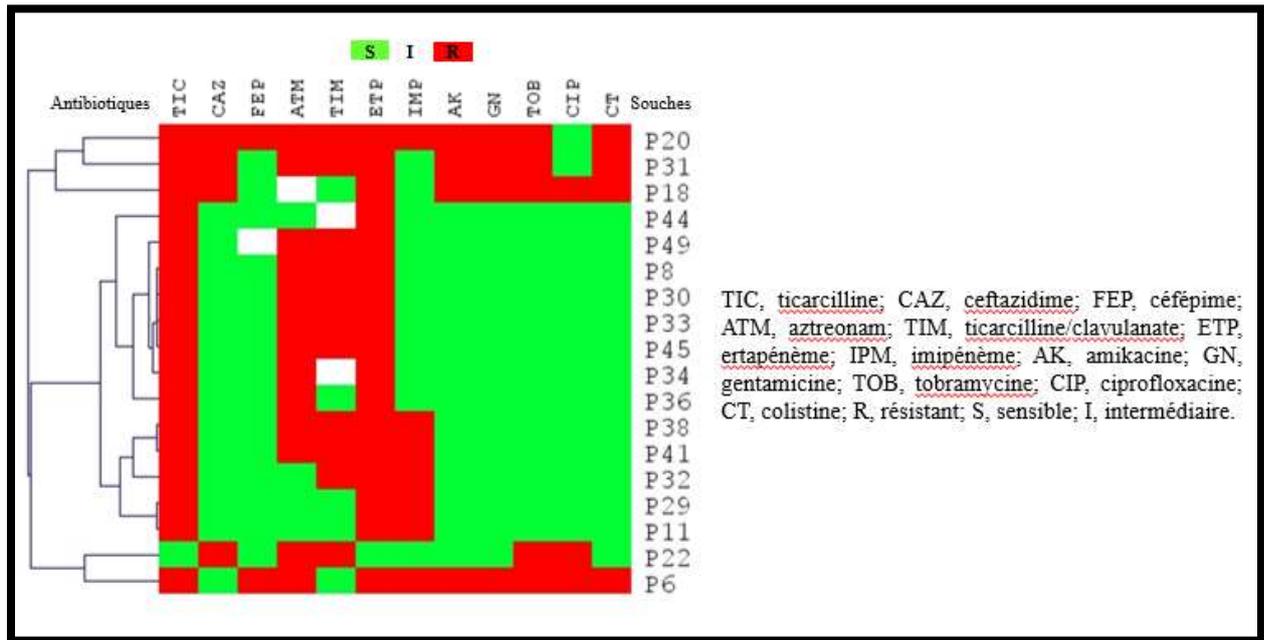
La clustérisation des profils d’antibiorésistance des BGN non fermentaires isolées au cours de notre étude à partir des échantillons de poissons a permis l’identification de 19 profils de résistance aux antibiotiques présentés dans la **figure 40**.



**Figure 38.** Résultats d’antibiogramme des isolats fermentaires isolés à partir des échantillons de poissons et regroupés à l’aide de la version 4\_6\_2 du logiciel MultiExperimentViewer (MEV).



**Figure 39.** Pourcentage de la résistance aux antibiotiques des BGN non fermentaires isolées à partir des échantillons de poissons.



**Figure 40.** Résultats d’antibiogramme des isolats non fermentaires isolés à partir des échantillons de poissons et regroupés à l’aide de la version 4\_6\_2 du logiciel MultiExperimentViewer (MEV).

**Tableau 9.** Les concentrations minimales inhibitrices de la colistine des souches isolées à partir des échantillons de poissons.

	Type d’aliment	Souches	Espèce bactérienne	CMI (µg/ml)
<b>Poissons</b>	<i>Sardina pilchardus</i>	P3	<i>Klebsiella oxytoca</i>	16
	<i>Sardina pilchardus</i>	P4	<i>Klebsiella oxytoca</i>	16
	<i>Sardina pilchardus</i>	P5	<i>Aeromonas caviae</i>	16
	<i>Sardina pilchardus</i>	P15	<i>Escherichia coli</i>	8
	<i>Sardina pilchardus</i>	P18	<i>Myroides odoratimimus</i>	64
	<i>Sardinella aurita</i>	P20	<i>Myroides odoratimimus</i>	64
	<i>Sardinella aurita</i>	P23	<i>Escherichia coli</i>	8
	<i>Sardina pilchardus</i>	P31	<i>Myroides odoratimimus</i>	16
	<i>Sardina pilchardus</i>	P42	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	64
	<i>Sardinella aurita</i>	P52	<i>Escherichia coli</i>	4
	<i>Sardinella aurita</i>	P47	<i>Escherichia coli</i>	8
	<i>Sardinella aurita</i>	P46	<i>Escherichia coli</i>	8

Nos résultats corroborent avec ceux obtenus dans une étude Indienne où dix-neuf échantillons ont été prélevés entre la période d’Août 2013 et d’Avril 2014 incluant ; poissons,

crevettes, palourdes, et calmars. Sur 169 souches isolées, 97,63% étaient résistantes au céfotaxime, 91,12% à la ceftazidime, 65,08% à l'aztreonam, et 38,46% étaient résistantes à l'association amoxicilline-acide clavulanique. Une résistance relativement moindre a été observée contre la céfoxitine (20,12%), l'imipénème (10,65%) et la ciprofloxacine (15,97%) (**Sanjit Singh et al. 2017**). En revanche, nos résultats sont différents de ceux rapportés en Corée par Dahanayake *et al.*, (2019) où ils ont signalé que 39% des souches d'*Aeromonas* spp. isolées à partir de palourdes étaient résistantes à l'imipénème, mais seulement 6% ont montré une résistance au méropénème. Pour les autres antibiotiques testés, aucune des souches obtenues n'était résistante au céfotaxime, à la gentamicine, à l'amikacine et à la ciprofloxacine (**Dahanayake et al. 2019**). L'analyse des échantillons de poissons frais collectés de différents marchés et centres commerciaux en Inde, a montré que toutes les souches d'entérobactéries isolées sont résistantes à la majorité des antibiotiques testés y compris; la céfoxitine, le céfotaxime, le céfépime, l'aztréonam, l'amoxicilline-acide clavulanique, l'etrapénème, l'imipénème, et à la ciprofloxacine suivie par l'amikacine avec un pourcentage de résistance de 50%. Tandis que l'ensemble des souches présentaient une parfaite sensibilité (100%) à la gentamicine, la tobramycine, et à la colistine (**Das et al. 2019**).

Dans notre étude, le taux élevé d'antibiorésistance observé chez les souches isolées à partir des poissons pourrait être lié à l'utilisation prolongée d'antibiotiques dans les piscicultures afin de prévenir les maladies et favoriser la croissance des poissons où ils sont principalement et régulièrement administrés par le biais d'alimentation (**Cabello et al. 2013**). Les différentes familles d'antibiotiques utilisées en aquaculture comprennent les  $\beta$ -lactamines, les aminoglycosides, les quinolones, les polymyxines, les sulfamides, les tétracyclines, les macrolides, les chloramphénicol, les nitrofuranes, et les lincosamides (**Okeke et al. 2022**). Après l'ajout d'antibiotiques, leurs concentrations augmentent dans la colonne d'eau et particulièrement dans les sédiments sous les cages par accumulation. Liang *et al.*, (2013) ont démontré que les concentrations d'antibiotiques dans les sédiments marins étaient beaucoup plus élevées que celles dans l'eau, indiquant que les sédiments sont un réservoir pour l'accumulation d'antibiotiques dans les écosystèmes marins et peuvent jouer le rôle d'une source de pollution secondaire du milieu marin qui dépend essentiellement des changements des paramètres physicochimiques à savoir la salinité et le pH (**Liang et al. 2013; Okeke et al. 2022**).

Dans ce contexte, la microflore intestinale des poissons peut être exposée à des aliments contenant des antibiotiques, ce qui peut entraîner l'apparition des souches résistantes

(**Chuah et al. 2016**). Plusieurs études ont montré que les autres organismes marins vivant dans le même environnement, y compris les poissons sauvages, se nourrissent des restes de nourriture et de matières fécales provenant de l'aquaculture marine influençant ainsi l'antibiorésistance de leur microbiote intestinal (**Gaw et al. 2014**). Par conséquent le microbiote intestinal de ces organismes marins représenterait un réservoir et une source de dissémination à travers la matière fécale dans le milieu aquatique des souches résistantes ainsi que les déterminants génétiques (gènes de résistance) responsable de cette résistance. Ces derniers peuvent à leur tour être transmis aux autres microorganismes par le biais des éléments génétiques mobiles (**Sheng & Wang 2021**).

En plus de l'utilisation non réglementée d'antibiotiques, le déversement des eaux usées non traitées renfermant des résidus d'antibiotiques ainsi que des bactéries résistantes provenant des déchets humains et animaux, des industries et des hôpitaux, du ruissellement des terres agricoles, des eaux usées municipales entraînent l'émergence et la propagation des bactéries résistantes aux antibiotiques dans le milieu aquatique particulièrement affectant ainsi les poissons et leur microbiote intestinal (**Fri et al. 2018; Sellera et al. 2018**).

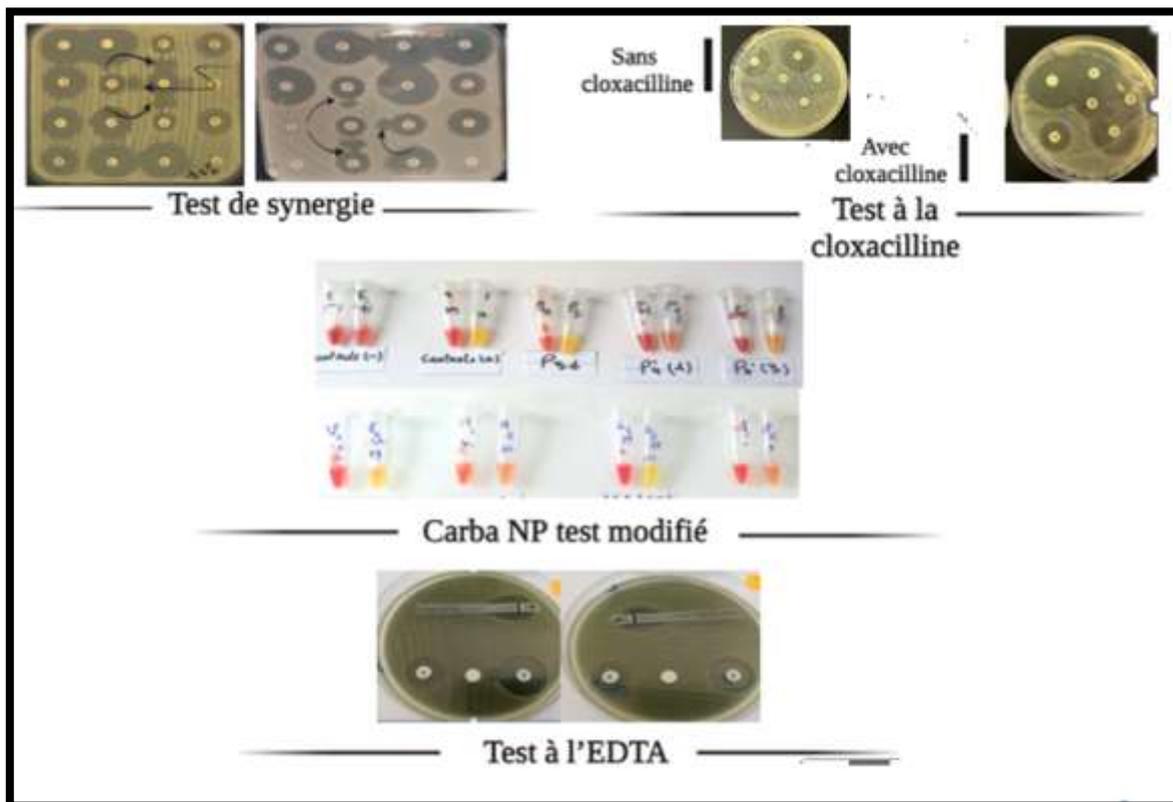
Les poissons sauvages peuvent être des récepteurs et des communicateurs des gènes de résistance aux antibiotiques dans le milieu aquatique où ils peuvent recevoir des gènes de résistance d'un environnement aquatique pollué. En Chine, **Zhou et al.**, (2020) ont montré une répartition saisonnière similaire des gènes de résistance aux antibiotiques entre les poissons et l'eau et ils ont suggéré que la source de ces gènes est l'environnement aquatique qui représente un milieu d'échange par excellence (**Zhou et al. 2021**).

En outre, les métaux lourds, qui sont fréquemment utilisés en aquaculture pour fournir des nutriments ou traiter des infections bactériennes, peuvent déclencher la co-sélection des gènes de résistance aux antibiotiques dans l'environnement d'élevage lorsque les concentrations critiques des métaux lourds sont atteintes. Une étude récente a révélé que le manganèse (Mn) et le zinc (Zn) étaient positivement corrélés avec la plupart des gènes de résistance aux antibiotiques en particulier pour les sulfamides (sulfapyridine, sulfadiazine, triméthoprim et sulfaméthoxazole) dans les sédiments aquacoles en Chine (**Lu et al. 2020**).

#### **4. Caractérisation phénotypique et moléculaire des gènes de résistance**

L'analyse phénotypique des  $\beta$ -lactamases chez les 150 souches isolées a permis d'identifier 31 souches productrices de BLSE, parmi lesquelles 15 souches ont été isolées à partir des échantillons de légumes, 4 souches proviennent des échantillons de fruits et 12 souches ont été obtenues à partir des échantillons de poissons.

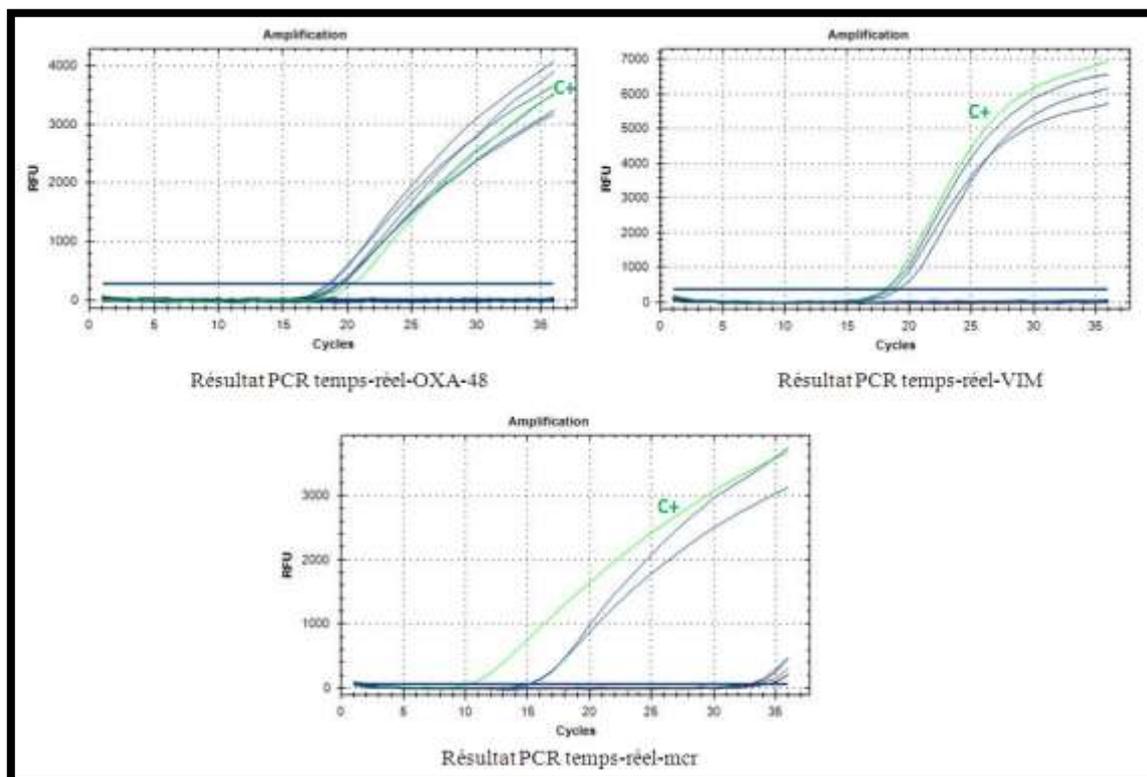
Sur l'ensemble des BGN isolées, 11 souches ont présenté une activité carbapénémase dont cinq souches ont été isolées à partir des légumes et six souches ont été obtenues à partir des échantillons de poissons. Tandis que, les céphalosporinases hyperproduites ou acquises ont été observées chez 16 souches (11 souches proviennent des échantillons de légumes, 3 souches des échantillons de fruits, et 2 souches à partir des échantillons de poissons). Les résultats du test à l'EDTA a permis d'identifier 4 souches (1 souche isolée à partir des échantillons de légumes et 3 souches à partir des poissons) positives pour la production de métallob-lactamases (**Figure 41**).



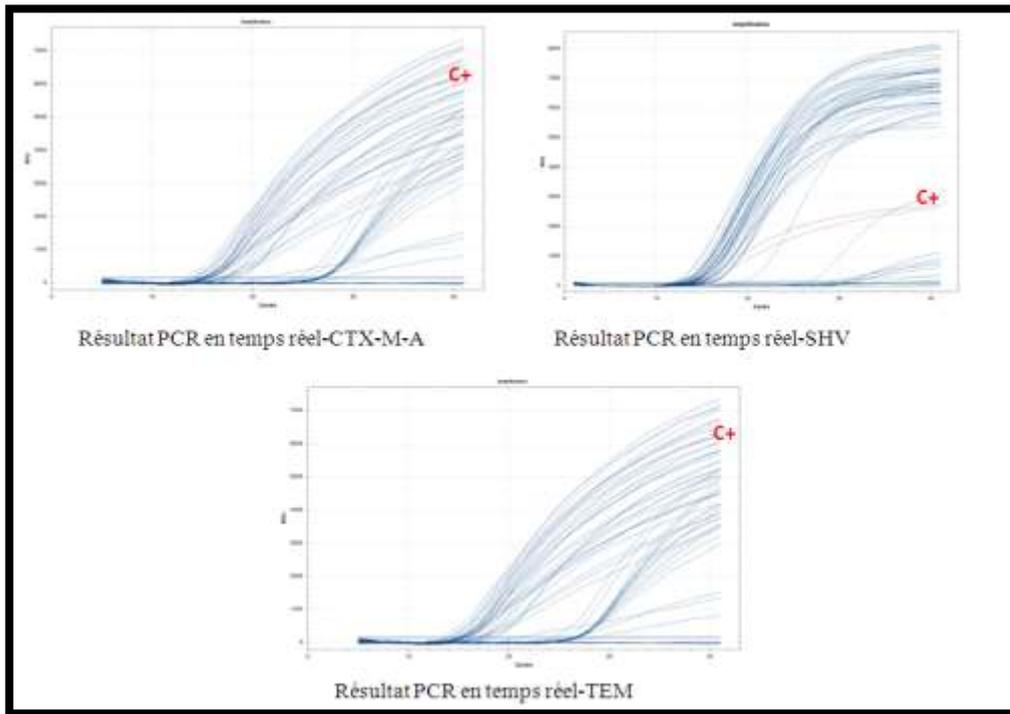
**Figure 41.** Résultats de la caractérisation phénotypique des mécanismes de résistance aux antibiotiques détectés chez des BGN isolées.

Les résultats de la PCR et du séquençage ont montré la présence de gènes codant pour des  $\beta$ -lactamase dans 26 isolats issus des échantillons de légumes (38,80%; n = 26). Le gène prédominant était *bla*<sub>TEM</sub> trouvé chez sept isolats de *C. freundii* (10,48%; n = 7), suivi de la combinaison de *bla*<sub>CTX-M-15</sub> avec *bla*<sub>TEM</sub> qui a été détectée dans cinq des isolats positifs (deux *C. braakii* et trois *E. coli*) (7,46%; n = 5). Trois isolats (deux *K. pneumoniae* et un *C. braakii*) ont été identifiés comme producteur de BLSE type CTX-M-15 (4,48%; n = 3). La combinaison de *bla*<sub>CTX-M-15</sub> avec *bla*<sub>TEM</sub> et le gène *bla*<sub>SHV-168</sub> a été identifiée chez deux isolats de *K. pneumoniae* (2,99%; n = 2). De plus, deux isolats de *K. pneumoniae* hébergeaient la

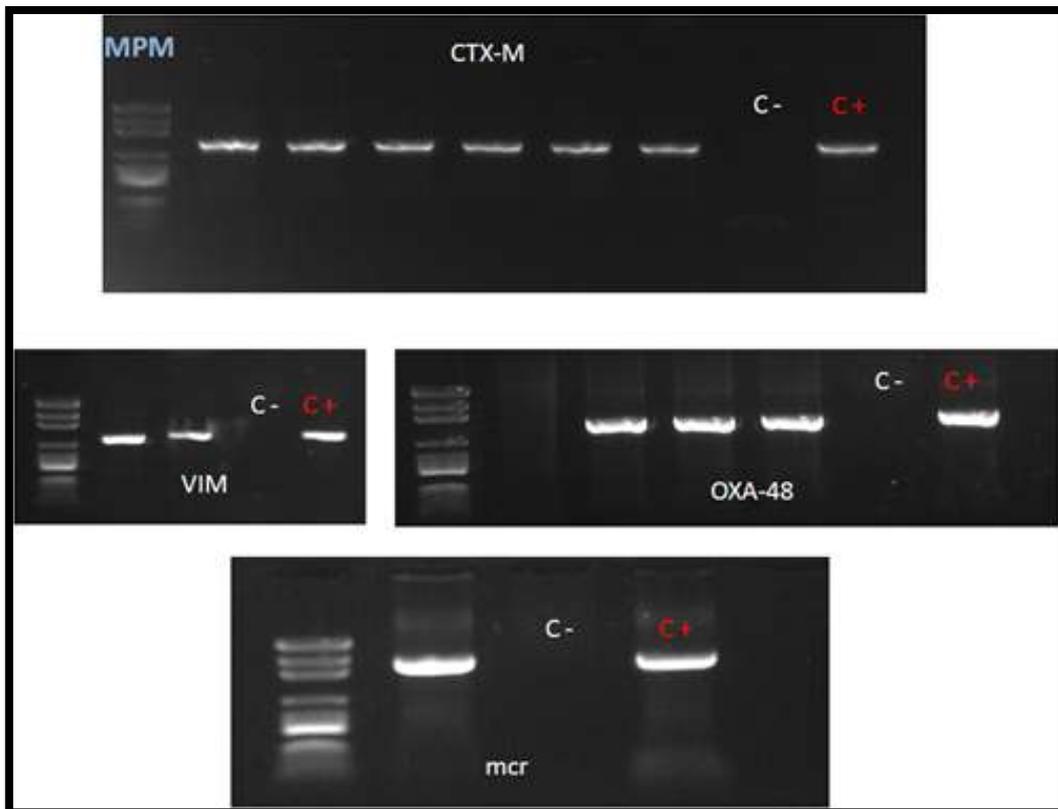
combinaison de *bla*<sub>TEM</sub> avec le gène codant pour la  $\beta$ -lactamase *bla*<sub>SHV-168</sub> (2,99%; n = 2). En revanche, une seule souche de *K. pneumoniae* qui était positive pour le gène *bla*<sub>SHV-11</sub> (1,49%; n = 1) à côté d'un autre isolat de *K. pneumoniae* qui a été positif pour l'association de *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>CTX-M-14</sub> et *bla*<sub>SHV-11</sub> (1,49%; n = 1). Les gènes codant pour des carbapénémases ont été détectés chez cinq isolats (7,46%; n = 5), trois d'entre eux hébergeaient le gène *bla*<sub>OXA-48</sub> (deux *Citrobacter braakii* et un *E. coli*), une seule souche de *Shewanella putrefaciens* qui était positive pour *bla*<sub>VIM-4</sub> tandis que l'autre isolat de *Shewanella putrefaciens* co-hébergeait les gènes *bla*<sub>OXA-48</sub> et *bla*<sub>VIM-4</sub>. Cependant, aucun des gènes de carbapénémase n'a été détecté dans les isolats de *S. maltophilia*, *P. rhodesiae* et *P. aeruginosa*, confirmant les résultats du carba NP test modifié. Sur 400 échantillons de légumes, le gène *mcr-1* a été détecté dans deux différents échantillons de coriandre chez deux souches d'*E. coli* (2,99%; n = 2) (**figures 42, 43, 44**). Cependant, aucun autre gène *mcr* n'a été identifié dans cette étude. Les résultats de la détection des gènes de résistance par PCR en temps réel et standard sont présentés dans le **tableau 10**.



**Figure 42.** Résultats de la recherche des gènes codant pour des carbapénémases et *mcr* par PCR en temps réel.



**Figure 43.** Résultats de la recherche des gènes BLSE par PCR en temps réel.



**Figure 44.** Images des gels de migration des produits de PCR standard ciblant les gènes codant pour des carbapénémases et *mcr-1*.

**Tableau 10.** Les différents gènes codant pour des  $\beta$ -lactamases et *mcr* détectés dans cette étude à partir des échantillons de légumes.

Type de légume	Espèce (souche)	Gènes de résistance	Type de légume	Espèce	Gènes de résistance
Coriandre	<i>C. freundii</i> (L5)	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	Navet	<i>K. pneumoniae</i> (L75)	<i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>
	<i>C. freundii</i> (L6)	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	Persil	<i>E. coli</i> (L45)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub>
	<i>C. freundii</i> (L7)	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>		<i>E. coli</i> (L63)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub>
	<i>C. freundii</i> (L36)	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>		<i>C. freundii</i> (L43)	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
	<i>C. freundii</i> (L64)	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>		<i>K. pneumoniae</i> (L31)	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-168</sub>
	<i>C. freundii</i> (L68)	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>		<i>K. pneumoniae</i> (L70)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-168</sub>
	<i>E. coli</i> (L65)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub>		<i>K. pneumoniae</i> (L69)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-168</sub>
	<i>E. coli</i> (L37)	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>		<i>C. braakii</i> (L16)	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>
	<i>S. putrefaciens</i> (L21)	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>		<i>C. braakii</i> (L17)	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>

**Suite du tableau 10.** Les différents gènes codant pour des  $\beta$ -lactamases et *mcr* détectés dans cette étude à partir des échantillons de légumes.

Type de légume	Espèce (souche)	Gènes de résistance	Type de légume	Espèce	Gènes de résistance
Coriandre	<i>E. coli</i> (L22)	<i>mcr-1</i>	Carotte	<i>K. pneumoniae</i> (L57)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>
	<i>E. coli</i> (L38)	<i>mcr-1</i>		<i>K. pneumoniae</i> (L29)	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-168</sub>
	<i>S. putrefaciens</i> (L39)	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM-4</sub>		<i>K. pneumoniae</i> (L56)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>
Laitue	<i>K. pneumoniae</i> (L67)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>		<i>C. braakii</i> (L12)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub>
				<i>C. braakii</i> (L13)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub>
				<i>C. braakii</i> (L4)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>

La détection des déterminants génétiques des BLSE et d'autres gènes de résistance dans les échantillons de légumes a été décrite principalement chez les bactéries opportunistes et saprophytes qui sont censées représenter un réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques (Zurfluh *et al.* 2015a). Dans notre étude, différentes associations de mécanismes de  $\beta$ -lactamases ont été détectées, y compris celle qui n'a jamais été rapportée en Algérie (*bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>CTX-M-14</sub> et *bla*<sub>SHV-11</sub>).

La BLSE type CTX-M-15 connue comme le type de BLSE le plus détecté chez les bactéries à Gram négatif dans le monde entier, provenant de différentes sources, y compris des échantillons d'humains, des animaux et d'environnement, a été détectée chez onze souches dans notre étude (Lahlaoui *et al.* 2014; Peirano & Pitout 2019). L'isolement des

entérobactéries résistantes aux céphalosporines à spectre étendu pourrait être lié aux eaux de surface contaminées par la matière fécale utilisées en irrigation et probablement à la fertilisation du sol avec des excréments d'animaux (Van Hoek *et al.* 2015).

Relativement peu de publications qui ont rapporté la présence de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu chez les BGN provenant de légumes. Dans ce contexte, différents variants de BLSE ont été signalés dans des échantillons de légumes, y compris les enzymes SHV, TEM, FONA, RAHN, CTX-M et OXA, où le plus répandu était le type CTX-M (Freitag *et al.* 2018; Iseppi *et al.* 2018; Richter *et al.* 2019; Mesbah Zekar *et al.* 2020). La détection de ce gène de résistance dans notre étude est en accord avec plusieurs études antérieures réalisées sur des prélèvements de légumes. Le gène *bla*<sub>CTX-M</sub> détecté dans notre étude a également été rapporté dans des échantillons de légumes dans différentes espèces bactériennes à travers plusieurs pays. Les gènes *bla*<sub>CTX-M-15</sub> et *bla*<sub>CTX-M-14</sub> ont été détectés dans des isolats d'*E. coli* en Suisse et en Allemagne (Zurfluh *et al.* 2015a; Freitag *et al.* 2018) dans des souches de *K. pneumoniae* en Suisse (Zurfluh *et al.* 2015a), et en Afrique du Sud chez différentes espèces d'Enterobacterales (Richter *et al.* 2019). Le gène *bla*<sub>CTX-M-15</sub> a déjà été rapporté en Algérie chez des isolats de *K. pneumoniae* à partir de différents types de légumes (Mesbah Zekar *et al.* 2020), d'*E. cloacae* et d'*E. aerogenes* en Suisse (Zurfluh *et al.* 2015a) et dans des souches d'*E. coli* isolées en Équateur (Ortega-Paredes *et al.* 2018).

Dans la littérature, un nombre très limité d'études qui ont été publiées sur l'isolement et la détection des souches productrices de BLSE à partir des échantillons de fruits au niveau mondial. Dans la présente étude nous avons rapporté la détection du gène BLSE type *bla*<sub>CTX-M-A</sub> chez quatre souches isolées des échantillons de fruits (12,90%), parmi lesquelles deux souches hébergeaient aussi le gène *bla*<sub>SHV</sub> et une souche était positive pour le gène *bla*<sub>TEM</sub>. Le gène *bla*<sub>CTX-M-A</sub> a été détecté chez *K. pneumoniae*, *C. braakii*, *E. cloacae* et *S. maltophilia*. Les résultats de la PCR en temps réel sont présentés dans le **tableau 11**. Ce résultat est similaire à celui d'une étude algérienne qui a signalé l'identification d'une souche de *K. pneumoniae* productrice de l'enzyme CTX-M-15 dans des fruits frais achetés dans la ville de Bejaia entre avril 2013 et mars 2014 (Mesbah Zekar *et al.* 2020). Les résultats obtenus par Montero *et al.*, (2021) en Équateur corroborent aussi avec nos résultats où ils ont rapporté que le gène *bla*<sub>CTX-M</sub> était le plus fréquemment associé au phénotype BLSE parmi les souches isolées (Montero *et al.* 2021). Dans la littérature, aucune étude n'a rapporté la détection des gènes codant pour des carbapénémases chez les souches isolées des échantillons de fruits, ce qui corrobore avec nos résultats où aucune des 31 souches isolées des fruits n'a été positive pour des gènes

codant pour les carbapénémases recherchées. Dans notre étude, les souches présentant une résistance acquise à la colistine ont été négatives pour tous les gènes *mcr* testés. Dans la littérature, une seule étude qui a rapporté la détection des gènes *mcr* dans des échantillons de fruits. Nos résultats sont différents de ceux rapportés en Chine où les auteurs ont mis en évidence le gène *mcr-1* chez des isolats d'*E. coli* et de *K. pneumoniae* provenant d'échantillons de pommes et d'oranges (Yang *et al.* 2019).

**Tableau 11.** Les différents gènes codant pour des  $\beta$ -lactamases détectés dans cette étude à partir des échantillons de fruits.

Aliment	Type de fruit	Souches	Espèce	Gènes codant pour des $\beta$ -lactamases
Fruit	Datte	F6	<i>Citrobacter braakii</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-A</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub>
	Banane	F16	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-A</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub>
	Poire	F20	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-A</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub>
	Orange	F30	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-A</sub>

Dans cette étude nous rapportons pour la première fois l'occurrence du gène *bla*<sub>VIM-4</sub> chez *Shewanella putrefaciens* et de *bla*<sub>OXA-48</sub> chez *Escherichia coli*, *Citrobacter braakii* et *Shewanella putrefaciens* dans des échantillons de légumes frais. *Shewanella putrefaciens* est considérée comme un agent important des maladies humaines. Elle peut provoquer généralement des otites et des infections des tissus mous, souvent après un traumatisme ou une exposition à des sources d'eau contaminée, une bactériémie, des infections hépatobiliaires et peut, dans de rares cas, entraîner une pneumonie, des infections gastro-intestinales et des infections nosocomiales, en particulier chez les patients immunodéprimés. Cette bactérie fait partie des microorganismes se trouvant dans les milieux aquatiques et peut également être isolée à partir d'autres sources telles que le sol, la volaille, les produits laitiers et les dispositifs médicaux (Ullah *et al.* 2018; Müller *et al.* 2022).

La présence de ces espèces bactériennes dans les milieux aquatiques et le sol comme niches écologiques confirme le rôle de l'environnement agricole comme une source de contamination et de dissémination des BGN résistantes aux antibiotiques (Alegbeleye *et al.*

**2018; Manyi-Loh et al. 2018; Sun et al. 2019).** Bien que l'origine des gènes *bla*<sub>VIM-4</sub> et *bla*<sub>OXA-48</sub> dans les légumes reste inconnue, la contamination peut avoir lieu suite à la fertilisation du sol par du fumier. De plus, la présence de bactéries résistantes aux carbapénèmes sur les légumes frais pourrait avoir comme cause en plus des pratiques agricoles, la contamination humaine au cours des étapes de récolte et post-récolte (**Liu & Song 2019; Richter et al. 2019**). Plusieurs travaux qui ont étudié les sources potentielles de contamination des produits dans la chaîne d'approvisionnement durant les périodes post-récolte liées à l'homme, elles ont signalé que les pratiques d'hygiène personnelle médiocres ou inappropriées pendant le transport, la conservation, la transformation et la préparation par les manutentionnaires, y compris les agriculteurs, les vendeurs et les consommateurs, contribuent également à la contamination des légumes et des fruits (**Berger et al. 2010; Alemu et al. 2018**).

L'implication potentielle des eaux usées utilisées en irrigation dans la dissémination d'agents pathogènes pour l'homme résistants aux antibiotiques ne peut plus être négligée, comme le suggèrent plusieurs études récentes (**Antwi-Agyei et al. 2015; Makkaew et al. 2016**).

La première étude rapportant l'isolement d'une BGN productrice de carbapénémase à partir d'échantillons de légumes frais a été publiée en 2015 chez une souche de *Klebsiella variicola* hébergeant le gène *bla*<sub>OXA-181</sub> en Suisse (**Zurfluh et al. 2015b**). Dans notre étude nous avons détecté le gène *bla*<sub>OXA-48</sub> chez des souches d'*Escherichia coli*, *Citrobacter braakii* et *Shewanella putrefaciens* isolées des légumes, ceci est en accord avec deux études au niveau mondial qui ont rapporté la détection de ce gène de résistance dans des échantillons de légumes mais chez des espèces différentes. Touati *et al.*, (2017) ont identifié trois isolats de *K. pneumoniae* positifs pour le gène *bla*<sub>OXA-48</sub> dans des échantillons de la laitue, tomate et persil dans la ville de Béjaïa, Algérie. Colosi *et al.*, (2020) ont rapporté la mise en évidence des gènes *bla*<sub>OXA-48</sub> et *bla*<sub>KPC</sub> dans du persil en Roumanie (**Touati et al. 2017; Colosi et al. 2020**). Par contre, d'autres types de carbapénémases ont été aussi décrites chez des souches isolées à partir des légumes ; OXA-72 a été signalé au Liban chez *Acinetobacter calcoaceticus* en plus de *K. pneumoniae*, *E. coli* et *Citrobacter freundii* productrices de KPC-2, NDM-1, NDM-5 et NDM-9 isolées à partir des échantillons de légumes frais en Chine (**Liu et al. 2018; Wang et al. 2018; Liu & Song 2019**).

Notre étude a également documenté la présence de quatorze souches présentant une résistance acquise à la colistine, dont deux étaient positives pour le gène *mcr-1*. Les deux souches d'*E. coli* porteuses du gène *mcr-1* ont été isolées à partir de deux échantillons différents de coriandre. À l'heure actuelle, différentes études ont révélé que la prévalence de *mcr-1* chez les BGN provenant des légumes était inférieure à celle d'origine animale (Barlaam *et al.* 2019; Kumar *et al.* 2020; Oh *et al.* 2020). La détection d'espèces commensales d'Enterobacterales telles que *E. coli* connues pour leurs niveaux élevés récents de résistance aux antibiotiques et leur implication dans plusieurs épidémies de maladies d'origine alimentaire suite à l'ingestion des légumes frais contaminés représente un sérieux problème de santé publique (Liu *et al.* 2018).

Les résultats de la résistance acquise à la colistine trouvés dans cette étude sont similaires à ceux de certaines études rapportant la détection du gène *mcr-1* chez *E. coli* dans des échantillons de légume à savoir ; la laitue au Portugal et en Corée du Sud, ainsi que dans deux échantillons de légumes importés (de Thaïlande et du Vietnam) en Suisse (Zurfeh *et al.* 2016; Manageiro *et al.* 2020; Oh *et al.* 2020).

En revanche, le même gène a été détecté chez *E. cloacae* et *Raoultella ornithinolytica* en Chine, où les auteurs ont suggéré que l'acquisition de ce gène pourrait avoir comme source les eaux usées ou le fumier (Luo *et al.* 2017; Liu *et al.* 2019; Liu & Song 2019; Yang *et al.* 2019).

La principale voie par laquelle les bactéries résistantes aux antibiotiques pénètrent dans le sol est la fertilisation par le fumier (Pu *et al.* 2019). En Australie, Zhang *et al.*, (2019) ont exploré l'impact de l'utilisation du fumier de la volaille et des bovins sur le résistome dans la laitue et le sol, y compris la rhizosphère, endosphère racinaire, endosphère foliaire et phyllosphère. Au cours de cette dernière, les auteurs ont pu identifier deux voies de transmission potentielles des gènes de résistance aux antibiotiques dans le système sol-plante. Où ils ont rapporté que l'application du fumier de volaille augmentait la présence des gènes de résistance aux antibiotiques dans la rhizosphère, l'endophyte racinaire et la phyllosphère, tandis que l'utilisation du fumier de bovin augmente l'abondance des gènes de résistance aux antibiotiques uniquement dans l'endophyte racinaire, ce qui suggère que le fumier de volaille peut avoir un impact plus fort sur les résistomes de la laitue. En outre, les auteurs ont également identifié un chevauchement des profils des gènes de résistance aux antibiotiques trouvés entre les tissus de la laitue et le sol, ce qui indique que les résistomes végétaux et

environnementaux sont interconnectés, et a confirmé la transmission de gènes de résistance aux antibiotiques du sol aux légumes (Zhang *et al.* 2019). Une autre étude réalisée en Chine a décrit l'impact de l'utilisation à long terme du fumier inorganique (chimiques) et organique sur la prévalence des gènes de résistance aux antibiotiques dans les sols sous serre. Les auteurs ont montré que l'utilisation du fumier inorganique et organique augmentait l'abondance et la diversité des gènes de résistance aux antibiotiques du sol, avec une différence dans les types des gènes dominants où l'abondance des gènes de résistance et la diversité étaient plus élevées suite à l'utilisation des engrais organiques (Sun *et al.* 2019).

Dans la présente étude, les résultats de la PCR des isolats provenant des échantillons des poissons ont révélé une prédominance du gène *bla*<sub>CTX-M</sub> du groupe A avec un pourcentage de 19,23% (10/52) (cinq souches d'*E. coli*, quatre souches de *K. pneumoniae* et une *K. oxytoca*) suivi du gène *bla*<sub>SHV</sub> (9,62 %; n = 5). Le gène *bla*<sub>TEM</sub> a été trouvé dans une souche d'*E. coli* et une d'*Aeromonas hydrophila* (3,85 %; n = 2). Sur les 52 souches isolées à partir des échantillons de poissons, uniquement une seule souche d'*E. coli* qui a été positive pour la carbapénémase type OXA-48. Ceci est en contradiction avec les résultats phénotypiques du carba NP test modifié. Le gène *mcr-1* a été détecté chez trois souches d'*E. coli*. Tandis qu'aucun autre variant du gène *mcr* n'a été identifié dans notre étude (tableau 12).

**Tableau 12.** Les différents gènes codant pour des β-lactamases et *mcr* détectés dans cette étude à partir des échantillons de poissons.

Aliment	Type d'aliment	Souche	Espèce	Gènes de β-lactamases	Le gène <i>mcr</i>
Poissons	<i>Sardinella aurita</i>	P47	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	<i>mcr-1</i>
		P19		<i>bla</i> <sub>CTX-M-A</sub>	-
		P46		<i>bla</i> <sub>CTX-M-A</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>mcr-1</i>
		P52	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-A</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub>	-
		P7		<i>bla</i> <sub>CTX-M-A</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub>	-

**Suite du tableau 12.** Les différents gènes codant pour des  $\beta$ -lactamases et *mcr* détectés dans cette étude à partir des échantillons de poissons.

Aliment	Type d'aliment	Souches	Espèces	Gène de $\beta$ -lactamases	Le gène <i>mcr</i>
Poissons	<i>Sardina pilchardus</i>	P15	<i>E. coli</i>	-	<i>mcr-1</i>
		P2		<i>bla</i> <sub>CTX-M-A</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub>	-
		P1		<i>bla</i> <sub>CTX-M-A</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub>	-
		P16		<i>bla</i> <sub>CTX-M-A</sub>	-
		P9	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-A</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub>	-
		P10		<i>bla</i> <sub>CTX-M-A</sub>	-
		P3	<i>K. oxytoca</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-A</sub>	-
		P39	<i>A. hydrophila</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	-

Les résultats de la caractérisation moléculaire coroborent avec ceux des études antérieures qui ont trouvé une prédominance du gène *bla*<sub>CTX-M</sub> parmi les entérobactéries résistantes aux  $\beta$ -lactamines isolées chez les poissons (**Sapugahawatte et al. 2020; Sola et al. 2022; Young et al. 2022**). En Algérie, Brahmia et al., (2017) ont aussi signalé la prédominance du gène *bla*<sub>CTX-M</sub> avec une prévalence de 60,5% chez des souches d'entérobactéries isolées à partir des poissons sauvages (**Brahmi et al. 2018**). Toutes les souches avec phénotype BLSE isolées par Dib et al., (2018) à Constantine, Algérie étaient positives pour le gène *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (**Dib et al. 2018**). Le gène *bla*<sub>CTX-M</sub> a été aussi détecté en Tunisie en 2016 chez des souches d'entérobactéries isolées à partir de 126 échantillons de poissons appartenant à 9 espèces sauvages différentes (**Hassen et al. 2020**). Les gènes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> et *bla*<sub>TEM</sub> ont été détectés respectivement dans 62,37%, 23,35% et 2,6% des isolats

d'*E. coli* obtenus de différents échantillons de poissons et de crevettes collectés auprès des détaillants de différents marchés au Nord-Ouest de Mumbai, en Inde (**Singh et al. 2020**).

Dans notre étude, nous avons rapporté pour la première fois la détection d'*E. coli* productrice d'OXA-48 à partir des prélèvements de poissons. Les résultats obtenus dans la présente étude sont différents de ceux trouvés au Canada par Morrison et Rubin (2014) où ils ont signalé la détection du gène *bla*<sub>OXA-48</sub> mais chez d'autres espèces bactérienne à savoir *Stenotrophomonas maltophilia*, *Myroides odoratimimus*, *Stenotrophomonas* spp. et *Pseudomonas putida* (**Morrison & Rubin 2015**). Nos résultats sont aussi différents de ceux de plusieurs études réalisées sur des échantillons de poissons au niveau mondial. En Italie et au Taïwan, les auteurs ont isolé *Shewanella algae* productrice d'OXA-55-like (**Huang et al. 2018; Zago et al. 2020**). En Tunisie, à partir de trois catégories de bivalves y compris ; les moules dépurées (*Mytilus galloprovincialis*), les huîtres (*Crassostrea gigas*) et les pétoncles (*Placopecten magellanicus*), deux souches d'*A. baumannii* porteuses du gène *bla*<sub>OXA-23</sub> ont été isolées (**Mani et al. 2018**).

Dans notre étude aucune souche n'a été positive pour les gènes codant pour les métallob- $\beta$ -lactamases testés, tandis que différents variants de ce type des gènes ont été rapportés chez des BGN obtenues de différents types de fruits de mer autour du monde. En 2016 et en Chine, une seule souche de *Vibrio alginolyticus* positive pour le gène *bla*<sub>NDM-1</sub> a été isolée d'un échantillon de crevettes (**Zheng et al. 2018**). Ce gène a été aussi détecté en France chez une souche de *Vibrio parahaemolyticus* isolée d'un échantillon de crevettes (**Briet et al. 2018**). En plus du variant *bla*<sub>NDM-1</sub>, le variant *bla*<sub>NDM-5</sub> a été détecté chez une souche d'*E. coli* isolée d'un prélèvement de poissons (*Otolithes cuvieri*) en Inde en 2016 (**Singh et al. 2016**). Dans le même pays, six souches d'Enterobacterales hébergeant le gène *bla*<sub>NDM</sub> ont été obtenues dont quatre souches de *Klebsiella pneumoniae* positives pour le variant *bla*<sub>NDM-5</sub> et deux souches d'*Escherichia coli* positives pour les variants *bla*<sub>NDM-1</sub> et *bla*<sub>NDM-2</sub>, respectivement (**Das et al. 2019**). Le gène codant pour la métallob- $\beta$ -lactamase type VIM-1 a été détecté en Allemagne chez une souche d'*E. coli* isolée d'une palourde de Vénus (*Ruditapes philippinarum*) (**Roschanski et al. 2017**). À Taiwan, parmi les 96 souches isolées à partir d'un total de 235 échantillons de poissons achetés auprès des marchés traditionnels, des supermarchés, des magasins de sushis et de fruits de mer de la ville de Tainan, 55,21% (53 souches) ont été positives pour une métallob- $\beta$ -lactamase codé par le gène *bla*<sub>CphA</sub>. Ce dernier a été détecté chez toutes les souches isolées des poissons et identifiées comme: *Aeromonas dhakensis*, *Aeromonas hydrophila*, et *Aeromonas veronii* (**Wu et al. 2019**).

Dans notre étude aucune des carbapénémases de la classe A testées n'a été trouvée. Tandis que cette classe a été mise en évidence par certaines études réalisées sur des échantillons de fruits de mer. En 2017, Brouwer *et al.*, (2019) ont signalé l'isolement d'une souche d'*E. cloacae* à partir d'un échantillon de crevette blanche congelée (*Litopenaeus vannamei*) importé de l'Inde. La souche obtenue hébergeait deux gènes codant pour une carbapénémase de la classe A d'Ambler ; le *bla*<sub>IMI-2</sub> et un nouveau gène *bla*<sub>FLC-1</sub> (Brouwer *et al.* 2019). Dans une étude Canadienne, 3% des échantillons de mollusques et 0,2% de crevettes importés du Vietnam contenaient des souches d'*Enterobacter cloacae* productrices de  $\beta$ -lactamase type IMI-1 et 0,1% de ceux importés du Bangladesh contenaient des *E. aerogenes* positifs pour le gène *bla*<sub>IMI-2</sub> (Janecko *et al.* 2016).

En Algérie, uniquement un seul travail publié qui a rapporté la détection des souches productrices de carbapénémases à partir de prélèvements de poissons où il s'agit de deux souches d'*A. baumannii* productrices d'OXA-23 (Brahmi *et al.* 2016). En parallèle, plusieurs études en Algérie qui ont mis en évidence la présence de bactéries résistantes et des gènes de résistance dans différentes sources à savoir les milieux aquatiques comme l'eau de mer, les eaux usées, l'eau du robinet et l'eau de puits où les gènes codant pour des carbapénémases les plus abondants étaient : *bla*<sub>OXA-48</sub> et *bla*<sub>NDM-1</sub> (Drali *et al.* 2018; Cherak *et al.* 2022). Les résultats de ces études renforcent donc l'hypothèse de la contamination des échantillons de poissons par l'eau polluée.

Dans cette étude nous avons pu détecter pour la première fois en Algérie le gène *mcr-1* chez trois souches d'*E. coli* isolées à partir des échantillons de poissons. Ce gène a été déjà décrit chez des isolats de la même espèce bactérienne obtenus à partir des prélèvements de poissons d'eau douce en Chine et au Vietnam (Lv *et al.* 2018; Hoa *et al.* 2022). L'émergence dans les milieux aquatiques et leurs produits, particulièrement les poissons de ce mécanisme porté sur un élément mobile (haut risque de dissémination) et conférant la résistance à un antibiotique (colistine) de dernier recours pose un sérieux problème de préoccupation mondiale.

## 5. Typage par séquençage

L'étude de la clonalité par la méthode MLST des souches d'*E. coli* productrices d'OXA-48 et positives pour le gène *mcr-1* a révélé trois séquences types d'*E. coli*, comme suit : i. ST2298 de l'isolat producteur d'OXA-48, ST216 et le clone épidémique ST101 des deux souches positives pour le gène *mcr-1*. La phylogénie montrant la clustérisation des

séquences types des isolats d'*E. coli* producteurs de carbapénémase ou MCR-1 trouvés dans cette étude et ceux rapportés par d'autres études dans le monde entier dans des échantillons de légumes est présentée dans la **figure 45**.

Les séquences types trouvées dans cette étude ont été déjà décrites par plusieurs études dans l'environnement, particulièrement dans des échantillons des eaux usées. En Algérie, des souches d'*E. coli* résistantes à la ciprofloxacine appartenant au clone international à haut risque ST101 ont été isolées à partir des eaux usées d'un hôpital (**Anssour et al. 2016**). Le même clone a été signalé chez des souches productrices de CTX-M-1 provenant des eaux usées prélevées d'une station d'épuration en Tunisie (**Toleman et al. 2015**). D'autres isolats du même ST producteurs de la métallo- $\beta$ -lactamase NDM-1 ont été obtenus des eaux usées municipales en Arabie Saoudite (**Mantilla-Calderon et al. 2016**). Au Bangladesh des souches d'*E. coli* appartenant au clone ST101 et productrices de NDM-1 et NDM-3 ont été trouvées dans des eaux de surface (**Toleman et al. 2015**).

Le deuxième clone détecté, ST216, a également été signalé dans les eaux usées hospitalières au Royaume-Uni comme porteur du gène de résistance *bla<sub>KPC</sub>* (**Decraene et al. 2018**). Toutes ces études ont montré que la majeure source de ces deux clones ST101 et ST216 est les eaux usées, renforçant ainsi notre hypothèse concernant l'origine des isolats d'*E. coli* producteurs de MCR-1 obtenus dans notre étude. En outre, plusieurs études ont signalé des épidémies humaines d'origine alimentaire liées à la consommation de légumes frais irrigués illicitement par des eaux usées et ils ont confirmé que le type des pratiques d'irrigation joue un rôle vital dans la contamination des produits agricoles (**Adegoke et al. 2018**).



**Figure 45.** Arbre phylogénétique basé sur la séquence génétique concaténée des MLST de nos isolats d’*E. coli* producteurs de carbapénémase ou hébergeait le gène *mcr* avec ceux positifs pour ces gènes présents dans le monde entier et isolés à partir de légumes.

## 6. Étude de l’activité antibactérienne des huiles essentielles

Les résultats du test d’activité antibactérienne et de détermination des concentrations minimales inhibitrices des trois huiles essentielles (*Brocchia cinerea*, *Origanum vulgare*, *Artemisia campestris*) par la méthode de micro-dilution en milieu liquide ont montré que toutes les huiles essentielles testées présentaient une activité antibactérienne contre une variété des souches résistantes aux  $\beta$ -lactamines et/ ou à la colistine présentant avec différents mécanismes de résistance.

Les résultats de la technique de micro-dilution en milieu liquide ont montré que l’huile essentielle de la plante *Brocchia cinerea* était la plus active avec des concentrations inférieures à celles des deux autres huiles testées. Les résultats obtenus montrent aussi que *Myroides odoratimimus* était très sensible à l’action de l’huile essentielle de *B. cinerea* une CMI de 1,333  $\mu\text{g/mL}$  (tableau 13, figure 46).

**Tableau 13.** CMI et CMB des souches testées *vis-à-vis* de l'huile essentielle de *Brocchia cinerea*.

Souche	Identification	Mécanisme de résistance	<i>Brocchia cinerea</i>	
			CMI (µg/ml)	CMB (µg/ml)
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	Sensible	21,34	42,68
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 1117	Sensible	21,34	42,68
<b>L22</b>	<i>E. coli</i>	Mcr-1	21,34	42,68
<b>L16</b>	<i>C. brakii</i>	OXA-48	21,34	21,34
<b>L37</b>	<i>E. coli</i>	OXA-48	42,68	42,68
<b>L39</b>	<i>Shewanella putrefaciens</i>	VIM	5,335	5,335
<b>L56</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CTX-M-15	42,68	85,36
<b>P11</b>	<i>Shewanella algae</i>	Résistante aux carbapénèmes	2,667	2,667
<b>L5</b>	<i>C. freundii</i>	TEM	42,68	45,68
<b>L53</b>	<i>E. cloacae</i>	Résistante aux C3G	42,68	42,68
<b>L23</b>	<i>P. aeruginosa</i>	Mutation oprD	21,34	21,34
<b>P18</b>	<i>Myroides odoratimimus</i>	Résistante aux carbapénèmes	1,333	1.333
<b>P5</b>	<i>Aeromonas caviae</i>	Résistante aux carbapénèmes	2,667	2,667
<b>P14</b>	<i>Morganella morganii</i>	Résistante aux C3G	5,335	10,67
<b>P22</b>	<i>Sphingomonas paucimobili</i>	Résistante aux C3G	2,667	5,335

**Suite du tableau 13.** CMI et CMB des souches testées *vis-à-vis* de l'huile essentielle *Brocchia cinerea*.

Souche	Identification	Mécanisme de résistance	<i>Brocchia cinerea</i>	
			CMI (µg/ml)	CMB (µg/ml)
<b>F18</b>	<i>Pantoea dispersa</i>	Résistante à la colistine	5,335	5,335
<b>F24</b>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Résistante à la colistine	10,67	10,67
<b>F3</b>	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	Résistante aux C3G	10,67	10,67

*Brocchia cinerea* appartient à la famille des Asteraceae et présente une activité antibactérienne assurée par ses principaux composants. Dans notre étude les constituants majoritaires de cette huile (*Brocchia cinerea*) sont Beta-Thuyone, 1-Méthyl-2-(1'-méthylethenyl) -3'- ethenylcyclopropylmethanol, 1,8-Cineole, limonen-10-ol, et d'autres composés à des teneurs relativement faibles : 1(7), 3, 8-o-Menthatriene, et (-) -Camphor (**Ben-Moussa et al. 2020**). Selon les résultats d'études ultérieures, nous avons suggéré que l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *B. cinerea* est fortement liée à la présence de Beta-Thuyone, de 1,8-cinéole et de limonen. En effet, Dorman *et al.*, (2000) ont testé un grand nombre de constituants purs de différentes huiles essentielles contre 25 espèces bactérienne et ont montré que le Thuyone et limonen sont des composés avec un large spectre d'activité antibactérienne (**Dorman & Deans 2000; Lima et al. 2021**). Thuyone est un composant naturel des huiles essentielles de nombreuses plantes. C'est une cétone monoterpénique biologiquement active.  $\alpha$ -Thuyone et  $\beta$ -Thuyone sont des constituants majeurs et des composants biologiquement actifs des huiles essentielles dérivées d'une variété de plantes d'Asteraceae, de Cupressaceae, et de Lamiaceae. Les plantes contenant la thuyone ont longtemps été utilisées en médecine traditionnelle pour traiter diverses affections, telles que le catarrhe bronchique, l'énurésie, la cystite, le psoriasis, les carcinomes utérins, l'aménorrhée et rhumatismes (**Wróblewska-Kurdyk et al. 2019**). Selon de nombreuses études antérieures, les espèces végétales avec un chémotype thuyone sont reconnues comme étant des antibactériens très puissants (**Hamdouch et al. 2022**).

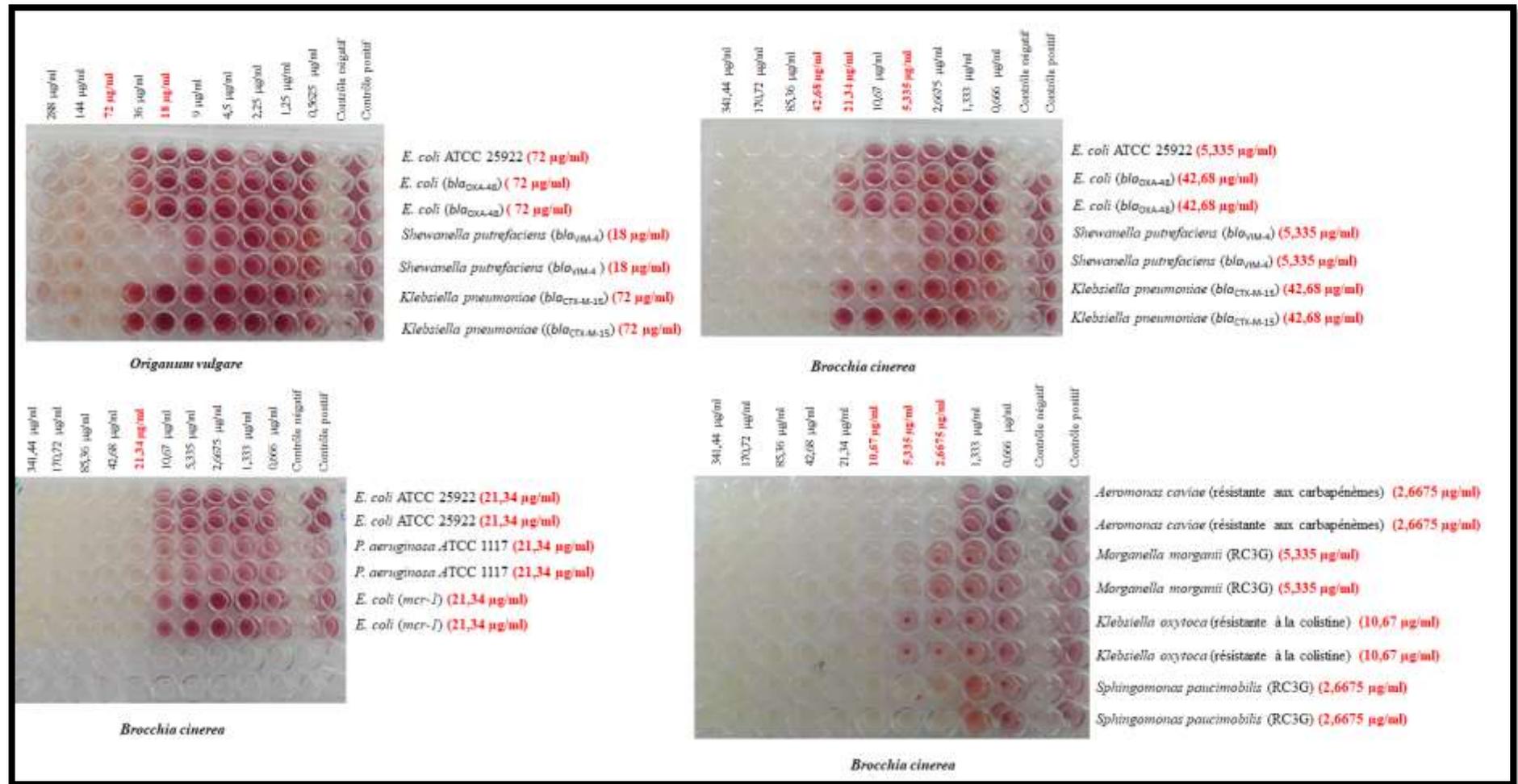


Figure 46. Les CMI de l'huile essentielle de la plante *Brocchia cinerea* vis-à-vis certaines souches isolées.

Dans ce contexte, nos résultats sont différents de ceux rapportés au Maroc où les auteurs ont signalé que l'huile essentielle de la partie aérienne fraîche de la plante *Brocchia cinerea* présente une activité inhibitrice bactéricide élevée contre *K. pneumoniae*, et *E. coli* à l'exception de *P. aeruginosa*, qui était résistante aux concentrations élevées utilisées. Dans notre étude nous avons remarqué une concentration minimale inhibitrice égale à 21,34 µg/mL contre *E. coli* portant le gène *mcr-1* et 42,68 µg/mL contre *K. pneumoniae* productrice d'une BLSE type CTX-M-15 et *E. coli* positive pour le gène *bla<sub>OXA-48</sub>*. Ces valeurs de CMI sont inférieures à celles signalées dans l'étude marocaine (1,56 mg/mL pour *K. pneumoniae*, et 3,12 mg/mL pour *E. coli*). Les auteurs de cette dernière ont suggéré que l'activité antibactérienne observée peut être liée à la richesse de cette huile essentielle en thuyone, Santalina Triene, 2-Bornanone et 1,8-Cineol, ainsi qu'à l'interaction entre ces différents composants (effet synergique) (**Chlif et al. 2021**).

Nos résultats sont aussi différents de ceux observés par Cheriti *et al.*, (2020) qui ont montré que l'huile essentielle de *Brocchia cinerea* a une meilleure activité antibactérienne où *E. coli* semble être la plus sensible à l'huile testée suivie de *K. pneumoniae* mais sans aucun effet antibactérien contre *P. aeruginosa*. Les auteurs ont associé cette activité antibactérienne à la richesse de l'huile en monoterpènes oxygénés tels que la trans-Thuyone (36,11%), le camphre (12,08%) connus pour leur activité antimicrobienne à large spectre (**Cheriti & Boukhobza 2020**).

Dans notre étude, *P. aeruginosa* était sensible à l'action de l'huile essentielle de *Brocchia cinerea* avec une concentration minimale inhibitrice égale à 21,34 µg/mL. Cette valeur obtenue dans notre étude est supérieure à celle rapportée par Hamdouch *et al.*, (2022). Ces derniers ont signalé que *Pseudomonas aeruginosa* est l'espèce la plus sensible à l'huile essentielle de *Brocchia cinerea* avec une CMI égale à 0,6 µL/mL et ils ont liés cette activité antibactérienne aux principaux composants de l'huile à savoir : thuyone, le camphre et l'eucalyptol (**Hamdouch et al. 2022**).

Les résultats obtenus avec l'huile essentielle de *B. cinerea* s'accordent avec ceux d'une étude marocaine où ils ont mis en évidence une activité inhibitrice significative contre toutes les souches microbiennes testées appartenant aux deux espèces *E. coli* et *P. aeruginosa*. Cette dernière espèce était sensible à l'action de l'huile essentielle avec une CMI très basse de 0,0018 mg/mL, en comparaison avec la CMI de 0,0037 mg/mL contre *E. coli*. Ces valeurs de CMI sont inférieures à celles trouvées dans notre étude. Dans la même étude, les auteurs ont identifié vingt et un constituants représentant environ 99,97 % de l'huile testée, dont les

principaux composants étaient : la thuyone (24,9 %), l'acétate de l'yratyle (24,32 %), camphre (13,55 %) et 1,8-cinéole (10,81 %) (Agour *et al.* 2022).

Pour la plante d'*Artemisia campestris*, les résultats obtenus ont montré que l'huile essentielle de cette plante était active contre toutes les souches résistantes testées avec des concentrations minimales inhibitrices supérieures à celles rapportées pour *Brocchia cinerea*, comme suit : 21,34 µg/mL contre *Shewanella putrefaciens* et 170,72 µg/mL contre *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. freundii* et *E. cloacae* (tableau 14, figure 47).

**Tableau 14.** CMI et CMB des souches testées *vis-à-vis* de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris*.

Souche	Identification	Mécanisme de résistance	<i>Artemisia campestris</i>	
			CMI (µg/ml)	CMB (µg/ml)
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	Sensible	170,72	341,44
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 1117	Sensible	85,36	170,72
<b>L22</b>	<i>E. coli</i>	Mcr-1	170,72	341,44
<b>L16</b>	<i>C. brakii</i>	OXA-48	85,36	170,72
<b>L37</b>	<i>E. coli</i>	OXA-48	170,72	170,72
<b>L39</b>	<i>S. putrefaciens</i>	VIM	21,34	42,68
<b>L56</b>	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-15	170,72	170,72
<b>L5</b>	<i>C. freundii</i>	TEM	170,72	170,72
<b>L53</b>	<i>E. cloacae</i>	Résistante aux C3G	170,72	170,72

Dans une étude Tunisienne les auteurs ont révélé que *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter amnigenus* étaient résistantes à l'action de l'huile essentielle de la plante *Artemisia campestris*, par contre elle était plus efficace contre *E. coli*. En effet, elle présentait une faible activité contre *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* et *Citrobacter freundii* où les auteurs ont lié cette activité à ces deux majeurs composants : β-pinène (45,8%) et α-

pinène (12,5%). Les résultats obtenus par Akrouit *et al.*, (2009) sont différents de ceux rapportés dans notre étude où nous avons trouvé une activité contre *E. coli* (CMI = 170,72 µg/ml), *P. aeruginosa* (CMI= 85,36 µg/ml), *K. pneumoniae* (CMI= 170,72 µg/ml) et *E. cloacae* (CMI = 170,72 µg/ml) (Akrouit *et al.* 2009). Nos résultats sont aussi différents de ceux obtenus par Al Jahid *et al.*, (2017), ces derniers ont révélé que l'huile essentielle extraite à partir des graines de la plante *A. campestris* L. avait une faible activité inhibitrice contre *P. aeruginosa* et n'avait aucune activité contre *E. coli* (Al Jahid *et al.* 2017).

Dans notre étude nous avons observé une activité inhibitrice contre *P. aeruginosa*, et *E. coli* avec une concentration minimale inhibitrice égale à 85,36 µg/mL et à 170,72 µg/mL respectivement. Ces résultats sont inférieurs à ceux signalés par Al Jahid *et al.*, (2016) qui ont montré un effet inhibiteur contre *P. aeruginosa* avec une concentration minimale inhibitrice de 100 µg/mL et supérieure à celle signalée contre *E. coli* (100 µg/mL) et ils ont associé cette activité à ces principaux constituants ; le germacrène D (10,20 %) et le β-pinène (8,90 %). D'autres composés représentatifs ont été aussi identifiés : le α-cadinol (4,50 %), le limonène (4,43 %), le β-myrcène (4,00 %), le spathuléol (3,9 %), le α-muurolol (3,80 %), le δcadinène (3,62 %), le bicyclogermacrène (3,47 %) et le (E)-ocimène (3,25 %). Les auteurs ont signalé que le mode d'action des huiles essentielles contenant des terpènes reste encore flou, imprévisible et difficile à caractériser en raison de la variabilité des structures chimiques et des proportions, ainsi que de l'interaction possible entre les composants existants (Al Jahid *et al.* 2016).

Pour la plante *Origanum vulgare*, les résultats obtenus ont montré que l'huile essentielle de cette plante était active contre toutes les souches résistantes testées avec des concentrations minimales inhibitrices supérieures à celles montrées pour *Broccchia cinerea* mais inférieures à celles trouvées pour l'huile d'*Artemisia campestris*. Dans la présente étude nous avons trouvé que *Shewanella putrefaciens* était très sensible à l'action de cette huile avec une concentration minimale inhibitrice de 18 µg/mL. Pour *E. coli* productrice de la carbapénémase de la classe D type OXA-48, *K. pneumoniae* positive pour le gène *bla<sub>CTX-M-15</sub>*, ainsi que *C. freundii* et *E. cloacae* résistantes aux C3G, une CMI égale à 72 µg/mL a été observée (tableau 15, figure 47).

**Tableau 15.** CMI et CMB des souches testées *vis-à-vis* de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*.

Souche	Identification	Mécanisme de résistance	<i>Origanum vulgare</i>	
			CMI (µg/ml)	CMB (µg/ml)
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	Sensible	72	72
<b>L37</b>	<i>E. coli</i>	OXA-48	72	72
<b>L39</b>	<i>S. putrefaciens</i>	VIM	18	18
<b>L56</b>	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-15	72	72
<b>L5</b>	<i>C. freundii</i>	TEM	72	72
<b>L53</b>	<i>E. cloacae</i>	Résistante aux C3G	72	72

Elansary *et al.*, (2018) ont mis en évidence une activité antibactérienne plus élevée pour l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* en raison de la proportion élevée de pulégone. La valeur de CMI (0.25 mg/ml) obtenu par Elansary *et al.*, est supérieure à celle trouvée dans notre étude pour *E. coli*. L'activité antibactérienne élevée des huiles essentielles riches en pulégone suggère que ce composé pourrait avoir un large spectre d'activité antibactérienne (Elansary *et al.* 2018). Dans une étude Brésilienne, Scandorieiro *et al.*, (2016) ont signalé que l'huile d'*Origanum vulgare* a inhibé la croissance de toutes les souches bactériennes testées, y compris les souches multirésistantes. Les valeurs des CMI de cette dernière étude étaient comme suit : 0.596 mg/ml pour *E. coli* productrice de BLSE et celle positive pour le gène *bla<sub>KPC</sub>* tandis que dans notre étude la CMI observée chez *E. coli* productrice d'OXA-48 était 72 µg/ml et 18 µg/ml pour *Shewanella putrefaciens* positive pour le gène *bla<sub>VIM-4</sub>* est inférieure à celles rapportées par l'étude Brésilienne (Scandorieiro *et al.* 2016). En Grèce Fournomiti *et al.*, (2015) ont montré que la bactérie la plus sensible était *K. oxytoca* avec une valeur moyenne de CMI de 0,9 mg/mL pour l'huile essentielle d'origan suivie par *K. pneumoniae* avec une CMI moyennes de 73,5 mg/mL. Tandis que, les souches d'*E. coli* étaient classées parmi les plus résistantes à l'action antimicrobienne de l'huile testée (Fournomiti *et al.* 2015).

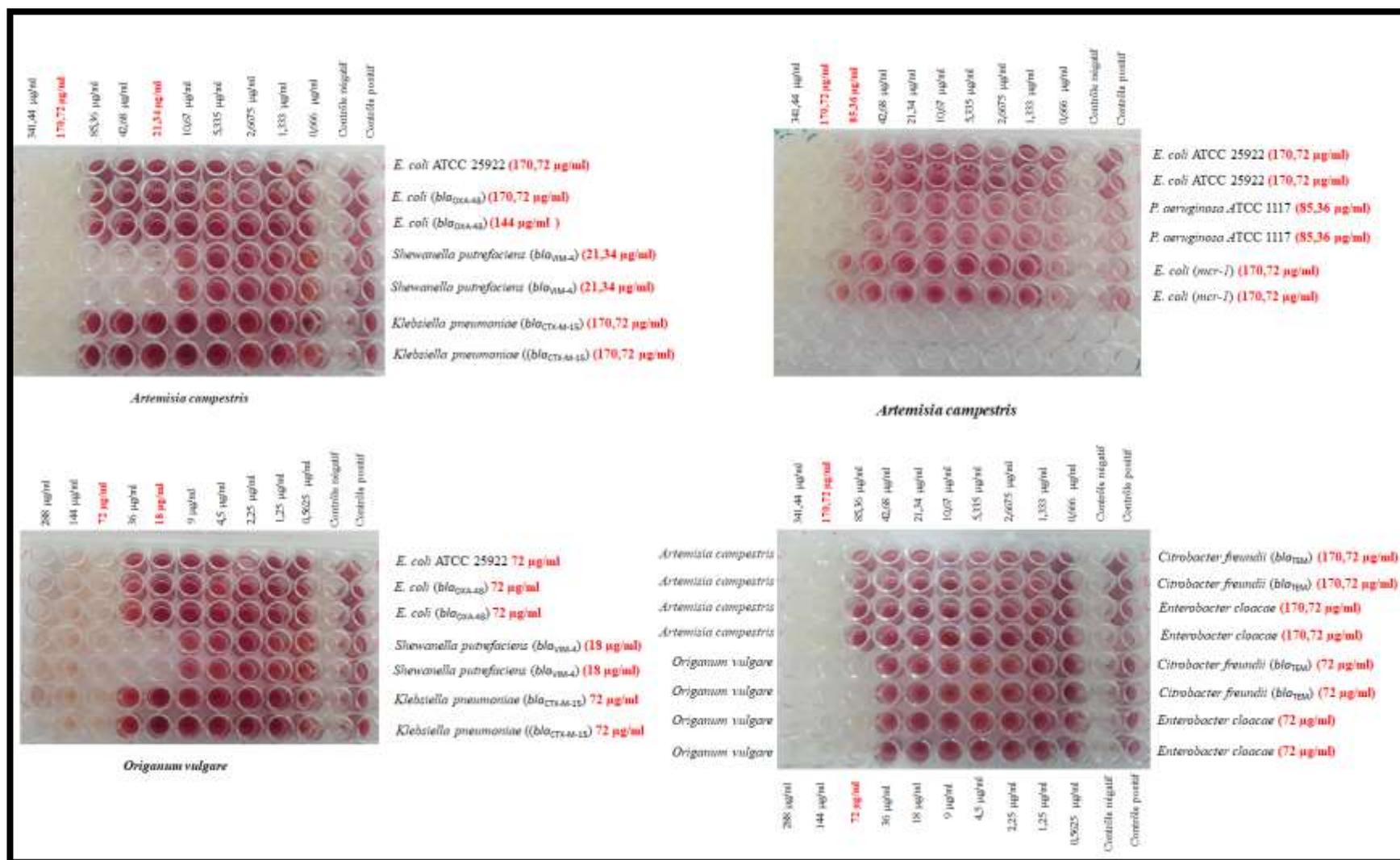


Figure 47. Les CMI de l’huiles essentielle d’*Artemisia campestris* et *Origanum vulgare* vis-à-vis certaines souches isolées.

CONCLUSION  
ET  
PERSPECTIVES

Le protocole expérimental suivi dans notre étude nous a permis d'isoler 150 bactéries à Gram négatif résistantes aux  $\beta$ -lactamines (jusqu'aux C3G et carbapénèmes) et/ ou à la colistine à partir de différents types d'aliments y compris les légumes, les fruits et les poissons avec une diversité bactérienne remarquable. La présente étude nous a permis aussi de constater que les poissons étaient le produit alimentaire le plus contaminé 43,33%, suivi par les légumes 16,75%, tandis que les fruits était le produit le moins contaminé (13,72%).

Les résultats obtenus dans notre étude ont montré que le type de légume influence la présence et le taux d'isolement des BGN résistantes, où nous avons remarqué que les échantillons de coriandre (85,50%) et de persil (75%) étaient les plus contaminés. Cette étude a révélé que l'abondance des BGN résistantes aux antibiotiques varie en fonction du site (surface /interne) de prélèvement où la surface des oranges était la seule partie contaminée par des bactéries résistantes par contre les échantillons des dattes ont présenté une contamination de la partie interne uniquement.

Dans la présente étude, nous avons aussi pu rapporter pour la première fois dans le monde la détection du gène *bla*<sub>OXA-48</sub> dans des isolats d'*E. coli* et de *C. braakii* et du gène *bla*<sub>VIM-4</sub> dans des échantillons de légumes. De plus, il s'agit aussi du premier rapport du gène *mcr-1* chez des souches isolées à partir des légumes et des poissons en Algérie. En parallèle de ces découvertes, l'association des mécanismes (OXA-48 et MCR-1) de résistance aux antibiotiques de dernier recours (carbapénèmes et colistine) portés généralement sur des éléments mobiles facilitant leur large dissémination a été mise en évidence dans cette étude.

Notre étude confirme aussi que les produits alimentaires en particulier les légumes, les fruits et les poissons sont des réservoirs des bactéries résistantes et peuvent jouer un rôle primordial dans leur transmission. Ceci représente un vrai danger pour les consommateurs et pour l'économie des pays et souligne la nécessité d'accorder une attention particulière à ces produits en tant que futur problème de santé publique.

Les résultats obtenus dans notre étude confirment aussi l'activité antibactérienne des huiles essentielles testées (*Brocchia cinerea*, *Origanum vulgare*, *Artemisia campestris*) contre les souches résistantes d'origine alimentaire d'où leur utilisation en tant que conservateur alimentaire naturel est envisageable.

Cette étude souligne la nécessité d'un programme de surveillance du phénomène de l'antibiorésistance chez les bactéries se trouvant dans les produits alimentaires pour garantir la

sécurité du consommateur ainsi que de contrôler le pouvoir de dissémination de ces agents. En outre, des mesures appropriées telles que le prétraitement des excréments d'animaux avant leur utilisation comme engrais, l'amélioration de la qualité de l'eau d'irrigation et la lutte contre les pratiques frauduleuses dans l'élevage des poissons, en particulier l'utilisation abusive d'antibiotiques, doivent être prises en considération.

Les résultats obtenus au cours de cette étude nécessitent le développement de certains aspects de recherche en perspective comme suit :

- Élargir l'étude tout en augmentant l'échantillonnage d'une part et diversifier les types de produits alimentaires pour évaluer le degré de leur contamination (abondance) et leur rôle dans la dissémination des bactéries résistantes.
- Détermination des sources de contamination en s'appuyant sur l'étude de clonalité des bactéries en question à travers le séquençage de leur génome entier.
- Caractérisation moléculaire de tous les mécanismes d'antibiorésistance détectés phénotypiquement y compris ceux inconnus ou détectés pour la première fois.
- Étude de l'organisation génétique des gènes de résistance au sein du chromosome et les plasmides.
- Caractérisation des activités biologiques des huiles essentielles ou autres métabolites naturels bioactifs testés positivement contre les bactéries en question.
- Evaluation de la cytotoxicité des produits naturels bioactifs intéressants.
- Essais et prototypage de l'éventuelle application des produits naturels bioactifs ou leurs dérivés sélectionnés comme conservateur alimentaire capable de prolonger la durée de conservation et de limiter la prolifération des bactéries résistantes aux antibiotiques tout en préservant une grande partie des qualités organoleptiques.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Abadias M, Usall J, Anguera M, Solsona C, Viñas I. 2008. Microbiological quality of fresh minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International journal of food microbiology* 123: 121-9
- Abelan US, De Oliveira AC, Cacoci ÉSP, Martins ATE, Giacon VM, *et al.* 2021. Potential use of essential oils in cosmetic and dermatological hair products: A review. *Journal of Cosmetic Dermatology* 00:1-12
- Adegoke AA, Amoah ID, Stenström TA, Verbyla ME, Mihelcic JR. 2018. Epidemiological Evidence and Health Risks Associated With Agricultural Reuse of Partially Treated and Untreated Wastewater: A Review. *Frontiers in public health* 6: 337
- Agour A, Mssillou I, Mechchate H, Es-Safi I, Allali A, *et al.* 2022. *Brocchia cinerea* (Delile) Vis. Essential Oil Antimicrobial Activity and Crop Protection against Cowpea Weevil *Callosobruchus maculatus* (Fab.). *Plants (Basel, Switzerland)* 11
- Akrout A, El Jani H, Amouri S, Neffati M. 2009. Screening of antiradical and antibacterial activities of essential oils of *Artemisia campestris* L., *Artemisia herba alba* Asso, & *Thymus capitatus* Hoff. et Link. growing wild in the Southern of Tunisia. *Recent Research in Science and Technology* 2
- Alanis AJ. 2005. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch. Med Res.* 36: 697-705
- Aldred KJ, Kerns, RJ, Osheroff N. 2014. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry* 53: 1565-1574
- Al-Kharousi ZS, Guizani N, Al-Sadi AM, Al-Bulushi IM. 2019. Antibiotic Resistance of Enterobacteriaceae Isolated from Fresh Fruits and Vegetables and Characterization of their AmpC  $\beta$ -Lactamases. *Journal of food protection* 82: 1857-63
- Al Jahid A, Elamrani A, Lahlou FA, Hmimid F, Bourhim N, *et al.* 2017. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil isolated from the seeds of Moroccan *Artemisia campestris* L. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 20: 375-84
- Aminov R. 2017. History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. *Biochem. Pharmacol* 133: 4-19
- Al Jahid A, Essabaq S, Elamrani A, Blaghen M, Jamal Eddine J. 2016. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the hydro-alcoholic extract of *Artemisia campestris* L. leaves from southeastern Morocco. *Journal of biologically active products from nature* 6: 393-405

- Alegbeleye OO, Singleton I, Sant'Ana AS. 2018. Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review. *Food microbiology* 73: 177-208
- Alemu G, Mama M, Siraj M. 2018. Bacterial contamination of vegetables sold in Arba Minch Town, Southern Ethiopia. *BMC research notes* 11: 775
- Anssour L, Messai Y, Estepa V, Torres C, Bakour R. 2016. Characteristics of ciprofloxacin-resistant Enterobacteriaceae isolates recovered from wastewater of an Algerian hospital. *Journal of infection in developing countries* 10: 728-34
- Antwi-Agyei P, Cairncross S, Peasey A, Price V, Bruce J, *et al.* 2015. A Farm to Fork Risk Assessment for the Use of Wastewater in Agriculture in Accra, Ghana. *PloS one* 10: e0142346
- Anyanwu MU, Jaja IF, Nwobi OC. 2020. Occurrence and Characteristics of Mobile Colistin Resistance (mcr) Gene-Containing Isolates from the Environment: A Review. *International journal of environmental research and public health* 17
- Aslam B, Khurshid M, Arshad MI, Muzammil S, Rasool M, *et al.* 2021. Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 11: 771510
- Baba Ahmed-Kazi, TZ, Arlet G. 2014. News of antibiotic resistance among Gram-negative bacilli in Algeria. *Pathologie Biologie (Paris)* 62: 169-178
- Bakour S, Garcia V, Loucif L, Brunel J M, Gharout-Sait A, *et al.* 2015. Rapid identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* using a modified Carba NP test. *New Microbes and New Infection* 7: 89-93
- Bakthavatchalam Y D, Pragasam AK, Biswas I, Veeraraghavan B. 2018. Polymyxin susceptibility testing, interpretative breakpoints and resistance mechanisms: An update. *Journal of Global Antimicrobiol Resistance* 12, 124-136
- Barlaam A, Parisi A, Spinelli E, Caruso M, Taranto PD, *et al.* 2019. Global Emergence of Colistin-Resistant *Escherichia coli* in Food Chains and Associated Food Safety Implications: A Review. *Journal of food protection* 82: 1440-48
- Barbosa AAT, Mantovani HC, Jain S. 2017. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their potential in the preservation of fruit products. *Critical Reviews in Biotechnology* 37: 852-864

- Bartolini A, Frasson I, Cavallaro A, Richter SN, Palù G. 2014. Comparison of phenotypic methods for the detection of carbapenem non-susceptible Enterobacteriaceae. *Gut pathogens* 6: 13
- Beharrysingh R. 2017. Myroides bacteremia: A case report and concise review. *IDCases* 8: 34-36
- Ben-Moussa MT, Khelil K, Harkat H, Lakehal S, Hadeif Y. 2020. Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Brocchia cinerea* VIS. d'Algérie. *Batna Journal Of Medical Sciences*: 122
- Bendjama E, Loucif L, Chelaghma W, Attal C, Bellakh FZ, *et al.* 2020. First detection of an OXA-48-producing *Enterobacter cloacae* isolate from currency coins in Algeria. *Journal of global antimicrobial resistance* 23: 162-66
- Berg G, Erlacher A, Smalla K, Krause R. 2014. Vegetable microbiomes: is there a connection among opportunistic infections, human health and our 'gut feeling'? *Microbial biotechnology* 7: 487-95
- Berger CN, Sodha SV, Shaw RK, Griffin PM, Pink D, *et al.* 2010. Fresh fruit and vegetable as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental microbiology* 12: 2385-97
- Bhutani N, Muraleedharan C, Talreja D, Rana SW, Walia S, *et al.* 2015. Occurrence of Multidrug Resistant Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing Bacteria on Iceberg Lettuce Retailed for Human Consumption. *BioMed research international* 2015: 547547
- Brahmi S, Touati A, Cadière A, Djahmi N, Pantel A, *et al.* 2016. First Description of Two Sequence Type 2 *Acinetobacter baumannii* Isolates Carrying OXA-23 Carbapenemase in Pagellus acarne Fished from the Mediterranean Sea near Bejaia, Algeria. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 60: 2513-5
- Brahmi S, Touati A, Dunyach-Remy C, Sotto A, Pantel A, *et al.* 2018. High Prevalence of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Wild Fish from the Mediterranean Sea in Algeria. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)* 24: 290-98
- Briet A, Helsen N, Delannoy S, Debuiche S, Brisabois A, *et al.* 2018. NDM-1-producing *Vibrio parahaemolyticus* isolated from imported seafood. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 73: 2578-79

- Brink AJ, Richards GA, Colombo G, Bortolotti F, Colombo P *et al.* 2014. Multicomponent antibiotic substances produced by fermentation: implications for regulatory authorities, critically ill patients and generics. *International Journal of Antimicrobial Agents* 43: 1-6
- Brouwer MSM, Tehrani K, Rapallini M, Geurts Y, Kant A, *et al.* 2019. Novel Carbapenemases FLC-1 and IMI-2 Encoded by an Enterobacter cloacae Complex Isolated from Food Products. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 63
- Bush K. 2018. Past and Present Perspectives on  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 62
- Bush K, Bradford PA. 2020. Epidemiology of  $\beta$ -lactamase-producing pathogens. *Clinical Microbiology Reviews* 33: e00047-19
- Bush NG, Diez-Santos I, Abbott LR, Maxwell A. 2020. Quinolones: mechanism, lethality and their contributions to antibiotic resistance. *Molecules*. 25
- Cabello FC, Godfrey HP, Tomova A, Ivanova L, Dölz H, *et al.* 2013. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environmental microbiology* 15: 1917-42
- Caniaux I, Van BA, Zambardi G, Poirel L, Gros MF. 2017. MCR: modern colistin resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 36: 415-420
- Chandrakasan G, Rodriguez-Hernandez AI, Del Rocio L, Palma-Rodriguez HM, Chavarra-Hernandez N. 2019. Bacteriocin encapsulation for food and pharmaceutical applications: advances in the past 20 years. *Biotechnology Letters* 41: 453-469
- Carattoli A, García-Fernández A, Varesi P, Fortini D, Gerardi S, *et al.* 2008. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases isolated in Rome, Italy. *Journal of clinical microbiology* 46: 103-8
- Carbonnelle E, Nassif X. 2011. Applications of MALDI-TOF-MS in clinical microbiology laboratory. *Medecine sciences : M/S* 27: 882-8
- Carle S. 2009. La résistance aux antibiotiques: un enjeu de santé publique important. *Pharmactuel* 42: 6-21
- Cavallo J, Fabre R, Jehl F, Rapp C, Garrab E. 2004. *Bêtalactamines*. *EMC- Maladies Infectieuses* 1: 129-202

- CASFM. 2019. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, (Recommandations)
- Chabou S, Leangapichart T, Okdah L, Le Page S, Hadjadj L, *et al.* 2016. Real-time quantitative PCR assay with Taqman(®) probe for rapid detection of MCR-1 plasmid-mediated colistin resistance. *New microbes and new infections* 13: 71-4
- Chelaghma W, Loucif L, Bendahou M, Rolain JM. 2021. Vegetables and Fruit as Reservoir of B-Lactam and Colistin-Resistant Gram-Negative Bacteria: A Review. *Microorganisms* 9
- Chen J, Jayachandran M, Bai W, Xu B. 2022. A critical review on the health benefits of fish consumption and its bioactive constituents. *Food Chemistry* 369: 130874
- Cheng G, Hao H, Dai M, Liu Z, Yuan Z. 2013. Antibacterial action of quinolones: from target to network. *European journal of medicinal chemistry* 66: 555-62
- Cherak Z, Loucif L, Bendjama E, Moussi A, Benbouza A, *et al.* 2022. Dissemination of carbapenemases and MCR-1 producing Gram-negative bacteria in aquatic environments in Batna, Algeria. *Antibiotics (Basel, Switzerland)* 11
- Cheriti A, Boukhobza Z. 2020. *Brocchia cinerea* essential oil from Brezina (Algerian Sahara): Chemical characterization and antibacterial activity. *Journal of Chemistry and Chemical Engineering* 1: 19-24
- Correia S, Poeta P, Habraud M, Capelo JL, Igrejas G. 2017. Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? *Journal of Medical Microbiology* 66: 551-559
- Chlif N, Ed-Dra A, Diouri M, El Messaoudi N, Zekkori B, *et al.* 2021. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oils extracted from dry and fresh *Brocchia cinerea* (Vis.). *Biodiversitas Journal of Biological Diversity* 22
- Chuah LO, Effarizah ME, Goni AM, Rusul G. 2016. Antibiotic Application and Emergence of Multiple Antibiotic Resistance (MAR) in Global Catfish Aquaculture. *Current environmental health reports* 3: 118-27
- Citterio B, Biavasco F. 2015. *Aeromonas hydrophila* virulence. pp. 417-18: Taylor & Francis
- Colosi IA, Baciuc AM, Opriş RV, Peca L, Gudat T, *et al.* 2020. Prevalence of ESBL, AmpC and carbapenemase-producing Enterobacterales isolated from raw vegetables retailed in Romania. *Foods (Basel, Switzerland)* 9

- Cui H, Yang X, Lu D, Jin H, Yan Z, *et al.* 2015. Isolation and characterization of bacteria from the rhizosphere and bulk soil of *Stellera chamaejasme* L. *Canadian journal of microbiology* 61: 171-81
- Dahanayake PS, Hossain S, Wickramanayake M, Heo GJ. 2019. Antibiotic and heavy metal resistance genes in *Aeromonas* spp. isolated from marketed Manila Clam (*Ruditapes philippinarum*) in Korea. *Journal of applied microbiology* 127: 941-52
- Das UN, Singh AS, Lekshmi M, Nayak BB, Kumar S. 2019. Characterization of bla(NDM)-harboring, multidrug-resistant Enterobacteriaceae isolated from seafood. *Environmental science and pollution research international* 26: 2455-63
- Davachi SM, Pottackal N, Torabi H, Abbaspourrad A. 2021. Development and characterization of probiotic mucilage based edible films for the preservation of fruits and vegetables. *Scientific Reports* 11: 16608
- Decraene V, Phan HTT, George R, Wyllie DH, Akinremi O, *et al.* 2018. A Large, refractory nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Escherichia coli* demonstrates carbapenemase gene outbreaks involving sink sites require novel approaches to infection control. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 62
- Deekshit VK, Kumar BK, Rai P, Rohit A, Karunasagar I. 2013. Simultaneous detection of *Salmonella* pathogenicity island 2 and its antibiotic resistance genes from seafood. *Journal of microbiological methods* 93: 233-8
- Delgado-Valverde M, Sojo-Dorado J, Pascual A, Rodriguez-Bao J. 2013. Clinical management of infections caused by multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Therapeutic Advances in Infectious Disease* 1: 49-69
- Dib AL, Agabou A, Chahed A, Kurekci C, Moreno E, *et al.* 2018. Isolation, molecular characterization and antimicrobial resistance of enterobacteriaceae isolated from fish and seafood. *Food Control* 88: 54-60
- Dib I, Angenot L, Mihamou A, Ziyat A, Tits M. 2017. *Artemisia campestris* L.: Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological review. *Journal of Herbal Medicine* 7: 1-10
- Dib I, El Alaoui-Faris FE. 2019. *Artemisia campestris* L.: review on taxonomical aspects, cytogeography, biological activities and bioactive compounds. *Biomedicine & pharmacotherapy*, *Biomedecine & pharmacotherapie* 109: 1884-906

- Diene SM, Bruder N, Raoult D, Rolain JM. 2011. Real-time PCR assay allows detection of the New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM-1)-encoding gene in France. *International journal of antimicrobial agents* 37: 544-6
- Djordjevic SP, Stokes HW, Roy Chowdhury P, 2013. Mobile elements, zoonotic pathogens and commensal bacteria: conduits for the delivery of resistance genes into humans, production animals and soil microbiota. *Frontiers in Microbiology* 4: 86
- Dofini Magnini R, Pedinielli F, Vergalli J, Ouedraogo N, Remy S, *et al.* 2023. Acacia senegal Budmunchiamines as a potential adjuvant for rejuvenating phenicol activities towards *Escherichia coli*-resistant strains. *International journal of molecular sciences* 24: 8790
- Doi Y. 2019. Treatment options for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria infections. *Clinical Infectious Diseases* 69: S565-S575
- Doi Y, Paterson DL. 2015. Carbapenemase-producing enterobacteriaceae. *Thieme Medical Publishers*. 074-084.
- Dorman HD, Deans SG. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology* 88: 308-16
- Dortet L, Poirel L, Nordmann P. 2012. Rapid identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56: 6437-40
- Drali R, Berrazeg M, Zidouni LL, Hamitouche F, Abbas AA, *et al.* 2018. Emergence of *mcr-1* plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from seawater. *The Science of the total environment* 642: 90-94
- Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. 2008. Phenotypic detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clinical Microbiology and Infection* 14: 90-103
- Dudeja SS, Suneja-Madan P, Paul M, Maheswari R, Kothe E. 2021. Bacteria endophytes: Molecular interactions with their hosts. *Journal Basic Microbiology* 61: 475-505
- Dukare AS, Paul S, Nambi VE, Gupta RK, Singh R, *et al.* 019. Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59: 1498-1513
- Elansary HO, Abdelgaleil SAM, Mahmoud EA, Yessoufou K, Elhindi K, *et al.* 2018. Effective antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of essential oils of

- horticultural aromatic crops in northern Egypt. *BMC complementary and alternative medicine* 18: 214
- Elsabee MZ, Abdou ES. 2013. Chitosan based edible films and coatings: A review. *Materials Science and Engineering C* 33: 1819–1841
- Elshamy AA, Aboshanab KM. 2020. A review on bacterial resistance to carbapenems: epidemiology, detection and treatment options. *Future science OA* 6: Fso438
- EUCAST. 2019. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (Recommendations)
- Fair RJ, Tor Y. 2014. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspective in Medicinal Chemistry* 6: 25-64
- Farouk F, Azzazy HM, Niessen WM. 2015. Challenges in the determination of aminoglycoside antibiotics, a review. *Analytica Chimica Acta* 890: 21-43
- Ferraboschi P, Ciceri S, Grisenti P. 2021. Applications of Lysozyme, an Innate Immune Defense Factor, as an Alternative Antibiotic. *Antibiotics (Basel)* 10
- Founou LL, Founou RC, Essack SY. 2016. Antibiotic resistance in the food chain: a developing country-perspective. *Frontiers in microbiology* 7: 1881
- Fournomiti M, Kimbaris A, Mantzourani I, Plessas S, Theodoridou I, *et al.* 2015. Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis*), and thyme (*Thymus vulgaris*) against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial ecology in health and disease* 26: 23289
- Freitag C, Michael GB, Li J, Kadlec K, Wang Y, *et al.* 2018. Occurrence and characterisation of ESBL-encoding plasmids among *Escherichia coli* isolates from fresh vegetables. *Veterinary microbiology* 219: 63-69
- Fri J, Ndip RN, Njom HA, Clarke AM. 2018. Antibiotic susceptibility of non-Cholera Vibrios isolated from farmed and wild marine fish (*Argyrosomus japonicus*), implications for public health. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)* 24: 1296-304
- Fu H, Yu P, Liang W, Kan B, Peng X, *et al.* 2020. Virulence, resistance, and genomic fingerprint traits of *Vibrio cholerae* isolated from 12 species of aquatic products in Shanghai, China. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)* 26: 1526-39

- Gaw S, Thomas KV, Hutchinson TH. 2014. Sources, impacts and trends of pharmaceuticals in the marine and coastal environment. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 369
- Germanou D, Spernovasilis N, Papadopoulos A, Christodoulou S, Agouridis AP. 2022. Infections Caused by *Moellerella wisconsensis*: A Case Report and a Systematic Review of the Literature. *Microorganisms* 10
- Ghafur A, Shankar C, GnanaSoundari P, Venkatesan M, Mani D, *et al.* 2019. Detection of chromosomal and plasmid-mediated mechanisms of colistin resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from Indian food samples. *Journal of global antimicrobial resistance* 16: 48-52
- Gokoglu N. 2019. Novel natural food preservatives and applications in seafood preservation: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 99: 2068-2077
- Hamdouch A, Bouzid HA, Gharby S, Asdadi A, Achemchem F, *et al.* 2022. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of *Brocchia Cinerea* from South-East of Morocco. *Arabian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 8: 1-20
- Hammoudi Halat D, Ayoub Moubareck C. 2020. The current burden of carbapenemases: Review of significant properties and dissemination among gram-negative bacteria. *Antibiotics* 9: 186
- Haouichat H, Guénard L, Bourgeois S, Pauli G, De Blay F. 2002. Les tests cutanés dans l'exploration de l'allergie à la pénicilline. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique* 42: 779-92
- Hassen B, Jouini A, Elbour M, Hamrouni S, Maaroufi A. 2020. Detection of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases (ESBL) producing Enterobacteriaceae from fish trapped in the Lagoon Area of Bizerte, Tunisia. *BioMed research international* 2020: 7132812
- Hennequin C, Ravet V, Robin F. 2018. Plasmids carrying DHA-1  $\beta$ -lactamases. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 37: 1197-1209
- Hinchliffe P, Yang QE, Portal E, Young T, Li H, *et al.* 2017. Sights into the mechanistic basis of plasmid-mediated colistin resistance from crystal structures of the catalytic domain of MCR-1. *Science Reports* 7: 39392
- Hoa TTT, Huyen HM, Nakayama T, Minh DTN, Hoang ON, *et al.* 2022. Frequent contamination of edible freshwater fish with colistin-resistant *Escherichia coli* harbouring the plasmid-mediated *mcr-1* gene. *Marine pollution bulletin* 184: 114108

- Hölzel CS, Tetens JL, Schwaiger K. 2018. Unraveling the Role of Vegetables in Spreading Antimicrobial-Resistant Bacteria: A Need for Quantitative Risk Assessment. *Foodborne pathogens and disease* 15: 671-88
- Hong JS, Yoon EJ, Lee H, Jeong SH, Lee K. 2016. Clonal Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* Sequence Type 235 Isolates Carrying *bla*<sub>IMP-6</sub> and Emergence of *bla*<sub>GES-24</sub> and *bla*<sub>IMP-10</sub> on Novel Genomic Islands PAGI-15 and -16 in South Korea. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 60: 7216-23
- Hu Z, Ganzle MG. 2019. Challenges and opportunities related to the use of chitosan as a food preservative. *Journal of Applied Microbiology* 126:1318-1331
- Huang YT, Cheng JF, Chen SY, Hong YK, Wu ZY, *et al.* 2018. Draft genome sequence of carbapenem-resistant *Shewanella algae* strain AC isolated from small abalone (*Haliotis diversicolor*). *Journal of global antimicrobial resistance* 14: 65-67
- Huang X, Ren J, Li P, Feng S, Dong P, *et al.* 2021. Potential of microbial endophytes to enhance the resistance to postharvest diseases of fruit and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 101: 1744-1757
- Iseppi R, de Niederhäusern S, Bondi M, Messi P, Sabia C. 2018. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase, AmpC, and MBL-producing Gram-negative bacteria on fresh vegetables and ready-to-eat salads sold in local markets. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)* 24: 1156-64
- Janecko N, Martz SL, Avery BP, Daignault D, Desruisseau A, *et al.* 2016. Carbapenem-resistant *Enterobacter* spp. in retail seafood imported from Southeast Asia to Canada. *Emerging infectious diseases* 22: 1675-7
- Jo S, Shin C, Shin Y, Kim PH, Park JI, *et al.* 2020. Heavy metal and antibiotic co-resistance in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shellfish. *Marine pollution bulletin* 156: 111246
- Jeon BC, Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee K, *et al.* 2005. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 beta-lactamase in Korea. *Journal of clinical microbiology* 43: 2241-5
- Kai J, Wang S. 2020. Recent progress on elucidating the molecular mechanism of plasmid-mediated colistin resistance and drug design. *International Microbiology* 23: 355-366

- Kaurinovic B, Popovic M, Vlasisavljevic S, Trivic S. 2011. Antioxidant capacity of *Ocimum basilicum* L. and *Origanum vulgare* L. extracts. *Molecules (Basel, Switzerland)* 16: 7401-14
- Khan A, Bashir S, Khan SR, Gilani AH. 2011. Antiuro lithic activity of *Origanum vulgare* is mediated through multiple pathways. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 11: 96
- Khurshid Z, Zafar MS, Naseem M, Khan RS, Najeeb S. 2018. Human oral defensins antimicrobial peptides: a future promising antimicrobial drug. *Current Pharmaceutical Design* 24: 1130-1137
- Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology* 8: 423-435
- Kosal Z, Alim Z. 2020. Lactoperoxidase, an antimicrobial enzyme, is inhibited by some indazoles. *Drug and Chemical Toxicology* 43: 22-26
- Kumariya R, Garsa AK, Rajput YS, Sood SK, Akhtar N, *et al.* 2019. Bacteriocins: classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microbial Pathogenesis* 128: 171-177
- Kumar H, Chen BH, Kuca K, Nepovimova E, Kaushal A, *et al.* 2020. Understanding of colistin usage in food animals and available detection techniques: a review. *Animals : an open access journal from MDPI* 10
- Kurenbach B, Gibson PS, Hill AM, Bitzer AS, Silby MW, *et al.* 2017. Herbicide ingredients change *Salmonella enterica* sv. *Typhimurium* and *Escherichia coli* antibiotic responses. *Microbiology (Reading, England)* 163: 1791-801
- Kurenbach B, Hill AM, Godsoe W, Van Hamelsveld S, Heinemann JA. 2018. Agrichemicals and antibiotics in combination increase antibiotic resistance evolution. *PeerJ* 6: e5801
- Kurenbach B, Marjoshi D, Amábile-Cuevas CF, Ferguson GC, Godsoe W, *et al.* 2015. Sublethal exposure to commercial formulations of the herbicides dicamba, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and glyphosate cause changes in antibiotic susceptibility in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *mBio* 6
- Lahlaoui H, Ben Haj Khalifa A, Ben Moussa M. 2014. Epidemiology of Enterobacteriaceae producing CTX-M type extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL). *Medecine et maladies infectieuses* 44: 400-4

- Lambert T. 2012. Antibiotics that affect the ribosome. *Revue scientifique et technique* 31: 57-64
- Lammie SL, Hughes JM. 2016. Antimicrobial resistance, food safety, and one health: the need for convergence. *Annual review of food science and technology* 7: 287-312
- Lasko MJ, Nicolau DP. 2020. Carbapenem-resistant Enterobacterales: considerations for treatment in the era of new antimicrobials and evolving enzymology. *Current Infectious Disease Reports* 22: 6
- Leff JW, Fierer N. 2013. Bacterial communities associated with the surfaces of fresh fruits and vegetables. *PloS one* 8: e59310
- Legrand TP, Wynne JW, Weyrich LS, Oxley AP. 2020. A microbial sea of possibilities: current knowledge and prospects for an improved understanding of the fish microbiome. *Reviews in Aquaculture* 12: 1101-34
- Li L, Ge H, Gu D, Meng H, Li Y, *et al.* 2018. The role of two-component regulatory system in  $\beta$ -lactam antibiotics resistance. *Microbiological Research* 215: 126-129
- Li X, Wen C, Liu C, Lu S, Xu Z, *et al.* 2022. Herbicide promotes the conjugative transfer of multi-resistance genes by facilitating cellular contact and plasmid transfer. *Journal of environmental sciences (China)* 115: 363-73
- Li X, Zhu Y, Ringø E, Yang D. 2020. Prevalence of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens* and factors influencing them in different freshwater fish ponds. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 19: 111-24
- Liang X, Chen B, Nie X, Shi Z, Huang X, *et al.* (2013). The distribution and partitioning of common antibiotics in water and sediment of the Pearl River Estuary, South China. *Chemosphere* 92: 1410-6
- Lima TS, Silva MFS, Nunes XP, Colombo AV, Oliveira HP, *et al.* 2021. Cineole-containing nanoemulsion: development, stability, and antibacterial activity. *Chemistry and physics of lipids* 239: 105113
- Lima T, Domingues S, Da Silva GJ. 2019. Plasmid-mediated colistin resistance in *Salmonella enterica*: a review. *Microorganisms* 7: 55
- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, *et al.* 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases* 16: 161-168

- Liu BT, Li X, Zhang Q, Shan H, Zou M, *et al.* 2019. Colistin-resistant *mcr*-positive Enterobacteriaceae in fresh vegetables, an increasing infectious threat in China. *International journal of antimicrobial agents* 54: 89-94
- Liu BT, Song FJ. 2019. Emergence of two *Escherichia coli* strains co-harboring *mcr-1* and *bla* (NDM) in fresh vegetables from China. *Infection and drug resistance* 12: 2627-35
- Liu BT, Zhang XY, Wan SW, Hao JJ, Jiang RD, *et al.* 2018. Characteristics of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in ready-to-eat vegetables in China. *Frontiers in microbiology* 9: 1147
- Loucif L, Chelaghma W, Bendjama E, Cherak Z, Khellaf M, *et al.* 2022a. Detection of *bla*(OXA-48) and *mcr-1* genes in *Escherichia coli* isolates from pigeon (*Columba livia*) in Algeria. *Microorganisms* 10
- Loucif L, Chelaghma W, Cherak Z, Bendjama E, Beroual F, *et al.* 2022b. Detection of NDM-5 and MCR-1 antibiotic resistance encoding genes in Enterobacterales in long-distance migratory bird species *Ciconia ciconia*, Algeria. *The Science of the total environment* 814: 152861
- Loho T, Dharmayanti A. 2015. Colistin: an antibiotic and its role in multiresistant Gram negative infections. *Acta Medica Indonesiana* 47: 157-168
- Lombrea A, Antal D, Ardelean F, Avram S, Pavel IZ, *et al.* 2020. A Recent insight regarding the phytochemistry and bioactivity of *Origanum vulgare* L. essential oil. *International journal of molecular sciences* 21
- Lu L, Liu J, Li Z, Zou X, Guo J, *et al.* 2020. Antibiotic resistance gene abundances associated with heavy metals and antibiotics in the sediments of Changshou Lake in the three Gorges reservoir area, China. *Ecological Indicators* 113: 106275
- Luo J, Yao X, Lv L, Doi Y, Huang X, *et al.* 2017. Emergence of *mcr-1* in *Raoultella ornithinolytica* and *Escherichia coli* isolates from retail vegetables in China. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 61
- Lupo A, Papp-Wallace KM, Sendi P, Bonomo RA, Endimiani A. 2013. Non phenotypic tests to detect and characterize antibiotic resistance mechanisms in Enterobacteriaceae. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 77: 179-194
- Lv L, Cao Y, Yu P, Huang R, Wang J, *et al.* 2018. Detection of *mcr-1* gene among *Escherichia coli* isolates from farmed fish and characterization of *mcr-1*-bearing IncP plasmids. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 62

- Ly TDA, Hadjadj L, Hoang VT, Louni M, Dao TL, *et al.* 2019. Low prevalence of resistance genes in sheltered homeless population in Marseille, France, 2014-2018. *Infection and drug resistance* 12: 1139-51
- Mehta D, Sharma AK. 2016. Cephalosporins: a review on imperative class of antibiotics. *Inventi Rapid: Molecular Pharmacology* 1: 1-6
- Makkaew P, Miller M, Fallowfield HJ, Cromar NJ. 2016. Microbial risk in wastewater irrigated lettuce: comparing *Escherichia coli* contamination from an experimental site with a laboratory approach. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research* 74: 749-55
- Manageiro V, Jones-Dias D, Ferreira E, Caniça M. 2020. Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1*) in *Escherichia coli* from non-imported fresh vegetables for human consumption in Portugal. *Microorganisms* 8
- Mani Y, Mansour W, Lupo A, Saras E, Bouallègue O, *et al.* 2018. Spread of bla(CTX-M-15)-producing Enterobacteriaceae and OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* Sequence Type 2 in Tunisian seafood. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 62
- Mansouri S, Pajohi-Alamoti M, Aghajani N, Bazargani-Gilani B, Nourian A. 2021. Stability and antibacterial activity of *Thymus daenensis* L. essential oil nanoemulsion in mayonnaise. *Journal of the science of food and agriculture* 101: 3880-88
- Mantilla-Calderon D, Jumat MR, Wang T, Ganesan P, Al-Jassim N, *et al.* 2016. Isolation and characterization of NDM-positive *Escherichia coli* from municipal wastewater in Jeddah, Saudi Arabia. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 60: 5223-31
- Manyi-Loh C, Mamphweli S, Meyer E, Okoh A. 2018. Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: potential public health implications. *Molecules (Basel, Switzerland)* 23
- Mathlouthi N, Al-Bayssari C, El Salabi A, Bakour S, Ben Gwierif S, *et al.* 2016. Carbapenemases and extended-spectrum  $\beta$ -lactamases producing Enterobacteriaceae isolated from Tunisian and Libyan hospitals. *Journal of infection in developing countries* 10: 718-27
- McMillan KAM, Coombs MRP. 2021. Investigating potential applications of the fish anti-microbial peptide pleurocidin: a systematic review. *Pharmaceuticals (Basel)* 14
- Meini S, Tascini C, Cei M, Sozio E, Rossolini GM. 2019. AmpC B-lactamase producing Enterobacterales: what a clinician should know. *Infection* 47: 363-375

- Mendes R, Garbeva P, Raaijmakers JM. 2013. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS microbiology reviews* 37: 634-63
- Mendes Oliveira V R, Paiva MC, Lima, WG. 2019. Plasmid-mediated colistin resistance in Latin America and Caribbean: A systematic review. *Travel Medicine and Infectious Disease* 31: 101459
- Mesbah Zekar F, Granier SA, Touati A, Millemann Y. 2020. Occurrence of third-generation cephalosporins-resistant *Klebsiella pneumoniae* in fresh fruits and vegetables purchased at markets in Algeria. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)* 26: 353-59
- Mesli E, Berrazeg M, Drissi M, Bekkhoucha SN, Rolain JM. 2013. Prevalence of carbapenemase-encoding genes including New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase in *Acinetobacter* species, Algeria. *International journal of infectious diseases : official publication of the International Society for Infectious Diseases* 17: e739-43
- Mlynarcik P, Kolar M. 2019. Molecular mechanisms of polymyxin resistance and detection of mcr genes. *Biomedical Papers* 163: 28-38
- Moalla S, Ammar I, Fauconnier ML, Danthine S, Blecker C, *et al.* 2021. Development and characterization of chitosan films carrying *Artemisia campestris* antioxidants for potential use as active food packaging materials. *International journal of biological macromolecules* 183: 254-66
- Modarres MBS, Akhlaghi M, Sharifiyazdi H. 2014. Phenotypic and genetic diversity of motile aeromonads isolated from diseased fish and fish farms. *Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University* 15 :238-243
- Mogren L, Windstam S, Boqvist S, Vågsholm I, Söderqvist K, *et al.* 2018. The Hurdle Approach-A holistic concept for controlling food safety risks associated with pathogenic bacterial contamination of leafy green vegetables. a review. *Frontiers in microbiology* 9: 1965
- Montero L, Irazabal J, Cardenas P, Graham JP, Trueba G. 2021. Extended-Spectrum Beta-Lactamase producing-*Escherichia coli* isolated from irrigation waters and produce in Ecuador. *Frontiers in microbiology* 12: 709418

- Morrison BJ, Rubin JE. 2015. Carbapenemase producing bacteria in the food supply escaping detection. *PloS one* 10: e0126717
- Müller S, Von Bonin S, Schneider R, Krüger M, Quick S, *et al.* 2022. *Shewanella putrefaciens*, a rare human pathogen: A review from a clinical perspective. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 12: 1033639
- Munita JM, Arias CA. 2016. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum* 4
- Muziasari WI, Pitkänen LK, Sorum H, Stedtfeld RD, Tiedje JM, *et al.* 2016. The Resistome of farmed fish feces contributes to the enrichment of antibiotic resistance genes in sediments below Baltic Sea fish farms. *Frontiers in microbiology* 7: 2137
- Muylaert A, Mainil JG. 2012. Résistances bactériennes aux antibiotiques : les mécanismes et leur « contagiosité ». *Annales de Médecine Vétérinaire* 156: 109- 123
- Nabti LZ, Sahli F, Ngaiganam EP, Radji N, Mezaghcha W, *et al.* 2020. Development of real time PCR assay allowed describing the first clinical *Klebsiella pneumoniae* isolate harboring plasmid-mediated colistin resistance *mcr-8* gene in Algeria. *Journal of global antimicrobial resistance* 20: 266-71
- Nordmann P. 2010. Gram-negative bacteriae with resistance to carbapenems. *médecine/sciences (Paris)* 26: 950-959
- Nordmann P. 2014. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: overview of a major public health challenge. *Medecine et maladies infectieuses* 44: 51-56
- Nordmann P, Dortet L, Poirel L. 2012. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends in molecular medicine* 18: 263-272
- Nordmann P, Poirel L. 2019. Epidemiology and diagnostics of carbapenem resistance in gram-negative bacteria. *Clinical Infectious Diseases* 69: S521-S528
- Normark BH, Normark S. 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine* 252: 91-106
- Oh SS, Song J, Kim J, Shin J. 2020. Increasing prevalence of multidrug-resistant *mcr-1*-positive *Escherichia coli* isolates from fresh vegetables and healthy food animals in South Korea. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* 92: 53-55
- Okeke ES, Chukwudozie KI, Nyaruaba R, Ita RE, Oladipo A, *et al.* 2022. Antibiotic resistance in aquaculture and aquatic organisms: a review of current nanotechnology

- applications for sustainable management. *Environmental science and pollution research international* 29: 69241-74
- Olaitan AO, Diene SM, Kempf M, Berrazeg M, Bakour S, *et al.* Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator mgrB: an epidemiological and molecular study. *International Journal of Antimicrobial Agents* 44: 500-507
- Oliveira VRM, Paiva MC, Lima WG. 2019. Plasmid-mediated colistin resistance in Latin America and Caribbean: a systematic review. *Travel Medicine and Infectious Disease* 31: 101459
- Omomowo OI, Babalola OO. 2019. Bacterial and fungal endophytes: tiny giants with immense beneficial potential for plant growth and sustainable agricultural productivity. *Microorganisms* 7
- Ortega-Paredes D, Barba P, Mena-López S, Espinel N, Zurita J. 2018. *Escherichia coli* hyperepidemic clone ST410-A harboring bla(CTX-M-15) isolated from fresh vegetables in a municipal market in Quito-Ecuador. *International journal of food microbiology* 280: 41-45
- Paradis H, Thirion DJ, Bergeron L. 2009. Les allergies croisées aux antibiotiques: comment s'y retrouver? *Pharmactuel* 42
- Parsonage B, Hagglund PK, Keogh L, Wheelhouse N, Brown RE, Dancer SJ. 2017. Control of antimicrobial resistance requires an ethical approach. *Frontiers in microbiology* 8: 2124
- Pehrsson EC, Forsberg KJ, Gibson MK, Ahmadi S, Dantas G. 2013. Novel resistance functions uncovered using functional metagenomic investigations of resistance reservoirs. *Frontiers in Microbiology* 4: 145
- Peirano G, Pitout JDD. 2019. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-producing Enterobacteriaceae: update on molecular epidemiology and treatment options. *Drugs* 79: 1529-41
- Pincus DH. 2006. Microbial identification using the bioMérieux Vitek® 2 system. *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*. Bethesda, MD: Parenteral Drug Association 2006: 1-32

- Poirel L, Haritier C, Tolan V, Nordmann P. 2004. Emergence of oxacillinase mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48: 15-22
- Popovića NT, Kazazić SP, Strunjak-Perovića I, Čož-Rakovaca R. 2017. Differentiation of environmental aquatic bacterial isolates by MALDI-TOF-MS. *Environmental Research* 152:7-16
- Pöppe J, Bote K, Ramesh A, Murugaiyan J, Kuropka B, *et al.* 2020. Selection for resistance to a glyphosate-containing herbicide in *Salmonella enterica* does not result in a sustained activation of the tolerance response or increased cross-tolerance and cross-resistance to clinically important antibiotics. *Applied and environmental microbiology* 86
- Pu C, Yu Y, Diao J, Gong X, Li J, *et al.* 2019. Exploring the persistence and spreading of antibiotic resistance from manure to biocompost, soils and vegetables. *The Science of the total environment* 688: 262-69
- Ramsey JT, Shropshire BC, Nagy TR, Chambers KD, Li Y, *et al.* 2020. Essential oils and health. *Yale Journal of Biology and Medicine* 63: 291-305
- Rathod NB, Ranveer RC, Benjakul S, Kim SK, Pagarkar AU, *et al.* 2021. Recent developments of natural antimicrobials and antioxidants on fish and fishery food products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 20: 4182-4210
- Rhouma M, Beaudry F, Thariault W, Letellier A. 2016. Colistin in pig production: chemistry, mechanism of antibacterial action, microbial resistance emergence, and One Health perspectives. *Frontiers in Microbiology* 7: 1789
- Richter L, Du Plessis EM, Duvenage S, Korsten L. 2019. Occurrence, identification, and antimicrobial resistance profiles of Extended-Spectrum and AmpC  $\beta$ -Lactamase-producing Enterobacteriaceae from fresh vegetables retailed in Gauteng Province, South Africa. *Foodborne pathogens and disease* 16: 421-27
- Richter L, Du Plessis EM, Duvenage S, Korsten L. 2020. Occurrence, phenotypic and molecular characterization of Extended-Spectrum- and AmpC-  $\beta$ -Lactamase producing Enterobacteriaceae isolated from selected commercial spinach supply chains in South Africa. *Frontiers in microbiology* 11: 638
- Rincón VMV, Neelam DK. 2021. An overview on endophytic bacterial diversity habitat in vegetables and fruits. *Folia microbiologica* 66: 715-25

- Ringø E, Zhou Z, Vecino JG, Wadsworth S, Romero J, *et al.* 2016. Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story? *Aquaculture nutrition* 22: 219-82
- Roca I, Akova M, Baquero F, Carlet J, Cavalieri M, *et al.* 2015. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New microbes and new infections* 6: 22-9
- Robin F, Gibold L, Bonnet R. 2012. Résistances naturelles et acquises aux  $\beta$ -lactamines chez les entérobactéries: comment les identifier en pratique quotidienne? *Revue Francophone des laboratoires* 2012: 47-58
- Rodriguez-Garcia I, Silva-Espinoza BA, Ortega-Ramirez LA, Leyva JM, Siddiqui MW, *et al.* 2016. Oregano essential oil as an antimicrobial and antioxidant additive in food products. *Critical reviews in food science and nutrition* 56: 1717-27
- Roschanski N, Fischer J, Guerra B, Roesler U. 2014. Development of a multiplex real-time PCR for the rapid detection of the predominant beta-lactamase genes CTX-M, SHV, TEM and CIT-type AmpCs in Enterobacteriaceae. *PloS one* 9: e100956
- Roschanski N, Guenther S, Vu TTT, Fischer J, Semmler T, *et al.* 2017. VIM-1 carbapenemase-producing *Escherichia coli* isolated from retail seafood, Germany 2016. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles European communicable disease bulletin* 22
- Ryan MP, Adley CC. 2010. *Sphingomonas paucimobilis*: a persistent Gram-negative nosocomial infectious organism. *The Journal of hospital infection* 75: 153-7
- Sakkas H, Papadopoulou C. 2017. Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils. *Journal of microbiology and biotechnology* 27: 429-38
- Sanjit Singh A, Lekshmi M, Prakasan S, Nayak BB, Kumar S. 2017. Multiple antibiotic-resistant, Extended Spectrum- $\beta$ -Lactamase (ESBL)-producing Enterobacteria in fresh seafood. *Microorganisms* 5
- Santajit S, Kong-Ngoen T, Tunyong W, Pumirat P, Ampawong S, *et al.* 2022. Occurrence, antimicrobial resistance, virulence, and biofilm formation capacity of *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. isolated from raw seafood marketed in Bangkok, Thailand. *Veterinary world* 15: 1887-95
- Sapugahawatte DN, Li C, Zhu C, Dharmaratne P, Wong KT, *et al.* 2020. Prevalence and characteristics of Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-producing and carbapenemase-

- producing Enterobacteriaceae from freshwater fish and pork in wet markets of Hong Kong. *mSphere* 5
- Sawa T, Kooguchi K, Moriyama K. 2020. Molecular diversity of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *Journal of intensive care* 8: 1-13
- Scandorieiro S, De Camargo LC, Lancheros CA, Yamada-Ogatta SF, Nakamura CV, *et al.* 2016. Synergistic and additive effect of oregano essential oil and biological silver nanoparticles against multidrug-resistant bacterial strains. *Frontiers in microbiology* 7: 760
- Seiffert SN, Hilty M, Perreten V, Endimiani A. 2013. Extended-spectrum cephalosporin resistant Gram-negative organisms in livestock: an emerging problem for human health? *Drug Resistance Updates* 16: 22-45
- Seiler C, Berendonk TU. 2012. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Frontiers in microbiology* 3: 399
- Serio AW, Keepers T, Andrews L, Krause KM. 2018. Aminoglycoside revival: review of a historically important class of antimicrobials undergoing rejuvenation. *EcoSal Plus* 8.
- Sellera FP, Fernandes MR, Moura Q, Carvalho MPN, Lincopan N. 2018. Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase (CTX-M)-producing *Escherichia coli* in wild fishes from a polluted area in the Atlantic Coast of South America. *Marine pollution bulletin* 135: 183-86
- Seng P, Rolain JM, Fournier PE, La Scola B, Drancourt M, *et al.* 2010. MALDI-TOF- mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future microbiology* 5: 1733-54
- Sheng L, Wang L. 2021. The microbial safety of fish and fish products: recent advances in understanding its significance, contamination sources, and control strategies. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 20: 738-86
- Singh AS, Lekshmi M, Nayak BB, Kumar SH. 2016. Isolation of *Escherichia coli* harboring bla(NDM-5) from fresh fish in India. *Journal of microbiology, immunology, and infection* 9: 822-23
- Singh SB, Barrett JF. 2006. Empirical antibacterial drug discovery--foundation in natural products. *Biochemical Pharmacology* 71: 1006-1015

- Singh AS, Nayak BB, Kumar SH. 2020. High prevalence of multiple antibiotic-resistant, Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in fresh seafood sold in retail markets of Mumbai, India. *Veterinary sciences* 7
- Slavin JL, Lloyd B. 2012. Health benefits of fruits and vegetables. *Advances in Nutrition* 3: 506-516
- Smet A, Rasschaert G, Martel A, Persoon D, Dewulf J, *et al.* 2011. In situ ESBL conjugation from avian to human *Escherichia coli* during cefotaxime administration. *Journal of Applied Microbiology* 110: 541–549.
- Smith RA, M'ikanatha NM, Read AF. 2015. Antibiotic resistance: a primer and call to action. *Health Communication* 30: 309-314
- Sola M, Mani Y, Saras E, Drapeau A, Grami R, *et al.* 2022. Prevalence and characterization of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase- and carbapenemase-producing Enterobacterales from tunisian seafood. *Microorganisms* 10
- Stalder T, Barraud O, Casellas M, Dagot C, Ploy MC. 2012. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Frontiers in microbiology* 3: 119
- Stefaniuk EM, Tyski S. 2019. Colistin Resistance in Enterobacterales Strains – A Current View. *Polish Journal of Microbiology* 4: 417-427
- Stierle A, Strobel G, Stierle D. 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science* 260: 214-216
- Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clinical Microbiology Reviews* 22: 664-689
- Stockwell VO, Duffy B. 2012. Use of antibiotics in plant agriculture. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 31: 199-210
- Stratev D, Odeyemi OA. 2016. Antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from different food sources: A mini-review. *Journal of infection and public health* 9: 535-44
- Sun Y, Qiu T, Gao M, Shi M, Zhang H, *et al.* 2019. Inorganic and organic fertilizers application enhanced antibiotic resistome in greenhouse soils growing vegetables. *Ecotoxicology and environmental safety* 179: 24-30
- Sundin GW, Wang N. 2018. Antibiotic Resistance in Plant-Pathogenic Bacteria. *Annual review of phytopathology* 56: 161-80

- Tenover FC. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine* 119: S3-10
- Tiwari BK, Valdramidis VP, O'Donnell CP, Muthukumarappan K, Bourke P, *et al.* 2009. Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 5987-6000
- Tongnuanchan P, Benjakul S. 2014. Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of Food Science* 79: R1231-R1249
- Touati A, Mairi A. 2020. Epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacterales in the Middle East: a systematic review. *Expert review of anti-infective therapy* 18: 241-50
- Toleman MA, Bugert JJ, Nizam SA. 2015. Extensively drug-resistant New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-encoding bacteria in the environment, Dhaka, Bangladesh, 2012. *Emerging infectious diseases* 21: 1027-30
- Tongnuanchan P, Benjakul S. 2014. Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of food science* 79: R1231-49
- Touati A, Mairi A, Baloul Y, Lalaoui R, Bakour S, *et al.* 2017. First detection of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 in fresh vegetables from Béjaïa city, Algeria. *Journal of global antimicrobial resistance* 9: 17-18
- Ullah S, Mehmood H, Pervin N, Zeb H, Kamal KR, *et al.* 2018. *Shewanella putrefaciens*: An emerging cause of nosocomial pneumonia. *Journal of investigative medicine high impact case reports* 6: 2324709618775441
- Usui M, Ozeki K, Komatsu T, Fukuda A, Tamura Y. 2019. Prevalence of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-producing bacteria on fresh vegetables in Japan. *Journal of food protection* 82: 1663-66
- Van Hoek AH, Veenman C, Van Overbeek WM, Lynch G, De Roda Husman AM, *et al.* 2015. Prevalence and characterization of ESBL- and AmpC-producing Enterobacteriaceae on retail vegetables. *International journal of food microbiology* 204: 1-8
- Vanegas D, Abril-Novillo A, Khachatryan A, Jerves-Andrade L, Peñaherrera E, *et al.* 2021. Validation of a method of broth microdilution for the determination of antibacterial activity of essential oils. *BMC research notes* 14: 439
- Vázquez-Ucha JC, Arca-Suárez J, Bou G, Beceiro A. 2020. New carbapenemase inhibitors: clearing the way for the  $\beta$ -Lactams. *International journal of molecular sciences* 21

- Vu TTT, Alter T, Roesler U, Roschanski N, Huehn S. 2018. Investigation of Extended-Spectrum and AmpC  $\beta$ -Lactamase-producing Enterobacteriaceae from retail seafood in Berlin, Germany. *Journal of food protection* 81: 1079-86
- Wang C, Feng Y, Liu L, Wei L, Kang M, *et al.* 2020. Identification of novel mobile colistin resistance gene mcr-10. *Emerging Microbes and Infection* 9: 508–516
- Wang B, TimilsenaYP, Blanch E, Adhikari B. 2019. Lactoferrin: structure, function, denaturation and digestion. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59: 580-596
- Wang J, Yao X, Luo J, Lv L, Zeng Z, *et al.* 2018. Emergence of *Escherichia coli* co-producing NDM-1 and KPC-2 carbapenemases from a retail vegetable, China. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 73: 252-54
- Wróblewska-Kurdyk A, Gniłka R, Dancewicz K, Grudniewska A, Wawrzeńczyk C, *et al.* 2019.  $\beta$ -Thujone and Its Derivatives Modify the Probing Behavior of the Peach Potato Aphid. *Molecules (Basel, Switzerland)* 24
- Wu CJ, Ko WC, Lee NY, Su SL, Li CW, *et al.* 2019. *Aeromonas* Isolates from fish and patients in Tainan city, Taiwan: genotypic and phenotypic characteristics. *Applied and environmental microbiology* 85
- Yang F, Shen C, Zheng X, Liu Y, El-Sayed Ahmed MAE, *et al.* 2019. Plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-1 in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from market retail fruits in Guangzhou, China. *Infection and drug resistance* 12: 385-89
- Ye Q, Wu Q, Zhang S, Zhang J, Yang G, *et al.* 2018. Characterization of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-producing Enterobacteriaceae from retail food in China. *Frontiers in microbiology* 9: 1709
- Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, *et al* 001. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45: 1151-1161
- Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, *et al.* 2009 Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53: 5046-5054

- Young KM, Isada MJ, Reist M, Uhland FC, Sherk LM, *et al.* 2022. A scoping review of the distribution and frequency of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in shrimp and salmon. *Epidemiology and infection* 151: e1
- Yousfi H, Hadjadj L, Dandachi I, Lalaoui R, Merah A, *et al.* 2019. Colistin- and carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates: Algeria. *Microbial drug resistance* 25: 258-63
- Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Arakawa Y. 2000. A preliminary survey of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS microbiology letters* 184: 53-6
- Yu Y, Ji S, Chen Y, Zhou W, Wei Z, *et al.* 2007. Resistance of strains producing extended-spectrum beta-lactamases and genotype distribution in China. *The Journal of infection* 54: 53-7
- Zago V, Veschetti L, Patuzzo C, Malerba G, Lleo MM. 2020. *Shewanella algae* and *Vibrio* spp. strains isolated in Italian aquaculture farms are reservoirs of antibiotic resistant genes that might constitute a risk for human health. *Marine pollution bulletin* 154: 111057
- Zalewska M, Błażejewska A, Czapko A, Popowska M. 2021. Antibiotics and antibiotic resistance genes in animal manure - consequences of its application in agriculture. *Frontiers in microbiology* 12: 610656
- Zeng Q, Tian X, Wang L. 2017. Genetic adaptation of microbial populations present in high-intensity catfish production systems with therapeutic oxytetracycline treatment. *Scientific reports* 7: 17491
- Zhang YJ, Hu HW, Chen QL, Singh BK, Yan H, *et al.* 2019. Transfer of antibiotic resistance from manure-amended soils to vegetable microbiomes. *Environment international* 130: 104912
- Zhang XL, Guo YS, Wang CH, Li GQ, Xu JJ, *et al.* 2014. Phenolic compounds from *Origanum vulgare* and their antioxidant and antiviral activities. *Food Chemistry* 152: 300-306
- Zhan X, Zhu Z, Sun DW. 2019. Effects of pretreatments on quality attributes of long term deep frozen storage of vegetables: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59: 743-757

- Zheng Z, Li R, Ye L, Chan EW, Chen S. 2018. Identification and characterization of IncA/C conjugative, bla(NDM-1)-bearing plasmid in *Vibrio alginolyticus* of food origin. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 62
- Zhou QL, Wang YJ, Xie J, Ge XP, Xi BW, *et al.* 2013. Distribution and virulence gene comparison of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish and water environment. *Polish journal of microbiology* 62: 299-302
- Zhou ZC, Lin ZJ, Shuai XY, Zheng J, Meng LX, *et al.* 2021. Temporal variation and sharing of antibiotic resistance genes between water and wild fish gut in a peri-urban river. *Journal of environmental sciences (China)* 103: 12-19
- Zurfluh K, Nüesch-Inderbinnen M, Morach M, Zihler Berner A, Hächler H, *et al.* 2015a. Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolated from vegetables imported from the Dominican Republic, India, Thailand, and Vietnam. *Applied and environmental microbiology* 81: 3115-20
- Zurfluh K, Poirel L, Nordmann P, Klumpp J, Stephan R. 2015b. First detection of *Klebsiella variicola* producing OXA-181 carbapenemase in fresh vegetable imported from Asia to Switzerland. *Antimicrobial resistance and infection control* 4: 38
- Zurfluh K, Poirel L, Nordmann P, Nüesch-Inderbinnen M, Hächler H, *et al.* 2016. Occurrence of the plasmid-borne *mcr-1* colistin resistance gene in Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-producing Enterobacteriaceae in river water and imported vegetable samples in Switzerland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60: 2594-5

# RÉSUMÉS

Les antibiotiques sont largement utilisés en agriculture et en aquaculture, influençant ainsi l'antibiorésistance des bactéries se trouvant dans leurs produits à savoir les légumes, les fruits et les poissons. Les objectifs de cette étude étaient la recherche des bactéries à Gram négatif résistantes aux  $\beta$ -lactamines et/ou à la colistine dans différents produits alimentaires vendus au niveau de la ville de Batna et la caractérisation moléculaire des mécanismes d'antibiorésistance en question ainsi que l'étude de la sensibilité des souches résistantes isolées *vis-à-vis* de trois huiles essentielles.

Au cours de la période allant de Mars 2019 à Mars 2020 et de Septembre 2020 à Avril 2021 (21 mois), 746 échantillons de légumes (n=400), fruits (n=226), et poissons (n=120) frais ont été collectés à partir de différents points de vente au niveau de la ville de Batna. Les échantillons prélevés ont été immédiatement soumis à l'isolement sélectif, puis les colonies représentatives ont été identifiées en utilisant la méthode de la spectrométrie de masse type MALDI-TOF-MS et/ou le système VITEK. Une détection phénotypique et génotypique des mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines et à la colistine a été effectuée. La transférabilité des plasmides porteurs des gènes de carbapénémases et *mcr-1* a été vérifiée par conjugaison. L'activité de trois huiles essentielles extraites à partir de trois plantes : *Brocchia cinerea*, *Origanum vulgare*, *Artemisia campestris* a été testée contre les souches isolées par la méthode de microdilutions en milieu liquide.

Au total, cent cinquante souches ont été isolées et identifiées comme bactérie à Gram négatif avec une prédominance des espèces suivantes : *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli* et *Citrobacter braakii*. Les déterminants génétiques codant pour des BLSE (le gène *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* et *bla<sub>TEM</sub>*), des carbapénémases (le gène *bla<sub>VIM-4</sub>* et *bla<sub>OXA-48</sub>*) et de *mcr-1* ont été détectés. La transférabilité par conjugaison des gènes *bla<sub>OXA-48</sub>* et *mcr-1* a été confirmée. En outre les trois huiles essentielles testées ont montré une activité antibactérienne contre les souches résistantes obtenues avec des valeurs de CMI allant jusqu'à 0,666  $\mu$ g/ml.

Cette étude a permis la détection du gène *bla<sub>OXA-48</sub>* pour la première fois chez les isolats d'*E. coli* et de *C. braakii* et du gène *bla<sub>VIM-4</sub>* dans les légumes et rapporte la première identification du gène *mcr-1* chez des souches isolées à partir des légumes et des poissons en Algérie.

**Mots clés :** résistance aux antibiotiques, légumes, fruits, poissons, activité antibactérienne, Batna, Algérie.

Antibiotics are widely used in agriculture and aquaculture, thus influencing the antibiotic resistance of bacteria found in their products, namely vegetables, fruits and fish. The aims of this study were to screen for Gram-negative bacteria resistant to  $\beta$ -lactams and/or colistin in different food products purchased in the city of Batna, followed by the molecular characterization of the drug resistance mechanisms as well as evaluation of antibacterial activity of three essential oils against the obtained resistant isolates.

During the period from March 2019 to March 2020 and from September 2020 to April 2021 (21 months), 746 samples of fresh vegetables (n=400), fruits (n=226), and fish (n=120) were collected from different points of sale in the city of Batna. The samples were immediately subjected to selective isolation, then the representative colonies were identified using the MALDI-TOF-MS mass spectrometry method and/or the VITEK system. A phenotypic and genotypic detection of antibiotic resistance mechanisms to  $\beta$ -lactams and colistin was carried out. The transferability of the plasmids carrying the carbapenemase and *mcr-1* genes was verified by conjugation. The antibacterial activity of the three essential oils extracted from the following plants: *Brocchia cinerea*, *Origanum vulgare*, *Artemisia campestris* was tested against the obtained resistant strains by the microdilution method.

A total of one hundred and fifty strains were isolated and identified as Gram-negative bacteria with a predominance of the following species: *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli* and *Citrobacter braakii*. The genetic determinants coding for ESBLs (the *bla*<sub>CTX-M</sub> gene, *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>TEM</sub>), carbapenemases (the *bla*<sub>VIM-4</sub> gene and *bla*<sub>OXA-48</sub>) and *mcr-1* were detected. The transferability of the *bla*<sub>OXA-48</sub> and *mcr-1* genes was confirmed by conjugation experiments. In addition, the three essential oils tested showed antibacterial activity against the obtained resistant strains with MIC values of up to 0,666  $\mu$ g/ml.

This study allowed the detection for the first time of *bla*<sub>OXA-48</sub> gene in *E. coli* and *C. braakii* isolates and the *bla*<sub>VIM-4</sub> gene in vegetables and reports the first identification of the *mcr-1* gene in bacterial strains isolated from vegetables and fish in Algeria.

**Keywords:** antibiotic resistance, vegetables, fruit, fish, antibacterial activity, Batna, Algeria.

المضادات الحيوية تستخدم على نطاق واسع في الزراعة وتربية الأحياء المائية، مما يؤثر على مقاومة المضادات الحيوية للبكتيريا الموجودة في منتجاتها، كالخضروات، الفواكه والأسماك. أهداف هذه الدراسة تمثلت في البحث عن البكتيريا في مختلف الأغذية التي تم شراؤها في مدينة باتنة، تليها الدراسة الجزيئية للآليات مقاومة المضادات الحيوية ( $\beta$ lactamines/colistine) عند البكتيريا سالبة الجرام المقاومة وكذلك تقييم النشاط المضاد للبكتيريا للثلاثة زيوت أساسية ضد السلالات المقاومة التي تم الحصول عليها.

خلال الفترة الممتدة بين مارس 2019 ومارس 2020 ومن سبتمبر 2020 إلى أبريل 2021 (21 شهرا)، تم جمع 746 عينة من الخضروات الطازجة (ن = 400)، الفواكه (ن = 226) والأسماك (ن = 120) من نقاط بيع مختلفة على مستوى مدينة باتنة. بعد ذلك كل العينات خضعت على الفور للعزل الانتقائي، ثم تشخيص المستعمرات المختارة باستخدام طريقة قياس الطيف الضوئي MALDI-TOF-MS و / أو نظام VITEK. تم إجراء الكشوف عن النمط الظاهري والجيني للآليات مقاومة المضادات الحيوية ل  $\beta$ -lactamines و colistine. التحقق من قابلية نقل البلازميدات التي تحمل جينات الكارابينيماز و mcr-1 تمك من طريق تقنية الاقتران، أما اختبار النشاط المضاد للبكتيريا للزيوت الأساسية الثلاثة المستخرجة من النباتات التالية : *Artemisia campestris*, *Origanum vulgare*, *Broccchia cinerea* ضد السلالات المقاومة التي تم الحصول عليها تم بطريقة التخفيف الدقيق.

تم عزل مائة وخمسين سلالة من البكتيريا سالبة الجرام المنتمية لأنواع الغالبة التالية: *Klebsiella*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *pneumoniae*, *E. coli* و *Citrobacter braakii*. تم التعرف على الجينات المسؤولة على إنتاج إنزيمات ESBLs (مورثة  $bla_{CTX-M}$  و  $bla_{SHV}$  و  $bla_{TEM}$ ) و carbapenemases (مورثة  $bla_{VIM-4}$  و  $bla_{OXA-48}$ ) و mcr-1. تم التأكد من إمكانية التبادل الجيني بين السلالات البكتيرية ل:  $bla_{OXA-48}$  و mcr-1. بالإضافة إلى ذلك، أظهرت الزيوت الأساسية الثلاثة المختبرة نشاطاً مضاداً للبكتيريا ضد السلالات المقاومة التي تم الحصول عليها بقيم التركيز الأدنى المثبت تصل إلى 0.666 ميكروغرام / مل.

سمحت هذه الدراسة بالكشف لأول مرة عن مورثة  $bla_{OXA-48}$  في سلالات *E. coli* و *C. braakii* ومورثة  $bla_{VIM-4}$  في الخضروات وتم الإبلاغ عن أول كشوف عن مورثة mcr-1 في السلالات البكتيرية المعزولة من الخضروات والأسماك في الجزائر.

**الكلمات المفتاحية:** مقاومة المضادات الحيوية، خضروات، فواكه، أسماك، النشاط المضاد للبكتيريا، باتنة، الجزائر.