

République Algérienne Démocratique
et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et la Recherche Scientifique
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة



THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Es-Sciences
En Sciences Vétérinaires

Thème :

*Etude des supports de l'antibiorésistance des
entérobactéries d'origine aviaire en Algérie et
proposition de solutions alternatives*

Présentée par : **BENAMEUR Qada**

Soutenue le 12 Mars 2020

Les membres du jury :

Président du jury :	Mr. Lamara. A	Professeur (ENSV)
Directrice de thèse :	Mme. BEN-MAHDI. M-H	Professeur (ENSV/ESSAIA)
Examineurs :	Mme. Azzag. N	Maitre de conférences A (ENSV)
	Mme. Boukhors. K	Professeur (ENSV)
	Mr. Arab. K	Professeur (Université de Boumerdes)
	Mr. Yala. D	Professeur (Faculté de médecine d'Alger/IPA)
Membres invités :	Mme. Rahal. K	Professeur (Faculté de médecine d'Alger/IPA)
	Mme. Tali-Maamar. H	MCA (Faculté de médecine d'Alger/IPA)

Année universitaire : 2019/2020

République Algérienne Démocratique
et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et la Recherche Scientifique
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة



THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Es-Sciences
En Sciences Vétérinaires

Thème :

*Etude des supports de l'antibiorésistance des
entérobactéries d'origine aviaire en Algérie et
proposition de solutions alternatives*

Présentée par : **BENAMEUR Qada**

Soutenue le 12 Mars 2020

Les membres du jury :

Président du jury :	Mr. Lamara. A	Professeur (ENSV)
Directrice de thèse :	Mme. BEN-MAHDI. M-H	Professeur (ENSV/ESSAIA)
Examineurs :	Mme. Azzag. N	Maitre de conférences A (ENSV)
	Mme. Boukhors. K	Professeur (ENSV)
	Mr. Arab. K	Professeur (Université de Boumerdes)
	Mr. Yala. D	Professeur (Faculté de médecine d'Alger/IPA)
Membres invités :	Mme. Rahal. K	Professeur (Faculté de médecine d'Alger/IPA)
	Mme. Tali-Maamar. H	MCA (Faculté de médecine d'Alger/IPA)

Année universitaire : 2019/2020

Dédicaces

Je dédie cette thèse,

A mes chers parents à qui je dois tantpour leur amour, leur présence et leurs encouragements incessants.

A mon unique frère Ahmed pour sa gentillesse et sa disponibilité.

A mes sœurs pour leur support continu et leur amour.

A mes oncles Ahmed et Abdellah pour leur soutien indéfectible.

A ma tante pour son appui et son encouragement.

A mes cousins et cousines pour leurs encouragements perpétuelles, et leur soutien moral.

A mon meilleur ami Meki pour son soutien permanent et son encouragement.

A tous mes collègues.

A tous ceux qui me sont chers.

REMERCIEMENTS

A ma directrice de thèse, Professeur Ben-Mahdi Meriem Hind

Pour avoir accepté la charge de m'encadrer, me guider et m'orienter tout au long de ces années de thèse. Je la remercie également pour toutes les heures qu'elle a consacré pour l'accomplissement de ce travail, pour ses qualités pédagogiques et scientifiques, sa patience, sa disponibilité, sa sympathie et sa gentillesse inestimable.

Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de ma vive admiration et de mon infinie gratitude.

Au Professeur LAMARA Ali

Pour nous avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Professeur, recevez l'expression de ma haute considération.

Au Professeur BOUKHORS Karima-Thamina, au Docteur AZZAG Naouelle, au Professeur ARAB Kamel et au Professeur YALA Djamel

Pour l'honneur qu'ils nous font en acceptant de siéger dans notre jury, nous les prions de trouver ici l'assurance de notre vive reconnaissance.

Au Professeur RAHAL Kheira et au docteur TALI-MAAMAR Hassiba

Pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire et ont mis à ma disposition tous les moyens qui m'ont permis de réaliser mon travail dans les meilleures conditions. Je les remercie également pour leurs discussions scientifiques et pour le temps qu'elles m'ont consacré malgré leurs obligations et leurs responsabilités.

Je tiens aussi à mentionner le plaisir que j'ai eu en travaillant au Laboratoire de Bactériologie Médicale de l'Institut Pasteur d'Algérie et j'en remercie l'ensemble des membres et en particulier *Mesdames ASSAOUS Farida, GUETTOU Badia et LALIAM Rym* pour leur assistance technique, leur support scientifique, leur disponibilité, leur soutien, leur encouragement et leur amitié. Elles ont contribué par leur bonne humeur à créer un cadre de travail agréable.

Au Docteur BEN-MAHDI Tarek, l'ex-directeur du Laboratoire Vétérinaire Régionale de Mostaganem, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et m'avoir soutenu. J'exprime également ma reconnaissance à tous les membres du laboratoire et en particulier *Docteur BENBERNOU Sennia*, *Docteur SEBAI Ali*, *Docteur BOUZIRI Abduldjalal*, et *M^{elle} BENKHAMKHAM Naziha*, pour leur précieuse aide, leur gentillesse et leur amitié.

A tous les vétérinaires des inspections vétérinaires des wilayas de Mostaganem, Oran, Mascara, Relizane, Chlef, Tiaret et Tissemsilt, pour leur collaboration, dans la partie initiale de ce travail, par la collection des prélèvements.

La deuxième partie de cette thèse a bénéficié d'un support financier de l'Union Européen dans le cadre du programme ERASMUS+ entre l'Université de Messine, Italie, et l'Université de Mostaganem. A ce titre, j'exprime mes sincères remerciements et une vive reconnaissance au *Docteur TEMDI Samira*, le responsable des relations extérieures de l'Université de Mostaganem, ainsi que ceux de l'Université de Messine, *Docteur POLUCINO Francesca* et *Docteur SCRIBANO Francesca* pour leur aide et tous leurs précieux conseils.

Au Professeur CICERO Nicola, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, le Laboratoire de Microbiologie et Chimie Alimentaire du département des sciences biomédicales, dentaires et de l'imagerie morpho-fonctionnelle de l'Université de Messine, Italie, ainsi que pour sa sympathie, son énergie et sa grande disponibilité.

Au Professeur MARINO Andreana, directrice du Laboratoire de Microbiologie du département des sciences chimiques, biologiques, pharmaceutique et de l'environnement de l'Université de Messine pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour son aide et sa sympathie. J'adresse encore mes remerciements à tous les membres du laboratoire et en particulier *Docteur GERVASI Teresa*, *Docteur CRISAFE Guiseppe* et *Docteur LA CAMERA Erminia*, pour leur sympathie, leurs conseils, leurs aides ainsi que pour leurs accueils à chaque fois chaleureux et amical.

J'adresse mes remerciements les plus chaleureux au *Docteur PLUCHTOVA Mária* et *Docteur AGHRAZ Abdellah* de l'Université de Prešov, Slovaquie, et de l'Université de Kadi Ayyad Marrakesh, Maroc, respectivement, pour nous avoir fourni l'ensemble des huiles essentielles et leurs données botaniques. Je les remercie également pour leur collaboration, leur sympathie et leur amitié.

Merci enfin à tous ce qui ont contribué de près ou de loin à accomplir ce projet de thèse.

RESUME

L'expansion des souches d'entérobactéries multi-résistantes aux antibiotiques dans certains systèmes de production animale dans le monde est inquiétante, ce qui nécessite le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Le but de cette étude était d'évaluer la fréquence de résistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries d'origine aviaire et de rechercher les gènes de résistance à certaines familles d'antibiotiques d'importance critique comme les quinolones et les céphalosporines de 3^{ième} génération. L'activité antibactérienne des huiles essentielles (HE) de certaines plantes médicinales (*Bubonium imbricatum*, *Cladanthus arabicus* et *Thymus vulgaris*) vis-à-vis des souches d'entérobactéries multi-résistantes aux antibiotiques et l'effet synergique entre les HE et certains antibiotiques conventionnels ont également été évalués.

L'étude de la sensibilité des souches d'entérobactéries aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion des disques. Les souches isolées ont également été analysées par la PCR et le séquençage pour la recherche de *bla*_{BLSE} (CTX-M du groupe 1, 2, 8 et 9, SHV et TEM) et des gènes *qnr* (*qnrA*, *qnrB* et *qnrS*). L'évaluation de l'activité antibactérienne des HE vis-à-vis des souches d'entérobactéries a été déterminée par la technique de diffusion sur gélose et la méthode de dilution en série sur microplaque. La méthode Checkerboard a été utilisée pour évaluer le potentiel effet synergique entre les HE et certains antibiotiques conventionnels.

Cette étude a révélé des résistances de hauts niveaux vis-à-vis des antibiotiques habituellement utilisés dans le traitement des pathologies aviaires en Algérie. La caractérisation moléculaire a permis la détection des gènes *qnr* et/ou *bla*_{BLSE} dans des souches d'*E. coli* isolées des ovaires des poules reproductrices chair et des œufs à couver. Les HE testées ont révélé une forte activité antibactérienne vis-à-vis de toutes les souches testées. Les combinaisons réalisées entre les HE et certains antibiotiques conventionnels ont montré un effet synergique vis-à-vis de quelques souches d'entérobactéries.

D'une manière générale, l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude va dans le sens d'une augmentation des niveaux de la multi-résistance. Les résultats de la présente étude ont également démontré que les HE, seuls ou en combinaison avec certains antibiotiques conventionnels, pourrait représenter une alternative pertinente dans la lutte contre les souches multi-résistantes aux antibiotiques. Cependant, d'autres investigations restent nécessaires pour mieux comprendre le mode d'action des HE testées en particulier et des HE en général.

Mots clés : Algérie, antibiorésistance, aviculture, BLSE, *Bubonium imbricatum*, *Cladanthus arabicus*, entérobactéries, HE, *qnr*, synergie, *Thymus vulgaris*.

SUMMARY

The increasing trend of multidrug resistant Enterobacteriaceae isolates in food producing animals worldwide is worrisome, necessitating the development of new therapeutic strategies. This study aimed to evaluate the frequency of antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae isolates of poultry origin and to investigate the presence of resistance genes to some critically important antibiotics. The antibacterial activity of essential oils (EO) of some medicinal plants (*Bubonium imbricatum*, *Cladanthus arabicus* and *Thymus vulgaris*) against multidrug resistant Enterobacteriaceae strains and the synergistic interactions between EO and some conventional antibiotics were also explored.

The Enterobacteriaceae isolates were tested for antimicrobial susceptibility using disk diffusion method. The isolated strains were also analyzed using PCR and sequencing for the detection of *bla*_{ESBL} (CTX-M of groupe 1, 2, 8 and 9, SHV and TEM) and *qnr* genes (*qnrA*, *qnrB* and *qnrS*). The antibacterial activity was investigated by disc diffusion and broth micro-dilution methods. Checkerboard test was used to evaluate the interaction of EO in combination with some conventional antibiotics.

This study revealed high levels of antimicrobial resistance against the commonly used antibiotics for treating poultry diseases in Algeria. Molecular characterization results showed the presence of *qnr* and/or *bla*_{ESBL} genes in *E. coli* strains isolated from the ovaries of broiler breeders and broiler hatching eggs. Furthermore, the results of the present study showed that the tested EO contain a potent activity against all the tested multidrug resistant Enterobacteriaceae isolates. The combination of the EO with some antibiotics revealed a synergistic effect against some multidrug resistant Enterobacteriaceae isolates.

Overall, all the results obtained during the present study point towards an increase in the levels of multidrug resistance. Our results showed also that the tested EO alone or in combination with conventional antibiotics could be a relevant alternative against multidrug resistant Enterobacteriaceae. However, further investigations are needed to understand the mode of action of the tested EO in particular and the EO in general.

Keywords : Algeria, antimicrobial resistance, *Bubonium imbricatum*, *Cladanthus arabicus* enterobacteriaceae, EO, ESBL, poultry, *qnr*, Synergy, *Thymus vulgaris*.

ملخص

إن انتشار سلالات بكتيريا الأمعاء (entérobactéries) المقاومة للمضادات الحيوية في بعض أنظمة الإنتاج الحيواني في جميع أنحاء العالم أمر مثير للقلق، مما يتطلب تطوير استراتيجيات علاجية جديدة. كان الهدف من هذه الدراسة هو تقييم نسبة مقاومة المضادات الحيوية في سلالات بكتيريا الأمعاء المعزولة من الدواجن في غرب الجزائر واختبار مدى حساسياتها للزيوت الأساسية المستخلصة من بعض النباتات الطبية (*Bubonium imbricatum*, *Cladanthus arabicus*) *Thymus vulgaris*). كما تم تقييم في هذه الدراسة مدى إمكانية التأزر بين الزيوت الأساسية وبعض المضادات الحيوية التقليدية.

أجريت دراسة مدى حساسية سلالات بكتيريا الأمعاء للمضادات الحيوية بواسطة طريقة نشر القرص. كما تم اختبار السلالات المعزولة بواسطة تقنيات البيولوجيا الجزيئية (PCR و séquençage) للبحث عن جينات ال *blaBLSE* (CTX-M من نوع 1, 2, 8, 9, SHV و TEM) وجينات ال *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*) . تم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا للزيوت الأساسية ضد بعض السلالات المعزولة بواسطة تقنية نشر القرص وطريقة التخفيف بالتسلسل في الميكروبلاتك (microplaque). كما تم استخدام طريقة الشيكربورد (Checkerboard) لتقييم التأثير التآزري المحتمل بين الزيوت الأساسية وبعض المضادات الحيوية التقليدية.

كشفت هذه الدراسة عن وجود مستويات عالية من المقاومة والمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية التي عادة ما تستخدم في علاج أمراض الطيور في الجزائر. لقد سمحت تقنيات البيولوجيا الجزيئية باكتشاف جينات ال *qnr* و/أو *blaBLSE* في سلالات بكتيريا الأمعاء المعزولة من البيض المخصص للتحصين ومبايض الدجاج المنتج للحم. أشارت نتائج اختبار الزيوت الأساسية عن وجود نشاط قوي مضاد للبكتيريا ضد جميع سلالات بكتيريا الأمعاء المتعددة المقاومة التي تم اختبارها. وقد أظهرت التركيبات بين الزيوت الأساسية وبعض المضادات الحيوية تأثيرًا تآزريًا ضد بعض السلالات المعوية.

بصفة عامة، تشير جميع النتائج التي تم الحصول عليها من خلال هذه الدراسة إلى زيادة في مستويات المقاومة المتعددة. كما أوضحت هذه الدراسة أن الزيوت الأساسية، بمفردها أو بالاشتراك مع بعض المضادات الحيوية التقليدية، يمكن أن تكون عاملاً علاجياً فعالاً ضد البكتيريا المعوية المقاومة للمضادات الحيوية. ومع ذلك، دراسات أخرى تبقى ضرورية لفهم طريقة عمل الزيوت الأساسية التي تم اختبارها في هذه الدراسة بشكل خاص والزيوت الأساسية بشكل عام.

الكلمات المفتاحية : بكتيريا الأمعاء، مقاومة المضادات الحيوية، تربية الدواجن، الزيوت الأساسية ، التآزر ،

Thymus vulgaris, *qnr*, ESBL, *Cladanthus arabicus*, *Bubonium imbricatum*

SOMMAIRE

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des sigles et abréviations

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction..... 01

Chapitre I : Antibiotiques et antibiorésistance

1. Antibiotique.....	04
1.1. Définition.....	04
1.2. Découverte des antibiotiques.....	04
1.3. Classification.....	05
1.4. Mécanismes d'action.....	05
1.4.1. Antibiotiques inhibant la synthèse du peptidoglycane.....	06
1.4.1.1. Les glycopeptides	06
1.4.1.2. La fosfomycine	06
1.4.1.3. Les bêta-lactamines	07
1.4.1.3.1. Les pénicillines	07
1.4.1.3.2. Les céphalosporines.....	08
1.4.1.3.3. Les monobactames	09
1.4.1.3.4. Les carbapénèmes	09
1.4.2. Antibiotiques avec une action sur la membrane	09
1.4.3. Antibiotiques qui inhibent la synthèse protéique	10
1.4.3.1. Les aminosides.....	10
1.4.3.2. Les tétracyclines	10
1.4.3.3. Les macrolides	11
1.4.4. Antibiotiques agissant sur les acides nucléiques.....	11
1.4.4.1. La rifampicine	11
1.4.4.2. Les quinolones.....	12
1.4.5. Antibiotiques qui inhibent une voie métabolique	12
2. Résistance aux antibiotiques.....	13
2.1. Définition.....	13
2.2. Relation entre l'utilisation des antibiotiques et l'apparition de la résistance	13
2.2.1. Facteur « nombre d'animaux traités ».....	14
2.2.2. Facteur « pression de sélection ».....	14
2.3. Impact de l'antibiorésistance.....	15
2.4. Mécanismes biochimiques de la résistance aux antibiotiques	16
2.4.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique	16
2.4.2. Modification ou remplacement de la cible de l'antibiotique	17
2.4.3. Imperméabilité aux antibiotiques	17
2.4.4. Pompes à efflux	17
2.4.5. Protection de la cible de l'antibiotique	17
2.5. Point de situation de l'antibiorésistance dans la filière avicole en Algérie.....	18
2.5.1. Présentation succincte de la filière avicole en Algérie.....	18
2.5.2. Consommation d'antibiotiques.....	18

2.5.3. Etat des lieux de la résistance aux antibiotiques en Algérie.....	19
2.6. Le concept « One Health » et l'antibiorésistance	20
2.7. Prévention	20

Chapitre II : Supports de la résistance aux antibiotiques

1. Supports génétiques de la résistance.....	22
1.1. Le chromosome	22
1.1.1. Résistance naturelle	22
1.1.2. Résistance acquise	22
1.2. Les éléments génétiques mobiles	22
1.2.1. Les plasmides	23
1.2.2. Séquences d'insertion et transposons	23
1.2.3. Les intégrons	24
2. Physiopathologie de la résistance aux quinolones	24
2.1. Mécanismes d'action des quinolones	24
2.2. Mécanismes de résistance aux quinolones	25
1.2.1. Mécanismes chromosomiques	25
1.2.2. Mécanismes plasmidiques	26
1.2.2.1. Les mécanismes Qnr	26
1.2.2.1.1. Découverte des gènes <i>qnr</i>	26
2.2.2.1.2. Mode d'action des protéines Qnr	27
2.2.2.1.3. L'activité de résistance de Qnr	27
2.2.2.1.4. Supports et environnement génétique des gènes <i>qnr</i>	28
2.2.2.1.5. Épidémiologie des déterminants <i>qnr</i>	28
2.2.2.2. Inactivation enzymatique des quinolones par <i>Aac(6')-Ib-cr</i>	29
2.2.2.3. Les pompes à efflux plasmidiques	30
2.2.2.3.1. La pompe à efflux <i>QepA</i>	30
2.2.2.3.2. La pompe à efflux <i>OqxAB</i>	30
2.2.2.3.3. La pompe à efflux <i>QacBIII</i>	30
2.3. Détection des premiers niveaux de résistance.....	31
3. Physiopathologie de la résistance aux β -lactamines.....	32
3.1. Mécanismes d'action des β -lactamines.....	32
3.2. Mécanismes de résistance aux β -lactamines	32
3.2.1. Résistances non enzymatiques.....	32
3.2.2. Production de β -lactamases.....	32
3.2.2.1. Classification des β -lactamases.....	33
3.2.2.2. Classification phylogénétique des BLSE.....	34
3.2.2.2.1. BLSE de type TEM.....	34
3.2.2.2.2. BLSE de type SHV.....	35
3.2.2.2.3. BLSE de type CTX-M	35
3.2.2.3. Détection des BLSE.....	36
3.3. Épidémiologie des entérobactéries productrices de BLSE.....	37
4. Caractérisation des gènes de résistance aux antibiotiques.....	38
4.1. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	38
4.2. Puces à ADN.....	38
4.3. Séquençage.....	39
5. Méthodes de typage épidémiologique moléculaire.....	40
4. Les animaux réservoirs des gènes de résistance aux antibiotiques.....	41

Chapitre III : Solutions alternatives

1. Les bactériophages.....	42
2. Les probiotiques.....	43
3. Les anticorps.....	43
4. Les huiles essentielles (HE).....	44
4.1. Procédés d'obtention des HE.....	45
4.2. Composition chimique des HE.....	45
4.2.1. Groupe des terpènes et terpénoïdes	46
4.2.2. Groupe des phénylpropanoïdes	46
4.2.3. Composés nitriques et sulfuriques.....	47
4.3. Méthodes de détermination des constituants de l'HE.....	47
4.4. Propriétés des HE.....	49
4.5. Propriétés antibactériennes des HE.....	50
4.6. Mécanismes d'action antibactérienne des HE.....	50
4.6.1. Action sur la membrane cellulaire	51
4.6.2. Action sur les acides gras membranaires.....	51
4.6.3. Action sur les protéines	52
4.6.4. Mode d'action ciblant le taux d'ATP	52
4.6.5. Action contre le Quorum Sensing (QS)	52
4.7. Toxicité des HE.....	53
4.8. Applications des HE.....	54

PARTIE EXPERIMENTALE

Problématique et objectifs.....	56
---------------------------------	----

Etude I : Caractérisation des entérobactéries résistantes aux quinolones d'origine aviaire isolées dans l'ouest Algérien : L'émergence de la résistance de type qnrS chez Enterobacter cloacae.....

58

1. Introduction.....	58
2. Matériel et Méthodes.....	59
2.1. Souches bactériennes.....	59
2.2. Etude de la sensibilité aux antibiotiques	59
2.3. Détection des gènes de résistance.....	60
2.4. Analyse statistique.....	60
3. Résultats et discussion	61
3.1. Sensibilité aux antibiotiques des souches d'entérobactéries	61
3.2. Etude des souches porteuses des gènes de résistance aux quinolones	62
4. Conclusion.....	65

Etude II : Présence d'un clone d'E. coli porteur de gènes CTX-M-1 et qnrS1 dans les organes reproducteurs des poules reproductrices chair et les œufs à couver.....

66

1. Introduction.....	66
2. Matériel et Méthodes.....	67
2.1. Souches bactériennes.....	67
2.2. Etude de la Sensibilité aux antibiotiques	67
2.3. PCR et séquençage.....	68
2.4. Multi Locus Sequence Typing (MLST).....	68

3. Résultats et Discussion.....	68
4. Conclusion.....	72

Etude III : Mise en évidence d'*E. coli* multi-résistantes aux antibiotiques dans les ovaires des poules reproductrices chair saines et de souches BLSE..... 73

1. Introduction.....	73
2. Matériel et Méthodes.....	73
2.1. Zone d'étude et échantillonnage	73
2.2. Isolement des souches bactériennes, étude de la sensibilité aux antibiotiques et caractérisation des gènes de résistance.....	74
3. Résultats et discussion.....	74
3.1. Mise en évidence de souches d' <i>E. coli</i> résistantes à de nombreux antibiotiques de première intention.....	74
3.2. Mise en évidence d'une résistance multiple chez les souches d' <i>E. coli</i> isolées.....	76
3.3. Mise en évidence de gènes de β -lactamases à spectre étendu.....	77
4. Conclusion.....	79

Etude IV : Activité antibactérienne des huiles essentielles de *Cladanthus arabicus* et de *Bubonium imbricatum* seules et en combinaison avec des antibiotiques conventionnels vis-à-vis des souches d'entérobactéries multi-résistantes aux antibiotiques..... 80

1. Introduction.....	80
2. Matériel et Méthodes.....	80
2.1. Matériel végétal et procédure d'extraction	80
2.2. Souches bactériennes et l'étude de la sensibilité aux antibiotiques	81
2.3. Détermination de l'activité antibactérienne des deux HE par la méthode de diffusion sur gélose	82
2.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des deux HE et des antibiotiques conventionnels.....	82
2.5. Test en synergie entre les HE et les antibiotiques conventionnels.....	83
2.6. Analyse statistique.....	83
3. Résultats et discussion.....	84
3.1. Identification des souches bactériennes	84
3.2. Sensibilité aux antibiotiques.....	84
3.3. Activité antibactérienne des HE de <i>C. arabicus</i> et <i>B. imbricatum</i>	84
3.4. Effet synergique entre les HE et les antibiotiques.....	87
4. Conclusion.....	90

Etude V : Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *thymus vulgaris* seul et ou associé au céfotaxime vis-à-vis des souches d'entérobactéries productrices de BLSE..... 91

1. Introduction.....	91
2. Matériel et Méthodes.....	92
2.1. Source de matériel.....	92
2.2. Analyse chimique de l'HETV par chromatographie gazeuse/ spectrophotométrie de masse (GC/MS).....	92
2.3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques	93
2.4. Évaluation de l'activité antimicrobienne.....	93
2.5. Analyse statistique.....	93

3. Résultats et discussion.....	94
3.1. Composition chimique de l’HETV	94
3.2. Sensibilité aux antibiotiques des souches sélectionnées.....	95
3.3. Activité antimicrobienne de l’HETV.....	96
4. Conclusion.....	98
DISCUSSION GENERALE.....	99
CONCLUSION GENERALE, RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES.....	103
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	106

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Multi-résistance aux antibiotiques chez les souches d'entérobactéries isolées...	62
Tableau 2 : Sensibilité aux antibiotiques et variant de gènes <i>qnr</i> détecté dans les souches d'entérobactéries étudiées.....	64
Tableau 3 : Caractéristiques des souches d' <i>E. coli</i> isolées.....	69
Tableau 4 : Caractéristiques des souches d' <i>E. coli</i> productrices de BLSE isolées des ovaires des poules reproductrices chair saines	77
Tableau 5: Profil de résistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries sélectionnées	84
Tableau 6 : Diamètres des zones d'inhibition des HE testées et leurs effets synergiques avec des antibiotiques conventionnels	85
Tableau 7 : Valeurs des CMI obtenues pour les HE de <i>C. arabicus</i> et <i>B. imbricatum</i>	86
Tableau 8 : Valeurs des FICI des HE en combinaison avec l'amoxicilline et la néomycine vis-à-vis des isolats d'entérobactéries	87
Tableau 9 : Gains des CMI obtenus pour l'amoxicilline et la néomycine en synergie avec les HE	88
Tableau 10 : Composition chimique de l'HETV déterminée par CPG/SM	94
Tableau 11 : Caractéristiques des souches d'entérobactéries testées	95
Tableau 12 : Diamètres des zones d'inhibition et les valeurs des CMI de l'HETV	97
Tableau 13 : FICI de l'HETV en combinaison avec le CTX	97

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Mode d'action des antibiotiques	6
Figure 2 : Relation chronologique entre l'introduction des antibiotiques et l'apparition de résistance	14
Figure 3 : Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle β -lactame	33
Figure 4 : Classification phylogénétique des BLSE	34
Figure 5 : Groupes phylogénique de CTX-M	36
Figure 6 : Structure chimique des chémotypes contenus dans les HE.....	46
Figure 7: Schéma de l'appareil de CPG.....	48
Figure 8: Mécanismes d'action des HE sur la cellule bactérienne.....	51
Figure 9 : Fréquence de résistance aux antibiotiques des espèces d'entérobactéries prédominantes	61
Figure 10: Test de synergie positif.....	70
Figure 11: Pourcentage de résistance aux antibiotiques des souches d' <i>E. coli</i> isolées des ovaires des poules reproductrices chair saines.....	75
Figure 12: Multi-résistances aux antibiotiques chez <i>E. coli</i> isolées des ovaires des poules reproductrices chair.....	76
Figure 13 : Partie aérienne de <i>Cladanthus arabicus</i>	81
Figure 14 : Partie aérienne de <i>Bubonium imbricatum</i>	81
Figure 15 : Effet synergique entre l'HE de <i>B. imbricatum</i> et l'amoxicilline vis-à-vis de <i>Proteus mirabilis</i>	89
Figure 16 : Effet synergique entre l'HE de <i>C. arabicus</i> et l'amoxicilline vis-à-vis de <i>Proteus mirabilis</i>	89
Figure 17 : Partie aérienne de <i>Thymus vulgaris</i>	92

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMC : Amoxicilline + acide clavulanique

AM : Amoxicilline

ATB : Antibiotique

ATCC : American Type Culture Collection

BI : *Bubonium imbricatum*

BLSE : Béta-Lactamase à Spectre Elargi ou Etendu

BMH : Bouillon Muller Hinton

C : Chloramphénicol

CA : *Cladanthus arabicus*

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

CIP : Ciprofloxacine

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice

CN : Gentamycine

CT : Colistine

CTX : Céfotaxime

C3G : Céphalosporines de 3^{ième} Génération

EFSA : European Food Safety Authority

EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FDA : Food and Drug Administration

FIC : Concentration Inhibitrice Fractionnaire

FICI : Indice de Concentration Inhibitrice Fractionnaire

FT : Nitrofurantoïne

HE : Huile Essentielle

HETV : Huile Essentielle de *Thymus Vulgaris*

IS : Insertion Sequence

LEV : Lévolofloxacine

N : Néomycine

NA : Acide nalidixique

ND: Non Déterminé

OMS : Organisation mondiale de la santé.

p : Seuil de significativité statistique

P: positif

pb : paires de bases

PCR : Polymérase Chain Reaction

pH : potentiel Hydrogène

PLP : Protéines liants la pénicilline

Qnr : Quinolone résistance

SXT : Triméthoprim + sulfaméthoxazol

TE : Tétracycline

TMP : Triméthoprime

TV : *Thymus Vulgaris*

UB : Fluméquine

XNL : Ceftiofur

ZI : Zone d'Inhibition

Introduction

Introduction

L'élevage avicole constitue une source non négligeable d'apport protéique dans les pays en voie de développement. L'aviculture est l'une des voies sur lesquelles s'est engagée l'Afrique afin d'augmenter la production animale. En Algérie, la filière avicole a connu depuis 1980 un développement notable, soutenu par une politique incitative (Alloui, 2011). En effet, la production nationale de viande blanche a atteint, en 2017, une production de 5,3 millions de quintaux, contre 2,092 millions de quintaux en 2009 et la production d'œufs de consommation a atteint les 6,6 milliards d'unités produites en 2017 contre 3,8 milliards unités en 2009 (MADR, 2017). Cependant, les pratiques d'élevage accusent un retard technologique considérable par rapport aux pays industrialisés.

Les antibiotiques ont constitué une découverte thérapeutique majeure pour la santé humaine et animale. Leur utilisation a permis de diminuer le taux de mortalité et de morbidité mondiale depuis longtemps. La production et la dissémination de centaines de milliers de tonnes d'antibiotiques, tous usages confondus (médecine humaine et vétérinaire, élevage et agriculture), ont constitué depuis un demi-siècle un stress nouveau auquel le monde bactérien a fait face sans trop de difficulté. La consommation des antibiotiques a explosé de manière fulgurante dans le monde, avec une augmentation de 65% entre 2000-2015, et l'Algérie figure parmi les six plus grand pays consommateurs d'antibiotiques dans le monde (Klein et al., 2018). L'utilisation souvent abusive et irréfléchie des antibiotiques a eu pour conséquence de faire émerger certaines formes de résistances des souches microbiennes contrebalançant l'efficacité des antibiotiques (Goossens et al., 2005). La résistance aux antibiotiques est devenue un risque de santé publique majeur touchant à la fois la santé humaine et la santé animale. A ce titre, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) l'a décrétée comme l'un des trois plus importants problèmes de santé du 21^e siècle.

L'évolution rapide de la résistance bactérienne aux antibiotiques est un phénomène particulièrement préoccupant dans les pays en voie de développement tels que certains pays africains où les pathogènes résistants aux antibiotiques peuvent avoir une plus forte prévalence (Bradford, 2001). En effet, certaines souches arrivent à rétablir une multi-résistance vis-à-vis de plusieurs antibiotiques à la fois donnant lieu à ce qu'on appelle les bactéries multi-résistantes aux antibiotiques (Chaudhary, 2016). Ces résistances ont été rencontrées principalement chez différentes espèces d'entérobactéries, dont *Escherichia coli*, qui sont quasiment résistantes à tous les antibiotiques prescrits (Chaudhary, 2016).

En Algérie, de nombreuses études ont signalé la dissémination des souches d'*E. coli* multi-résistantes en élevages avicoles (Aggad et al., 2010; Benameur et al., 2014; Benameur et al., 2016; Halfaoui et al., 2018; Hammoudi et Aggad, 2008). Cependant, très peu de données publiées sont disponibles sur la résistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries d'origine animale autres que *E. coli* et *Salmonella* spp., en Algérie.

Les antibiotiques d'importance critique utilisés en médecine humaine et vétérinaire sont principalement les céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) et les fluoroquinolones. Dans le cadre des plans de surveillance européen, certains mécanismes de résistance chez les entérobactéries font l'objet d'une surveillance ciblée. Il s'agit des β -lactamases à spectre étendue (BLSE) chez les entérobactéries qui ont la capacité de détruire différentes classes de β -lactamine dont les C3G et ceux de la résistance plasmidique aux quinolones de type Qnr qui rendent inactifs les quinolones et favorisent la sélection des souches résistantes aux fluoroquinolones, classe d'antibiotique de haute importance chez l'homme. En effet, ces dix dernières années ont été marquées par l'émergence et la dissémination des gènes de résistance à ces deux familles d'antibiotiques en médecine humaine (Gharout-Sait et al., 2012; Meradi et al., 2011) et vétérinaire (Belmahdi et al., 2016; Chabou et al., 2017; Meguenni et al., 2015) en Algérie.

L'impact de cette multi-résistance aux antibiotiques est important au niveau clinique en termes de morbidité et de mortalité, conduisant à une diminution du cheptel, mais aussi sur le plan économique (antibiothérapie prolongée) et sur l'écologie des flores microbiennes (Wenzel, 2004). Le problème d'une éventuelle transmission à l'homme des souches bactériennes résistantes sélectionnées chez l'animal a été très tôt posé par l'OMS en 1977 ainsi que son impact sur la santé humaine (OMS, 2015).

Le risque associé à ce problème s'est donc majoré ces vingt dernières années dans un contexte d'une industrie pharmaceutique peu encline à développer de nouvelles molécules antibiotiques. Pour faire face à cette situation, beaucoup d'études ont été réalisées pour développer des molécules alternatives efficaces contre ces bactéries multi-résistantes. Les plantes médicinales et aromatiques constituent une source importante de molécules bioactives qui pourraient être exploitées dans la thérapie des maladies infectieuses (Griffin et al., 1999; Talbaoui et al., 2012). En effet, depuis l'Antiquité, les plantes et leurs dérivés, tels que les huiles essentielles (HE), ont été utilisés en médecine traditionnelle.

Aussi, la présente thèse a été une contribution à l'étude de la fréquence de résistance et de multi-résistance des entérobactéries d'origine aviaire dans l'ouest Algérien et la mise en évidence des gènes de résistance aux quinolones et aux C3G. Par ailleurs, l'activité antibactérienne des HE de certaines plantes médicinales seules et en association avec des antibiotiques conventionnels a également été évaluée.

La première partie du manuscrit a été consacrée à une synthèse bibliographique portant sur la résistance aux antibiotiques, les supports de l'antibiorésistance et les solutions alternatives possibles.

La seconde partie, organisée en cinq études, s'articule autour de deux axes principaux :

Dans un premier temps nous avons évalués la fréquence de résistance et de multi-résistance des entérobactéries d'origine aviaire dans l'ouest Algérien et la détection des souches productrices de BLSE. La recherche des gènes de résistance aux quinolones (*qnrA*, *qnrB* et *qnrS*) et aux C3G (CTX-M du groupe 1, 2, 8 et 9, TEM et SHV) a été également réalisée. En outre, La mise en évidence de souches d'*E. coli* multi-résistantes aux antibiotiques dans les ovaires des poules reproductrices chair et le contenu interne des œufs à couver a été explorée.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'activité antibactérienne des HE de trois plantes (*Cladanthus arabicus*, *Bubonium imbricatum* et *Thymus vulgaris*) sur quelques souches d'entérobactéries multi-résistantes. Par ailleurs, l'effet synergique entre les HE et certains antibiotiques conventionnels a également été évalué.

Enfin, les résultats des cinq études menées ont été discutés et les perspectives ultérieures d'études présentées.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

*Chapitre I : Antibiotiques
et antibiorésistance*

Chapitre I : Antibiotiques et antibiorésistance

1. Antibiotiques

1.1. Définition

Etymologiquement le terme « antimicrobien » (du grec *anti* : contre, *mikros* : petit et *bios* : vie), désigne toute substance capable d'agir contre la vie des microorganismes, alors que celui d'antibiotique (du grec *anti* : contre, *biotikos* : concernant la vie), utilisé pour la première fois en 1889, en référence à une substance synthétisée par un organisme pour en détruire un autre, se précisera plus tard, comme une substance chimique produite par un microorganisme et disposant en solution diluée de la capacité d'inhiber sélectivement la croissance, voir même de détruire d'autres microorganismes. Les composés utilisés à des fins thérapeutiques lors de maladies bactériennes chez l'homme et les animaux sont fréquemment appelés, par les professionnels de la santé ainsi que par les profanes, antibiotiques. Pourtant, ce terme est bien souvent utilisé de façon erronée et subit régulièrement un élargissement de son sens (Muylaert et Mainil, 2012). En effet, la définition du mot antibiotique réfère strictement aux substances antimicrobiennes d'origine naturelle, et selon cette notion, ce terme ne devraient donc pas être employé pour qualifier des substances synthétiques telles que les sulfamidés et les quinolones, ou semi-synthétiques telles que l'amoxicilline et l'amikacine (Guardabassi et Courvalin, 2006).

1.2. Découverte des antibiotiques

En 1929, Alexander Fleming (1881-1955) observe que la croissance d'un champignon, *Penicillium notatum*, semble avoir une activité antimicrobienne sur ses cultures de *Staphylococcus aureus* (Fleming, 1929). Une molécule libérée par le champignon inhibait dans la zone adjacente à sa pousse la croissance bactérienne. Il donnera le nom de pénicilline à cet inhibiteur d'après son organisme d'origine.

L'instabilité de la molécule et sa difficulté d'extraction ne lui permettront pas de poursuivre vers une application thérapeutique. Ce sont les recherches d'Ernst Chain et Howard Florey qui rendront cette utilisation possible en 1940 (Kardos et Demain, 2013). Depuis l'introduction de la pénicilline, un grand nombre d'agents antibactériens a été développé et commercialisé à des fins thérapeutiques, réduisant ainsi l'importante morbidité et mortalité

humaines associées aux infections bactériennes observées avant « l'ère des antibiotiques » (Muylaert et Mainil, 2012).

En plus des bénéfices évidents pour la santé humaine, l'introduction et l'usage des antimicrobiens en médecine vétérinaire ont, sans nul doute, contribué à l'amélioration de la productivité et de la santé animale au cours des dernières décennies (Johnston, 1998; Piddock, 1996). En agriculture, ils sont également employés en prophylaxie pour limiter l'apparition et la dissémination de maladies, mais aussi comme facteurs de croissance à des doses sub-thérapeutiques, pour une longue durée et sur un grand nombre d'animaux (McEwen et Fedorka-Cray, 2002).

1.3. Classification

La classification des antibiotiques repose sur différents critères : leur origine (produit naturellement par des champignons, des bacilles ou des *Streptomyces*, ou bien issus du génie chimique), leurs caractéristiques chimiques (dérivés d'acides aminés, hétérosidiques ou polycycliques), physiques (hydrophile, hydrophobe ou lipophile...), pharmacodynamiques et pharmacocinétiques ou leur spectre d'activité antibactérienne (Gram+, Gram-, spectre large ou étroit).

Les antibiotiques peuvent également être classés suivant qu'ils soient bactéricides ou bactériostatiques (Alanis, 2005), suivant leur mode d'action. Par définition, un antibiotique bactéricide est une molécule qui stoppe la croissance bactérienne et tue l'agent pathogène tandis qu'un antibiotique bactériostatique est une molécule qui inhibe la croissance bactérienne sans tuer la bactérie.

1.4. Mécanismes d'action

Les antibiotiques agissent essentiellement par l'inhibition spécifique d'une étape précise d'une fonction bactérienne (Figure 1). Ils se fixent sur des sites moléculaires de la cellule bactérienne entraînant ainsi la perturbation de diverses réactions métaboliques, sans affecter la cellule hôte, ce qui nécessite la connaissance, de plus en plus précise, des fonctions spécifiques et vitales de la bactérie, lesquelles, pourraient constituer des cibles potentielles. Ces dernières sont caractéristiques de chaque famille (Poyart, 2003).

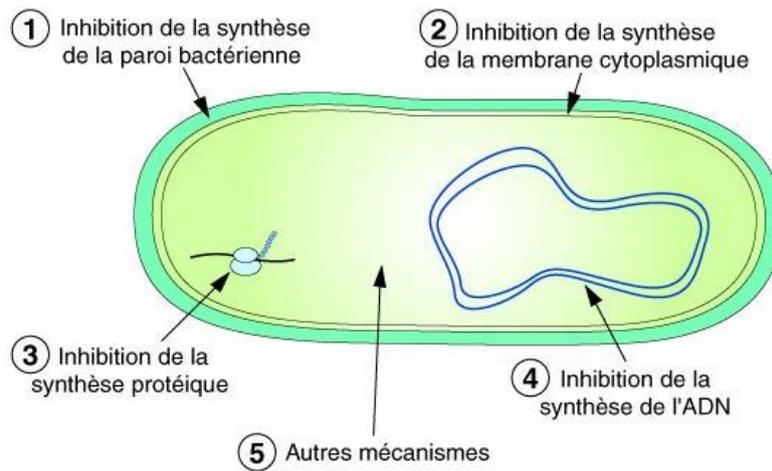


Figure 1 : Mode d'action des antibiotiques (www.bacteriologie.net)

1.4.1. Antibiotiques inhibant la synthèse du peptidoglycane

1.4.1.1. Les glycopeptides

Ce sont des molécules complexes dont le spectre d'action est limité aux bactéries Gram+ puisqu'ils ne peuvent pas traverser la membrane externe des bactéries Gram-. Ils se fixent au niveau des extrémités peptidyl-D-Ala-D-Ala des précurseurs lipopeptidiques du peptidoglycane lors de leur transport à travers la membrane cytoplasmique et inhibent ainsi les étapes de transglycosylation et transpeptidation (Talarmin, 2016). La vancomycine introduite en 1958 en clinique et la teicoplanine, en 1988, sont les représentants de la première génération (Binda et al., 2014).

1.4.1.2. La fosfomycine

La fosfomycine, après pénétration dans le cytoplasme de la bactérie grâce à un transport actif, se lie par une liaison covalente à un résidu cystéine de la pyruvyltransférase inhibant ainsi la conversion de l'UDP-N-acétylglucosamine en acide UDP-N-acétylmuramique. Il s'agit d'un antibiotique à activité bactéricide qui est utilisé, en association avec le trométamol qui améliore son adsorption digestive, essentiellement en monodose comme traitement de première intention de la cystite non compliquée (Talarmin, 2016).

1.4.1.3. Les β -lactamines

Les β -lactamines ont toutes en commun un noyau bêta-lactame auquel va se lier un hétérocycle différent selon qu'il s'agit des pénicillines, des céphalosporines, des carbapénèmes ou des monobactames. Elles possèdent une analogie structurale avec le dipeptide D-alanyl-D-alanine ce qui leur permet d'inhiber les protéines liant la pénicilline qui se trouvent sur la surface externe de la membrane cytoplasmique et ainsi d'inhiber la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane. Leur spectre d'action est fonction de leur affinité pour les PLP, de leur capacité à traverser la membrane externe pour atteindre les PLP localisées dans l'espace périplasmique et de la présence de β -lactamases naturellement produites par certaines espèces bactériennes (Talarmin, 2016).

1.4.1.3.1. Les pénicillines

Les pénicillines sont formées du cycle β -lactame associé à un cycle thiazolidine et sont les premiers antibiotiques qui ont été synthétisés de manière industrielle (Kong et al., 2010). Elles sont divisées en plusieurs molécules :

- Les pénicillines naturelles, comme les pénicillines G et V (respectivement benzylpénicilline et phénoxy-pénicilline), qui sont utilisées pour traiter les infections à bactéries Gram+ aérobies et sont sensibles aux pénicillinases.
- Les pénicillines résistantes aux pénicillinases, aussi appelées pénicillines M comme la méthicilline, l'oxacilline et la cloxacilline, qui sont surtout utilisées pour traiter des infections impliquant des souches de staphylocoques produisant des pénicillinases.
- Les aminopénicillines, comme l'ampicilline et l'amoxicilline. Leur groupement amine les rend plus hydrophiles, ce qui facilite leur prise en charge par les porines présentes chez les Gram-. Elles sont utilisées contre les bactéries à Gram+ aérobies, les coques à Gram- et certaines entérobactéries comme *E. coli* et *P. mirabilis* par exemple. Elles sont sensibles aux pénicillinases, et de ce fait, utilisées en combinaison avec un inhibiteur de β -lactamases, par exemple amoxicilline + acide clavulanique (Augmentin®).
- Les pénicillines à large spectre (ou carboxypénicillines) comme la ticarcilline, la carbénicilline, dont les groupements en chaîne latérale les rendent plus perméantes encore que les aminopénicillines pour les bactéries à Gram- et plus résistantes aux

pénicillinases. Elles sont utilisables contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* et *Enterobacter*.

- Les uréidopénicillines, comme la pipéracilline administrable par voie intraveineuse et intramusculaire, sont également des pénicillines antipycyaniques et sensibles aux pénicillinases. Par conséquent, la pipéracilline peut être associée au Tazobactam (Tazocilline®) (Boutal, 2017).

1.4.1.3.2. Les céphalosporines

Chez les céphalosporines, le cycle thiazolidine est remplacé par un cycle dihydrothiazine qui possède un carbone supplémentaire. Elles ont été découvertes par Giuseppe Brotzu en 1940 à partir d'un champignon, *Cephalosporium acremonium*. Actuellement, il existe quatre générations de céphalosporines classées selon leur date de mise sur le marché et leur spectre d'activité.

- Les céphalosporines de première génération (C1G : céfalotine, céfazoline), avec un spectre d'action comparable aux pénicillines M, sont actives contre les cocci à Gram+ et certains bacilles à Gram-, mais elles restent toutefois sensibles aux pénicillinases.
- Les céphalosporines de deuxième génération (C2G : céfamandole, céfuroxime et céfoxitine), sont plus résistantes aux β -lactamases. Elles possèdent un spectre d'action plus large (vers les Gram-) et une meilleure diffusion tissulaire que les C1G. Elles sont notamment utilisables dans des infections respiratoires, urinaires et ostéo-articulaires.
- Les céphalosporines de troisième génération (C3G : céfotaxime, ceftazidime et ceftriaxone) ont un spectre d'action moindre pour les Gram+ mais plus élargi pour les Gram- (Paladino et al., 2008) telles que les entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa*. Elles sont utilisables à plus faible concentration et sont plus résistantes aux céphalosporinases que les C1G et C2G. Elles sont principalement employées dans le traitement d'infections nosocomiales. Elles offrent une bonne pénétration tissulaire et traversent la barrière hémato-encéphalique. Malheureusement ces molécules sont hydrolysées par les céphalosporinases (à spectre étendu).
- Les céphalosporines de quatrième génération (C4G : céfépime et ceftiprome), résistent mieux à l'hydrolyse des céphalosporinases que les C3G. De plus elles ont une meilleure affinité pour les protéines liants la pénicilline (PLP) (Boutal, 2017).

Dans certains cas les β -lactamines sont utilisées en association avec des inhibiteurs de β -lactamases ce qui permet d'élargir le spectre antibactérien ou de restaurer une activité sur certaines espèces devenues résistantes. Les trois cités le plus souvent sont l'acide clavulanique, le tazobactam et le sulbactam. Ces molécules sont des substrats suicides des β -lactamases auxquelles ils se lient de façon irréversible, protégeant ainsi les β -lactamines de l'inactivation enzymatique (Drawz et Bonomo, 2010).

1.4.1.3.3. Les monobactames

Représentés par l'aztréonam (Le Noc. 1999), qui a une activité sur les bacilles à Gram négatif comparable à celles des céphalosporines de 3^{ème} génération, mais elle est inactive sur les bactéries à Gram+ et les anaérobies.

1.4.1.3.4. Les carbapénèmes

Les carbapénèmes sont les β -lactamines les plus récemment développées avec le spectre d'activité le plus large : Gram- et Gram+. De plus, ils sont résistants à la plus part des β -lactamases, y compris les β -lactamases à spectre élargi, et sont donc des candidats de choix pour traiter des infections impliquant des organismes résistants. Ce sont des antibiotiques dits de "dernier recours". L'imipénème est, de toutes les β -lactamines, celle avec le spectre le plus large. Leur usage est principalement limité au milieu hospitalier pour traiter les infections nosocomiales, mais l'incidence des entérobactéries produisant des BLSE tant à l'hôpital que dans la population pourrait entraîner une augmentation de leur utilisation (Pitout et Laupland, 2008).

1.4.2. Antibiotiques avec une action sur la membrane

Les polymyxines sont des antibiotiques produits naturellement par des espèces de *Paenibacillus polymyxa*. Plusieurs classes (A, B, C, D et E) existent mais seules deux sont utilisées en clinique. Il s'agit de la polymyxine B et de la polymyxine E aussi appelée colistine (Dortet et al., 2016). Ce sont des composés constitués d'un cycle de 7 acides aminés et d'une chaîne latérale sur laquelle est lié un acide gras. Ils ont donc des propriétés hydrophiles et lipophiles responsables de leurs modes d'action antibactériens. Le principal consiste en la déstabilisation des membranes bactériennes. Les polymyxines se fixent au lipide A, constituant du lipopolysaccharide (LPS) ce qui aboutit à la perméabilisation de la membrane externe. La membrane interne est à son tour lysée par les polymyxines ayant atteint

l'espace périplasmique. Les polymyxines ne sont efficaces que sur les bactéries à Gram-. Elles présentent une néphrotoxicité mais leur utilisation a regagné de l'intérêt pour le traitement d'infections dues à des bactéries à Gram- multi-résistantes (Abdelraouf et al., 2012). La daptomycine appartient à une nouvelle classe d'antibiotique uniquement active sur les bactéries Gram+. Par fixation sur leur membrane cytoplasmique, elle provoque la formation de canaux ioniques entraînant une fuite de potassium et une dépolarisation membranaire.

1.4.3. Antibiotiques inhibant la synthèse protéique

1.4.3.1. Les aminosides

Les aminoglycosides ou aminosides sont les premiers antibiotiques découverts après un criblage systématique de l'activité biologique de produits issus des cultures de *Streptomyces* spp. par Selman Waksman (1888-1973). La streptomycine est la première molécule découverte de cette famille et sera introduite en thérapie en 1944. Ce sont des antibiotiques à large spectre avec une activité contre les bactéries à Gram- et les Mycobactéries (Boutal, 2017).

Les aminosides pénètrent dans le cytoplasme au travers de la membrane cytoplasmique grâce aux enzymes qui constituent la chaîne respiratoire ; leur spectre d'action se limite donc aux bactéries aérobies. Les aminosides vont ensuite se fixer sur la sous-unité 30S des ribosomes mais également à la sous-unité 50S et vont altérer le métabolisme glucidique. Il en résulte une accumulation d'erreurs dans les protéines synthétisées entraînant une désorganisation de la membrane bactérienne et une perte de son intégrité fonctionnelle. Les antibiotiques altérant la paroi comme les β -lactamines ou les glycopeptides vont faciliter leur pénétration et sont souvent utilisés en association pour cet effet synergique (Talarmin, 2016).

1.4.3.2. Les tétracyclines

Les tétracyclines ont été découvertes dans les années 1940. Elles sont produites par *Streptomyces* spp. ou par héli-synthèse et sont des molécules à large spectre couvrant une large variété de bactéries à Gram+ et à Gram- et avec très peu d'effets secondaires (Boutal, 2017). Les tétracyclines vont atteindre leur cible après un passage de la membrane externe des Gram- par des porines puis un transport actif au travers de la membrane cytoplasmique via

des transporteurs. Elles agissent en se fixant sur la sous unité 30S ribosomale perturbant l'attachement du complexe ARN-t-AA sur le ribosome et en inhibant les systèmes enzymatiques bactériens par chélation des cations divalents. Ces antibiotiques à large spectre ont perdu beaucoup de leurs indications devant la diffusion de gènes de résistance (Talarmin, 2016).

1.4.3.3. Les macrolides

Les macrolides sont des molécules naturelles produites par *Streptomyces* spp. ou obtenues par hémi-synthèse. La première molécule isolée en 1950 a été appelée pikromycine à cause de son goût amer (du grec *pikro* signifiant amer). Ils sont constitués d'un noyau lactonique et sont classés en fonction de la taille de ce cycle sur lequel est fixé un sucre aminé et/ou un sucre neutre. Un des plus connus est l'érythromycine. Ils sont surtout efficaces contre les bactéries aérobies à Gram+. Du fait de l'imperméabilité partielle de la membrane externe des bactéries à Gram- à ces composés hydrophobes, leur concentration dans le cytoplasme est 100 fois plus faible que chez les Gram+ (Mao et Putterman, 1968). Les macrolides se fixent à la sous-unité 50S des ribosomes procaryotes au niveau du canal de sortie du peptide néo-synthétisé (George, 2017). L'inhibition de la synthèse protéique leur confère plutôt une activité bactériostatique (Boutal, 2017).

1.4.4. Antibiotiques agissant sur les acides nucléiques

1.4.4.1. La rifampicine

Cette molécule appartient à la famille des ansamycines qui sont des molécules lipophiles traversant facilement les membranes. Elles sont composées de deux cycles aromatiques reliés par une chaîne aliphatique (van Bambeke et al., 2017). La rifampicine est un dérivé hémi-synthétique de la ryfamycine B produite par *Nocardia mediterranei*. C'est une molécule à large spectre qui inhibe la transcription au niveau de son initiation par blocage de l'ARN polymérase ADN dépendante (Campbell et al., 2001). C'est un antibiotique bactéricide avec un effet post-antibiotique du fait de sa liaison irréversible à sa cible (Boutal, 2017). Il est aussi l'un des médicaments de choix des infections à mycobactéries. Des risques non négligeables de toxicité hépatique sont toutefois associés à son usage. De nouveaux dérivés (rifabutine) trouvent des indications particulières (patients immunodéprimés).

1.4.4.2. Les quinolones

Les quinolones sont une des trois principales familles d'antibiotiques utilisées en thérapeutique humaine et vétérinaire. Ce sont des antibactériens de synthèse dérivés de l'acide nalidixique, chef de file des quinolones classiques, longtemps indiquées dans le traitement des infections urinaires (Honoré et al., 2006). Les quinolones sont des dérivés de la quinoléine et toutes les molécules possèdent un cycle pyridine dont l'azote peut être diversement substitué (Soussy, 2006). Les quinolones sont des antibiotiques bactéricides et sont généralement classées en générations en fonction de leur spectre d'activité et de la chronologie de leur découverte :

- Les premières quinolones, dites de première génération (acide nalidixique, acide oxolinique, acide pipémidique), comprennent des molécules à spectre étroit utilisées dans le traitement des infections urinaires dues aux entérobactéries (Andriole, 2005).
- Les quinolones de deuxième génération, communément appelées fluoroquinolones, sont caractérisées biologiquement par un plus grand spectre d'action et une meilleure biodisponibilité. Ces caractéristiques sont en partie liées à la présence d'un atome de fluor en position 6 d'où leur appellation commune (Van Bambeke, 2005). On retrouve dans cette classe la norfloxacin, l'ofloxacin, la péfloxacin et la ciprofloxacin.
- Les molécules de troisième génération, dites fluoroquinolones anti-pneumococciques, ont été développées pour étendre le spectre à *Streptococcus pneumoniae*. On retrouve dans cette classe la sparfloxacin, la lévofloxacin et la moxifloxacin (Andriole, 2005).
- Les fluoroquinolones de quatrième génération (la trovafloxacin, la gatifloxacin) présentent une activité accrue sur les bactéries anaérobies strictes (Andriole, 2005). Cette classe combine les caractéristiques de deuxième et troisième génération (Van Bambeke, 2005).

1.4.5. Antibiotiques qui inhibent une voie métabolique

Le triméthoprime, de la famille des diaminopyrimidines, est un inhibiteur compétitif de la dihydrofolate réductase qui catalyse la réduction de l'acide dihydrofolique en acide tétrahydrofolique. L'acide tétrahydrofolique est un cofacteur de la synthèse des bases puriques et pyrimidiques. Le triméthoprime est un antibiotique bactériostatique temps dépendant qui inhibe la synthèse de l'ADN (Gleckman et al., 1981). Les sulfamides agissent par inhibition de la dihydroptéroase synthétase, enzyme de la voie métabolique des folates en

se substituant à l'acide para-amino benzoïque dont ils sont des analogues structuraux. Du fait de l'apparition de nombreuses résistances ils sont désormais utilisés en association avec des inhibiteurs de la dihydrofolate réductase comme le triméthoprim (Talarmin, 2016).

2. Résistance aux antibiotiques

2.1. Définition

La résistance aux antimicrobiens est un terme tout à fait relatif. En effet, il existe un grand nombre de définitions pour l'expression « résistance bactérienne aux antibiotiques », qui sont basées sur différents critères (génétiques, biochimiques, microbiologiques et cliniques). Les définitions les plus fréquemment employées se fondent sur les critères microbiologiques (résistance *in vitro*) et sur les critères cliniques (résistance *in vivo*). Selon la définition microbiologique du terme, une souche est dite résistante lorsqu'elle se cultive en présence de concentration plus élevée en antibiotique comparativement à d'autres souches qui lui sont phylogénétiquement liées. Par conséquent, la résistance est une propriété qui ne peut être étudiée que par comparaison d'au moins deux souches, dont l'une de référence souvent appelée souche sauvage et développée en laboratoire à partir d'individus prélevés dans la nature, d'une même espèce ou d'un même genre, cultivées dans les mêmes conditions. Selon la définition clinique, une souche est qualifiée de résistante lorsqu'elle survit à la thérapie antibiotique mise en place (Muylaert et Mainil, 2012).

2.2. Relation entre l'utilisation des antibiotiques et l'apparition de la résistance

Le développement de molécules nouvelles a été motivé par l'apparition de résistance aux anciennes molécules chez des bactéries naturellement sensibles. Comme indiqué dans la figure 2, les résistances aux antibiotiques ont suivi de près leur mise sur le marché, démontrant les possibilités adaptatives des bactéries. Avant même le début de l'utilisation des premiers antibiotiques, des phénomènes de résistance des bactéries avaient été observés (Talarmin, 2016).

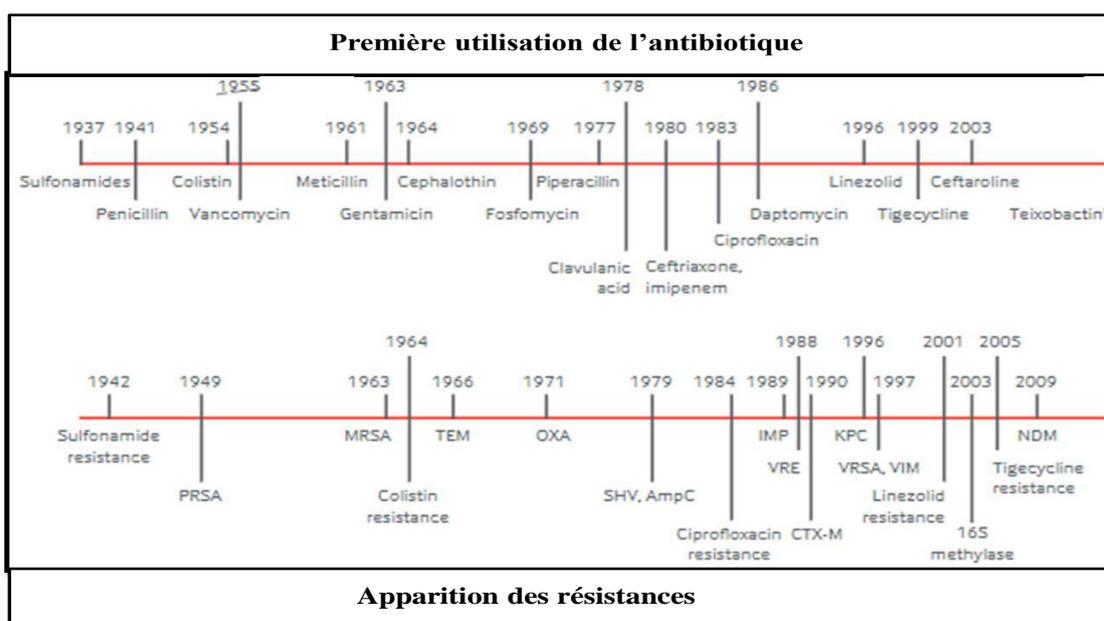


Figure 2 : Relation chronologique entre l'introduction des antibiotiques et l'apparition de résistance (Iredell et al., 2016)

Les facteurs intervenant dans ces relations sont inhérents à la population bactérienne et aux traitements antibiotiques utilisés (Sanders, 1999):

- le nombre d'animaux traités ;
- la pression de sélection exercée par l'antibiotique.

2.2.1. Facteur « nombre d'animaux traités »

L'apparition d'une résistance à un antibiotique dans un environnement donné est fonction de la proportion de sujets traités avec cet antibiotique. En d'autres termes, plus cette proportion est faible et plus le taux de résistance sera faible. Or les antibiotiques utilisés en thérapeutique préventive et en tant qu'additifs alimentaires sont le plus souvent administrés à un groupe d'animaux plutôt qu'à un seul animal ce qui favorisent les conditions d'émergence de bactéries résistantes (Faye, 2005).

2.2.2. Facteur « pression de sélection »

Le phénomène d'antibiorésistance chez l'animal est souvent interprété comme une conséquence de la pression de sélection exercée par les antibiotiques en usage vétérinaire

(Sanders, 1999; Schwarz et al., 2001a; Schwarz et al., 2001b). L'antibiorésistance traduirait la capacité d'adaptation des microorganismes à la pression de sélection des antibiotiques pour échapper à l'activité inhibitrice de ces antibiotiques. En d'autres termes, la pression exercée par l'antibiotique va sélectionner et maintenir les organismes résistants de la flore bactérienne. La population bactérienne subit différents niveaux de pression de sélection. Deux facteurs vont déterminer le niveau de pression de sélection: le type d'antibiotique utilisé et la modalité d'utilisation de l'antibiotique (dose, durée d'utilisation et voie d'administration) (Faye, 2005; Mc Ewen et Fedorka-Cray, 2002; Sanders, 1999).

L'apparition de bactéries résistantes semble plus probable avec les antibiotiques de type temps-dépendant (ex : tétracyclines et macrolides) du fait de leur cinétique et de leur modalité d'administration (réduction plus lente de la population bactérienne). La pharmacocinétique de l'antibiotique permet donc d'évaluer son potentiel pour la pression de sélection (Sanders, 1999). Plusieurs études ont établi une corrélation entre les quantités d'antibiotiques utilisés et la prévalence de la résistance dans la flore fécale des animaux (Van Den Bogaard et Stobberingh, 1999). De faibles doses d'antibiotiques et de longues durées de traitement antibiotique favorisent le recrutement des germes antibiorésistants (Andremont, 2000). Cette modalité d'utilisation des antibiotiques s'apparente essentiellement à la promotion de croissance qui utilise de très faibles doses subthérapeutiques d'antibiotiques, de manière continue et sur une longue période (Faye, 2005).

L'usage à visée thérapeutique des antibiotiques peut aussi favoriser la survenue du phénomène d'antibiorésistance. Il est clair qu'une diminution de l'usage des antibiotiques chez l'animal constitue l'un des leviers importants pour réduire la prévalence de ces bactéries résistantes chez les entérobactéries animales, à l'image des résultats obtenus au Canada suite au retrait puis à la réintroduction partielle du ceftiofur dans la filière avicole (Dutil et al., 2010).

2.3. Impact de l'antibiorésistance

Les inquiétudes concernent les effets de la résistance aux antimicrobiens sur la santé humaine, la production de viande et la productivité des animaux, mais aussi sur la transmission de gènes et de bactéries résistants entre les différents réservoirs. La question en jeu est celle de l'utilisation fréquente et inappropriée des antibiotiques chez les animaux et les êtres humains, laquelle accélère l'émergence et la propagation d'agents pathogènes résistants. En fait, un

grand nombre d'antibiotiques utilisés dans l'élevage des animaux le sont aussi dans la médecine humaine, ce qui accroît les risques de transmission et d'émergence d'organismes pathogènes multi-résistants.

Des études ont estimé que ce problème pourrait causer jusqu'à 10 millions de décès à l'horizon 2050 et entraîner une baisse du produit intérieur brut (PIB) mondial comprise entre 2% et 3.8% (Banque Mondiale, 2016; OMS, 2015). Selon les estimations, la résistance aux antimicrobiens pourrait réduire la production animale mondiale de 2.6% à 7.5% d'ici à 2050, les pays à faible revenu risquant d'être les plus durement touchés, avec une baisse pouvant atteindre 11% (Banque mondiale, 2016). En plus de ces conséquences sanitaires, ces microorganismes multi-résistants allongent les durées et coûts de traitement faisant aussi peser une charge économique plus importante sur les institutions de santé. Mondialement, ces surcoûts sont estimés entre 300 et 1000 milliards de dollars par an d'ici 2050 (O'Neill, 2014).

2.4. Mécanismes biochimiques de la résistance aux antibiotiques

Les mécanismes de résistance aux antibiotiques ont été largement étudiés, et de nombreuses cibles des fonctions cellulaires ont été impliquées dans ces mécanismes (Giedraitiene et al., 2011). Dans certains cas, au sein de la même souche bactérienne, on peut trouver plusieurs mécanismes de résistance différents.

2.4.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique

L'inactivation enzymatique de l'antibiotique représente le principal mécanisme de résistance des bêta-lactames, des aminoglycosides et des phénicolés. L'enzyme en modifiant le noyau actif de l'antibiotique par clivage ou par addition d'un groupement chimique, empêche la fixation de l'antimicrobien sur sa cible et provoque une perte d'activité. Parmi les réactions biochimiques catalysées par ces enzymes bactériennes, on peut citer des hydrolyses, des acétylations, des phosphorylations, des nucléotidylations, des estérifications, des réductions et des réactions d'addition d'un glutathion (Muylaert et Mainil, 2012). Ces enzymes sont généralement associées à des éléments génétiques mobiles (Aleksun et Levy, 2007; Guardabassi et Courvalin, 2006 ; Nikaido, 2009).

2.4.2. Modification ou remplacement de la cible de l'antibiotique

Le deuxième mécanisme de résistance est celui qui affecte les cibles des antibiotiques. Dans certaines situations, la bactérie modifie l'affinité de ses protéines de liaison à des antibiotiques spécifiques. Par exemple, certaines souches pathogènes modifient l'affinité des PLP, ce qui leur permet de résister à des antibiotiques de la famille des β -lactamines (Poole, 2004). En plus de la modification enzymatique, certaines souches pathogènes mobilisent le positionnement de leurs organites pour échapper à l'action des antibiotiques (Jana et Deb, 2006).

2.4.3. Imperméabilité aux antibiotiques

La majorité des antibiotiques ont des cibles intracellulaires, ce qui implique que la molécule doit traverser la membrane externe et/ou la membrane cytoplasmique pour avoir un effet antimicrobien. Les bactéries ont développé des mécanismes pour bloquer la diffusion des antibiotiques. Ce phénomène est très répandu chez les bactéries à Gram- pour lesquelles cette diffusion, concernant les tétracyclines, les fluoroquinolones ou les β -lactamines, est dépendante des porines (Pagès et al., 2008).

2.4.4. Pompes à efflux

Certaines souches bactériennes empêchent les antibiotiques de rentrer dans la cellule bactérienne, et cela grâce à un mécanisme de transport particulier dit pompe à efflux qui leur permet d'exporter les antibiotiques à l'extérieur (Li et Nikaido, 2009). Récemment, une pompe d'efflux MFS à 14 segments transmembranaire, QepA, spécifique des quinolones, codée par un gène de support plasmidique, a été décrite chez les entérobactéries (Périchon et al., 2007).

2.4.5. Protection de la cible de l'antibiotique

La protection de la cible de l'antibiotique est un mode de résistance bien connu pour la famille des tétracyclines et plus récemment décrit pour les quinolones et les fluoroquinolones. Ce mécanisme est notamment dû à la présence de gènes plasmidiques *qnr* (pour *quinolone resistance*) dont 5 groupes existent. Il a été rapporté parmi différentes bactéries Gram - à travers le monde, et des analogues de ces gènes ont également été décrits chez des bactéries

Gram+ (Rodriguez-Martinez et al., 2008). Les protéines Qnr en se fixant sur les topoisomérases, cibles des fluoroquinolones, réduisent l'affinité de la famille d'antibiotiques pour leurs cibles (Cavaco et al., 2009; Robiczek et al., 2006a ; Wang et al., 2009).

2.5. Point de situation de l'antibiorésistance dans la filière avicole en Algérie

2.5.1. Présentation succincte de la filière avicole en Algérie

La filière avicole en Algérie a connu un développement considérable en relation avec les politiques avicoles incitatives mises en œuvre au cours de la décade 1980-1990 et visant l'autosuffisance alimentaire en protéines animales. Cette période a été marquée par la naissance d'une grande entreprise publique l'Office National des Aliments du Bétail (ONAB) et ses trois offices régionaux : l'Office Régional Avicole du Centre (ORAC), de l'Ouest (ORAVIO) et de l'Est (ORAVIE). Le développement de la filière avicole en Algérie a permis d'améliorer la consommation des populations en protéines animales à moindre coût. En effet, la production de viande de volailles a atteint, en 2017, une production de 5,3 millions de quintaux, contre 2,092 millions de quintaux en 2009. La production d'œufs de consommation a atteint les 6,6 milliards d'unités produites en 2017 contre 3,8 unités en 2009 (MADR, 2017). Actuellement, la production avicole en Algérie est le fait d'éleveurs privés et d'entreprises économiques publiques. Mais la production de ces dernières reste insignifiante par rapport à celle des exploitations privées qui représentent, respectivement, 92% et 73% des capacités de production nationale en viandes blanches et en œufs de consommation. Depuis 1980, date de mise en œuvre des politiques avicoles, aucune évolution significative n'est apparue dans la structure des élevages privés. La taille moyenne des ateliers est de 3000 et 5000 sujets respectivement pour les élevages de poulets de chair et poules pondeuses. Cette démarche a certes mis fin à l'importation des produits finis (œufs de consommation et poulet de chair) mais, elle a accentué la dépendance des marchés mondiaux pour l'approvisionnement des entreprises en intrants industriels (inputs alimentaires, matériel biologique, produits vétérinaires, équipements) ce qui demeure le principal handicap au développement de l'aviculture algérienne (OFAL, 2000).

2.5.2. Consommation d'antibiotiques

La consommation des antibiotiques a explosé de manière fulgurante dans le monde, avec une augmentation de 65% entre 2000-2015, et l'Algérie figure parmi les six plus grand

pays consommateurs d'antibiotiques dans le monde (Klein et al., 2018). Les estimations de la consommation annuelle totale mondiale d'antibiotiques dans le secteur de l'agriculture varient considérablement en raison de l'insuffisance des activités de surveillance et de collecte de données dans de nombreux pays. La consommation mondiale d'agents antimicrobiens était estimée à 63 151 tonnes dans ce secteur en 2010. La situation est d'autant plus préoccupante que l'on prévoit que les deux tiers de l'augmentation future estimée de la consommation d'agents antimicrobiens seront le fait du secteur de l'élevage, en particulier la filière avicole où l'utilisation de ces produits devrait doubler (Van Boeckel et al., 2015). D'autres aspects doivent aussi être pris en considération lorsque l'on examine l'emploi d'antibiotiques: il faut notamment faire la distinction entre l'utilisation thérapeutique et non thérapeutique, entre les différents systèmes de production existants et tenir compte des spécificités liées aux différentes espèces animales et à leur localisation éco-géographique.

2.5.3. Etat des lieux de la résistance aux antibiotiques en Algérie

Une importante augmentation de la résistance aux antibiotiques en Algérie en particulier chez les entérobactéries a été enregistrée en médecine humaine et vétérinaire selon les données publiées annuellement par le réseau Algérien de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques (<http://www.sante.dz/aarn/>). Cependant, le rapport d'évaluation de la résistance des bactéries aux antibiotiques en médecine vétérinaire n'a pas été publié depuis plus de quatre ans. Seules quelques études sur le sujet des antibiorésistances vétérinaires ont été publiées dans certaines régions du centre et de l'ouest Algérien (Agabou et al., 2015 ; Belmahdi et al., 2016 ; Benameur et al., 2014 ; Benameur et al., 2016, Djeflal et al., 2017 ; Halfaoui et al., 2017, Yousfi et al., 2016). D'après ces résultats, une évolution importante de la résistance aux antibiotiques a été enregistrée dans des souches d'origine aviaire. La nature de cette résistance devient de plus en plus inquiétante avec une augmentation constante de la résistance aux antibiotiques de premier recours tels les fluoroquinolones et les β -lactamines. La majorité des souches circulantes sont multi-résistantes et peuvent être sources d'impasses thérapeutiques. Deux termes sont récemment apparus pour évoquer l'isolement possible de bactéries hautement résistantes (BHR) et celles toto-résistantes (BTR) (Magiorakos et al., 2012). Ces souches ont été identifiées sous forme de petits foyers en médecine humaine dans le nord de l'Algérie (Baba Ahmed-Kazi Tani et Arlet, 2014).

2.6. Le concept « One Health » et l'antibiorésistance

Les bactéries ont une répartition ubiquitaire (Homme, animaux, environnement), et ce constat s'applique particulièrement aux entérobactéries. Elles sont facilement échangeables entre les individus et les différents réservoirs. Cette famille de bactéries illustre donc parfaitement la problématique du concept « One Health ». Les antibiotiques sont utilisés en santé humaine, en santé animale et dans les productions animales et végétales et ils jouent un rôle essentiel dans ces domaines d'activité. De plus, ils se retrouvent dans l'environnement et donc au contact des autres réservoirs *via* les eaux usées ou les déjections des animaux d'élevage. Ce contact entre les entérobactéries et les antibiotiques, quel que soit le réservoir, va induire la sélection de mécanismes de résistances tels que l'expression de BLSE. En plus, un grand nombre d'antibiotiques utilisés dans l'élevage des animaux le sont aussi dans la médecine humaine, ce qui accroît les risques de transmission et d'émergence d'organismes pathogènes multi-résistants. Cette sélection va être fortement facilitée par la proximité et la « perméabilité » des différents réservoirs qui favorisent les échanges (comme les transferts de gènes) entre les entérobactéries et donc l'acquisition de nouvelles résistances. En effet, les entérobactéries sont facilement échangeables entre les individus ou acquises depuis l'environnement, et la population est un réservoir et un pourvoyeur permanent en entérobactéries produisant des BLSE pour le milieu hospitalier (Boutal, 2017). De ce fait, toute mesure prise dans un seul de ces secteurs n'est pas suffisante pour limiter l'émergence et la dissémination de résistances. On parle donc de concept de santé globale ou « One Health » en antibiorésistance (Doublet et al., 2012).

2.7. Prévention

L'approche « One Health » de la lutte contre l'antibiorésistance portée depuis 2015 par l'OMS favorise l'articulation de la prévention entre santé humaine, santé animale et environnement. Les antibiotiques étant un bien précieux permettant de traiter les infections bactériennes, il est urgent de mettre en œuvre les moyens nécessaires pour les préserver. La résistance aux antibiotiques est devenue un enjeu majeur de santé publique, et notamment la récente augmentation de l'incidence des infections aux entérobactéries productrices de BLSE qui est reconnue comme une menace sérieuse par l'OMS (WHO, 2014). L'utilisation des antibiotiques dans le cadre de la production d'aliments d'origine animale (viande, lait, œufs, miel) fait l'objet d'une attention particulière des instances internationales en charge de

l'analyse de risque. La sécurité sanitaire pour tous est au cœur des efforts des organisations en charge de l'alimentation.

L'Algérie dispose maintenant d'un ancrage juridique à travers la promulgation récente du décret exécutif 17-310 du 24 octobre 2017 portant création, missions, organisation et fonctionnement du comité national multisectoriel de lutte contre la résistance aux antimicrobiens pour l'élaboration et la mise en œuvre du plan d'action national. Ce plan national d'action a été adopté pour renforcer le dispositif, déjà mis en place par le ministère de tutelle, à travers le réseau Algérien de surveillance de la résistance aux antibiotiques avec comme laboratoire de référence le laboratoire de bactériologie médicale et de surveillance de la résistance aux antibiotiques de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA) et celui mis en place par le Ministère de l'Agriculture, à savoir le réseau vétérinaire de surveillance de la résistance aux antibiotiques.

L'OMS, la FAO (Food and Agriculture Organization), et l'OIE (Office Internationale des Epizooties, devenu l'organisation mondiale de la santé animale) ont adopté récemment un plan d'action mondiale pour combattre la résistance aux antimicrobiens. Il se décline en cinq axes:

- Sensibiliser le personnel de santé et le public ;
- Renforcer la surveillance et la recherche ;
- Prendre des mesures d'assainissement, d'hygiène et de prévention des infections ;
- Optimiser l'usage des antimicrobiens en santé humaine et animale ;
- Soutenir des investissements durables pour la mise au point de nouveaux traitements, diagnostics ou vaccins.

*Chapitre II : Supports de la résistance aux
antibiotiques*

Chapitre II : Supports de la résistance aux antibiotiques

1. Supports génétiques de la résistance

La résistance bactérienne aux antibiotiques aurait deux origines essentielles, naturelle et acquise. La première est programmée au niveau du pool génomique alors que la seconde est due à une mutation chromosomique ou à une acquisition de gène (résistance extra-chromosomique).

1.1. Le chromosome

1.1.1. Résistance naturelle

Le chromosome bactérien est porteur des informations génétiques nécessaires à l'existence même de la bactérie et contient aussi les gènes responsables de sa résistance naturelle intrinsèque (liée à sa structure ou à son métabolisme). Les gènes de résistance codant pour des enzymes d'inactivation ou des systèmes d'échappement s'expriment de façon constitutive lorsqu'ils sont portés par le chromosome conférant les caractères de résistance naturelle de la bactérie (Doyle, 2006).

1.1.2. Résistance acquise

La résistance chromosomique acquise résulte d'une mutation. La fréquence de ces mutations est faible et variable (10^{-6} à 10^{-9}) mais la mutation est stable et transmissible à la descendance. La résistance apparaît dans ce cas au hasard et n'est donc pas influencée par l'antibiotique qui ne fait que la révéler. La mutation du gène peut entraîner l'apparition d'une protéine particulière ou d'une variabilité structurelle responsable de la résistance; elle peut aussi entraîner la disparition ou la modification d'une protéine structurale ou enzymatique normale. En absence d'antibiotiques dans le milieu exerçant une pression de sélection, la plupart des mutants naturels vont disparaître.

1.2. Les éléments génétiques mobiles

La résistance aux antibiotiques acquise par les bactéries est principalement due à la présence de trois types d'éléments extra-chromosomiques portant des gènes de résistance: les plasmides, les transposons et des cassettes de résistances insérées sur un intégron (Bennett,

2008 ; Martinez, 2009 ; Walsh, 2006). Les espèces microbiennes partagent des éléments génétiques entre elles d'une manière perpétuelle. Cet échange est appelé transfert horizontal du matériel génétique. Ce transfert est généralement réalisé grâce à trois phénomènes essentiels, à savoir la conjugaison (transfert des fragments via des plasmides conjugatifs), la transformation (incorporation par une bactérie des fragments d'ADN libérés par d'autres bactéries) et la transduction (transfert des gènes via les bactériophages) (Sommer et al., 2009). Le transfert des gènes peut se produire entre des bactéries phylogénétiquement éloignées, essentiellement entre les bactéries à Gram+ et celles à Gram- (Courvalin, 1994). Le transfert horizontal des gènes a donné lieu à une résistance aux différentes classes d'antibiotiques telles que les aminoglycosides, les céphalosporines et les fluoroquinolones (Nordmann et Poirel, 2002).

1.2.1. Les plasmides

Les plasmides sont des agents essentiels pour le flux horizontal de gènes et donc une composante importante de l'évolution bactérienne. Ce sont des ADN circulaires extra-chromosomiques capables d'autoréplication et parfois de transfert. Les plasmides codent également pour des fonctions conférant un avantage à la cellule hôte comme leur capacité à porter et à transmettre les gènes codant pour la résistance aux antimicrobiens. Les plasmides bactériens revêtent une importance toute particulière dans l'étude des phénomènes de résistance car ils constituent à la fois un vecteur de premier plan pour la dissémination des résistances et un immense réservoir génétique (Diallo, 2013).

1.2.2. Séquences d'insertion et transposons

Les séquences d'insertion (0,2 à 6 kpb), aussi appelées éléments IS, sont la forme la plus simple d'un élément transposable. Elles sont composées uniquement d'un gène de transposase bordé de part et d'autre d'une séquence inversée répétée. Les transposons (2-20 kpb) forment une classe très hétérogène d'éléments génétiques pouvant s'insérer par transposition à divers endroits sur un chromosome ou un plasmide. Les transposons (2-20 kpb) sont composés de séquences d'ADN qui fonctionnent comme des sites de recombinaison et de gènes codants pour des protéines qui participent à la réaction de recombinaison. Les sites de recombinaison sont situés aux deux extrémités du transposon et organisés en séquences inversées répétées. La taille de ces répétitions inversées terminales varie entre ~25 et quelques centaines de paires de bases. Les sites de recombinaison ne sont pas des répétitions exactes et portent les

séquences de reconnaissance des transposases (Diallo, 2013). Le caractère transposable chez la majorité des gènes est responsable de l'apparition des souches multi-résistantes.

1.2.3. Les intégrons

Les intégrons sont des éléments génétiques bactériens capables de promouvoir l'acquisition et l'expression de gènes (Stokes et al., 1989). La définition d'un intégron se limite à la présence d'une plateforme fonctionnelle, parfois désignée région 5' conservée (5'CS), composée de trois éléments clés : un gène *intI* qui code une intégrase IntI, un site spécifique de recombinaison attI, et un promoteur Pc (Boucher et al., 2007). Les gènes, dont l'expression est assurée par Pc sont localisés dans des cassettes intégrées en aval de la plateforme fonctionnelle. Les cassettes sont des éléments génétiques mobiles capables d'être intégrés ou excisés par un mécanisme de recombinaison catalysé par l'intégrase IntI. Au sein des intégrons, sont définis deux grands groupes, les super-intégrons (SI) et les intégrons de résistance (IR). Les IR contiennent un nombre plus restreint de cassettes dont les gènes codent le plus souvent des résistances aux antibiotiques. Les IR ne codent pas de fonction de transposition mais, localisés sur des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides ou les transposons, ils peuvent être transférés entre bactéries et contribuent ainsi à la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques. Le plus grand réservoir animal en IR concerne les animaux de la ferme, et notamment la volaille (Nandi et al., 2004; Yang et al., 2004).

2. Physiopathologie de la résistance aux quinolones

2.1. Mécanismes d'action des quinolones

Les quinolones inhibent la réplication et la transcription bactérienne en inhibant le fonctionnement des topo-isomérases bactériennes de type II, l'ADN gyrase et la topo-isomérase IV (Hooper, 2000). Les quinolones se fixent sur le complexe ADN-topo-isomérase. Ce complexe devient irréversible conduisant, d'une part, à l'immobilisation des enzymes qui entraînent la bactériostase et, d'autre part, à la libération des cassures double brin de l'ADN activant le système SOS ou produisant un effet toxique pour la bactérie, responsable de la bactéricidie intense des quinolones. L'effet bactéricide varie en fonction de la molécule et de l'espèce bactérienne considérées (De Lastours et Fantin, 2014).

2.2. Mécanismes de résistance aux quinolones

Plusieurs types de mécanismes de résistance ont été décrits:

- Diminution de l'accumulation intra-cytoplasmique par diminution de la perméabilité de la paroi ou augmentation de l'efflux (pompe d'efflux codée par un gène *QepA*);
- Diminution de l'affinité des cibles par mutation ou par protection des cibles (protéines Qnr codées par des gènes *qnr*);
- Inactivation enzymatique (acétylase codée par un gène *aac(6')-Ib-cr*) (De Lastours et Fantin, 2014).

2.2.1. Mécanismes chromosomiques

Classiquement, les mécanismes de résistance aux quinolones chez les entérobactéries résultent essentiellement de modifications ponctuelles des cibles, les topo-isomérases, et plus rarement d'une diminution de la concentration intracellulaire de ces antibiotiques par imperméabilité membranaire et/ou surexpression des systèmes d'efflux (Hooper, 2001). Les déterminants de ces mécanismes de résistance sont chromosomiques, c'est-à-dire stables et non transférables. Ils ne sont pas associés physiquement à des gènes de résistance à d'autres familles d'antibiotiques.

Le principal mécanisme de résistance est lié à des mutations chromosomiques dans les gènes de structure des topo-isomérases, le plus souvent dans les gènes *gyrA* ou *parC*, plus rarement les gènes *gyrB* ou *parE*. Ces mutations sont sélectionnées en présence de quinolone avec une fréquence de sélection de mutants d'environ $1/10^8$ (De Lastours et Fantin, 2014). La première mutation survient généralement au niveau de la topo-isomérase pour laquelle la quinolone a la plus grande affinité, ce qui peut varier en fonction de l'espèce bactérienne et en fonction de la quinolone (Cambau et al., 2009; Cattoir et al., 2006). Ainsi, la cible primaire de la ciprofloxacine est la sous-unité A de l'ADN gyrase chez les bacilles à Gram-, et la sous-unité ParC de la topo-isomérase IV chez les cocci à Gram+ (De Lastours et Fantin, 2014). Deux autres mécanismes de résistance chromosomiques permettent un défaut d'accumulation des quinolones dans les bactéries : la diminution de la perméabilité de la paroi bactérienne par diminution quantitative des porines et l'hyper-expression des pompes d'efflux chez les bactéries à Gram- (Poole, 2000). Ces mécanismes ne sont pas spécifiques aux quinolones car ils concernent aussi l'influx et l'efflux d'autres molécules de petit poids moléculaire, plutôt

hydrophiles comme les β -lactamines, les aminosides et les sulfamides (Poole, 2000 ; Poole, 2007).

2.2.2. Mécanismes plasmidiques

Les mécanismes de résistances aux quinolones à médiation plasmidique (PMQR) impliquent les protéines Qnr, l'enzyme AAC(6')-Ib-cr et différentes pompes d'efflux (QepA, OqxAB, QacBIII).

2.2.2.1. Les mécanismes Qnr

2.2.2.1.1. Découverte des gènes *qnr*

Les PMQR ont été découvertes en 1998 par Martinez-Martinez et ses collaborateurs, lors de l'étude d'un plasmide porteur d'un gène codant pour une β -lactamase, provenant d'une souche multi-résistante de *Klebsiella pneumoniae*, isolée d'un échantillon d'urine prélevé en 1994 chez un patient de l'Université d'Alabama. Ce plasmide confère une résistance sub-clinique vis-à-vis de différentes quinolones et fluoroquinolones, en produisant une augmentation de la concentration minimale inhibitrice (CMI) vis-à-vis de l'acide nalidixique de 8 fois et vis-à-vis de différentes fluoroquinolones de 8 à 64 fois. En outre, ce plasmide facilite la sélection de souches mutantes à niveaux élevés de résistance aux fluoroquinolones (Martinez-Martinez et al., 1998). Le gène de 657 pb responsable de ce phénotype code pour une protéine nommée Qnr (Tran et Jacoby, 2002), de la famille des pentapeptides répétés (PRP pour *pentapeptide repeat protein*), et rebaptisée plus récemment QnrA1 après l'identification de différentes protéines Qnr et de différents variants pour chacune d'entre elles (Muylaert et Mainil, 2013).

Actuellement, sept variants du gène *qnrA* sont décrits (*qnrA1* à *qnrA7*) (Cambau et al., 2006; Cheung et al., 2005 ; Nordmann et Poirel, 2005 ; Poirel et al., 2005a). En 2003, un clone de *Shigella flexneri* 2b causa une épidémie d'entérocolites au Japon. Parmi les huit souches isolées de ce clone, une présentait une résistance à la ciprofloxacine et possédait un unique plasmide conjugatif responsable du transfert de ce phénotype et porteur d'un gène codant pour une protéine de 218 acides aminés. Cette protéine PRP présentait 59% d'identité en acides aminés avec la protéine QnrA1 et fut nommée QnrS (Hata et al., 2005). Depuis, cinq autres variants du gène *qnrS* ont été identifiés (*qnrS1* à *qnrS6*) (Gay et al., 2006 ; Han et al., 2012; Torpdahl et al., 2009; Yue et al., 2008). Jacoby et al. (2006), en étudiant des souches de *K.*

pneumoniae provenant d'Inde, ont mis en évidence la présence d'une résistance transférable à bas niveau aux fluoroquinolones en excluant la présence de *qnrA*. Le gène PMQR responsable de ce phénotype code pour une protéine de 214 acides aminés désignée QnrB (Cattoir et al., 2008a). Cette protéine appartient également à la famille PRP et partage 43 et 44% d'identité en acides aminés avec respectivement QnrA1 et QnrS1 (Jacoby et al., 2006). Aujourd'hui, 54 variants du gène *qnrB* sont décrits (*qnrB1* à *qnrB54*). Le gène *qnrC*, produisant une augmentation de la CMI de la ciprofloxacine de 32 fois, a ensuite été identifié sur un plasmide conjugatif provenant d'une souche de *Proteus mirabilis* isolée à Shangai en Chine. Le gène de 666 pb code pour une protéine de la famille des PRP, QnrC, de 221 acides aminés et qui partage 64, 41 et 59% d'identité en acides aminés avec QnrA1, QnrB1 et QnrS1 respectivement. Enfin, le gène *qnrD* a été découvert sur un petit plasmide provenant de souches de *Salmonella enterica* isolées d'humains en Chine et présentant une réduction transférable de sensibilité à la ciprofloxacine. Le gène *qnrD* responsable d'une augmentation de la CMI de la ciprofloxacine de 32 fois, code pour une protéine de type PRP de 214 acides aminés qui présente 48, 61, 32 et 43% de similarité avec respectivement QnrA1, QnrB1, QnrS1 et QnrC (Cavaco et al., 2009 ; Wang et al., 2009).

2.2.2.1.2. Mode d'action des protéines Qnr

La structure des Qnr, très proche de la structure de la double hélice d'ADN, a conduit à évoquer un mode d'action des Qnr par « mimétisme de l'ADN » au niveau du site actif de l'ADN gyrase. Les quinolones se fixant au complexe ADN-ADN gyrase, la protéine Qnr en se fixant à l'ADN gyrase empêcherait la formation du complexe sur lequel se fixent les quinolones (Guillard et Cambau, 2012). Par un mécanisme de type « sauvetage des complexes », Vetting et al. (2011) suggèrent qu'à faible concentration, les Qnr se fixeraient aux complexes clivés et déstabiliseraient le complexe ternaire, ADN-ADN gyrase-quinolones en libérant la quinolone. L'ADN gyrase, ainsi libérée du complexe, redeviendrait active et pourrait assurer la religation de l'ADN. Ce n'est qu'à haute concentration que les protéines Qnr inhiberaient l'ADN gyrase (Vetting et al., 2011).

2.2.2.1.3. L'activité de résistance de Qnr

L'acquisition d'un plasmide porteur d'un gène *qnr* n'est pas suffisante pour transformer une bactérie de type sauvage sensible aux fluoroquinolones en souche résistante selon les normes standards de sensibilité fixées par des comités scientifiques internationaux tels que le CLSI

(Clinical and Laboratory Standards Institute) (Muylaert et Mainil, 2013). On détermine l'effet de la présence d'un tel plasmide sur la sensibilité d'une souche vis-à-vis d'une fluoroquinolone particulière en déterminant et en comparant les CMI de cette molécule pour une souche porteuse ou non du plasmide (Strahilevitz et al., 2009). Pour la plupart des composés de cette famille, on observe une augmentation de la CMI de 16 à 125 fois. La CMI de l'acide naladixique est, quant à elle, augmentée de 2 à 8 fois, mais cette augmentation est suffisante pour exprimer un phénotype de résistance vis-à-vis de cet antibiotique (Wang et al., 2004). Le faible niveau de résistance associé à la présence des gènes *qnr* n'assure donc pas la survie totale d'une population bactérienne en présence de fluoroquinolones à dose thérapeutique, mais il accroît substantiellement le nombre de bactéries mutées sélectionnées dans cette population (Jacoby, 2005; Martinez-Martinez et al., 1998). Par ailleurs, les gènes *qnr* sont fréquemment observés en présence d'autres mécanismes de résistance avec lesquels ils agissent en synergie au sein de souches cliniques, et de nombreuses études ont également identifié des bactéries porteuses de plusieurs gènes *qnr* possédant dès lors un effet additif sur la CMI (Strahilevitz et al., 2009).

2.2.2.1.4. Supports et environnement génétique des gènes *qnr*

Les gènes *qnr* sont majoritairement associés à des structures de mobilisation de gènes, comme par exemple *qnrA* dans les intégrons complexes de type 1 (Poole, 2007). Dans l'environnement génétique de *qnrA*, *qnrB* et *qnrS*, sont souvent retrouvés de gènes codant des β -lactamases et notamment des BLSE (Strahilevitz et al., 2009). Les gènes *qnrA*, *qnrB* et *qnrC* sont majoritairement portés par de grands plasmides conjugatifs, tandis que *qnrS* et *qnrD* sont plus souvent portés par de petits plasmides non conjugatifs voire non mobilisables (Cavaco et al., 2009).

2.2.2.1.5. Épidémiologie des déterminants *qnr*

Après la première description de *qnrA1* dans une souche nord-américaine de *K. pneumoniae* (Martínez-Martínez, 1998), de nombreux autres gènes *qnr* ont été décrits, définissant les familles *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrVC* (Cavaco et al., 2009 ; Jacoby et al., 2008; Strahilevitz et al., 2009; Wang et al., 2009), avec pour chacune plusieurs allèles (7 *qnrA*, 71 *qnrB*, 1 *qnrC*, 1 *qnrD* et 8 *qnrS*) dont la description est consignée sur le site de la Lahey Clinic (<http://www.lahey.org/qnrStudies/>).

Ce mécanisme de résistance fut trouvé dans de nombreuses autres souches nord-américaines (Jacoby et al., 2003; Wang et al., 2004), quelques souches de *E. coli* de Chine (Wang et al., 2003), une souche de *Providencia stuartii* d'Égypte (Wiegand et al., 2004) et dans des souches de *E. coli* de Corée du Sud (Kim et al., 2004). À Shanghai, la prévalence de ce mécanisme de résistance a été estimée à 7,7 % des souches d'*E. coli* résistantes à la ciprofloxacine (Wang et al., 2003). La présence de déterminants *qnr* a été signalée ensuite dans le monde entier dans différentes espèces d'entérobactéries, essentiellement *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *E. coli* et *Salmonella enterica*, aussi bien en médecine humaine (March et al., 2009; Minarini et al., 2008; Wang et al., 2008b) et animale (Cavaco et al., 2008; Ma et al., 2009; Veldman et al., 2008), en corrélation avec une importante utilisation des quinolones et des fluoroquinolones en médecine humaine et vétérinaire et avec la nature plasmidique de ces déterminants. Par ailleurs, il existe une fréquente association entre les déterminants géniques de type *qnr* et ceux des BLSE (Szabo et al., 2008; Tamang et al., 2008; Wang et al., 2008a), ce qui souligne la possibilité d'une co-sélection de ces deux mécanismes de résistance plasmidique.

En Algérie, les gènes *qnr* (-A, -B, -S) ont été détectés chez des souches hospitalières et communautaires d'entérobactéries produisant des BLSE (CTX-M, SHV-12 et VEB-1) (Baba Ahmed-Kazi Tani et al., 2013; Gharout-Sait et al., 2012; Iabadene et al., 2008; Meradi et al., 2011; Touati et al., 2008). Plus récemment, *qnrA* a été identifié chez des souches d'*E. coli* d'origine aviaire porteuses de SHV-12 (Belmahdi et al., 2016), et *qnrS1* et *qnrB5* chez des souches d'*E. coli* productrices de BLSE d'animaux de compagnie (Yousfi et al., 2016).

2.2.2.2. Inactivation enzymatique des quinolones par AAC(6')-Ib-cr

Le mécanisme de résistance par inactivation enzymatique des quinolones n'existait pas, avant la description du gène *aac(6)-Ib-cr*, qui code une aminoside 6-N-acétyltransférase plasmidique bi-fonctionnelle, capable d'acétyler à la fois les aminosides, la ciprofloxacine et la norfloxacine au niveau du groupement amine secondaire du cycle piperazinyll (Robicsek et al., 2006a). Le gène *aac(6')-Ib-cr* code un variant de l'aminoglycosyltransférase AAC(6')-Ib, enzyme responsable d'une résistance à la kanamycine, tobramycine et amikacine. (Mérens et Servonnet, 2010). Aujourd'hui, le variant *aac(6')-Ib-cr* se révèle largement répandu à travers le monde, et bien souvent en association à d'autres gènes PMQR (Nordmann et Mammeri, 2007).

2.2.2.3. Les pompes à efflux plasmidiques

Plusieurs pompes d'efflux plasmidiques ont été décrites et majoritairement sur des plasmides portés par des souches d'origine vétérinaire.

2.2.2.3.1. La pompe à efflux *QepA*

Le gène *qepA* a été décrit à partir d'une souche clinique d'*E. coli* isolée en Belgique en 2007 (Périchon et al., 2007) et code une pompe d'efflux appartenant aux MFS (Major Facilitator Super family). Sa présence a pour conséquence une moindre sensibilité aux quinolones hydrophiles, avec une augmentation des CMI de l'ordre d'un facteur 10. Le progéniteur de ce gène semblerait appartenir à la famille des actinomycètes car le gène *qepA1* présente un (G + C) % (72 %) proche de celui des actinomycètes. Un variant allélique codant une pompe d'efflux ayant les mêmes effets a été décrit ensuite et nommé *qepA2* (Cattoir et al., 2008). Ces deux variants du gène *qep* sont tous les deux situés en amont d'une séquence d'insertion ISCR3 (Guillard et Cambau, 2012).

2.2.2.3.2. La pompe à efflux *OqxAB*

Une autre pompe d'efflux, *OqxAB*, de la famille des RND (resistance nodulation division) a été décrite chez une souche d'*E. coli* isolée chez un cochon. *OqxAB* confère une résistance à l'olaquinox, un dérivé quinoléique, très utilisé en médecine vétérinaire. *OqxAB* confère une augmentation de la CMI de l'acide nalidixique et de la ciprofloxacine, respectivement d'un facteur 8 et 16 (Hansen et al., 2007).

2.2.2.3.3. La pompe à efflux *QacBIII*

La pompe d'efflux *QacB* appartient à la famille MFS comme *QepA*. Cette pompe est souvent retrouvée dans des souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) (Guillard et Cambau, 2012). Trois variants, *QacBI*, *QacBII* et *QacBIII* ont été décrits en se basant sur les séquences nucléotidiques. Le variant *QacBIII* est impliqué dans la résistance de bas niveau des SARM à la ciprofloxacine et à la norfloxacine (Nakaminami et al., 2010).

2.3. Détection des premiers niveaux de résistance

Les niveaux de résistances conférés par les différents PMQR sont de bas niveau. La concentration minimale inhibitrice (CMI) de la ciprofloxacine est généralement augmentée d'un facteur 4 à 60 pour une souche portant un tel mécanisme de résistance, mais elle reste en dessous de la concentration critique la catégorisant sensible à l'action de l'antibiotique. Cela implique le recours à une détection moléculaire, et pose la question de la diminution de la réponse au traitement par quinolone (Guillard et Cambau, 2012).

La résistance aux quinolones résulte le plus souvent de l'association de plusieurs mécanismes de résistance, chaque mécanisme étant acquis indépendamment. On observe ainsi un phénomène de résistance « par paliers » (De Lastours et Fantin, 2014). Ainsi par exemple, chez *Escherichia coli*, un niveau de résistance conférant une résistance en clinique n'est atteint que par l'association d'au moins deux mécanismes, le plus souvent une mutation dans *gyrA* et un efflux ou une imperméabilité. Ainsi, une seule mutation de résistance chez *E. coli*, par exemple dans *gyrA*, confère une augmentation de la CMI de la ciprofloxacine de 0,008 à 0,25 mg/l (soit d'un facteur > 30) mais n'atteignant pas la concentration critique de 1 mg/l établie par l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) définissant la résistance à la ciprofloxacine (Allou et al., 2009). On parle alors de premier niveau de résistance aux quinolones. Une seconde mutation (par exemple dans *parC*) s'additionnant à la première fera élever la CMI à 8 mg/l. Puisque la résistance est acquise par étapes successives, il est très important de pouvoir détecter les premiers niveaux de résistance témoignant de l'obtention d'un premier mécanisme de résistance afin d'alerter le clinicien, même si la souche est rendue intermédiaire ou sensible au regard des recommandations des sociétés savantes établissant les concentrations critiques (De Lastours et Fantin, 2014). En effet, la présence de premiers niveaux de résistance est accompagnée à un niveau de bactéricidie inférieure des fluoroquinolones et un risque d'échecs thérapeutique comme cela a bien été démontré dans des modèles animaux mais également en clinique (Allou et al., 2009; Crump et al., 2008; Vasallo et al., 1998). En pratique, l'existence de premiers niveaux de résistance doit être recherchée, soit par la mesure des CMI soit par la détection d'une résistance à l'acide nalidixique. Ceci est nécessaire afin d'avertir le clinicien du risque de bactéricidie diminuée, donc de moindre efficacité possible du traitement, et d'émergence secondaire de souches hautement résistantes (Hakanenet al., 1999; Varon et al., 2006). Il est nécessaire que le clinicien interprète les résultats rendus par le laboratoire dans ce contexte et

essaye dans la mesure du possible de ne pas traiter par fluoroquinolone une infection par un germe ayant déjà atteint un premier niveau de résistance (De Lastours et Fantin, 2014).

3. Physiopathologie de la résistance aux β -lactamines

La famille des β -lactamines comprend un grand nombre de molécules, toutes caractérisées par la présence d'un cycle β -lactame indispensable à l'activité antibiotique.

3.1. Mécanismes d'action des β -lactamines

Toutes les β -lactamines ont le même mécanisme d'action. Elles bloquent la synthèse du peptidoglycane (ou mucopeptide, ou muréine) qui est le polymère majeur spécifique de la paroi des bactéries à Gram- et à Gram+. Ce blocage intervient par inhibition de certaines enzymes responsables de la transpeptidation, étape essentielle de la synthèse du peptidoglycane. Ces enzymes, collectivement appelées PLP, sont insérées dans la partie externe de la membrane cytoplasmique bactérienne. Pour être actives, les β -lactamines vont devoir atteindre leur cible en pénétrant dans la paroi bactérienne et se fixer sur les PLP.

3.2. Mécanismes de résistance aux β -lactamines

Les mécanismes de résistance acquis aux β -lactamines sont de nature enzymatique ou non enzymatique.

3.2.1. Résistances non enzymatiques

Il y a plusieurs mécanismes qui permettent aux bactéries de contrecarrer l'action des antibiotiques :

- Modification de la cible
- Diminution de la perméabilité
- Hyperproduction de système d'efflux

3.2.2. Production de β -lactamases

L'hydrolyse irréversible de la liaison amide du cycle β -lactames des β -lactamines par les β -lactamases (Figure 3) est le mécanisme de résistance naturelle ou acquise le plus répandu en particulier chez les bacilles Gram négatif.

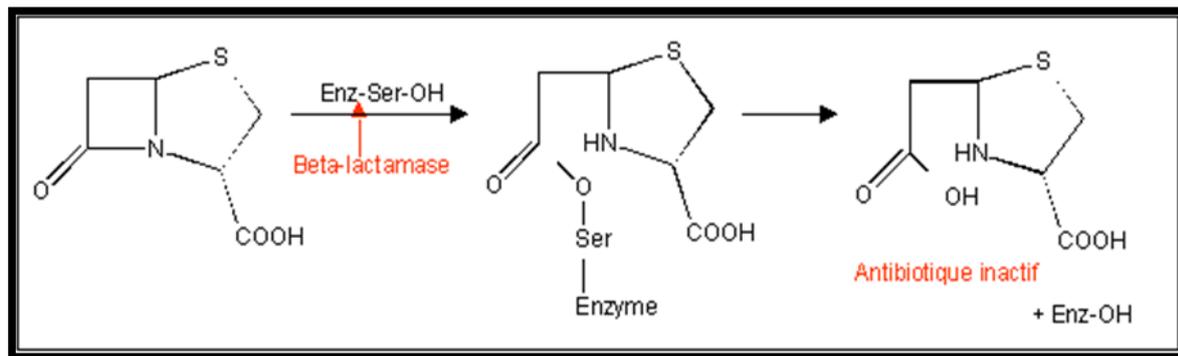


Figure 3: Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle β -lactame (Diallo, 2013)

3.2.2.1. Classification des β -lactamases

Il existe plusieurs classes de β -lactamases qu'il faut distinguer. Les pénicillinases de bas niveau et de haut niveau, les pénicillinases résistantes aux inhibiteurs de β -lactamase et les céphalosporinases de bas niveau sur lesquelles les C3G restent actives. À l'inverse, les céphalosporinases de haut niveau, les BLSE et les carbapénémases hydrolysent généralement toutes les C3G. Les BLSE confèrent habituellement aux bactéries un phénotype de résistance aux pénicillines, aux céphalosporines de première, deuxième et troisième génération ainsi qu'au céfépime et à l'aztréonam. Les BLSE sont inhibées partiellement par les inhibiteurs de β -lactamase (acide clavulanique, tazobactam et sulbactam) (Doit et al., 2010). À l'inverse, elles ne confèrent pas de résistance vis-à-vis des céphamycines ou des carbapénèmes (Paterson et al., 2005). Les gènes des BLSE sont portés par des plasmides conjugatifs, ils sont donc transférables d'une souche à une autre mais aussi d'une espèce à une autre.

La classification de ces enzymes est traditionnellement basée sur leurs caractéristiques fonctionnelles et leur structure primaire. La classification la plus simple repose sur leur séquence protéique qui permet de distinguer 4 classes de A à D (classification de Ambler). Les classes A, C et D utilisent un site actif à sérine pour hydrolyser le noyau bêta-lactame, alors que les enzymes de la classe B sont des métallo-enzymes à zinc. Les β -lactamases de la classe A sont ainsi subdivisées en 8 groupes fonctionnels 2a, 2b, 2be, 2br, 2ber, 2c, 2e et 2f (Bush et Jacoby, 2010). C'est dans le groupe 2be où se trouvent les BLSE de type TEM, SHV et CTX-M, qui sont les plus diversifiées et les plus répandues.

3.2.2.2. Classification phylogénétique des BLSE

A ce jour, plus de 600 variantes de BLSE ont été décrites à travers le monde représentant un problème majeur de santé publique (Geser et al., 2012). En fonction de leur séquence en acides aminés, ces enzymes ont été classées dans 11 familles différentes: TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES, SFO, FEC et OXA (Figure 4). Les BLSE les plus anciennes dérivent de TEM-1, 2 et de SHV-1.

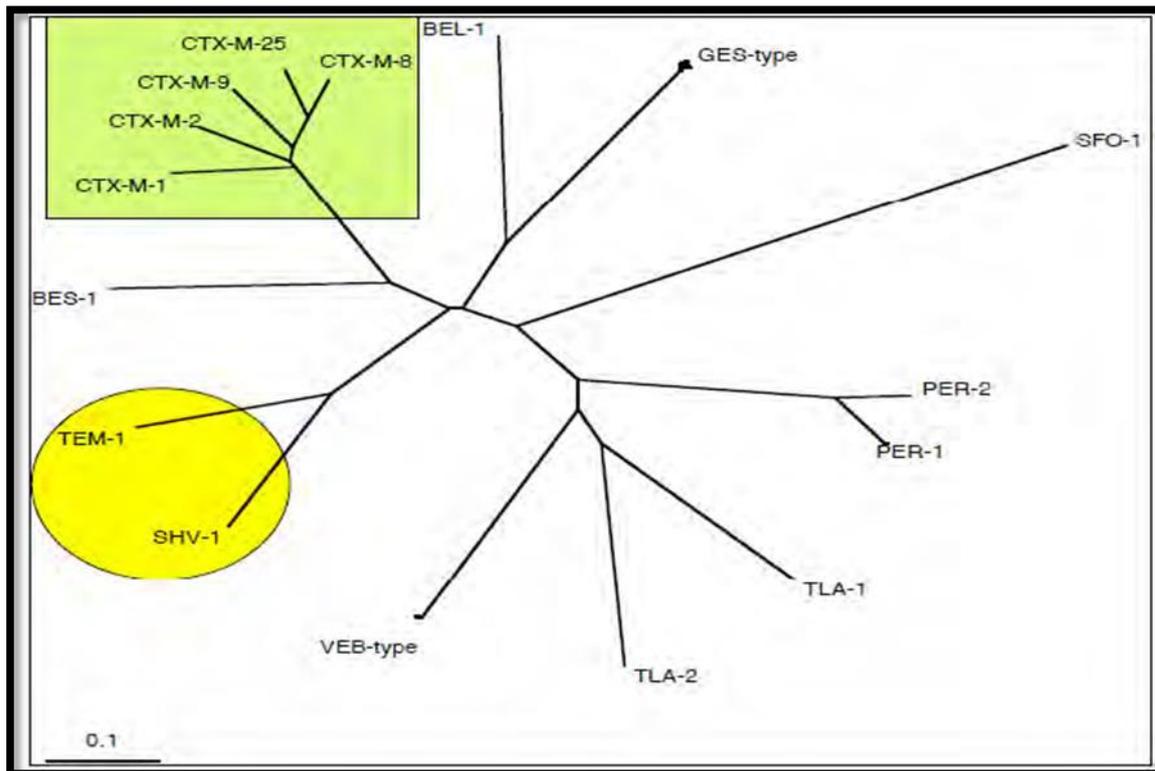


Figure 4: Classification phylogénétique des BLSE (Arlet., 2006)

Dans la suite de ce chapitre, nous allons nous focaliser sur les trois grandes familles de BLSE de type TEM, SHV et CTX-M illustrées en couleur dans la figure 4 ci-dessus.

3.2.2.2.1. BLSE de type TEM

Les BLSE de type TEM dérivent de TEM-1 (pour TEMoniera du nom de la première patiente chez qui elle fut isolée), qui a été détectée pour la première fois sur une souche de *E. coli* isolée chez un patient à Athènes en Grèce en 1965 et de TEM-2.

Plus de 195 types de BLSE TEM ont été décrits (www.lahey.org/studies/webt.htm), dont plus de 100 avec un phénotype BLSE. A noter que certains dérivés de TEM (environ 30) ne sont pas des BLSE mais présentent une diminution de sensibilité aux β -lactamines (Bradford, 2001). TEM-1, TEM-2 et TEM-13 qui ont une capacité d'hydrolyse limitée aux dérivés de pénicilline, ne sont pas considérés ainsi comme des BLSE (Livermore, 1995). Bien que fréquemment retrouvées chez *E. coli* et *K. pneumoniae*, les BLSE de type TEM ont aussi été rapportées parmi les autres membres de la famille des entérobactéries ainsi que *P. aeruginosa* (Bradford, 2001 ; Paterson et Bonomo, 2005). En Europe, les BLSE de type TEM les plus fréquentes sont TEM-24 chez *Enterobacter aerogenes*, TEM-3 et TEM-4 chez *K. pneumoniae*, et TEM-52 chez *Salmonella enterica* et *E. coli* (Cantón et al., 2008).

3.2.2.2.2. BLSE de type SHV

Tout comme les enzymes de type TEM, la majorité des enzymes SHV (pour *sulphydryl variable*, les réactifs sulfhydryles ayant un effet variable sur la spécificité du substrat) identifiées actuellement sont des BLSE et dérivent toutes de SHV-1 et de SHV-2. Plus de 143 types de BLSE SHV ont été décrits (www.lahey.org/studies/webt.htm). La majorité des dérivés de SHV-1, plus de 60 dérivés, ont un phénotype BLSE, avec SHV-5 et SHV-12 étant les mutants les plus fréquents en Europe (Cantón et al., 2008). La résistance induite par SHV-1 est limitée aux pénicillines. Par contre, SHV-2, qui a été décrite pour la première fois en 1983 chez *Klebsiella ozaenae* en Allemagne, est capable d'hydrolyser le céfotaxime (Gupta, 2007). Les BLSE de type SHV ont été détectées parmi de nombreuses entérobactéries (notamment *K. pneumoniae*) mais aussi chez *P. aeruginosa* et *Acinetobacter* spp. (Bradford, 2001 ; Paterson et Bonomo, 2005).

3.2.2.2.3. BLSE de type CTX-M

Elles hydrolysent préférentiellement le céfotaxime parmi les C3G, d'où leur nom de céfotaximases (Bonnet, 2004). En effet, les bactéries productrices de CTX-M sont résistantes au céfotaxime (CMI > 64 $\mu\text{g/ml}$) et plus ou moins sensibles à la ceftazidime (CMI de 2 à 8 $\mu\text{g/ml}$), tandis que les CMI de l'aztréonam sont variables (Paterson et Bonomo, 2005). Les enzymes CTX-M présentent une forte homologie avec les β -lactamases chromosomiques de *Kluyvera ascorbata* et *Kluyvera goergiana*, espèces d'entérobactéries de l'environnement. Pour l'heure, plus d'une centaine de CTX-M ont été identifiées (<http://www.lahey.org/Studies/>) classées en cinq groupes (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M- 8,

CTX-M-9, et CTX-M-25) en se basant sur les différentes substitutions d'acides aminés (Figure 5).

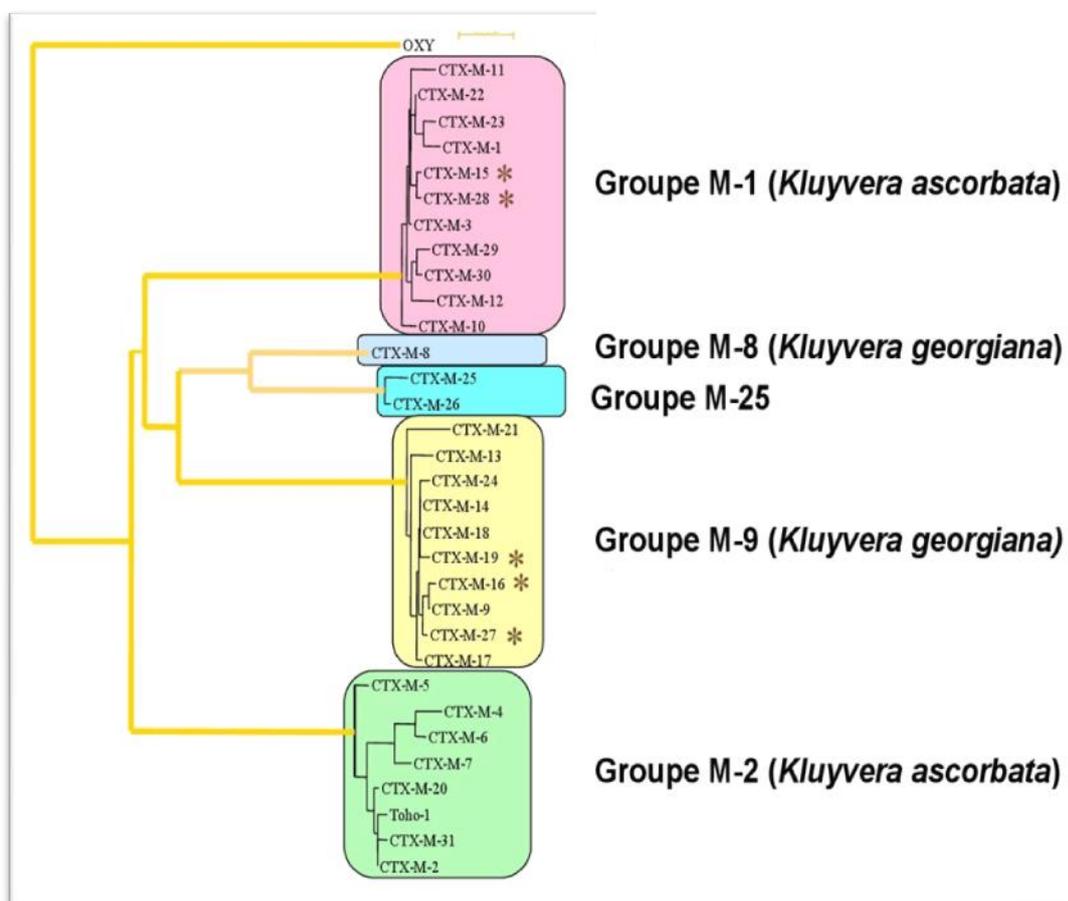


Figure 5 : Groupes phylogénique de CTX-M (Arlet, 2006)

3.2.2.3. Détection des BLSE

Historiquement, l'expression phénotypique des premières BLSE posait problème en raison d'une expression insuffisante de la résistance aux C3G par rapport à la concentration critique (c) de 4 mg/l proposée à l'époque par le CA-SFM. La proposition européenne récente des concentrations suivantes ($c \leq 1$ mg/l, $C > 2$ ou 4 mg/l) améliore de manière conséquente l'individualisation des souches résistantes ou intermédiaires par ce mécanisme (<http://www.sfm-microbiologie.org/>). Cependant, leur détection directe peut être nécessaire pour des raisons épidémiologiques ou d'hygiène. Elle reste basée sur la mise en évidence d'une synergie, ce qui se traduit par un aspect dit «en bouchon de champagne», par exemple entre un disque de C3G (céfotaxime, ceftazidime et/ou aztréonam) et un disque d'amoxicilline/acide clavulanique (méthode de diffusion), la distance séparant les disques

étant de 30 mm, centre à centre (Jarlier et al., 1988). On notera que la détection de la BLSE peut être négative avec une C3G, par exemple la ceftazidime mais positive avec l'aztréonam. À l'inverse, la céfotaximase CTX-M-1 peut apparaître sensible vis-à-vis de la ceftazidime et de l'aztréonam, mais présente une excellente synergie avec le céfotaxime (Philippon, 2013).

3.3. Épidémiologie des entérobactéries productrices de BLSE

Les souches productrices des BLSE ont été initialement rapportées de façon plus ou moins sporadique à la fin des années 1980 et au début de 1990 en Europe, au Japon et en Argentine ou encore au Mexique (Bonnet, 2004). Les BLSE de type TEM et SHV ont très rapidement et largement été diffusés dans le monde avec des prévalences variables selon les pays. L'apparition des CTX-M s'est accompagnée d'une profonde modification dans l'épidémiologie des entérobactéries productrices de BLSE dans la mesure où elles se sont répandues chez *E. coli* alors que les BLSE dérivées de TEM et SHV étaient principalement présentes chez *K. pneumoniae* et *Enterobacter cloacae* (Pitout et al., 2005). De plus, le portage digestif de souches productrices de BLSE est devenu non négligeable avec un réservoir de BLSE animal important (Rossolini et al., 2008). Chez l'animal, la production d'enzymes de type BLSE a été décrite chez la plupart des entérobactéries d'importance clinique (*E. coli*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*,...etc). Néanmoins, c'est chez *E. coli* que les BLSE ont été le plus fréquemment décrites. La détection de ces résistances est également majeure dans la filière poules/poulets, où la proportion de souches résistantes est en nette augmentation (Rapport Résapath ; www.resapath.anses.fr). De façon générale, aucune espèce animale n'est épargnée, y compris les animaux de compagnie.

En Algérie, la présence des souches d'*E. coli* productrices de BLSE a été de plus en plus signalée en milieu hospitalier et communautaires (Baba Ahmed-Kazi Tani et al., 2013; Gharout-Sait et al., 2012; Iabadene et al., 2008; Meradi et al., 2011; Touati et al., 2008). Chez l'animal, la production d'enzymes de type BLSE a été décrite chez des souches d'*E. coli* d'origine aviaire au cours des dernières années (Belmahdi et al., 2016, Meguenni et al., 2015). Des BLSE de type CTX-M-1, SHV-12 et TEM-1 ont été détectées dans des souches d'*E. coli* isolées à partir d'intestins de poulets abattus (Belmahdi et al., 2016) et de type CTX-M-1- et CTX-M-15 dans des souches d'*E. coli* d'origine aviaire dans les régions du centre Algérien (Meguenni et al., 2015).

4. Caractérisation des gènes de résistance aux antibiotiques

4.1. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La PCR est la méthode de référence permettant la mise en évidence directe de gènes de résistance aux antibiotiques en un temps relativement court, en utilisant des amorces spécifiques. La PCR permet d'amplifier, en un nombre élevé de copies, une séquence particulière d'ADN. La polymérisation se réalise dans un mélange réactionnel contenant de faibles quantités d'ADN possédant la séquence à amplifier, les deux amorces nucléotidiques complémentaires des séquences qui encadrent la cible à amplifier, l'ADN polymérase et un mélange des quatre désoxyribonucléotides-triphosphates (dNTP) (dATP, dTTP, dCTP et dGTP). Elle débute par une étape de dénaturation thermique de l'ADN à amplifier. Des séquences oligonucléotidiques complémentaires ou amorces sont alors hybridées aux extrémités 3' des deux brins du fragment d'ADN matrice. L'allongement des amorces dans le sens 5' → 3' est ensuite assuré par l'ADN polymérase *Taq*. Les nouvelles molécules d'ADN ainsi formées sont dénaturées et un nouveau cycle peut commencer, la réaction se répétant ainsi jusqu'à plusieurs dizaines de fois (Bonnet et al., 2000b ; Hennequin et al., 2012). La PCR peut être utilisée en simplex, multiplex ou en temps réel. Cette technique présente l'avantage de rendre un résultat rapide (en 4 à 6 heures). Elle est en outre très sensible et spécifique mais reste onéreuse et seuls des gènes de résistance spécifiques peuvent être recherchés.

4.2. Puces à ADN

La détection des gènes de résistance aux antibiotiques peut également être faite grâce à l'utilisation de puces à ADN (DNA microarray). Il s'agit d'une réaction d'hybridation entre des brins d'ADN monocaténaux synthétiques fixés sur une matrice et appelés sondes (spécifiques des gènes à rechercher) avec les brins complémentaires potentiellement présents dans l'échantillon résultant de la traduction des ARNm (provenant des gènes exprimés), et préalablement extraits et fixés sur un fluorochrome. L'hybridation va se traduire par un signal émis par le fluorochrome dans la longueur d'onde du laser, cela sera visualisé par un point de couleur rouge. Cette technique est plus coûteuse que la PCR et nécessite un appareil dédié tout en demandant une certaine expertise (Chen et al., 2005). Elle est également plus longue, nécessitant un temps de réponse variant entre 8 et 12 heures.

4.3. Séquençage

L'identification précise du variant du gène de résistance à un antibiotique détectée par PCR nécessite d'effectuer un séquençage entier de la région codante de l'ADN amplifié. Le séquençage de l'ADN constitue une méthode dont le but est de déterminer la succession linéaire des bases azotées prenant part à la structure de l'ADN. La méthode de Sanger (Sanger et al., 1977), décrite pour la première fois en 1977, reste à ce jour la principale méthode de séquençage utilisée dans les laboratoires. Son principe est le suivant : dans un premier temps, il est nécessaire d'amplifier l'ADN cible par PCR, puis de le dénaturer afin d'obtenir un ADN simple brin. À l'aide d'une amorce spécifique et complémentaire du brin étudié (sens ou antisens), identique ou différente de celle utilisée pour la PCR, une ADN polymérase effectue alors la synthèse de l'ADN complémentaire à partir de cette amorce. De l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', cette enzyme ajoute les dNTP complémentaires et de manière aléatoire et inconstante des didéoxyribonucléotides triphosphates (ddNTP), par exemple un ddGTP sera parfois ajouté à la place d'un dGTP. La réaction se faisant dans un seul tube, les ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP et ddTTP) sont marqués à l'aide de fluorophores différents pour chaque ddNTP (fluorophores « quatre couleurs »). Lorsqu'un ddNTP est incorporé à la place d'un dNTP, l'ADN polymérase ne peut plus continuer sa polymérisation. La réaction d'extension s'arrête (en effet, le didéoxynucléotide ne possède pas de groupe 3'-hydroxyle indispensable à la réaction de polymérisation de l'enzyme). Statistiquement, au cours de la réaction, pour chaque « base » de l'ADN cible, au moins une fois, un ddNTP complémentaire sera incorporé à la place d'un dNTP. Par conséquent, à la fin de la réaction, nous obtiendrons des fragments de tailles différentes (Lamoril et al., 2008). Cette technique est réservée aux laboratoires de recherche et aux centres de référence, elle serait utile uniquement à des fins épidémiologiques. Classiquement, les biologistes chargent leurs séquences à analyser *via* l'interface web de l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al., 1990) qui repose sur la base de données du NCBI (National Center for Biotechnology information).

Grâce aux procédés technologiques les plus récents, le génome bactérien entier (WGS : whole genome sequencing) peut être séquencé (Piso et al., 2017). La méthode du WGS emploie généralement des isolats bactériens. Toutefois, des protocoles pour le séquençage directement à partir de l'échantillon du patient sont de plus en plus souvent développés. La méthode du WGS permet en outre un typage de haute résolution ainsi que la classification des isolats dans un contexte moléculaire épidémiologique (Egli et al., 2018). Actuellement, ces analyses basées sur le séquençage ne sont pas réalisées de manière routinière, mais les progrès

techniques permettront dans un futur proche d'établir des profils de résistance très rapidement.

5. Méthodes de typage épidémiologique moléculaire

Face aux performances limitées des marqueurs phénotypiques (sérotypes, antibiotypes, lysotypes, ...etc), de nombreux marqueurs génotypiques ont été développés reposant soit sur la restriction de l'ADN suivie d'une électrophorèse soit sur l'amplification de certains gènes.

Le typage moléculaire permet de déterminer la clonalité de deux isolats ou de tracer l'histoire évolutive d'une souche bactérienne. Ce typage est réalisable suivant plusieurs méthodes comme la PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis), le MLST (Multi Locus Sequence Typing), la MLVA (Multiple Locus VNTR Analysis), le WGS ou encore la spectrométrie de masse à MALDI-ToF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight). Les méthodes de typage moléculaire présentent l'avantage d'apporter des données peu susceptibles de varier dans le temps à la différence des méthodes phénotypiques. En outre, elles ont fait la preuve d'être plus reproductibles et plus discriminantes et sont donc les méthodes de choix pour les études épidémiologiques (Shopsin et al., 1999).

Nous reprenons ci-après la méthode MLST, une technique largement utilisée dans la discrimination et la classification des souches bactériennes (Jaureguy et al., 2008).

La méthode de MLST (Multi Locus Sequence Typing) est basée sur l'amplification par PCR puis le séquençage de gènes de ménage. Les critères de choix de ces gènes reposent sur leur variabilité allélique, l'absence de répercussions due à la pression de sélection du milieu extérieur et leur répartition homogène sur le chromosome. Ce sont pour la plupart des gènes codant pour des enzymes du métabolisme intermédiaire, par exemple : l'amplification et le séquençage des huit gènes, *dinB*, *icdA*, *pabB*, *polB*, *putP*, *trpA*, *trpB* et *uidA*, ont été choisis pour *E. coli* (Jaureguy et al, 2008). Au sein d'une même espèce et pour chaque locus étudié, toute mutation relevée dans la séquence définit un nouvel allèle ou variant allélique, auquel un numéro arbitraire est attribué. La combinaison des différents allèles fournit un profil allélique qui définit un type particulier pour chaque isolat ou Sequence Type (ST). La combinaison des allèles des différents gènes analysés est unique pour une souche donnée (Maiden, 2006 ; Maiden et al., 1998). Le procédé relativement lent d'accumulation de changements dans la séquence des gènes métaboliques au cours du temps rend cette méthode idéale pour les études

d'épidémiologie globale (Sullivan et al., 2005). Cependant, elle est une méthode lourde en termes de coût et de temps d'analyse.

6. Les animaux réservoirs des gènes de résistance aux antibiotiques

Le lien animal-homme de l'antibiorésistance repose probablement sur la bactérie *E. coli*, l'une des plus ubiquitaires des deux réservoirs, et qui constitue une part importante de la flore commensale des mammifères. Cette bactérie s'échange également entre espèces animales, conduisant au constat d'un réservoir animal commun, malgré la diversité des filières et des systèmes de production. Les produits d'origine animale destinés à la consommation sont considérés comme un véritable réservoir de bactéries antibiorésistantes et de gènes de résistance (Pezzotti et al., 2003; White et al., 2001). Le risque pour l'homme est d'autant plus important qu'il concerne la résistance à des familles d'antibiotiques jugées « critiques », telle que celle aux C3G et aux fluoroquinolones.

Des souches d'entérobactéries productrices de BLSE de type CTX-M ont été isolées un peu partout dans le monde et leur fréquence a connu une augmentation spectaculaire, ce qui est devenu un problème thérapeutique majeur puisqu'elle ne cesse de croître. Depuis les vingt dernières années, les espèces des entérobactéries, principalement *E. coli*, ont montré des particularités d'acquisition de plasmides exprimant les gènes de résistance aux C3G et aux quinolones. Les gènes, principalement localisés sur des plasmides, diffusent très facilement entre bactéries. En plus, la majeure partie des BLSE isolées chez les patients à l'hôpital a été retrouvée dans des isolats d'origine animale (Ben Sallem et al., 2014; Leverstein-van et al., 2011). Même si les clones d'*E. coli* impliqués dans les infections humaines et animales sont principalement différents, plusieurs plasmides communs ont été décrits. Ces plasmides pourraient constituer - plutôt que les bactéries elles-mêmes - un véritable lien entre les deux réservoirs.

Chapitre III : Solutions alternatives

Chapitre III : Solutions alternatives

Au début du XX^e siècle, les antibiotiques ont révolutionné la prise en charge des pathologies infectieuses en réduisant considérablement la mortalité. Les progrès de la recherche ont permis, jusque dans les années 1990, un développement incessant de nouvelles molécules de mécanismes d'action variés et complémentaires, permettant de répondre de façon adaptée à l'évolution de la résistance. Les années 2000 ont été marquées par une perte de cette sensation d'invulnérabilité stigmatisée par l'apparition de bactéries d'abord multi-résistantes puis pan-résistantes à l'origine d'authentiques impasses thérapeutiques. Ce nouveau challenge a donc motivé ces dernières années un regain d'intérêt pour des thérapeutiques considérées comme alternatives (Kipnis et al., 2012). Ce chapitre résume les principales solutions alternatives actuelles de lutte contre les agents pathogènes.

1. Les bactériophages

Le concept de la phagothérapie a été envisagé pour le traitement des maladies infectieuses avant même l'apparition des antibiotiques. L'idée est d'utiliser des virus qui neutralisent les bactéries pathogènes par le processus de la bactériophagie. Slopek et al. rapportaient en 1987 les résultats d'un essai mené sur 550 patients traités par phagothérapie pour des infections purulentes entre 1981 et 1986 (Slopek et al., 1987). Plus récemment, la phagothérapie a été proposée dans le cadre de bactériémies liées à des pathogènes multi-résistants sur un collectif de 94 patients (Weber-Dabrowska et al., 2003), soit seule, soit associée aux antibiotiques. Une efficacité thérapeutique fut obtenue dans 85,1% des cas. Les bactériophages représentent donc une source riche d'agents antibactériens, mais ne sont pas à l'abri du développement de mécanismes de résistance, dont le taux est équivalent à celui des antibiotiques. Un diagnostic bactériologique précis est nécessaire, du fait d'une certaine spécificité d'action des bactériophages, de plus, il est difficile de développer des phages à large spectre. Des questions demeurent en suspens quant à la toxicité possible et les effets secondaires immunologiques possibles, surtout en cas d'exposition itérative (Kipnis et al., 2012).

L'utilisation des bactériophages a été autorisée en 2006 aux États-Unis par la Food and Drug Administration (FDA) comme conservateur alimentaire, notamment pour lutter contre la listériose avec l'utilisation d'une préparation à base de six bactériophages. Cette préparation a été évaluée sans danger, notamment vis-à-vis du risque allergénique ou immunologique. En 2009, l'European Food Safety Authority (EFSA) reconnaît le bénéfice potentiel de

l'utilisation des bactériophages dans certaines conditions, mais ne peut conclure quant à la durée d'action et notamment l'efficacité en cas de recontamination (Mahony et al., 2011).

2. Les probiotiques

Le terme « probiotique » fut introduit en 1965 par Lilly et Stillwell, en opposition à celui d'antibiotique, comme des facteurs microbiologiques capables de stimuler la croissance d'autres organismes comme ceux composant la flore intestinale. En 1989, Roy Fuller précise que ces bactéries doivent être viables et induire un effet bénéfique sur l'hôte. Les effets bénéfiques des probiotiques découlent de mécanismes indépendants du système immunitaire proprement dit. En digérant les aliments dans la lumière digestive, les bactéries probiotiques diminuent l'accessibilité des bactéries pathogènes aux nutriments (Majamaa et Isolauri, 1997). Les probiotiques produisent des substances antibiotiques naturelles comme la bactériocine (Zamfir et al., 1999), et altèrent le pH local générant un milieu défavorable à la prolifération des bactéries pathogènes (Aiba et al., 1998). Les probiotiques aident l'hôte à mieux réparer les muqueuses agressées par les bactéries invasives en participant à l'élimination des radicaux superoxydes toxiques pour les cellules eucaryotes (Akisu et al., 2003) et en stimulant la couche protectrice de mucine (Otte et Podolsky, 2004). Aujourd'hui, l'OMS définit les probiotiques comme des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, ont des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte. En effet, les probiotiques sont actuellement considérés comme un complément alimentaire par la FDA et ne sont donc pas soumis aux mêmes règlements que les produits pharmaceutiques (Kipnis et al., 2012).

3. Les anticorps

La sérothérapie consiste à traiter des pathologies infectieuses en utilisant des sérums d'origine animale ou humaine riches en anticorps spécifiques capables de neutraliser une toxine bactérienne, un venin ou un virus. La sérothérapie est capable d'offrir une protection efficace mais de courte durée, ce qui rend cette méthode moins adaptée à des traitements très prolongés. En outre, les sérums d'origine animale pouvaient, surtout en cas de répétition, déclencher des réactions indésirables car ils contiennent les protéines animales immunogènes contre lesquelles le receveur est susceptible de s'immuniser (Lebranchu, 2018).

De la sérothérapie découle l'immunisation passive qui consiste à injecter directement au patient des anticorps dirigés contre l'agent pathogène ou un de ses facteurs de virulence comme les toxines, et non le sérum en entier. Les deux types d'anticorps utilisés sont les immunoglobulines humaines polyclonales poolées qui reconnaissent plusieurs cibles microbiennes ou épitopes, et les anticorps monoclonaux qui reconnaissent un seul épitope. Les anticorps agissent par des mécanismes antimicrobiens directs : neutralisation de toxines, interférence avec le pathogène et effet bactéricide (La Rocca et al, 2008), et indirects via le fragment immuno-modulateur (fragment cristallisable, Fc), tels que l'opsonisation et l'activation de la réponse innée, notamment du complément (Casadevall et Pirofski, 2003).

L'association des anticorps avec les antibiotiques en tant qu'adjuvant potentialisateur illustre la place que pourrait prendre les immunothérapies spécifiques dans le traitement des infections. De même, des études récentes ont montré l'utilité *in vivo* d'associer un anticorps anti-PcrV du système de sécrétion de type 3 et les antibiotiques contre *P. aeruginosa* (Song et al., 2011), et l'utilité *in vitro* d'une association entre un anticorps anti-pompe à efflux ABC et les antibiotiques contre *Stenotrophomonas maltophilia* (Al-Hamad et al., 2011). Cependant, les anticorps peuvent entraîner un déficit immunitaire en détruisant ou en bloquant un ou plusieurs composants de ce système (Lebranchu, 2015). En outre, ces anticorps peuvent en effet entraîner une réponse auto-immune avec des manifestations cliniques telles que des thyroïdites, colites, hépatites (Lebranchu, 2018).

4. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE) sont des composés organiques naturels complexes de structures organiques très variées (Duquenois et Anton, 1968). Le terme « huiles » vient de leur propriété de se solubiliser dans les graisses, alors que le terme « essentielles » désigne l'odeur dégagée par la plante productrice (Chemat et al., 2013). Généralement, les HE sont des liquides à température ambiante, volatiles, inflammables, odorantes, et leur densité est généralement inférieure à 1, à l'exception du cinnamome (cannellier), des clous de girofle et de sassafras. Elles sont pratiquement incolores, sauf la tanise qui est bleue, la cannelle rouge brune et l'inule verte. Elles sont insolubles dans l'eau mais solubles dans les huiles végétales et dans la plupart des solvants organiques, tels que l'alcool et l'éther. Elles peuvent être oxydées rapidement (Charpentier, 2008).

Les HE sont bio-synthétisées par des plantes odorantes dites aromatiques comme métabolites secondaires. Ces plantes se caractérisent par la présence de structures sécrétrices des HE bien spécialisées telles que les poils sécréteurs (Lamiaceae), les poches sécrétrices (Myrtaceae) et les canaux sécréteurs (Apiaceae). Ces structures sont dotées d'un caractère physiologique sécrétoire bien défini, qui diffèrent selon l'organe végétal en question. Ces structures sont également impliquées dans le stockage des HE. Deux principales voies sont à la base de la synthèse des HE. La voie de l'acide mévalonique (MVA) qui a lieu dans le cytoplasme, la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (Bohlmann et Keeling, 2008; Croteau et al., 2000; Dubey et al., 2003). La seconde voie est celle du phosphate déoxyxylulose ou le méthylérythritol (MEP) et se déroule au niveau des plastides (Bohlmann et Keeling, 2008; Dubey et al., 2003). Selon la voie empruntée, les constituants des HE appartiennent presque exclusivement à deux familles biosynthétiques distinctes : les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes. Les monoterpènes (dix carbones) et les sesquiterpènes (15 carbones) sont des composés des HE qui représentent la majorité des membres de terpénoïdes ; quoique les constituants diterpéniques peuvent occasionnellement être observés (bouyahla et al., 2006).

4.1. Procédés d'obtention des HE

L'extraction des HE se fait par différentes techniques, mais les plus utilisées sont celles de distillation (l'hydrodistillation, l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodiffusion), essentiellement à des fins commerciales (Burt, 2004). Elles peuvent aussi être obtenues par extraction à froid (Santoyo et al., 2005), dioxyde de carbone supercritique, extraction assistée par ultrasons ou par micro-ondes (Kimbaris et al., 2006).

4.2. Composition chimique des HE

L'HE peut contenir approximativement jusqu'à 300 molécules ; cependant, la plupart des huiles comportent 20 à 60 molécules (Dung et al., 2008; Iscan et al., 2005; Langenheim, 1994; Pengelly, 2004). Les composés trouvés dans les HE appartiennent à des classes chimiques variées (Figure 6). Les composés terpéniques sont prédominants, mais les phénylpropanoïdes et les autres composés (composés nitriques et sulfuriques) se retrouvent avec des fréquences plus faibles et en proportion similaire (Friedrich, 1976). Elles peuvent aussi contenir des composés azotés (Weidenhamer et al., 1993).

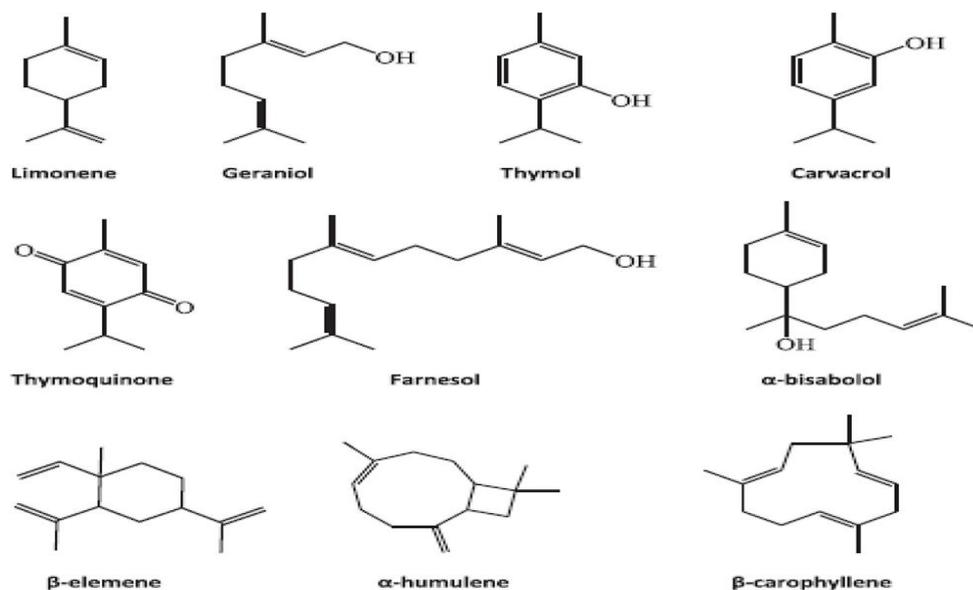


Figure 6: Structure chimique des chémotypes contenus dans les HE (Bouyahya et al., 2016)

4.2.1. Groupe des terpènes et terpénoïdes

C'est le groupe le plus important, près de 3 000 terpènes ont été décrits dans la littérature (Connolly et Hill, 1991; Pinder, 1960). Il comprend des monoterpènes (dix atomes de carbone dans la molécule), des sesquiterpènes (15 atomes de carbone), des diterpènes (20 atomes de carbone). Les terpènes sont des molécules organiques constituées par un multiple de cinq atomes de carbone de formule générale $(C_5H_8)_n$. La molécule de base est l'isoprène (Ruzicka, 1953). Ce dernier, sous sa forme réactive, est l'isoprénylpyrophosphate (IPP), qui se transforme partiellement en diméthylallylpyrophosphate (DMAPP). Les composés IPP et DMAPP réagissent ensemble pour former le géranylpyrophosphate (ou GPP), précurseur des monoterpènes en C10. Une deuxième molécule d'IPP, réagissant sur le GPP, fournit le farnésylpyrophosphate (ou FPP), précurseur des sesquiterpènes en C15 ; une troisième molécule d'IPP, réagissant sur le FPP, fournit le géranylgéranylpyrophosphate (GGPP), précurseur des diterpènes en C20 ; et ainsi de suite, pour la formation des sesterpènes en C25, des triterpènes en C30 et des carotènes en C40 (Keszei et al., 2008).

4.2.2. Groupe des phénylpropanoïdes

Ce groupe des dérivés du phénylpropane ($C_6H_5-CH_2-CH_2-CH_3$) est moins fréquent. La biosynthèse concerne le précurseur de cette série qui est l'acide shikimique (ou acide trihydroxy-3,4,5-cyclohexane-1-carboxylique) qui conduira aux dérivés de l'acide cinnamique

C₆H₅-CH=CH-COOH. Ce deuxième groupe est constitué par : des aldéhydes (par exemple, le cinnamaldéhyde) et des dérivés méthoxylés, ainsi que des allylphénols (par exemple, l'eugénol), des propénylphénols (par exemple, l'anéthole) (Bakkali et al., 2008; Clifford, 2000; Friedrich, 1976 ; Sangwan et al., 2001). Il existe aussi des lactones ou esters cycliques (par exemple, la coumarine) formés à partir de dérivés de l'acide cinnamique. Parfois, la chaîne aliphatique est réduite à un seul atome de carbone (par exemple, la vanilline) (Bouyahya et al., 2016).

4.2.3. Composés nitriques et sulfuriques

Ces composés proviennent le plus souvent de la dégradation de molécules peu ou pas volatiles. Par exemple, l'oxydation des acides linoléique et linoléique conduit à des peroxydes instables qui, à leur tour, après dégradation, vont donner des alcools, des aldéhydes et des acides de masse moléculaire plus petite. Les acides organiques sont rarement présents dans les HE, ils réagissent avec les alcools pour former des esters. Les carotènes se décomposent en ionones. Les composés azotés qui contiennent du soufre sont rares dans les HE; on les retrouve à l'état naturel dans les aliments torréfiés, grillés ou rôtis. Les concrètes renferment des molécules de masse moléculaire élevée (Halkier et Gershenzon, 2006). La présence de soufre, en particulier, confère un caractère odorant très marqué (Boelens, 1996; Goeke, 2002; Pengelly, 2004). Les molécules contenant du soufre et du nitrogène sont des aglycones, des glycosinolates et des isothiocyanates. Les aglycones constituent la portion non sucrée d'un glycoside, et les glycosinolates sont des composés contenant du soufre ou du nitrogène, formés de glycoside et l'un des acides aminés. En plus des isothiocyanates, des cyanates et des composés nitriques, d'autres molécules contenant le nitrogène peuvent occasionnellement être présentes dans les HE.

4.3. Méthodes de détermination des constituants de l'HE

Les différentes techniques chromatographiques utilisées dans la détermination de la composition des HE sont : la chromatographie en phase gazeuse (CPG), la chromatographie sur couche mince (CCM) et la chromatographie liquide à haute performance (CLHP). La chromatographie concerne la séparation des constituants d'un mélange grâce à la différence de distribution des composés entre deux phases non miscibles : stationnaire et mobile. La phase stationnaire étant un liquide non volatil réparti ou greffé sur un support inerte. La phase mobile est constituée de gaz inerte (H₂, N₂, He). La chromatographie en phase gazeuse

couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) est la méthode la plus appropriée dans l'étude des HE. Elle est très sensible et possède un vaste champ d'application. Cette technique permet d'obtenir des informations sur la nature, la composition et la structure des constituants d'un mélange. Nous reprenons ci-après la technique CPG/SM, la méthode la plus couramment utilisée pour déterminer la composition chimique des HE.

L'appareillage de la CPG est schématisé dans la figure 7. Il comprend une bouteille de gaz comprimé, avec un manomètre détenteur et un autre manomètre indiquant la pression de sortie, un injecteur dans lequel est introduit l'échantillon, une colonne placée dans un four thermostaté et un détecteur relié à un système d'enregistrement. Actuellement tous les appareils sont pilotés par un micro-ordinateur. Un débitmètre, placé à la sortie du détecteur, permet la mesure exacte du débit de gaz vecteur.

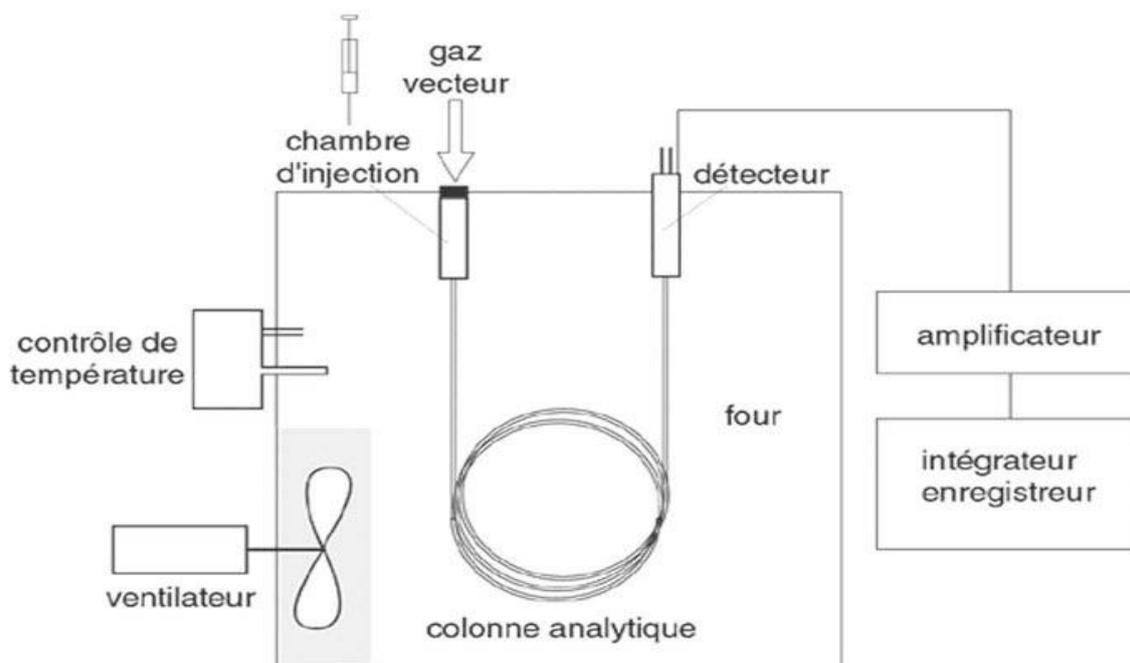


Figure 7 : Schéma de l'appareil de CPG (Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2012)

La solution est injectée manuellement au moyen d'une seringue ou avec un injecteur automatique qui permet d'obtenir une meilleure reproductibilité. La chambre d'injection est maintenue à une température telle que la vaporisation de l'échantillon se fasse dans un temps le plus court possible. Le temps de rétention Tr_A (ou temps passé dans la phase mobile) est le temps mesuré depuis l'injection du mélange des composés dans la colonne jusqu'à la sortie du composé A. Le Tr est caractéristique du constituant dans les conditions d'analyse données. Il

dépend de la nature de la phase stationnaire, de la nature de la phase mobile et de son débit D, ainsi que de la longueur L de la colonne. Les indices de Kovats (IK) sont calculés par comparaison entre les Tr du composé étudié et ceux d'une série d'alcane linéaires permettant un « étalonnage » du chromatogramme (Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2012).

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse est la première association réussie d'une méthode chromatographique à la spectrométrie de masse. Deux types d'analyseur en SM sont couramment utilisés : le quadripôle et la trappe à ions. Le quadripôle est caractérisé par quatre barreaux parallèles situés aux quatre angles d'un carré, connectés deux à deux, et soumis à des radiofréquences. On fait varier les tensions continues et alternatives appliquées aux électrodes. Pour une radiofréquence spécifique, l'ion entre en résonance, il oscille entre les électrodes adjacentes et suivra un parcours très rapide jusqu'au détecteur, alors que les autres ions seront éjectés du champ. La trappe à ions est constituée par trois électrodes, l'une est en forme d'anneau, alors que les deux autres constituent les parois supérieure et inférieure de l'enceinte. Comme dans le cas précédent, les variations de radiofréquence vont faire entrer en résonance l'ion considéré qui poursuivra son trajet jusqu'au détecteur, alors que les autres seront éjectés. Par la suite, les multiplicateurs d'électrons et les photomultiplicateurs qui sont les détecteurs les plus courants, convertissent le faisceau d'ions et l'amplifient en signaux électriques utilisables par l'ordinateur. Les signaux sont visualisés sous forme de pics d'intensité variable et rangés sur une échelle de rapport masse/charge (m/z). L'enregistrement de chaque espèce m/z correspond au spectre de masse, spécifique de chaque molécule. Un logiciel permet de proposer la structure de la molécule, grâce à son spectre de masse comparé à une banque de données. L'identification est ensuite réalisée par comparaison des indices de rétention Ir et des données spectrales (spectres de masse) des constituants individualisés avec les caractéristiques de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres. La probabilité d'identification ou de ressemblance doit être la plus élevée possible. Le dosage se fera selon le mode SIM (Single Ion Monitoring) par la prise en compte de l'ion « quantifiant » (un seul ion caractéristique choisi) ou selon le mode SCAN (acquisition en balayage) où tous les ions sont considérés (CIT ou courant ionique total) (Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2012).

4.4. Propriétés des HE

Les HE sont des complexes naturels de molécules volatiles et odorantes synthétisées par les plantes aromatiques comme métabolites secondaires. Elles possèdent des propriétés

antimicrobiennes, antioxydantes, anti-inflammatoires, antiprolifératrices et anticancéreuses. Nous ne décrivons ici que l'activité antibactérienne des HE.

4.5. Propriétés antibactériennes des HE

Les HE et leurs composants majoritaires se sont révélés efficaces dans le contrôle de la propagation de certains agents bactériens (Nazzaro et al., 2013). Les propriétés antibactériennes des HE sont connues depuis longtemps et aujourd'hui, un bon nombre de publications importantes ont confirmé leur effet bactériostatique et bactéricide contre des souches bactériennes pathogènes même parfois à de très faibles concentrations (Talbaoui et al., 2012). Plusieurs molécules présentes dans les HE sont douées de propriétés antibactériennes, en particulier les phénols (tels que le carvacrol, le thymol et l'eugénol), les alcools (tels que le linalool) et les aldéhydes (tels que le cinnamaldéhyde). Les effets antibactériens sont influencés par différents facteurs tels que la composition chimique de l'HE testée, la méthode expérimentale utilisée et la souche bactérienne testée (Delaquis et al., 2012). Leur action antibactérienne dépend à la fois des composés majoritaires, des effets synergiques et/ou additifs et des composés mineurs qui y sont présents (Mourey et Canillac, 2002).

4.6. Mécanismes d'action antibactérienne des HE

Plusieurs travaux ont été réalisés depuis des années sur l'activité antibactérienne des HE. Ces résultats obtenus restent figés dans des tests révélant la présence ou l'absence d'un effet et n'ont pas pu aborder clairement le mode d'action par lequel une HE exerce son effet bactéricide ou bactériostatique. Plus récemment, certaines études ont commencé à décortiquer spécifiquement l'action des HE et leurs composants majoritaires sur les cibles bactériennes. Cependant, les mécanismes restent moins clairs, et leur complexité vient de la composition chimique des HE qui présente une diversité de molécules pouvant agir chacune sur une cible différente (Tiwari et al., 2009). Par ailleurs, divers mécanismes antibactériens des HE ont été décrits. Elles peuvent affecter des niveaux morphologiques jusqu'à des niveaux de régulation en passant par des cibles structurales. Les principales cibles d'action des HE et de leurs composés sont indiquées d'une manière générale sur la Figure 8. Elles peuvent agir sur la membrane cellulaire perturbant ainsi le maintien du statut énergétique de la cellule, le processus de transduction d'énergie couplé à la membrane et le transport de soluté, et la

régulation métabolique. Parfois, les HE modifient l'expression des opérons en inhibant les médiateurs des auto-inducteurs.

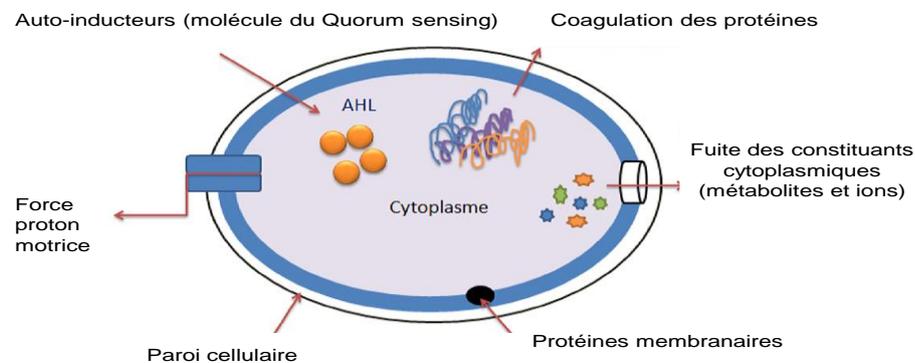


Figure 8 : Mécanismes d'action des HE sur la cellule bactérienne (Bouyahya et al., 2017)

4.6.1. Action sur la membrane cellulaire

Beaucoup de mécanismes d'action sont attribués à l'interaction de composants des HE avec les constituants de la membrane cellulaire (Benchaar et al., 2008). En effet, le caractère lipophile des molécules constituant les HE les rend capables de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane cellulaire et de s'accumuler entre les phospholipides, entraînant des changements de conformation et éventuellement un manque de régulation de la membrane cellulaire, ce qui perturbe ainsi le transport membranaire des substances nutritives. Le transport membranaire peut aussi dysréguler via la perturbation du gradient ionique de deux côtés de la membrane cytoplasmique. Cependant, certaines souches bactériennes ont pu développer des mécanismes lui permettant de contrebalancer cet effet grâce à l'utilisation de la pompe ionique (Cox et al., 2001).

4.6.2. Action sur les acides gras membranaires

Les HE, grâce à leur caractéristique hydrophobe, constituent de véritables candidats qui pourraient affecter la biosynthèse des lipides, y compris les acides gras insaturés, et modifier ainsi la structure de la membrane cellulaire (Burt et Reinders, 2003). En effet, la présence des

HE dans la cellule bactérienne, même à des concentrations inférieures à la concentration minimale inhibitrice (CMI), diminue le taux des acides gras insaturés qui sont généralement responsables de la fluidité membranaire. Cela cause légèrement des perturbations au niveau de l'enveloppe externe de la cellule, traduisant ainsi des modifications structurales de la membrane. L'action des HE n'est pas restreinte aux acides gras eux-mêmes, mais peut également affecter des enzymes responsables de la biosynthèse de ces derniers (Di Pasqua et al., 2007).

4.6.3. Action sur les protéines

Les différents composants des HE peuvent agir sur les protéines présentes dans les bactéries et peuvent affecter la division cellulaire. Le cinnamaldéhyde, par exemple, est capable d'inhiber la séparation des cellules de *Bacillus cereus*. L'action de cinnamaldéhyde sur la division cellulaire réside dans l'inhibition de l'assemblage du complexe FtsZ (un régulateur de division cellulaire chez les procaryotes) avec les anneaux-Z localisés sur les sites de division cellulaire. Ce composé peut encore perturber la morphologie des anneaux-Z et inhiber la polymérisation des FtsZ GTP-dépendante (Domadia et al., 2007).

4.6.4. Mode d'action ciblant le taux d'ATP

La production d'ATP dans les cellules procaryotes se produit à la fois dans la paroi cellulaire au niveau de la membrane, par la chaîne respiratoire, et dans le cytosol par la glycolyse. La modification dans la membrane cellulaire affecte légèrement le processus du couplage énergétique conduisant à une perturbation entre l'équilibre du pool d'ATP intra- et extracellulaire (Turgis et al., 2009). Par exemple, l'utilisation de l'HE d'origan contre *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* a réduit significativement le taux d'ATP intracellulaire via la perturbation de la chaîne respiratoire au niveau membranaire (Caillet et Lacroix, 2006).

4.6.5. Action contre le Quorum Sensing (QS)

Le QS, appelé encore phéromones bactériennes, désigne le principe commun de communication intercellulaire entre microorganismes qui leur permet de détecter leur densité et de coordonner leur expression génique notamment en matière de virulence et de formation de biofilms. Le QS fonctionne par la synthèse et la sécrétion de molécules de signalisation

intercellulaire, appelées des « auto-inducteurs », qui diffusent librement et dont la concentration intracellulaire reflète la concentration extracellulaire et donc la densité des microorganismes environnants. Les auto-inducteurs recouvrent plusieurs classes de composés: les oligopeptides des bactéries Gram+ tels les autoinducing peptides (AIP) de *S. aureus*, les dérivés du dihydroxypentanedione (DPD) tels AI-2 de *Vibrio harveyi* retrouvé chez les Gram+ et Gram-, les N-acyl homoserine lactones (AHL) des Gram-, et diverses petites molécules telles que le *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) (Antunes et al., 2010). Classiquement, trois approches sont envisagées dans l'inhibition du QS : la perturbation de l'auto-inducteur, l'inhibition des interactions ligand/récepteur et la destruction de l'auto-inducteur par clivage enzymatique (Tay et Yew, 2013). Une combinaison de ces trois approches peut également être développée afin d'abolir totalement la communication intercellulaire (Hirakawa et Tomita, 2013).

Plusieurs travaux récemment réalisés ont montré que les HE représentent de véritables candidats contre le QS (Luciardi et al., 2016; Luís et al., 2016; Myszka et al., 2016). Parmi les HE testées contre le QS, on trouve celles de la lavande, du clou de girofle et du romarin (Faleiro, 2011). Récemment, Luciardi et al. (2016) ont étudié l'activité antibiofilm et anti-QS de l'HE de *Citrus reticulata* en utilisant *Pseudomonas aeruginosa* comme modèle d'étude. Les résultats ont montré une inhibition de la formation de biofilm à la concentration de 0,1 mg/ml, une réduction de viabilité cellulaire du biofilm (41%) et une diminution dans la production du système AHL (33 %) (Luciardi et al., 2016). L'HE de *Thymus vulgaris* et ses composés majoritaires (carvacrol et thymol) ont été aussi testés pour leurs effets anti-biofilms et anti-QS contre *Pseudomonas fluorescens* KM121. Les auteurs ont révélé une réduction significative de la production d'AHL, de la formation de biofilms et de la mobilité des flagelles, ce qui suggère que l'inhibition des gènes d'AHL et des flagelles empêche la formation de biofilms (Myszka et al., 2016). Certains composés isolés des HE (chémotypes) se sont aussi montrés efficaces contre le QS. Par exemple, la cinnamaldéhyde a inhibé la bioluminescence chez *Vibrio harveyi* BB170 et l'eugénol chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Chromobacterium violaceum* via l'inhibition de la production des facteurs de virulence tels que le violacéine, l'élastase, la pyocyanine et le biofilm (Zhou et al., 2013).

4.7. Toxicité des HE

Généralement, les huiles et les substances aromatiques utilisées sous contrôle médical et aux doses physiologiques ne présentent aucune toxicité. Les problèmes toxiques peuvent

cependant apparaître lors de confusion, de volonté suicidaire ou d'automédication irraisonnée. Cependant, certaines molécules aromatiques sont potentiellement très toxiques et font l'objet d'interdiction ou de restriction que ce soit en pharmacie, en parfumerie ou en tant qu'arômes alimentaires. Par exemple : le menthol, composé majoritaire de l'HE de la menthe poivrée [*Mentha x piperita* (L) var. *piperita*] et de la menthe du Japon [*Mentha arvensis* (L) var. *piperascens*] présente une toxicité remarquable lorsqu'il est administré à forte dose, provoquant ainsi des douleurs abdominales, nausées, vomissements, vertiges, ataxie, convulsions et somnolence puis coma (Reynolds, 1982). La thujone (cétone monoterpénique présente dans l'HE de certaines plantes comme : *Artemisia absinthium*) existe sous deux formes isomériques, α et β , la forme α étant la plus toxique. L' α -thujone est un antagoniste du récepteur GABA-A et a des effets stimulants et convulsivants. L'intoxication à la thujone comprend des convulsions épileptiques, des cyanoses, des entrecoupées d'hypotonie, des hyporeflexies et des pertes de conscience. Un autre exemple d'une substance d'HE toxique est celle du pulégone (composé présente dans l'HE de certaines plantes comme : *Mentha pulegium*). La toxicité des HE riches en pulégone se manifeste par des nécroses hépatocellulaires conduisant à des hépatites aiguës parfois fulminantes (Siamak et al., 1998).

4.8. Applications des HE

Les HE des plantes sont largement utilisées en aromathérapie, en pharmacie, en parfumerie, en cosmétique et en industrie agro-alimentaire. Leur utilisation est liée à leurs larges spectres d'activités biologiques reconnues (Amarti, 2010; Schelz et al., 2010). L'usage des HE en médecine ne fut jamais abandonné malgré la découverte de processus de synthèse organique et la naissance de l'industrie pharmaceutique. Elles sont considérées comme un réservoir irremplaçable de principes actifs (Ouraïni et al., 2005). En effet, les HE sont largement utilisées, en médecine humaine et vétérinaire, pour traiter certaines maladies internes et externes d'origine bactérienne ou virale.

Dans le domaine des productions animales, les HE sont principalement utilisées pour améliorer les performances zootechniques des volailles (vitesse de croissance, Indice de Consommation (IC), digestibilité des aliments) (Alleman et al., 2013 ; Ben-Mahdi et al., 2011). Leur usage, comme d'autres extraits végétaux à connotation « naturelle », a connu un développement important et cela depuis l'interdiction des « Antibiotiques Facteurs de Croissance » en 2006 en Europe (article 11-2 du règlement (CE) n°2003/1831). Les industriels de l'alimentation animale se sont alors efforcés de rechercher des alternatives à ces

molécules, désormais bannies de la liste des additifs pour les animaux d'élevage. Les produits à base de plantes, déjà utilisés pour leurs effets sur les performances zootechniques chez les volailles depuis les années 1990 (Brenes et Roura, 2010), ont vu leur utilisation se développer fortement. Ainsi, plusieurs nouveaux mélanges d'HE ou de composés synthétiques (associés ou non à d'autres produits tels que les épices), ont fait leur apparition sur le marché mondial (Alleman et al., 2013). On peut aujourd'hui ainsi obtenir plus de 3 000 sortes d'HE, dont 300 sont commercialisées à des fins très diverses (en pharmacie humaine et vétérinaire, parfumerie et cosmétique), comme produits phytosanitaires, comme sources d'arômes et enfin en alimentation humaine et animale (Brenes et Roura, 2010).

PARTIE EXPERIMENTALE

Problématique et objectifs

Les bactéries multi-résistantes aux antibiotiques constituent une préoccupation majeure en santé humaine et animale en raison de leur diffusion globale et de la variété des facteurs favorisant leur diffusion. Cette multi-résistance est retrouvée chez une vaste proportion de bacilles à gram négatif, mais les entérobactéries représentent les germes les plus incriminés. La coexistence de plusieurs gènes de résistance pour différents antibiotiques dans des souches d'entérobactéries et leur dissémination dans la filière avicole chair majeure d'autant le risque croissant d'impasse thérapeutique. Afin de lutter contre l'émergence et la diffusion de l'antibiorésistance, et également de protéger la santé du consommateur, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et leur origine tout au long de la filière avicole est absolument nécessaire à la mise en place d'une stratégie de prévention de dissémination globale des bactéries multi-résistantes.

En attendant l'avènement de nouvelles molécules antibiotiques innovantes, la phytothérapie et l'aromathérapie peuvent constituer de bons alliés dans une démarche à la fois préventive et curative. Le potentiel thérapeutique très varié des HE a attiré, ces dernières années, l'attention de chercheurs quant à leur possible activité contre les bactéries multi-résistantes aux antibiotiques.

Notre travail a eu, par conséquent, deux objectifs principaux :

- Le premier consacré à l'étude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries d'origine aviaire et la recherche des déterminants de résistance à deux familles d'antibiotiques d'importance critique (les quinolones et les C3G) en santé humaine et animale ;
- Le second, avait pour but d'évaluer l'activité antibactérienne des HE de quelques plantes médicinales et aromatiques seules ou en association avec des antibiotiques conventionnels vis-à-vis des souches d'entérobactéries multi-résistantes aux antibiotiques.

Ce travail a été réalisé au sein de l'Equipe de Recherche « *Evaluation des Molécules Pharmaceutiques et Développement de Stratégies Thérapeutiques Alternatives* » dans le Laboratoire de Recherche « *Santé et Productions Animales* », de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, ainsi qu'au niveau du Laboratoire Vétérinaire Régional de Mostaganem, du Laboratoire de Bactériologie Médicale et de surveillance de la

Problématique et objectifs

résistance aux antibiotiques de l'Institut Pasteur d'Alger et du Laboratoire de Microbiologie et Chimie Alimentaire du département des sciences biomédicales, dentaires et de l'imagerie morpho-fonctionnelle de l'Université de Messine, Italie.

*Etude I : Caractérisation des entérobactéries
résistantes aux quinolones d'origine aviaire dans
l'ouest Algérien : L'émergence de la résistance de type
qnrS chez Enterobacter cloacae*

Etude I : Caractérisation des entérobactéries résistantes aux quinolones d'origine aviaire dans l'ouest Algérien : L'émergence de la résistance de type qnrS chez Enterobacter cloacae

1. Introduction

Les quinolones et les fluoroquinolones sont des agents antimicrobiens à large spectre, couramment utilisés dans le traitement des pathologies aviaires. Cette utilisation généralisée a été associée, dans le monde entier, à un niveau accru de résistance, en particulier chez les bactéries à Gram négatif au cours de la dernière décennie (Richter et al., 2010 ; Robicsek et al., 2006a). Des souches d'entérobactéries multi-résistantes ont été fréquemment signalées, en médecine humaine et vétérinaire, dans différentes parties du monde en raison de l'utilisation souvent abusive et irréfléchie des antibiotiques (Kilonzo-Nthenge et al., 2013; Yadav et al., 2015). En Algérie, les fréquences de la résistance aux antibiotiques chez *E. coli* d'origine animale ont déjà été rapportées par plusieurs auteurs (Aggad et al., 2010; Benameur et al., 2014; Benameur et al., 2016 ; Hammoudi et Aggad, 2008). Cependant, très peu de données publiées sont disponibles sur la résistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries d'origine animale autres que *E. coli* et *Salmonella* spp., en Algérie.

Il est, en effet, admis que la résistance aux quinolones résulte à la fois de mécanismes de résistance chromosomiques et à médiation plasmidique (PMQR). L'un des mécanismes les plus importants de PMQR est représenté par les gènes *qnr*. Ces gènes codant pour des protéines répétées pentapeptidiques qui bloquent l'action de la ciprofloxacine sur l'ADN gyrase bactérienne et la topoisomérase IV (Tran et Jacoby, 2002 ; Tran et al., 2005a ; Tran et al., 2005b). Trois grands groupes de déterminants Qnr ont été décrits (QnrA, QnrB et QnrS), qui partagent entre 40% et 60% de similarité (Strahilevitz et al., 2009). Ces déterminants ont été identifiés dans le monde entier, chez diverses souches d'entérobactéries, et ils ont été fréquemment associés à des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) et à des céphalosporinases plasmidiques (Cambau et al., 2006 ; Cattoir et al., 2007). En Algérie, ces déterminants *qnr* ont été rapportés chez diverses souches d'entérobactéries d'origine humaine (Gharout-Sait et al., 2012 ; Iabadene et al., 2008 ; Meradi et al., 2011). Cependant, la présence de ces gènes de résistance chez des isolats d'origine animale en Algérie a été rarement documentée.

Aussi, la présente étude a eu pour objectif l'évaluation de la fréquence de résistance aux quinolones et aux autres familles d'antibiotiques chez des souches d'entérobactéries d'origine

aviaire isolées dans l'ouest Algérien et d'étudier la présence de gènes *qnr* dans une collection de souches d'entérobactéries résistantes à l'acide nalidixique.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Souches bactériennes

Cette partie a été réalisée au Laboratoire Vétérinaire Régional de Mostaganem de Décembre 2010 à Janvier 2014. Durant cette période, 253 souches d'entérobactéries ont été isolées à partir de 310 échantillons de volailles vivantes, malades ou saines, provenant des différentes filières de production : poules reproductrices ponte et chair, poussins d'un jour chair et ponte, poulets de chair et poules pondeuses. Des prélèvements de surface des bâtiments d'élevage ont été aussi analysés. Ces prélèvements ont été collectés par les services vétérinaires dans des fermes et couvoirs situés dans différentes régions de l'ouest Algérien (Mostaganem, Oran, Mascara, Relizane, Chlef, Tiaret et Tissemsilt). Ils ont été ensuite acheminés au laboratoire pour la recherche des salmonelles. Les souches d'entérobactéries ont été isolées à partir d'organes internes (foie, rate, ou cœur), fientes, ou prélèvements de surfaces. Pour l'isolement primaire, 1 ml d'échantillon a été inoculé avec 9 ml d'eau peptonée tamponnée, vortexé et incubé à 37 °C pendant une nuit. Ensuite, une goutte de bouillon a été ensemencée sur gélose MacConkey (Institut Pasteur d'Algérie, Algérie) et incubée à 37 °C pendant une nuit. Les souches d'entérobactérie ont été identifiées biochimiquement par des tests biochimiques classiques ou à l'aide de galeries API 20E (Bio Mérieux, Marcy l'Étoile, France).

2.2. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

L'antibiogramme a été réalisé par la méthode de diffusion sur gélose (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) sur gélose Müller Hinton (Institut Pasteur d'Algérie, Algérie) et interprété après mesure des diamètres des zones d'inhibition (ZI) en accord avec les recommandations du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015). Les antibiotiques testés étaient les suivants: acide nalidixique (NA, 30 µg), fluméquine (UB, 30 µg), ciprofloxacine (CIP, 5 µg), ampicilline (AM, 10 µg), amoxicilline/acide clavulanique (AMC, 20/10 µg), ceftiofur (XNL, 30 µg), tétracycline (TE, 30 µg), triméthoprim/sulfaméthoxazole (SXT, 1,25 / 23,75 µg), néomycine (N, 30 µg), gentamycine (CN, 15 µg) chloramphénicol (C, 30 µg) et colistine (CT, 50 µg). La souche de référence *E. coli* ATCC 25922 a été utilisée comme témoin.

2.3. Détection des gènes de résistance

Un total de 18 souches multi-résistantes aux antibiotiques, sélectionnées aléatoirement parmi les isolats d'entérobactéries résistants à l'acide nalidixique, a été analysé par PCR multiplex pour la recherche des gènes *qnrA*, *qnrB* et *qnrS* comme précédemment décrit (Gay et al., 2006 ; Jacoby et al., 2003 ; Jacoby et al., 2006), après extraction de l'ADN total par la méthode d'ébullition. Les amorces utilisées étaient les suivantes:

- *qnrA*, 5'-TTCTCACGCCAGGATTTGAG et 5'-TGCCAGGCACAGATCTTGAC, pour donner un produit de 571 pb;
- *qnrB*, 5'-TGGCGAAAAATT (GA) ACAGAA et 5'-GAGCAACAG (TC) GCCTGGTAG, pour donner un produit de 594 pb;
- *qnrS*, 5'-GACGTGCTAACTTGCGTGAT et 5'-GACGTGCTAACTTGCGTGAT, pour donner un produit de 388 pb.

Le programme d'amplification se composait d'une dénaturation initiale 5 minutes à 95°C, d'une série de 30 cycles comprenant une réaction de dénaturation (1 min à 94°C), d'hybridation (45 secondes à 60°C) et d'élongation (1 min à 72°C). Une dernière phase d'élongation terminale a été effectuée pendant 10 min à 72°C. Des témoins négatifs (sans matrice ADN) ont été inclus dans chaque série. Les produits d'amplification ont été séparés et identifiés selon leur poids moléculaire par électrophorèse, sur des gels d'agarose colorés au bromure d'éthidium à 1,5% dans du tampon TBE 1X à 150 V pendant 1 h, puis visualisés sous rayons ultraviolet. Les amplicons de PCR ont été confirmés par séquençage et les séquences d'ADN obtenues ont été comparées à celles de la GenBank en utilisant le programme BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

2.4. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à un intervalle de confiance de 95% via le logiciel BiostaTGV. Le test exact de Fisher a été employé pour comparer les fréquences de résistance aux antibiotiques chez les espèces d'entérobactéries prédominantes. La différence entre les fréquences a été considérée comme significative lorsque p est inférieur à 0,05.

3. Résultats et Discussion

3.1. Sensibilité aux antibiotiques des souches d'entérobactéries

Deux cent cinquante-trois souches d'entérobactéries ont été isolées à partir de 310 échantillons d'origine aviaire reçus au Laboratoire Vétérinaire Régional de Mostaganem. Les isolats comprenaient 134 *E. coli*, 55 *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*), 42 *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), 10 *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*), 7 *Serratia marcescens* et 5 *Providencia rettgeri*. Les fréquences de résistance aux antibiotiques des espèces d'entérobactéries prédominantes sont indiquées sur la figure 9.

Les taux de résistance étaient significativement plus élevés, chez les souches d'*E. coli* que chez les souches d'*E. cloacae*, pour NA (94,03% vs 83,63%, $p < 0,05$), UB (93,28% vs 76,36%, $p = 0,002$), CIP (85,10% vs 65,45%, $p < 0,05$), TE (94,77% vs 74,54%, $p < 0,001$) et SXT (76,11% vs 52,72%, $p < 0,01$). De plus, le taux de résistance aux SXT était significativement plus élevé chez les souches d'*E. coli* que chez les souches de *K. pneumoniae* (76,11% vs 57,14%, $p = 0,02$). En outre, les fréquences de résistance aux antibiotiques testés étaient plus importantes chez les souches de *K. pneumoniae* en comparaison avec les souches d'*E. cloacae*. Cependant la différence signalée n'est pas statistiquement significative sauf pour CIP (90,47% vs 65,45%, $p = 0,004$) et C (30,95% vs 9,09%, $p < 0,01$).

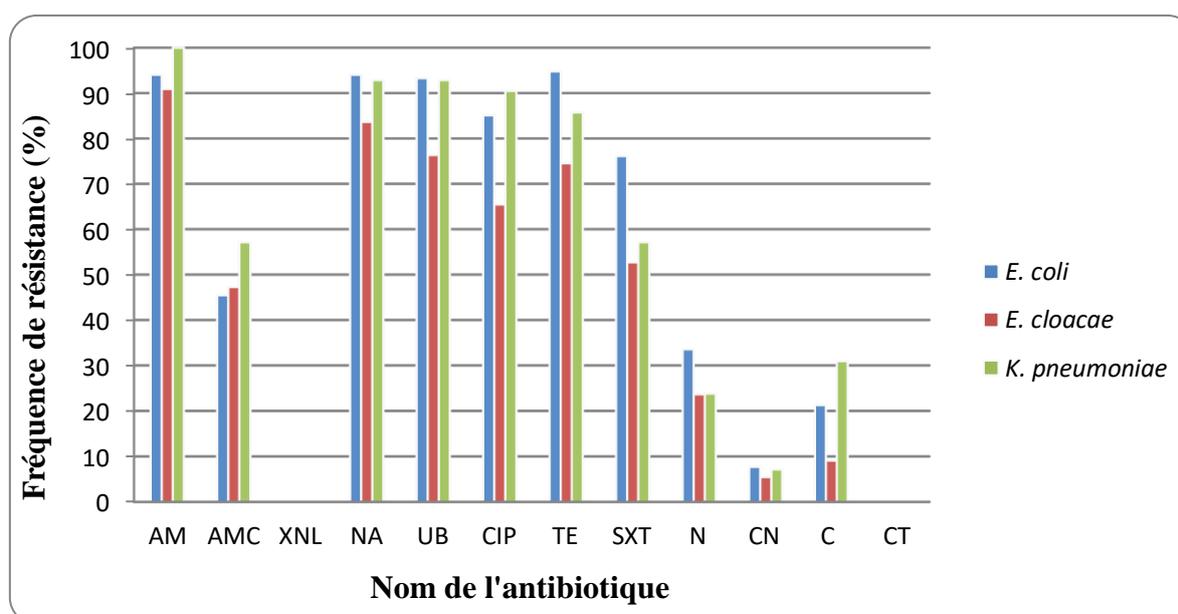


Figure 9 : Fréquence de résistance aux antibiotiques des espèces d'entérobactéries prédominantes

Toutes les souches d'entérobactéries, examinées dans cette étude, étaient résistantes à au moins un antibiotique. Parmi eux, 233 (92,09%) étaient considérées comme multi-résistantes (résistantes à trois antibiotiques différents ou plus et appartenant à des classes différentes d'antibiotiques) (tableau 1).

Tableau 1 : Multi-résistance aux antibiotiques chez les souches d'entérobactéries isolées

Microorganisme	Nombre total	Nombre de souches multi-résistantes (%)
<i>E. coli</i>	134	125 (93.28)
<i>E. cloacae</i>	55	52 (94.54)
<i>K. pneumoniae</i>	42	39 (92.85)
<i>P. mirabilis</i>	10	8 (80.00)
<i>Serratia marcescens</i>	7	5 (71.42)
<i>Providencia rettgeri</i>	5	4 (80.00)
Total	253	233 (92.09)

K. pneumoniae et *E. coli* sont les entérobactéries opportunistes les plus courantes et leur résistance croisée aux quinolones est de plus en plus critique (Ling et al., 2006 ; Silva-Sanchez et al., 2011).

En Algérie, très peu de données publiées concernant la résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries d'origine animale autre que *E. coli* et *Salmonella* spp. sont disponibles. Le pourcentage de résistance des isolats d'*E. coli* aux quinolones obtenu était beaucoup plus élevé que celui de l'étude menée en Algérie par Hamoudi et Aggad. (2008) qui ont rapportés un taux de 31% vis-à-vis de la fluméquine (Hamoudi et Aggad, 2008). Compte tenu de l'utilisation croissante et souvent inappropriée des quinolones dans les élevages aviaires en Algérie, l'incidence globalement élevée de la résistance aux antibiotiques observée dans cette étude n'est pas vraiment surprenante.

3.2. Etude des souches porteuses des gènes de résistance aux quinolones

L'amplification par PCR multiplex des gènes *qnr* a permis la détection de deux isolats positifs (un *E. coli* et un *E. cloacae*), les deux portaient le gène *qnrS1* (Tableau 2), tandis que *qnrA* et *qnrB* n'ont pas été identifiés dans les 18 isolats sélectionnés. En Algérie, plusieurs études ont rapporté la présence des déterminants *qnr* dans des souches d'entérobactéries d'origine humaine (Baba Ahmed-Kazi Tani et al., 2013; Gharout-Sait et al., 2012; Iabadene et al., 2008;

Meradi et al., 2011; Touati et al., 2008). Cependant, peu d'études ont signalé leur présence dans des isolats d'origine animale. *qnrA* a été récemment identifié dans des souches d'*E. coli* d'origine aviaire productrices de BLSE (Belmahdi et al., 2016), et *qnrS1* et *qnrB5* dans des souches d'*E. coli* productrices de BLSE isolées à partir d'animaux de compagnie (Yousfi et al., 2016). La présente étude a permis la description pour la première fois de gène *qnrS* chez un isolat d'*E. cloacae* d'origine animale en Algérie. Les gènes *qnr* ont été détectés seuls ou en association avec des gènes BLSE dans une gamme d'espèces bactériennes (Kirchner et al., 2011). Toutes les études Algériennes précédemment citées ont détecté la présence de déterminants *qnr* dans des souches d'entérobactéries productrices de BLSE. Cependant, aucune étude n'a signalé leur présence chez des souches d'entérobactéries non productrices de BLSE dans notre pays. Nos résultats ont confirmé que la dissémination de ces gènes pouvait être indépendante et pas toujours associée aux gènes *bla*_{BLSE} (Robicsek et al., 2006b, Poirel et al., 2006). Le gène *qnrS* a déjà été détecté dans plusieurs souches de *Salmonella* isolées à partir de volailles au Danemark, en Allemagne et aux Pays-Bas (Cavaco et al., 2007 ; Ferrari et al., 2011 ; Veldman et al., 2008) et également dans des isolats d'*E. coli* d'animaux de rente en Chine et au Nigeria (Fortini et al., 2011 ; Ma et al., 2009). En général, *qnrB* était considéré comme le gène PMQR le plus répandu dans les souches d'entérobactéries (Strahilevitz et al., 2009). Les 16 autres isolats d'entérobactéries résistants à l'acide nalidixique, testés dans cette étude, étaient négatifs pour les trois gènes *qnr* recherchés. Cependant, ils n'ont pas été testés pour d'autres déterminants *qnr* (*qnrC*, *qnrD* et *qnrVC*). Cette étude préliminaire devra être complétée par d'autres investigations pour la recherche des autres déterminants PMQR, y compris *qnrC*, *qnrD*, *qnrVC*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA* et *oqxAB*.

Tableau 2 : Sensibilité aux antibiotiques et variant de gènes *qnr* détecté dans les souches d'entérobactéries étudiées

Codes	Souches	<i>qnr</i>	Profil de résistance aux antibiotiques
[S1]	<i>E. coli</i>	/	NAL, UB, CIP, AM, SXT.
[S2]	<i>E. coli</i>	/	NAL, UB, CIP, AM, TE.
[S3]	<i>E. coli</i>	/	NAL, UB, CIP, AM, SXT, TE.
[S4]	<i>E. coli</i>	/	NAL, UB, CIP, AM, TE.
[S5]	<i>E. coli</i>	/	NAL, UB, CIP.
[S6]	<i>E. coli</i>	<i>qnrS1</i>	NAL, UB, CIP, AM, SXT, TE.
[S7]	<i>E. coli</i>	/	NAL, UB, CIP, AM, SXT, TE, N.
[S8]	<i>E. coli</i>	/	NAL, UB, CIP, AM, SXT, TE.
[S9]	<i>Providencia rettgeri</i>	/	NAL, UB, CIP, AM, AMC, SXT, TE, CN, C.
[S10]	<i>E. coli</i>	/	NAL, UB, SXT, TE.
[S11]	<i>K. pneumoniae</i>	/	NAL, UB, CIP, AM, SXT, TE, C.
[S12]	<i>E. cloacae</i>	<i>qnrS1</i>	NAL, UB, AM, AMC, SXT, TE.
[S13]	<i>E. coli</i>	/	NAL, UB, AM, AMC, SXT, TE.
[S14]	<i>E. coli</i>	/	NAL, UB, AM, AMC, SXT, TE.
[S15]	<i>E. coli</i>	/	NAL, UB, CIP, AM, SXT, TE, N.
[S16]	<i>E. coli</i>	/	NAL, UB, CIP, AM, SXT, TE.
[S17]	<i>E. coli</i>	/	NAL, UB, CIP, AM, SXT, TE, N.
[S18]	<i>E. coli</i>	/	NAL, UB, CIP, AM, SXT, TE, CN.

E. coli porteuse du gène *qnrS1*, détecté dans notre étude, était résistante à la ciprofloxacine, tandis que *E. cloacae* portant le gène *qnrS1* lui était sensible. La résistance aux quinolones serait transmise par des plasmides porteurs des gènes *qnr* (Robicsek et al., 2006b), conduisant à un faible niveau de résistance aux quinolones et favorisant la sélection de mutants résistants aux quinolones avec une résistance plus élevée (Martinez-Martinez et al., 1998 ; Martinez-Martinez et al., 2008). La transférabilité des souches d'*E. coli* résistantes à la ciprofloxacine ou des déterminants de la résistance mobile de l'animal à l'homme a été décrite dans plusieurs études (Johnson et al., 2006; Agabou et al., 2015).

4. Conclusion

Cette étude préliminaire a permis la détection, pour la première fois, du gène *qnrS* dans une souche d'*E. cloacae* d'origine animale en Algérie. L'émergence de PMQR peut donc contribuer par plusieurs moyens à l'augmentation rapide et délétère de la résistance bactérienne aux fluoroquinolones. Ces bactéries résistantes aux fluoroquinolones peuvent être transférées de l'animal à l'homme et vice versa, majorant d'autant le risque d'échec thérapeutique. Par conséquent, la mise en œuvre de mesures préventives, plus efficaces et adaptées à tous les niveaux de la filière avicole, devient urgente et impérative.

Cette étude a donné lieu à une publication intitulée : “*Characterization of quinolone-resistant Enterobacteriaceae strains isolated from poultry in Western Algeria: First report of qnrS in an Enterobacter cloacae*”, dans la revue : *Veterinary World* (2018).

Auteurs : Benameur Q, Tali-Maamar H, Assaous F, Guettou B, Boutaiba Benklaouz M, Rahal K, Ben-Mahdi M-H.

Characterization of quinolone-resistant Enterobacteriaceae strains isolated from poultry in Western Algeria: First report of *qnrS* in an *Enterobacter cloacae*

Qada Benameur^{1,2}, Hassiba Tali-Maamar³, Farida Assaous³, Badia Guettou³, Meki Boutaiba Benklaouz⁴, Kheira Rahal³ and Meriem-Hind Ben-Mahdi^{2,5}

1. Faculty of Natural Sciences and Life, Abdelhamid Ibn Badis University, Mostaganem, Algeria; 2. Research Laboratory, Health and Animal Production, Higher National Veterinary School, Algiers, Algeria; 3. Medical Bacteriology Laboratory, Pasteur Institute of Algeria, Algiers, Algeria; 4. Veterinary Sciences Institute, Ibn Khaldoun University, Tiaret, Algeria; 5. Higher School of Food Sciences and Agro-alimentary Industries, Algiers, Algeria.

Corresponding author: Qada Benameur, e-mail: qada.benameur@univ-mosta.dz

Co-authors: HT: htali@yahoo.fr, FA: fassaous@yahoo.fr, BG: beachedz@yahoo.fr, MBB: meki1327@yahoo.com, KR: kheirarahal@gmail.com, MHB: mhbenmahdi.ensv@gmail.com

Received: 21-12-2017, **Accepted:** 06-03-2018, **Published online:** 12-04-2018

doi: 10.14202/vetworld.2018.469-473 **How to cite this article:** Benameur Q, Tali-Maamar H, Assaous F, Guettou B, Boutaiba Benklaouz M, Rahal K, Ben-Mahdi MH (2018) Characterization of quinolone-resistant Enterobacteriaceae strains isolated from poultry in Western Algeria: First report of *qnrS* in an *Enterobacter cloacae*, *Veterinary World*, 11(4): 469-473.

Abstract

Aim: Multidrug-resistant (MDR) Enterobacteriaceae have frequently been reported, in both human and veterinary medicine, from different parts of the world as a consequence of antibiotic usage. However, there is a lack of published data regarding antimicrobial resistance in non-*Escherichia coli* (*E. coli*) Enterobacteriaceae from animals in Algeria. This study aimed to evaluate the frequency of resistance to antibiotics with a focus on quinolones and to investigate the presence of *qnr* genes in Enterobacteriaceae of poultry origin.

Materials and Methods: A total of 310 samples of poultry origin were collected from 2010 to 2014 from broiler and layer farms and hatcheries located in different geographic areas of Western Algeria (including Mostaganem, Oran, Mascara, Relizane, Chlef, Tiaret, and Tissemsilt). Antimicrobial susceptibility testing was performed using disc diffusion assay. Polymerase chain reaction and sequencing accomplished the characterization of *qnr* genes (*qnrA*, *qnrB*, and *qnrS*).

Results: A total of 253 Enterobacteriaceae strains were isolated in this study. These isolates exhibited high levels of resistance to quinolones and other families of antibiotics. All the strains isolated in this study were resistant to at least one antibiotic. Among them, 233 (92.09%) were considered MDR. Among the 18 randomly selected nalidixic acid (NA)-resistant Enterobacteriaceae isolates, one *E. coli* and one *Enterobacter cloacae* were carrying *qnrS1*. By contrast, *qnrA* and *qnrB* were not detected in this study.

Conclusion: This is the first report on the identification of the *qnrS* gene in *E. cloacae* isolated from animal source in Algeria. Further studies have to be conducted to determine the real prevalence of *qnr* genes.

Keywords: Algeria, antimicrobial resistance, Enterobacteriaceae, *qnrS1*.

Introduction

Quinolones and fluoroquinolones are broad-spectrum antimicrobial agents, extensively used in poultry disease treatment. This widespread use has been associated worldwide with an increased level of resistance, especially in Gram-negative bacteria species in the last decade [1,2]. Multidrug-resistant (MDR) Enterobacteriaceae have frequently been reported, in both human and veterinary medicine, from different parts of the world as a consequence of antibiotic usage [3,4]. In Algeria, the frequency of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* (*E. coli*) from animals has already been reported by several authors [5-8].

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

However, there is a lack of published data regarding antimicrobial resistance in non-*E. coli* Enterobacteriaceae from animals in Algeria. It is admitted that resistance to quinolones results from both chromosomal and plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) mechanisms. *Qnr* genes represent one of the most important PMQR mechanisms. These genes encode pentapeptide repeat proteins that block the action of ciprofloxacin (CIP) on bacterial DNA gyrase and topoisomerase IV [9,10]. Three major groups of Qnr determinants have been described (QnrA, QnrB, and QnrS), which share between 40% and 60% similarity [11]. These determinants have been identified worldwide in various Enterobacteriaceae, and they have frequently been associated with extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and plasmidic cephalosporinases [12,13].

In Algeria, these determinants have been reported in various human Enterobacteriaceae [14-16]. However, the occurrence of these resistance determinants in isolates of animal origin in Algeria is rarely documented.

This study aimed to evaluate the frequency of resistance to quinolones and other groups of antibiotics in Enterobacteriaceae isolated from poultry in Western Algeria and to investigate the presence of *qnr* genes in a collection of nalidixic acid (NA)-resistant Enterobacteriaceae isolates.

Materials and Methods

Ethical approval

Ethical approval is not needed to pursue this type of study. However, no chickens were harmed during the collection of samples.

Bacterial strains

From December 2010 to January 2014, 253 non-duplicate Enterobacteriaceae strains were isolated from 310 samples received in the Regional Veterinary Laboratory of Mostaganem, Algeria, for routinely control of *Salmonella*. All samples were collected by veterinarians controlling from farms and hatcheries located in different geographic areas of Western Algeria (including Mostaganem, Oran, Mascara, Relizane, Chlef, Tiaret, and Tissemsilt). The samples nature received were healthy and diseased broiler and layer breeders, 1 day-old broiler and layer chicks, broilers, laying hens, and farm swabs. The isolates were recovered from internal organs (liver, spleen, or pericardium), fecal samples, or farm swabs. For the primary isolation, one mL of sample was inoculated with nine mL of buffered peptone water vortexed and incubated at 37°C overnight. Then, a drop of broth was streaked on MacConkey agar and incubated at 37°C overnight. The Enterobacteriaceae isolates were identified biochemically by classical biochemical testing or using the API 20E system (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France).

Antimicrobial susceptibility testing

The antimicrobial susceptibility of all isolated Enterobacteriaceae strains was tested following Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines [17]. The isolates were tested against a panel of 12 antimicrobials: Nalidixic acid (NA, 30 µg), flumequin (UB, 30 µg), ciprofloxacin (CIP, 5 µg), ampicillin (AM, 10 µg), amoxicillin/clavulanic acid (AMC, 20/10 µg), ceftiofur (XNL, 30 µg), tetracycline (TE, 30 µg), trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT, 1.25/23.75 µg), neomycin (N, 30 µg), gentamicin (CN, 15 µg), chloramphenicol (C, 30 µg), and colistin (CT, 50 µg) (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). Results were obtained after incubating samples for 16–18 h at 37°C and were interpreted according to CLSI previously cited guidelines. *E. coli* ATCC 25922 was used as a quality control strain.

Polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing

A total of 18 MDR isolates randomly selected among NA-resistant Enterobacteriaceae isolates were screened by multiplex PCR amplification of *qnrA*, *qnrB*, and *qnrS* as previously described [18–20], after extraction of total DNA by

the boiling method. Primers used were as follows: for *qnrA*, 5'-TTCTCACGCCAGGATTTGAG and 5'-TGCCAGGCACAGATCTTGAC, to give a 571 pb product; for *qnrB*, 5'-TGGCGAAAATT(GA)ACAGAA and 5'-GAGCAACAG(TC)GCCTGGTAG, to give a 594 pb product; and for *qnrS*, 5'-GACGTGCTAACTTGC GTGAT and 5'-GACGTGCTAACTTGC GTGAT, to give a 388 pb product. All the six primers were added to the template DNA and PCR mix (Invitrogen, Carlsbad, CA). The following cycle conditions were used: Initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 60°C for 45 s and amplification at 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 10 min. Negative controls (without DNA template) were included in each run. Amplification products were provisionally identified from their sizes in agarose gels. Amplification products were separated by electrophoresis, on 1.5% ethidium bromide-stained agarose gels in 1 × TBE buffer at 150 V for 1 h, and then visualized under ultraviolet light. PCR amplicons were confirmed by sequencing and the DNA sequences obtained were compared with those in the GenBank using the BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Results and Discussion

Antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae isolates

Two hundred and fifty three Enterobacteriaceae strains were isolated from 310 poultry samples received in the Regional Veterinary Laboratory of Mostaganem, Northwestern Algeria. The isolates consisted of 134 *E. coli*, 55 *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*), 42 *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), 10 *Proteus mirabilis*, 7 *Serratia marcescens*, and 5 *Providencia rettgeri*. The percentage of antimicrobial resistance of the predominant Enterobacteriaceae strains isolated in this study is shown in the Figure-1. *E. coli* isolates showed a high resistance rate to particular antimicrobials, notably TE 94.77% (n=127), NA 94.03% (n=126), AM 94.03% (n=126), UB 93.28% (n=125), CIP 85.10% (n=114), and SXT 76.11% (n=102). Among *E. cloacae* isolates, the highest proportion of resistance was toward AM 90.90% (n=50), followed by NA 83.63% (n=46), UB 76.36% (n=42), TE 74.54% (n=41), CIP 65.45% (n=36), and SXT 52.72% (n=29). Resistance of *K. pneumoniae* to AM, NA, UB, CIP, TE, SXT, and AMC was, respectively, observed in 100% (n=42), 92.85% (n=39), 92.85% (n=39), 90.47% (n=38), 85.71% (n=36), 57.14% (n=24), and 57.14% (n=24) of the isolates. All the isolates examined in this study were resistant to at least one antibiotic. Among them, 233 (92.09%) were considered MDR (resistant to three or more different antimicrobial agents belonging to different classes of antibiotics) (Table-1). *K. pneumoniae* and *E. coli* are the most common opportunistic Enterobacteriaceae, and their growing cross-resistance

to quinolones is a critical problem [21,22]. In Algeria, there is a lack of published data regarding antimicrobial resistance in non-*E. coli* and non-*Salmonella* spp. Enterobacteriaceae of animal origin. Resistance of *E. coli* isolates to quinolones was far higher compared to previous studies conducted in Algeria [6,7]. In view of the whole range of antibiotics available in Algeria and the increasing and inappropriate use of quinolones in poultry farms, the globally high incidence of antibiotic resistance observed in this study is not really surprising.

Qnr occurrence

The *qnr* multiplex PCR allowed the detection of two positive isolates (one *E. coli* and one *E. cloacae*), both of them were carrying *qnrS1* (Table-2), whereas *qnrA* and *qnrB* were not identified in any of the 18 randomly selected isolates. In Algeria, several studies allowed the detection of *qnr* determinants in human clinical isolates [12-14]. However, few studies reported their presence in isolates of animal origin. *qnrA* has been recently identified in ESBL producing *E. coli* isolates from poultry [23], and *qnrS1* and *qnrB5* in ESBL producing *E. coli* isolates from companion animals [24]. To the best of our knowledge, this is the first description of *qnrS* genes in an *E. cloacae* isolate from animal source in Algeria. All of the previously cited Algerian studies detected the presence of *qnr* determinants in ESBL producing isolates. However, no study reported their presence in non-ESBL Enterobacteriaceae in our country. The *qnrS* gene has been previously detected in several *Salmonella* strains isolated from poultry source in Denmark, Germany, and Netherland [25-27] and was also reported in *E. coli* isolates from food-producing animals in China and Nigeria [28,29]. Typically, *qnrB* was considered to be the most prevalent PMQR gene in Enterobacteriaceae isolates [11]. The other 16 NA-resistant Enterobacteriaceae isolates tested in this study were negative for the three *qnr* genes investigated. However, they were not tested for other *qnr* determinants (*qnrC*, *qnrD*, and *qnrVC*). Thus, this

preliminary study have to be completed by further investigations of other PMQR determinants, including *qnrC*, *qnrD*, *qnrVC*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*, and *oqxAB*. *qnr* genes have been either detected alone or in association with ESBL genes in a range of bacterial species [30]. Recently, *qnrA* or *qnrS* determinants were identified in non-ESBL-positive isolates harboring *TEM-1* or *LAP-1* [31]. As previously reported, our results confirmed that the spread of these genes can be independent and not always associated with *bla*_{ESBL} genes [2,31].

E. coli harboring *qnrS1* gene, detected in our study, was resistant to CIP, whereas the *qnrS1* positive *E. cloacae* were susceptible to CIP. Quinolone resistance has been described to be transmitted by plasmids carrying *qnr* genes [32], resulting in low-level quinolone resistance and it can facilitate the selection of quinolone-resistant mutants with higher-level resistance [33,34]. The transferability of CIP-resistant *E. coli* or mobile resistance determinants from chickens to humans has been indicated in several studies [35,36]. Since the zoonotic transfer of fluoroquinolone-resistant bacteria is of concern from a human health perspective, the reverse scenario - the transfer of fluoroquinolone-resistant bacteria from humans to animals - warrants equal consideration, which may be responsible for therapeutic failures in animals.

Conclusions

This study revealed high levels of antimicrobial resistance to antibiotics with a focus on quinolones in Enterobacteriaceae isolates. This is the first detection of *qnrS* in *E. cloacae* isolates from the animal in Algeria. The emergence of PMQR thus may contribute by several means to the rapid and deleterious increase in bacterial resistance to fluoroquinolones. These fluoroquinolone-resistant bacteria may be transferred from animals to humans and vice versa, increasing the risk of treatment failure. Therefore, implementation of more efficient preventive measures at all levels of broiler and layer industries is becoming mandatory.

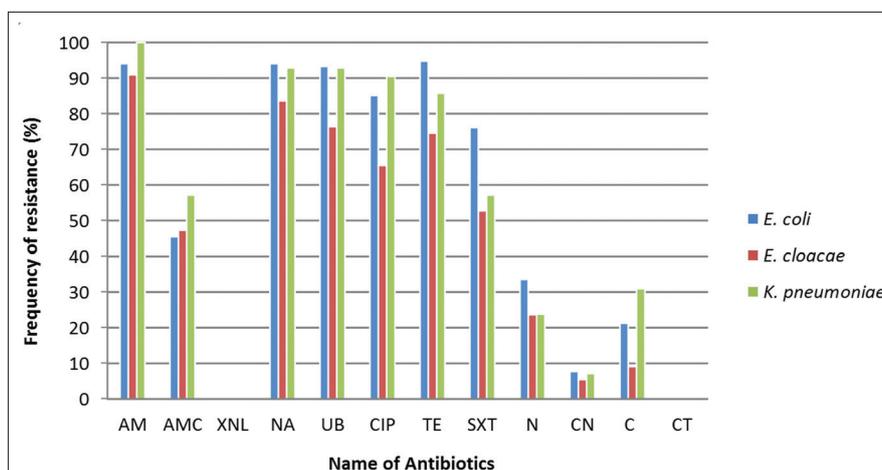


Figure-1: Antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae. AM=Ampicillin, AMC=Amoxicillin/clavulanic acid, XNL=Ceftiofur, NA=Nalidixic acid, UB=Flumequin, CIP=Ciprofloxacin, TE=Tetracycline, SXT=Trimethoprim/sulfamethoxazole, N=Neomycin, CN=Gentamicin, C=Chloramphenicol, CT=Colistin.

Table-1: MDR in Enterobacteriaceae isolates.

Organism	Total No.	Number of MDR isolates (%)
<i>E. coli</i>	134	125 (93.28)
<i>E. cloacae</i>	55	52 (94.54)
<i>K. pneumoniae</i>	42	39 (92.85)
<i>P. mirabilis</i>	10	8 (80.00)
<i>S. marcescens</i>	7	5 (71.42)
<i>P. rettgeri</i>	5	4 (80.00)
Total	253	233 (92.09)

MDR=Multidrug resistant, *E. coli*=*Escherichia coli*,
E. cloacae=*Enterobacter cloacae*,
K. pneumoniae=*Klebsiella pneumoniae*,
P. mirabilis=*Proteus mirabilis*,
S. marcescens=*Serratia marcescens*,
P. rettgeri=*Providencia rettgeri*

Table-2: Enterobacteriaceae isolates tested by PCR for the determination of *qnr* determinants.

Strain	<i>qnr</i>	Antimicrobial resistance pattern
<i>E. coli</i> (S1)	/	NA, UB, CIP, AM, SXT
<i>E. coli</i> (S2)	/	NAL, UB, CIP, AM, TE
<i>E. coli</i> (S3)	/	NAL, UB, CIP, AM, SXT, TE
<i>E. coli</i> (S4)	/	NAL, UB, CIP, AM, TE
<i>E. coli</i> (S5)	/	NAL, UB, CIP
<i>E. coli</i> (S6)	<i>qnrS1</i>	NAL, UB, CIP, AM, SXT, TE
<i>E. coli</i> (S7)	/	NAL, UB, CIP, AM, SXT, TE, N
<i>E. coli</i> (S8)	/	NAL, UB, CIP, AM, SXT, TE
<i>P. rettgeri</i> (S9)	/	NAL, UB, CIP, AM, AMC, SXT, TE, CN, C
<i>E. coli</i> (S10)	/	NAL, UB, SXT, TE
<i>K. pneumoniae</i> (S11)	/	NAL, UB, CIP, AM, SXT, TE, C
<i>E. cloacae</i> (S12)	<i>qnrS1</i>	NAL, UB, AM, AMC, TE, SXT
<i>E. coli</i> (S13)	/	NAL, UB, AM, AMC, SXT, TE
<i>E. coli</i> (S14)	/	NAL, UB, AM, AMC, SXT, TE
<i>E. coli</i> (S15)	/	NAL, UB, CIP, AM, SXT, TE, N
<i>E. coli</i> (S16)	/	NAL, UB, CIP, AM, SXT, TE
<i>E. coli</i> (S17)	/	NAL, UB, CIP, AM, SXT, TE, N
<i>E. coli</i> (S18)	/	NAL, UB, CIP, AM, SXT, TE, CN

NA=Nalidixic acid; UB=flumequine; CIP=Ciprofloxacin;
AM=Ampicillin; AMC=Amoxicillin/clavulanic acid;
SXT=Trimethoprim/sulfamethoxazole; TE=Tetracycline;
N=Neomycin; CN=Gentamicin; C=Chloramphenicol,
E. coli=*Escherichia coli*, *E. cloacae*=*Enterobacter cloacae*,
K. pneumoniae=*Klebsiella pneumoniae*,
P. rettgeri=*Providencia rettgeri*

Authors' Contributions

QB, FA, BG, and MBB carried out the main research works and analyzed the main data in the experiments. HT, KR, and MHB have supervised the laboratory work and approved the final version of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

The authors appreciate the staff of the veterinary practitioners for providing samples. A special thanks to Dr. Ben-Mahdi Tarek, the ex-Director of the Regional Veterinary Laboratory of Mostaganem, Algeria, Dr. Benbernou Sennia, Dr. Sebai Ali, Dr. Bouziri Abduldjalal, and Ms. Benkhamkham Naziha, for their skilled assistance in the laboratory work. This study was supported by internal funding.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

- Richter, S.N., Frasson, I., Bergo, C., Manganelli, R., Cavallaro, A. and Palu, G. (2010) Characterisation of *qnr* plasmid-mediated quinolone resistance in Enterobacteriaceae from Italy: Association of the *qnrB19* allele with the integron element ISCR1 in *Escherichia coli*. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 35: 578-583.
- Robicsek, A., Jacoby, G.A. and Hooper, D.C. (2006) The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect. Dis.*, 6: 629-640.
- Yadav, K.K., Adhikari, N., Khadka, R., Pant, A.D. and Shah, B. (2015) Multidrug-resistant Enterobacteriaceae and extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli*: A cross-sectional study in national kidney center, Nepal. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.*, 4: 42.
- Kilonzo-Nthenge, A., Rotich, E. and Nahashon, S.N. (2013) Evaluation of drug-resistant Enterobacteriaceae in retail poultry and beef. *Poult. Sci.*, 92: 1098-1107.
- Benameur, Q., Guemour, D., Hammoudi, A., Aoudia, K., Aggad, H., Humblet, M.H. and Saegermang, C. (2014) Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from chickens in West of Algeria. *Int. J. Sci. Basic Appl. Res.*, 13: 366-370.
- Hammoudi, A. and Aggad, H. (2008) Antibioresistance of *Escherichia coli* strains isolated from chicken colibacillosis in Western Algeria. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 32: 123-126.
- Aggad, H., Ammar, Y.A., Hammoudi, A. and Kihal, M. (2010) Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis. *Glob. Vet.*, 4: 303-306.
- Benameur, Q., Ben-Mahdi, M.H., Boutaiba Benklaouz, M., Tali-Maamar, H., Assaou, F., Guettou, B. and Rahal, K. (2016) Analysis of high levels of multidrug-resistant *Escherichia coli* from healthy broiler chickens in Western Algeria. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 10: 1792-1797.
- Tran, J.H. and Jacoby, G.A. (2002) Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 5638-5642.
- Tran, J.H., Jacoby, G.A. and Hooper, D.C. (2005) Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein QnrA with *Escherichia coli* topoisomerase IV. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 49: 3050-3052.
- Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Hooper, D.C. and Robicsek, A. (2009) Plasmid-mediated quinolone resistance: A multifaceted threat. *Clin. Microbiol. Rev.*, 22: 664-689.
- Cattoir, V., Poirel, L. and Nordmann, P. (2007) Plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrB4 identified in France in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate coexpressing a QnrS1 determinant. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 51: 2652-2653.
- Cambau, E., Lascos, C., Sougakoff, V., Bébéar, C., Bonnet, R., Cavallo, J.D., Gutmann, L., Ploy, M.C., Jarlier, V., Soussy, C.J. and Robert, J. (2006) Occurrence of *qnrA*-positive clinical isolates in French teaching hospitals during 2002-2005. *Clin. Microbiol. Infect.*, 12: 1013-1020.

14. Iabadene, H., Messai, Y., Ammari, H., Ramdani-Bougouessa, N., Lounes, S., Bakour, R. and Arlet, G. (2008) Dissemination of ESBL and Qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria. *J. Antimicrob. Chemother.*, 62: 133-136.
15. Meradi, L., Djahoudi, A., Abdi, A., Bouchakour, M., Claude, J.D. and Timinouni, M. (2011) Qnr and Aac(6')-Ib-cr types quinolone resistance among Enterobacteriaceae isolated in Annaba, Algeria. *Pathol. Biol.*, 59: 73-78.
16. Gharout-Sait, A., Touati, A., Benallaoua, S., Guillard, T., Brasm, T.J. and de Champs, C. (2012) CTX-M from community acquired urinary tract infections in Algeria. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 6: 5306-5313.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2015) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-fifth Informational Supplement document M100S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
18. Jacoby, G.A., Chow, N. and Waites, K.B. (2003), Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 47: 559-562.
19. Jacoby, G.A., Walsh, K.E., Mills, D.M., Walker, V.J., Oh, H., Robicsek, A. and Hooper, D.C. (2006) *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 50: 1178-1182.
20. Gay, K., Robicsek, A., Strahilevitz, J., Park, C.H., Jacoby, G., Barrett, T.J., Medalla, F., Chiller, T.M. and Hooper, D.C. (2006) Plasmid-mediated quinolone resistance in non-typhi serotypes of *Salmonella enterica*. *Clin. Infect. Dis.*, 43: 297-304.
21. Ling, T.X., Xiong, J., Yu, Y., Lee, C.C., Ye, H. and Hawkey, P.M. (2006) Multicenter antimicrobial susceptibility survey of gram-negative bacteria isolated from patients with community-acquired infections in the people's republic of China. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 50: 374-378.
22. Silva-Sanchez, J., Barrios, H., Reyna-Flores, F., Bello-Diaz, M., Sanchez-Perez, A., Rojas, T., Bacterial Resistance Consortium and Garza-Ramos, U. (2011) Prevalence and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates in Mexico. *Microb. Drug Resist.*, 17: 497-505.
23. Belmahdi, M., Bakour, S., Al Bayssari, C., Touati, A. and Rolain, J.M. (2016) Molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase- and plasmid AmpC-producing *Escherichia coli* strains isolated from broilers in Béjaïa, Algeria. *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, 6: 108-112.
24. Yousfi, M., Mairi, A., Touati, A., Hassissene, L., Brasme, L., Guillard, T. and De Champs, C. (2016) Extended spectrum β -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* fecal isolates from healthy companion animals in Algeria. *J. Infect. Chemother.*, 22: 431-435.
25. Cavaco, L.M., Hendriksen, R.S. and Aarestrup, F.M. (2007) Plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrS1* detected in *Salmonella enterica* serovar *Corvallis* strains isolated in Denmark and Thailand. *J. Antimicrob. Chemother.*, 60: 704-706.
26. Ferrari, R., Galiana, A., Cremades, R., Rodriguez, J.C., Magnani, M., Tognim, M.C.B., Oliveira, T.C.R.M. and Royo, G. (2011) Plasmid-mediated quinolone resistance by genes *qnrA1* and *qnrB19* in *Salmonella* strains isolated in Brazil. *J. infect. Dev. Ctries*, 5: 496-498.
27. Veldman, K., van Pelt, W. and Mevius, D. (2008) First report of *qnr* genes in *Salmonella* in the Netherlands. *J. Antimicrob. Chemother.*, 61: 452-453.
28. Fortini, D., Fashae, K., Garcia-Fernandez, A., Villa, L. and Carattoli, A. (2011) Plasmid-mediated quinolone resistance and beta-lactamases in *Escherichia coli* from healthy animals from Nigeria. *J. Antimicrob. Chemother.*, 66: 1269-1272.
29. Ma, J., Zeng, Z., Chen, Z., Xu, X., Wang, X., Deng, Y., Lue, D., Huang, L., Zhang, Y., Liu, L. and Wang, M. (2009) High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, and *qepA* among ceftiofur-resistant Enterobacteriaceae isolates from companion and food-producing animals. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 53: 519-524.
30. Kirchner, M., Wearing, H. and Teale, C. (2011) Plasmid-mediated quinolone resistance gene detected in *Escherichia coli* from cattle. *Vet. Microbiol.*, 148: 434-435.
31. Poirel, L., Leviandier, C. and Nordmann, P. (2006) Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA and QnrS in Enterobacteriaceae isolates from a French university hospital. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 50: 3992-3997.
32. Robicsek, A., Strahilevitz, J., Sahn, D.F., Jacoby, G.A. and Hooper, D.C. (2006) *Qnr* prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 50: 2872-2874.
33. Martinez-Martinez, L., Cano, M.E., Rodriguez-Martinez, J.M., Calvo, J. and Pascual, A. (2008) Plasmid-mediated quinolone resistance. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.*, 6: 685-711.
34. Martinez-Martinez, L., Pascual, A. and Jacoby, G.A. (1998) Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*, 351: 797-799.
35. Johnson, J.R., Kuskowski, M.A., Menard, M., Gajewski, A., Xercavins, M. and Garau, J. (2006) Similarity between human and chicken *Escherichia coli* isolates in relation to ciprofloxacin resistance status. *J. Infect. Dis.*, 194: 71-78.
36. Agabou, A., Lezzar, N., Ouchenane, Z., Khemissi, S., Satta, D., Sotto, A., Lavigne, J.P. and Pantel, A. (2015) Clonal relationship between human and avian ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* isolates in North-Eastern Algeria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 35: 227-234.

*Etude II : Présence d'un clone d'E. coli porteur de
gènes CTX-M-1 et qnrS1 dans les organes
reproducteurs des poules reproductrices chair et les
œufs à couver*

Etude II : Présence d'un clone d'*E. coli* porteur de gènes CTX-M-1 et qnrS1 dans les organes reproducteurs des poules reproductrices chair et les œufs à couver**1. Introduction**

L'expansion de la résistance des *E. coli* aux C3G et aux quinolones dans certains systèmes de production animale dans le monde est inquiétant (Mnif et al., 2012 ; Naseer et Sundsfjord, 2011), en raison de l'importance des C3G et des quinolones en santé humaine et animale. La production de β -lactamase à spectre étendu (BLSE) est le mécanisme le plus fréquemment responsable de la résistance aux C3G. TEM, SHV et CTX-M sont les trois principales familles de BLSE (Bush et Jacoby, 2010). CTX-M est la famille la plus importante parmi les enzymes BLSE, et en raison de sa prévalence croissante (supérieure à TEM et SHV), certains auteurs avaient prédit une «pandémie BLSE CTX-M» (Cantón et Coque, 2006). Au cours de ces dernières années, des mécanismes de résistance aux quinolones à médiation plasmidique (PMQR) ont été rapportés chez des souches d'*E. coli* isolées d'animaux de rente (Pérez-Moreno et al., 2013). Dans la plupart des cas, ces souches sont également productrices de BLSE, ce qui augmente le risque potentiel de transfert d'*E. coli* multi-résistantes aux humains (Wang et al., 2012).

Récemment, la présence d'*E. coli* résistantes aux C3G et/ou quinolones a été signalée à tous les niveaux de la chaîne de production de poulets de chair, dans plusieurs pays (Börjesson et al., 2015; Canton et Coque, 2006; Mo et al., 2014 ; Nahar et al., 2018). Elles ont également été détectées dans les couvoirs, chez des poussins d'un jour qui n'avaient jamais été traités aux antibiotiques auparavant (Dierikx et al., 2013; Yossapol et al., 2017), suggérant l'introduction de certains clones d'*E. coli* résistants aux C3G et/ou quinolones, via l'importation des poules reproductrices, et leurs dissémination par transmission verticale à travers la chaîne de production de poulets de chair. Le but de cette étude était par conséquent de mettre en évidence la présence d'*E. coli* résistante aux C3G et/ou quinolones dans les organes reproducteurs de poules reproductrices chair et dans le contenu interne des œufs produits par celles-ci.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Souches bactériennes

Deux souches d'*E. coli* productrices de BLSE (*E. coli* S1 et *E. coli* S2) ont été incluses dans la présente étude. La première souche (*E. coli* S1) a été isolée des ovaires de poules reproductrices chair d'un élevage situé dans la wilaya de Chlef, dans l'ouest Algérien. La seconde souche (*E. coli* S2) a été isolée du contenu des œufs à couver collectés depuis ce même élevage et ce, une semaine après, d'un couvoir situé dans la wilaya de Mostaganem, au nord-ouest de l'Algérie, qui reçoit habituellement des œufs provenant de différentes régions du nord-ouest et de l'ouest du pays. Ces deux échantillons ont été collectés par les services vétérinaires des deux wilayas et transportés au Laboratoire Vétérinaire Régional de Mostaganem. Le vétérinaire praticien en charge de cet élevage a par ailleurs rapporté, une baisse de la production d'œufs (12.53%) dans l'élevage de poules reproductrices échantillonné.

Les échantillons ont été traités dès leur réception en utilisant des techniques aseptiques. Dix sujets, prélevés aléatoirement dans l'élevage reproducteur, ont été autopsiés au laboratoire et seuls les ovaires ont été prélevés. Les ovaires ont été mis dans un tube stérile, légèrement flambés à la flamme d'un bec Bunsen et coupés en petits dés. Un échantillon d'œufs à couver visuellement propres (20 œufs) a également été collecté au hasard et placé dans des sacs en plastique stériles et transporté au laboratoire dans une glacière. Après la désinfection de la coquille d'œuf, le contenu interne de l'œuf a été examiné comme décrit précédemment (Chousalkar et al., 2010). Un millilitre d'échantillon (contenu interne des œufs ou ovaires) a été inoculé dans 9 ml d'eau peptonée tamponnée, vortexé et incubé à 37°C pendant une nuit. Pour l'isolement bactérien, une goutte de bouillon a étéensemencée sur une gélose MacConkey (Institut Pasteur d'Algérie, Algérie). Les isolats ont été identifiés en utilisant la galerie API 20E (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

2.2. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques a été effectuée par la technique de diffusion en milieu gélosé et l'interprétation des résultats a été faite selon les règles et les recommandations du CLSI (CLSI, 2016). Un panel de 23 antibiotiques a été testé: acide nalidixique (NA, 30 µg), fluméquine (UB, 30 µg), ciprofloxacine (CIP, 5 µg), lévofloxacine (LEV, 5 µg), ampicilline (AM, 10 µg), amoxicilline/acide clavulanique (AMC, 20/10 µg),

ticarcilline (TIC, 75 µg), pipéracilline (PIP, 100 µg), céfazolline (CZ, 30 µg), céphalothine (CF, 30 µg), ceftazidime (CAZ, 30 µg), céfotaxime (CTX, 30 µg), aztréonam (ATM, 30 µg), céfépime (FEP, 30 µg), ceftriaxone (CRO, 30 µg), tétracycline (TE, 30 µg), sulfonamides (SSS, 300 µg), triméthoprime (TMP, 5 µg), triméthoprime/sulfaméthoxazole (SXT, 1,25 / 23,75 µg), l'imipénème (IMP, 10 µg), la gentamicine (CN, 10 µg), le chloramphénicol (C, 30 µg) et la nitrofurantoïne (FT, 300 µg) (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). La détermination des CMI pour le céfotaxime, la ceftazidime, l'aztréonam, le céfépime, la ceftriaxone, l'acide nalidixique, la ciprofloxacine et la lévofloxacine a été réalisée par E-test (AES, AB Biodisk, Solna, Suède). La CMI pour la colistine a été déterminée par la méthode de microdilution en bouillon selon les recommandations de l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2018). *E. coli* ATCC 25922 a été utilisée comme témoin. La recherche du phénotype BLSE est réalisée sur l'antibiogramme selon la technique de synergie comme précédemment décrit (Jarlier et al., 1988).

2.3. PCR et séquençage

Les souches d'*E. coli* ont également été analysées par PCR pour la recherche des gènes *bla*_{BLSE} comme décrit précédemment pour les groupes CTX-M-1, 2, 8 et 9 (Arlet et al., 1997), SHV (Arlet et al., 1997) et TEM (Mabilat et Goussard, 1993). Les gènes de type *qnr* (*qnrA*, *qnrB* et *qnrS*) ont été recherchés également comme décrit précédemment (Gay et al., 2006 ; Jacoby et al., 2003 ; Jacoby et al., 2006). Les amplicons de PCR ont été confirmés par séquençage et les comparaisons avec les séquences connues ont été effectuées avec le programme BAST.

2.4. Multi Locus Sequence Typing (MLST)

Afin de déterminer une relation clonale possible entre les souches d'*E. coli*, un génotypage par MLST a été réalisé. Des fragments internes de huit gènes de ménage (*dinB*, *icdA*, *pabB*, *polB*, *putP*, *trpA*, *trpB* et *uidA*) ont été étudiés par PCR et séquençage selon la méthode de Jaureguy et al. (Jaureguy et al., 2008). Les séquences d'allèles et le typage de séquence ont été assignés selon le schéma MLST de l'Institut Pasteur pour *E. coli*.

3. Résultats et Discussion

L'examen nécropsique a révélé des signes de tuméfaction et de congestion sur trois ovaires parmi les 10 examinées. *E. coli* a été isolée en culture pure sur gélose de MacConkey à partir des deux échantillons. Les deux souches d'*E. coli* isolées présentaient le même profil de résistance aux antibiotiques, avec une résistance à l'ampicilline, à la ticarcilline, à la pipéracilline, à la céfazolline, à la céphalotine et au céfotaxime. Les deux isolats étaient sensibles à la ceftazidime et à l'imipénème. Les valeurs des CMI ont indiqué que ces souches présentaient une sensibilité réduite au céfépime et à l'aztréonam (tableau 3). De plus, ces souches étaient résistantes à l'acide nalidixique, à la tétracycline et aux sulfonamides, mais sensibles à la ciprofloxacine, au triméthoprime-sulfaméthoxazole, au chloramphénicol, à la nitrofurantoïne et à la colistine.

Tableau 3 : Caractéristiques des souches d'*E. coli* isolées

Isolat	Profil de résistance aux antibiotiques	CMI (µg/ml)								
		CTX	CAZ	FEP	ATM	CRO	NA	CIP	LEV	CT
<i>E. coli</i> S1	AM, TIC, PIP, CZ, CF, CTX, NA, TE, SSS.	>32	3	12	6	64	>256	0.25	0.5	0.125
<i>E. coli</i> S2	AM, TIC, PIP, CZ, CF, CTX, NA, TE, SSS.	>32	3	12	6	128	>256	0.38	0.75	0.125

Le test de synergie a montré que les deux souches présentaient un phénotype BLSE (figure 10). De plus, la recherche par PCR des gènes *bla*_{BLSE} et *qnr* a mis en évidence la présence des gènes CTX-M-1 et *qnrS* dans les deux souches. Selon les résultats du séquençage, les variants exprimés étaient CTX-M-1 et *qnrS1*. Les résultats de l'étude épidémiologique moléculaire ont révélé la présence d'une nouvelle séquence allélique (25-47-10-10-16-57-4-50) sous la désignation ST461 dans les deux souches d'*E. coli*.

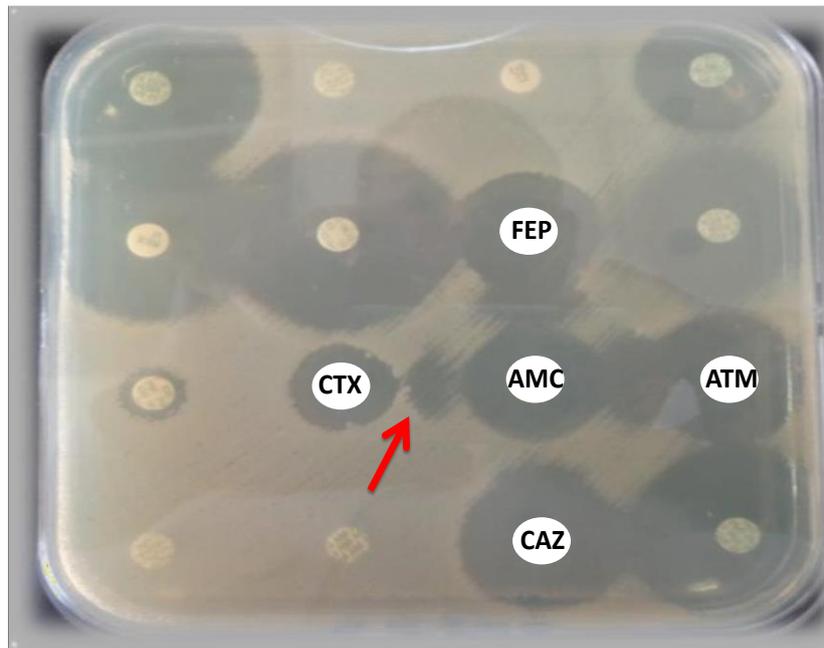


Figure 10 : Test de synergie positif

Les dernières années ont été les témoins de l'émergence et de la dissémination des souches d'*E. coli* résistantes aux C3G et aux quinolones dans la filière avicole chair (Börjesson et al., 2015; Bortolaia et al., 2010 ; Mo et al., 2014). L'importation d'animaux reproducteurs a été suggérée comme la source la plus probable d'introduction de la résistance aux antibiotiques dans la filière avicole chair (Dierikx et al., 2013; Mo et al., 2014).

Aucune étude n'a pour autant démontrée l'hypothèse d'une transmission verticale d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques des poules reproductrices à leur descendance. Ces bactéries n'ayant pas encore été isolées des organes reproducteurs des poules reproductrices et /ou du contenu interne des œufs à couver. Dans notre étude, un clone d'*E. coli* porteur de gènes CTX-M-1 et *qnrS1* a été détecté dans les ovaires d'un élevage de reproducteurs chair et ensuite dans le contenu interne des œufs à couver produits par la même bande de poules reproductrices chair. La présence d'*E. coli* dans le contenu de l'œuf peut être due d'une part à la pénétration dans la coquille pendant ou après la ponte (Chousalkar et al., 2010) ou à la contamination directe avant l'oviposition, suite à l'infection des organes reproducteurs par *E. coli*. Dans la présente étude, la détection d'*E. coli* hébergeant les gènes CTX-M-1 et *qnrS1* dans les ovaires des poules reproductrices chair également siège d'une inflammation associée à l'observation d'une réduction du taux de ponte soutient fortement la dernière hypothèse.

Très peu d'études ont été menées afin de caractériser des souches d'*E. coli* isolées des œufs à couver. Mezhoud et al. (2016) ont signalé la présence des souches d'entérobactéries

productrices de TEM et de SHV à la surface de la coquille et dans la coquille d'œufs à couver de poulets de chair (Mezhoud et al., 2016). Dans notre étude, *E. coli* résistante aux antibiotiques a été détectée dans un échantillon d'œufs à couver collecté dans un couvoir. Cette souche était multi-résistante à plusieurs antibiotiques de différentes familles d'antibiotiques tels que les β -lactamines, les quinolones, les tétracyclines et les sulfonamides. Aux Pays-Bas, des souches d'*E. coli* résistantes aux C3G ont été détectées par Dierikx et al. (2013) dans des couvoirs, chez des poussins d'un jour qui n'avaient reçus aucun traitement à base d'antibiotique.

En Algérie, seules quelques enquêtes ont démontré la présence de déterminants *qnr* dans des isolats d'animaux. Parmi ceux-ci, *qnrA* a été récemment identifié dans des souches d'*E. coli* d'origine aviaire porteuses du gène SHV-12 (Belmahdi et al., 2016), et *qnrS1* et *qnrB5* dans des souches d'*E. coli* productrices de BLSE d'animaux de compagnie (Yousfi et al., 2016). Récemment, *qnrS1* a également été détecté chez des souches d'entérobactéries d'origine aviaire non productrices de BLSE (Benameur et al., 2018). Cette coexistence de déterminants de résistance à différentes familles d'antibiotiques dans une même bactérie pourrait constituer rapidement une véritable impasse thérapeutique en santé humaine et animale.

Les résultats de cette étude ont révélé que les deux isolats présentaient un niveau élevé de résistance à l'acide nalidixique (CMI > 256), mais qu'ils restaient sensibles à la ciprofloxacine et à la lévofloxacine. Ces résultats concordent avec les données précédentes démontrant que les déterminants *qnr* confèrent une résistance aux quinolones, par exemple l'acide nalidixique, et une sensibilité réduite aux fluoroquinolones, et que la présence de gènes *qnr* ne conduit pas nécessairement à des CMI supérieures aux points critiques du CLSI pour la résistance à la ciprofloxacine (Martinez-Martinez et al., 1998). En outre, leur présence pourrait favoriser l'évolution vers de plus hauts niveaux de résistance aux fluoroquinolones par la sélection de mutation pour les cibles de ces molécules. La résistance chromosomique aux quinolones chez les entérobactéries résulte essentiellement d'accumulation de mutations dans l'ADN gyrase (GyrA, GyrB), puis dans la topoisomérase IV (ParC) (Ruiz, 2003). Les mutations apparaissent quasi-exclusivement dans de courtes régions conservées, situées entre les acides aminés 67 et 106, appelées quinolone resistance determining region (QRDR) (Ruiz, 2003 ; Jacoby, 2005). De plus, la résistance chromosomique aux quinolones peut être associée à la diminution de la perméabilité membranaire et/ou à la surexpression des systèmes d'efflux (Jacoby, 2005).

Une résistance à plus de trois antibiotiques différents et appartenant à différentes familles d'antibiotiques a été observée dans les deux isolats. L'étude de Belmahdi et al. (2016) a décrit une prévalence élevée de la co-résistance à l'acide nalidixique et à la streptomycine chez les *E. coli* productrices de BLSE (Belmahdi et al., 2016). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les plasmides BLSE portent souvent d'autres gènes de résistance (en particulier aux aminosides, aux tétracyclines et aux sulfamides) suggérant une co-résistance, une co-expression et une co-sélection des résistances comme rapporté précédemment (Pai et al., 2006).

4. Conclusion

En conclusion, il s'agit de la première étude démontrant la présence d'un clone d'*E. coli* résistant aux C3G et aux quinolones dans les organes reproducteurs de poules reproductrices chair et le contenu des œufs à couver. Les résultats de cette étude devraient contribuer à une meilleure compréhension épidémiologique moléculaire des résistances aux C3G et aux quinolones chez des *E. coli*. Cependant, d'autres études de typage moléculaire plus précises et incluant un nombre plus élevé de souches multi-résistantes demeurent nécessaires.

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication intitulée: "*Isolation of Escherichia coli carrying the bla_{CTX-M-1} and qnrS1 genes from reproductive organs of broiler breeders and internal contents of hatching eggs*", dans la revue: Journal of Veterinary Medical Science (2018) (Impact factor: 0.910).

Auteurs : Benameur Q, Tali-Maamar H, Assaous F, Guettou B, Tahrat N, Aggoune N, Rahal K et Ben-Mahdi MH.



NOTE

Avian Pathology

Isolation of *Escherichia coli* carrying the *bla*_{CTX-M-1} and *qnrS1* genes from reproductive organs of broiler breeders and internal contents of hatching eggs

Qada BENAMEUR^{1,2)*}, Hassiba TALI-MAAMAR³⁾, Farida ASSAOUS³⁾,
Badia GUETTOU³⁾, Naïma TAHRAT³⁾, Nadjet AGGOUNE⁴⁾, Kheira RAHAL³⁾ and
Meriem-Hind BEN-MAHDI^{2,5)}

¹⁾Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem 27000, Algeria

²⁾Laboratoire de Recherche, Santé et Productions Animales, Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire, Algiers 16000, Algeria

³⁾Laboratoire de Bactériologie Médicale, Institut Pasteur d'Algérie, Algiers 16000, Algeria

⁴⁾Laboratoire de Microbiologie, Hôpital Central de l'Armée, Algiers 16000, Algeria

⁵⁾Ecole Supérieure des Sciences de l'Aliment et des Industries Agro-alimentaires, Algiers 16000, Algeria

ABSTRACT. This study aimed to characterize two third-generation cephalosporins- and quinolone-resistant *Escherichia coli* (TGCs- and Q-R-*Ec*) isolates recovered from the ovaries of a broiler breeder flock and the internal contents of hatching eggs produced by the broiler breeder flock. Clonal relatedness was determined by multilocus sequence typing (MLST). The isolates displayed the same multidrug resistance profile, with resistance to ampicillin, ticarcillin, piperacillin, ceftazidime, cephalothin, cefotaxime, nalidixic acid, tetracycline and sulfonamides. Double disk synergy test demonstrated that the two isolates presented an ESBL phenotype. PCR and sequencing results showed that both the isolates harbored the *bla*_{CTX-M-1} and *qnrS1* genes. MLST revealed a novel allele combination, designated as ST461, in these isolates. This study would contribute to the molecular epidemiological understanding of TGCs- and/or Q-R-*Ec*.

KEY WORDS: antimicrobial resistance, molecular epidemiology, ovary, PCR, poultry

J. Vet. Med. Sci.

80(10): 1540–1543, 2018

doi: 10.1292/jvms.18-0283

Received: 22 May 2018

Accepted: 18 August 2018

Published online in J-STAGE:
3 September 2018

The increasing trend of third-generation cephalosporins- and quinolone-resistant *Escherichia coli* (TGCs- and Q-R-*Ec*) in food-producing animals worldwide is worrisome [19, 22], due to the significance of TGCs and quinolones in human and veterinary medicine. The production of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) is the most encountered mechanism responsible for resistance to TGCs. TEM, SHV, and CTX-M-types are the three major families of ESBL [6]. CTX-M is the most extended group among ESBL enzymes, and due to its increasing prevalence (higher than TEM and SHV), some authors have announced the “CTX-M ESBL pandemic” [7]. Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) determinants *qnr* gene has been subsequently reported [24]. In most cases, strains also had ESBLs, which raises the risk for transfer of multidrug resistant *E. coli* to humans [26].

Recently, TGCs- and/or Q-R-*Ec* isolates have been isolated at all levels of the broiler production pyramid, including chicken meat, in several countries [4, 7, 20, 21]. It has also been detected at commercial hatcheries, in one day old broiler chicks that had not been treated with antimicrobial before [10, 27], suggesting that particular TGCs- and/or Q-R-*Ec* clones are introduced through import of breeder stock and hatching eggs and disseminated via vertical transmission through the broiler production pyramid. Several experimental investigations have been employed to demonstrate possible colonization of hatching eggs by antimicrobial resistant (AMR) *E. coli* [8, 18]. Until now, there is no indication that trans-ovarian transmission plays a role in the dissemination of TGCs- and/or Q-R-*Ec*. To the author's knowledge, studies on vertical transmission of AMR *E. coli* from parent birds to their offspring have not been carried out so far since these bacteria have not been isolated from the reproductive organs of parent birds and/or internal contents of hatching eggs. The aim of this study was to characterize two TGCs- and Q-R-*Ec* strains isolated from the ovaries of a broiler breeder flock and the internal contents of hatching eggs produced by the broiler breeder flock.

Two ESBL-producing *Escherichia coli* strains (*E. coli* S1 and *E. coli* S2) were included in this study. The first strain (*E. coli* S1) was isolated from a pooled sample of the ovaries of broiler breeders collected from a breeder flock situated in Chlef province,

*Correspondence to: Benameur, Q.: qada.benameur@univ-mosta.dz

©2018 The Japanese Society of Veterinary Science



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial No Derivatives (by-nc-nd) License. (CC-BY-NC-ND 4.0: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Table 1. Characteristics of *E. coli* isolates

Isolate	Specimen	Resistance profile	MICs ($\mu\text{g/ml}$)									<i>bla</i> gene	Qnr determinant	Sequence type
			CTX	CAZ	FEP	ATM	CRO	NA	CIP	LEV	CT			
<i>E. coli</i> S1	Broiler breeders	AM, TIC, PIP, CZ, CF, CTX, NA, TE, SSS	>32	3	12	6	64	>256	0.25	0.5	0.125	CTX-M-1	<i>qnrS1</i>	ST461
<i>E. coli</i> S2	Hatching eggs	AM, TIC, PIP, CZ, CF, CTX, NA, TE, SSS	>32	3	12	6	128	>256	0.38	0.75	0.125	CTX-M-1	<i>qnrS1</i>	ST461

MIC, minimum inhibitory concentration; AM, ampicillin; TIC, ticarcillin; PIP, piperacillin; CZ, cefazolin; CF, cephalothin; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; FEP: cefepime; ATM, aztreonam; CRO, cefriaxone; NA, nalidixic acid; CIP, ciprofloxacin; LVX, levofloxacin; TE, tetracycline; SSS, sulfonamides; CT, colistin.

Western Algeria, and the second one (*E. coli* S2) was recovered from a sample of internal contents of broiler hatching eggs collected from a commercial broiler hatchery located in Mostaganem province, North-western Algeria. Eggs produced by the breeder flock in Chlef province were transported to the hatchery in Mostaganem province. Hatching eggs were collected one week after the sampling of the ovaries. The samples were collected following the instructions of veterinarians in those facilities and submitted to the Regional Veterinary Laboratory of Mostaganem, Algeria, for routine antimicrobial resistance monitoring. According to the veterinarian, a drop in egg production (12.53%) was observed in the breeder flock sampled.

The samples were processed immediately upon arrival using aseptic techniques. Ten birds, randomly sampled from the breeder flock, were necropsied in the laboratory and only the ovaries were collected. The ovaries were pooled in a sterile tube and were then flamed for 5 sec using a Bunsen burner, for disinfecting their surface, and cut into small dice. Visually clean hatching eggs (20 eggs) were also randomly collected in sterile plastic bags and transported to the laboratory on ice in an ice box. After disinfection of the surface of the eggshell, by dipping the eggs into 2% tincture iodine for 1 min, the egg internal contents were examined as described previously [8]. One ml or g of the samples (egg internal contents or ovaries) was mixed with 9 ml of buffered peptone water, vortexed and incubated at 37°C overnight. To isolate *E. coli*, a drop of broth was streaked on MacConkey's agar. Isolates were further identified using the API 20E System (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

Antimicrobial susceptibility tests of the *E. coli* isolates were carried out using the disk diffusion method and minimal inhibitory concentrations (MICs) following Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines [9]. The isolates were tested against a panel of 23 antimicrobials including many that are important to both human and veterinary medicine: nalidixic acid (30 μg), flumequin (30 μg), ciprofloxacin (5 μg), levofloxacin (5 μg), ampicillin (10 μg), amoxicillin-clavulanic acid (20/10 μg), ticarcillin (75 μg), piperacillin (100 μg), cefazolin (30 μg), cephalothin (30 μg), ceftazidime (30 μg), cefotaxime (30 μg), aztreonam (30 μg), cefepime (30 μg), cefriaxone (30 μg), tetracycline (30 μg), sulfonamides (300 μg), trimethoprim (5 μg), trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25/23.75 μg), imipenem (10 μg), gentamicin (10 μg), chloramphenicol (30 μg), and nitrofurantoin (300 μg) (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). The MICs against cefotaxime, ceftazidime, aztreonam, cefepime, cefriaxone, nalidixic acid, ciprofloxacin and levofloxacin were determined using E-test (AES, AB Biodisk, Solna, Sweden). The MIC value for colistin was determined by broth microdilution method following EUCAST recommendations [25]. *E. coli* ATCC 25922 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, U.S.A.) was used as a quality control strain.

Double disk synergy test (DDST) was performed to confirm ESBL production as described by Jarlier *et al.* [15] using a central amoxicillin/clavulanic acid disk, 30 mm away from cefotaxim, cefriaxone, ceftazidim, and aztreonam disks. The presence of ESBL was revealed by a champagne cork aspect.

The *E. coli* isolates were also subjected to PCR for the detection of *bla*_{ESBL} as described previously for *bla*_{CTX-M} genotype groups 1, 2, 8 and 9 [1], *bla*_{SHV} [1], and *bla*_{TEM} [17]. The isolates were also screened for *qnr*-type genes (*qnrA*, *qnrB* and *qnrS*) as previously described [11, 12, 14]. PCR amplicons were confirmed by sequencing and the DNA sequences obtained were compared with those in the GenBank using the BLAST program.

To analyze the possible clonal relatedness between the *E. coli* isolates, molecular typing by multilocus sequence typing (MLST) was used. Internal fragments of eight housekeeping genes (*dinB*, *icdA*, *pabB*, *polB*, *putP*, *trpA*, *trpB* and *uidA*) were studied by PCR and sequencing according to the method of Jaureguy *et al.* [16] Allele sequences and sequence typing were assigned according to Institute Pasteur's MLST scheme for *E. coli*.

Congestion and swelling of the ovaries were observed on post mortem examination in 3 out of the 10 ovaries examined. *E. coli* was isolated in pure culture on MacConkey's agar from the two specimens. The two isolates displayed the same antimicrobial resistance profile, with resistance to ampicillin, ticarcillin, piperacillin, cefazolin, cephalothin and cefotaxime. Both isolates were susceptible to ceftazidime and imipenem. The MIC values indicated that these isolates showed reduced susceptibility to cefepime and aztreonam (Table 1). On another hand, the isolates were resistant to nalidixic acid, tetracycline and sulfonamides, but susceptible to ciprofloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole, chloramphenicol, nitrofurantoin and colistin. DDST demonstrated that both isolates presented an ESBL phenotype. In addition, PCR screening for *bla*_{ESBL} and *qnr* genes showed that the two isolates coproduced *bla*_{CTX-M} and *qnrS*-encoding genes. According to sequencing results, the *bla*_{CTX-M} and *qnr* genes harbored by the two isolates were *bla*_{CTX-M-1} and *qnrS1*. By MLST, a novel allele combination (25-47-10-10-16-57-4-50) was found in both the isolates and is designated as ST461.

In recent years, there has been increasing concern in the scientific community about the emergence and dissemination of TGCs- and Q-R-*Ec* within the broiler production pyramid [4, 5, 20]. Import of breeding animals has been suggested as the most

likely source for introduction of antimicrobial resistance to the broiler production [10, 20]. In this study, *E. coli* isolates harboring the *bla*_{CTX-M-1} and *qnrS1* genes belonging to ST461 were detected in the ovaries of a broiler breeder flock and subsequently in the internal contents of hatching eggs originating from the broiler breeder flock. The presence of *E. coli* in egg internal contents may be due to penetration through the eggshell during or after oviposition as previously demonstrated [8]. A recent study has reported the presence of TEM- and SHV-producing Enterobacteriaceae isolates in the shell surface and shell crushed of broiler hatching eggs [18]. Another explanation is by direct contamination before oviposition, originating from the infection of reproductive organs with *E. coli*. Isolation of *E. coli* harboring the *bla*_{CTX-M-1} and *qnrS1* genes from the ovaries of the broiler breeders in this study strongly suggests the latter hypothesis which may be responsible for ovaritis and associated with reduced egg production. Indeed, TGCs-R-*Ec* has also been detected, in commercial hatcheries, in one-day-old chicks that had not been treated with antimicrobial before [10].

In Algeria, a few investigations have demonstrated the presence of *qnr* determinants in isolates from animals and food of animal origin. Among them, *qnrA* has been recently identified in SHV-12-producing *E. coli* isolates from poultry [2], and *qnrS1* and *qnrB5* in ESBL-producing *E. coli* isolates from companion animals [28]. In this study *qnrS1* was reported in CTX-M-1 producing *E. coli*. Recently, *qnrS1* has also been detected in non-ESBL-producing *E. coli* and *Enterobacter cloacae* of poultry origin [3].

The results of this study revealed that the isolates showed a high level of resistance to nalidixic acid (MIC>256), but they remained susceptible to ciprofloxacin and levofloxacin. Generally, the plasmid-mediated mechanisms provide only low-level resistance that by itself does not exceed the clinical breakpoint for susceptibility [13]. MICs of nalidixic acid in the isolates from ovary and egg content samples may be due to a mutation(s) in the quinolone resistance-determining regions including *gyrA* and *parC* genes. Resistance to other antibiotics was also observed in the two *E. coli* isolates. It has been reported that the prevalence of co-resistance to nalidixic acid and sulfonamides was high among ESBL-producing *E. coli* [2]. This can be explained by the ESBL-plasmids often carry other genes of resistance (particularly to aminosides, tetracyclins and sulfamides) suggesting co-resistance, co-expression, and co-selection as previously reported [23].

In conclusion, this is the first report demonstrating the presence of TGCs- and Q-R-*Ec* in the reproductive organs of broiler breeders and internal contents of hatching eggs. The present results would contribute to the molecular epidemiological understanding of TGCs- and Q-R-*Ec*. However, further molecular epidemiological studies are needed in order to characterize a large number of AMR isolates.

ACKNOWLEDGMENTS. We wish to thank the curators of the Pasteur Institute MLST databases, Professors Olivier Clermont and Sylvain Brisse, for curating the data and making them publicly available at <http://bigsd.db.pasteur.fr/>.

REFERENCES

1. Arlet, G., Rouveau, M. and Philippon, A. 1997. Substitution of alanine for aspartate at position 179 in the SHV-6 extended-spectrum beta-lactamase. *FEMS Microbiol. Lett.* **152**: 163–167. [Medline] [CrossRef]
2. Belmahdi, M., Bakour, S., Al Bayssari, C., Touati, A. and Rolain, J. M. 2016. Molecular characterisation of extended-spectrum β -lactamase- and plasmid AmpC-producing *Escherichia coli* strains isolated from broilers in Béjaïa, Algeria. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **6**: 108–112. [Medline] [CrossRef]
3. Benameur, Q., Tali-Maamar, H., Assaous, F., Guettou, B., Benklaouz, M. B., Rahal, K. and Ben-Mahdi, M. H. 2018. Characterization of quinolone-resistant Enterobacteriaceae strains isolated from poultry in Western Algeria: First report of *qnrS* in an *Enterobacter cloacae*. *Vet. World* **11**: 469–473. [Medline] [CrossRef]
4. Börjesson, S., Guillard, T., Landén, A., Bengtsson, B. and Nilsson, O. 2016. Introduction of quinolone resistant *Escherichia coli* to Swedish broiler population by imported breeding animals. *Vet. Microbiol.* **194**: 74–78. [Medline] [CrossRef]
5. Bortolaia, V., Guardabassi, L., Trevisani, M., Bisgaard, M., Venturi, L. and Bojesen, A. M. 2010. High diversity of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates from Italian broiler flocks. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**: 1623–1626. [Medline] [CrossRef]
6. Bush, K. and Jacoby, G. A. 2010. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**: 969–976. [Medline] [CrossRef]
7. Cantón, R. and Coque, T. M. 2006. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**: 466–475. [Medline] [CrossRef]
8. Chousalkar, K. K., Flynn, P., Sutherland, M., Roberts, J. R. and Cheetham, B. F. 2010. Recovery of *Salmonella* and *Escherichia coli* from commercial egg shells and effect of translucency on bacterial penetration in eggs. *Int. J. Food Microbiol.* **142**: 207–213. [Medline] [CrossRef]
9. Clinical and Laboratory Standards Institute 2016. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed., Clinical and Laboratory Standards Institute Supplement M100-S26, Wayne.
10. Dierikx, C. M., van der Goot, J. A., Smith, H. E., Kant, A. and Mevius, D. J. 2013. Presence of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in the broiler production pyramid: a descriptive study. *PLoS One* **8**: e79005. [Medline] [CrossRef]
11. Gay, K., Robicsek, A., Strahilevitz, J., Park, C. H., Jacoby, G., Barrett, T. J., Medalla, F., Chiller, T. M. and Hooper, D. C. 2006. Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*. *Clin. Infect. Dis.* **43**: 297–304. [Medline] [CrossRef]
12. Jacoby, G. A., Chow, N. and Waites, K. B. 2003. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 559–562. [Medline] [CrossRef]
13. Jacoby, G. A., Strahilevitz, J. and Hooper, D. C. 2014. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiol. Spectr.* **2**: 1–24. [Medline] [CrossRef]
14. Jacoby, G. A., Walsh, K. E., Mills, D. M., Walker, V. J., Oh, H., Robicsek, A. and Hooper, D. C. 2006. *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**: 1178–1182. [Medline] [CrossRef]
15. Jarlier, V., Nicolas, M. H., Fournier, G. and Philippon, A. 1988. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.* **10**: 867–878. [Medline] [CrossRef]
16. Jauregui, F., Landraud, L., Passet, V., Diancourt, L., Frapy, E., Guigon, G., Carbonele, E., Lortholary, O., Clermont, O., Denamur, E., Picard, B., Nassif, X. and Brisse, S. 2008. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics* **9**: 560. [Medline] [CrossRef]

17. Mabilat, C. and Goussard, S. 1993. PCR detection and identification of genes for extended-spectrum β -lactamases. pp. 553–559. *In: Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications* (Persing, D.H., Smith, T.F., Tenover, F.C. and White, T.J. eds.), American Society for Microbiology, Washington, D.C.
18. Mezhoud, H., Chantziaras, I., Iguer-Ouada, M., Moula, N., Garmyn, A., Martel, A., Touati, A., Smet, A., Haesebrouck, F. and Boyen, F. 2016. Presence of antimicrobial resistance in coliform bacteria from hatching broiler eggs with emphasis on ESBL/AmpC-producing bacteria. *Avian Pathol.* **45**: 493–500. [[CrossRef](#)] [[Medline](#)]
19. Mnif, B., Ktari, S., Rhimi, F. M. and Hammami, A. 2012. Extensive dissemination of CTX-M-1- and CMY-2-producing *Escherichia coli* in poultry farms in Tunisia. *Lett. Appl. Microbiol.* **55**: 407–413. [[Medline](#)] [[CrossRef](#)]
20. Mo, S. S., Norström, M., Slettemeås, J. S., Løvland, A., Urdahl, A. M. and Sunde, M. 2014. Emergence of AmpC-producing *Escherichia coli* in the broiler production chain in a country with a low antimicrobial usage profile. *Vet. Microbiol.* **171**: 315–320. [[Medline](#)] [[CrossRef](#)]
21. Nahar, A., Awasthi, S. P., Hatanaka, N., Okuno, K., Hoang, P. H., Hassan, J., Hinenoya, A. and Yamasaki, S. 2018. Prevalence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in domestic and imported chicken meats in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **80**: 510–517. [[Medline](#)] [[CrossRef](#)]
22. Naseer, U. and Sundsfjord, A. 2011. The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones. *Microb. Drug Resist.* **17**: 83–97. [[Medline](#)] [[CrossRef](#)]
23. Pai, H., Kim, M. R., Seo, M. R., Choi, T. Y. and Oh, S. H. 2006. A nosocomial outbreak of *Escherichia coli* producing CTX-M-15 and OXA-30 beta-lactamase. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **27**: 312–314. [[Medline](#)] [[CrossRef](#)]
24. Pérez-Moreno, M. O., Picó-Plana, E., de Toro, M., Grande-Armas, J., Quiles-Fortuny, V., Pons, M. J., Gomes, C., Sáenz, Y., Torres, C. and Ruiz, J. 2013. β -Lactamases, transferable quinolone resistance determinants, and class 1 integron-mediated antimicrobial resistance in human clinical *Salmonella enterica* isolates of non-Typhimurium serotypes. *Int. J. Med. Microbiol.* **303**: 25–31. [[Medline](#)] [[CrossRef](#)]
25. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2018). Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 8.0. Available online at: <http://www.eucast.org> [accessed on June 13, 2018].
26. Wang, Y., He, T., Han, J., Wang, J., Foley, S. L., Yang, G., Wan, S., Shen, J. and Wu, C. 2012. Prevalence of ESBLs and PMQR genes in fecal *Escherichia coli* isolated from the non-human primates in six zoos in China. *Vet. Microbiol.* **159**: 53–59. [[Medline](#)] [[CrossRef](#)]
27. Yossapol, M., Sugiyama, M. and Asai, T. 2017. The occurrence of CTX-M-25-producing Enterobacteriaceae in day-old broiler chicks in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **79**: 1644–1647. [[Medline](#)] [[CrossRef](#)]
28. Yousfi, M., Mairi, A., Touati, A., Hassissene, L., Brasme, L., Guillard, T. and De Champs, C. 2016. Extended spectrum β -lactamase and plasmid mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* fecal isolates from healthy companion animals in Algeria. *J. Infect. Chemother.* **22**: 431–435. [[Medline](#)] [[CrossRef](#)]

*Etude III : Mise en évidence d'E. coli multi-résistantes
aux antibiotiques dans les ovaires des poules
reproductrices chair saines et de souches productrices
de BLSE*

Etude III : Mise en évidence d'E. coli multi-résistantes aux antibiotiques dans les ovaires des poules reproductrices chair saines et de souches productrices de BLSE**1. Introduction**

L'étude précédente a permis la détection d'un clone d'*E. coli* dans les ovaires des poules reproductrices chair et dans le contenu des œufs à couver confirmant les hypothèses présentées par des études antérieures, réalisées dans différent pays du monde (Börjesson et al., 2015, Bortolaia et al., 2010, Dierikx et al., 2013, Mo et al., 2014), sur la transmission verticale d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques, depuis les reproductrices vers leur descendance. Ces mêmes auteurs ont rapporté une prévalence relativement élevée d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques isolées à tous les niveaux de la chaîne de production du poulet de chair et même dans plusieurs pays considérés comme de faibles utilisateurs d'antibiotiques (Börjesson et al., 2015, Bortolaia et al., 2010, Dierikx et al., 2013, Mo et al., 2014). Néanmoins, la recherche d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques dans la filière de production de poulets de chair, a été limitée à des échantillons provenant du tube digestif (organes, fientes ou écouvillons cloacaux) de poules et/ou poulets ou de leur environnement. Par conséquent, l'objectif de la présente étude a été de mettre en évidence une éventuelle colonisation des organes reproducteurs des poules reproductrices chair saines par *E. coli* résistantes aux antibiotiques.

2. Matériel et Méthodes***2.1. Zone d'étude et échantillonnage***

L'étude a été menée dans quatre-vingts élevages de reproducteurs chair situés dans sept wilayas de l'ouest de l'Algérie (Mostaganem, Oran, Mascara, Relizane, Chlef, Tiaret et Tissemsilt). Un total de 400 poules reproductrices saines a été analysé entre février 2011 et mars 2017. Des échantillons des poules reproductrices (cinq poules par échantillon) ont été collectés au hasard des différents élevages. Chaque élevage de reproducteurs a été échantillonné une seule fois. Les échantillons ont ensuite été transportés au Laboratoire Vétérinaire Régional de Mostaganem pour procéder immédiatement à l'isolement bactérien.

2.2. Isolement des souches bactériennes, étude de la sensibilité aux antibiotiques et caractérisation des gènes de résistance aux antibiotiques

Les protocoles d'isolement des *E. coli*, de l'antibiogramme et de la recherche des gènes de résistance aux antibiotiques (*bla*_{CTX-M} du groupe 1, 2, 8 et 9, *bla*_{TEM} et *bla*_{SHV}), adoptés dans cette étude, ont déjà été détaillés dans l'étude précédente. Quatorze antibiotiques ont cependant été testés dans cette étude : l'acide nalidixique (NA, 30 µg), fluméquine (UB, 30 µg), ciprofloxacine (CIP, 5 µg), lévofloxacine (LVX, 5 µg), ampicilline (AMP, 10 µg), amoxicilline/acide clavulanique (AMC, 20/10 µg), ceftiofur (XNL, 30 µg), tétracycline (TE, 30 µg), triméthoprimé (TMP, 5 µg), sulfonamides (SSS, 300 µg), triméthoprimé/sulfaméthoxazole (SXT, 1,25/23,75 µg), néomycine (N, 30 µg), chloramphénicol (C, 30 µg) et colistine (CT, 50 µg). Dans cette étude, les valeurs des CMI ont été déterminées pour le céfotaxime, la ceftazidime, l'aztréonam, le céfépime et la ceftriaxone.

3. Résultats et Discussion

3.1. Mise en évidence de souches d'*E. coli* résistantes à de nombreux antibiotiques de première intention

Au total, 37 échantillons d'ovaires prélevés sur les 80 élevages étudiés ont été trouvés colonisés par *E. coli*. Cependant, aucune lésion apparente n'a été observée sur les ovaires à l'examen nécropsique. Des taux élevés de résistance ont été relevés vis-à-vis de l'acide nalidixique 94,5% (n = 35), l'ampicilline 91,8% (n = 34), la ciprofloxacine 89,1% (n = 33), la lévofloxacine 89,1% (n = 33) et la tétracycline 81% (n = 30). Le taux de résistance le plus faible a été observé vis-à-vis du ceftiofur 10,8% (n = 4) (Figure 11). Tous les isolats étaient sensibles à la colistine. Neuf isolats d'*E. coli* (24,3%) ont montré une résistance au chloramphénicol.

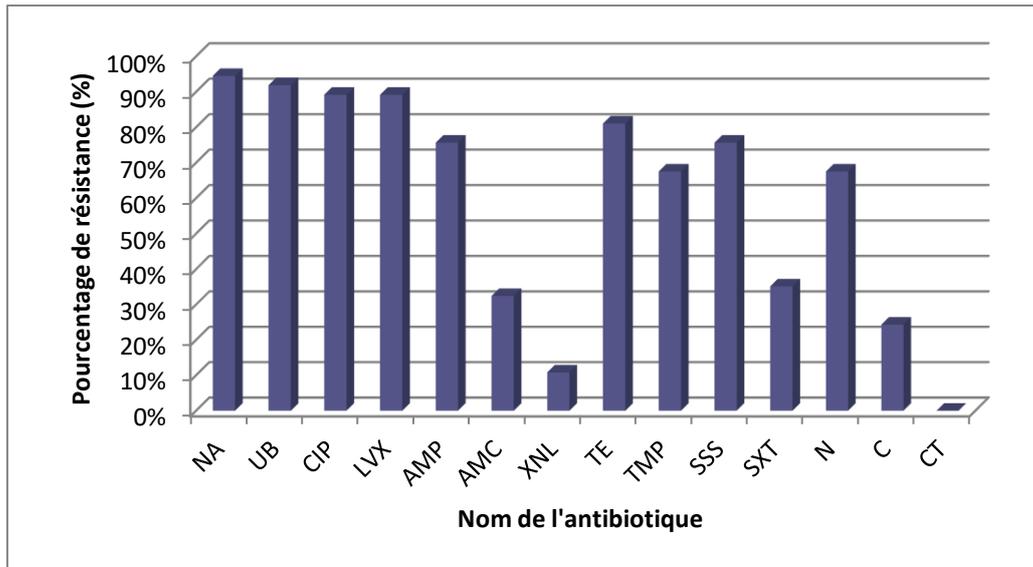


Figure 11: Résistance aux antibiotiques des souches d'*E. coli* isolées des ovaires des poules reproductrices chair saines

L'épidémiologie d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques est à la fois évolutive et complexe, et le rôle potentiel des reproducteurs comme réservoir possible d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques a été rapporté récemment par plusieurs études (Börjesson et al., 2015; Mo et al., 2014. Myrenås et al., 2018). Les résultats de la présente étude ont démontré la capacité d'*E. coli* résistante aux antibiotiques de coloniser les ovaires des poules reproductrices saines. Chez les poules adultes, les organes reproducteurs sont des sites de prédilection qui conduisent à l'infection des follicules ovariens et, par conséquent, à la transmission trans-ovarienne de la maladie (Lutful Kabir., 2010).

En Afrique du Sud, des souches d'*E. coli* résistantes à l'ampicilline et à l'acide nalidixique ont été détectées dans la filière avicole chair, et ce en l'absence de toute utilisation d'antibiotiques (Bortolaia et al., 2010). En Suède, la présence d'*E. coli* résistantes à l'acide nalidixique a également été signalée à tous les niveaux de la filière du poulet de chair local et chez des reproducteurs importés en l'absence d'une quelconque pression de sélection par l'usage d'antibiotiques (Börjesson et al., 2015). La persistance de souches multi-résistantes, malgré la réduction drastique de l'usage des antibiotiques dans plusieurs pays indique que des facteurs autres que la pression de sélection sont impliqués dans l'apparition et la dissémination des bactéries résistantes et confirme l'hypothèse présentée par plusieurs chercheurs (Börjesson et al., 2015, Bortolaia et al., 2010, Dierikx et al., 2013, Mo et al., 2014) dont celle de notre

équipe (Benameur et al., 2018) sur une transmission verticale d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques, depuis les reproductrices vers leurs descendances.

Les taux de résistance élevés aux antibiotiques de première intention observés chez *E. coli* sont assez alarmants si l'on tient compte de leur importante et large utilisation dans le traitement des pathologies aviaires. La résistance au chloramphénicol a également été rapportée dans notre étude alors que son usage est proscrit chez les animaux de rente en Algérie. La persistance de la résistance au chloramphénicol chez *E. coli* a également été observée précédemment (Bischoff et al., 2005). Cette persistance de la résistance pourrait s'expliquer par la co-sélection de la résistance par des éléments génétiques mobiles (Harada et al., 2006).

3.2. Mise en évidence d'une résistance multiple chez les souches d'*E. coli* isolées

Les souches d'*E. coli* résistantes à trois antibiotiques ou plus, appartenant à différentes classes d'antibiotiques, ont été considérées comme des souches multi-résistantes. Cette étude a montré que 89,18% (n = 33) des souches d'*E. coli* étaient multi-résistantes. La plupart des isolats étaient résistants à plus de 6 antibiotiques, comme indiqué dans la figure 12. Trois isolats se sont révélés résistants à plus de 10 antibiotiques sur les 14 antibiotiques testés.

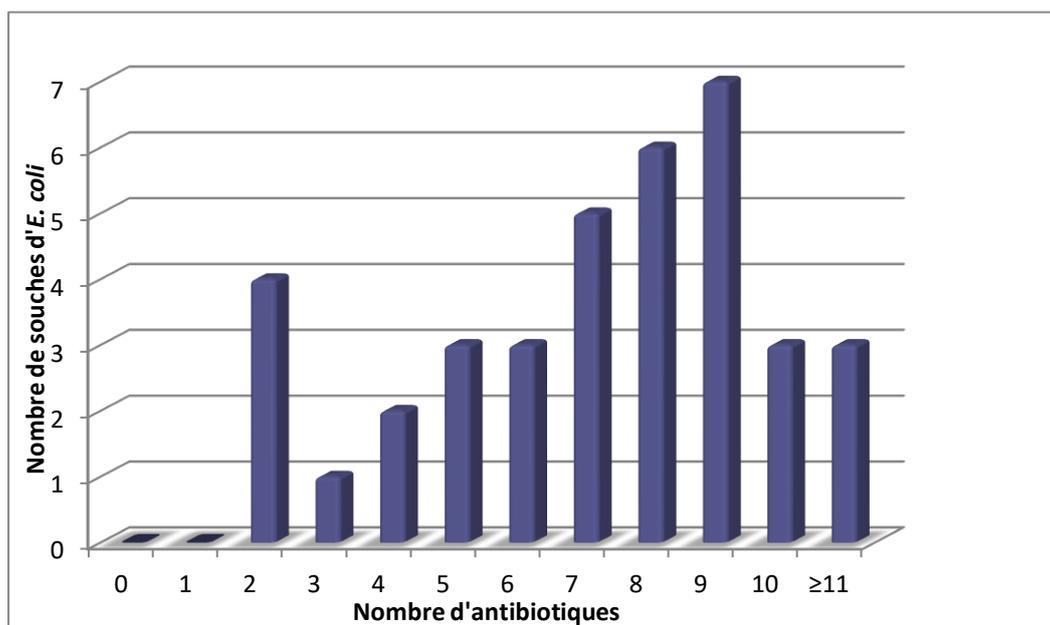


Figure 12 : Multi-résistances aux antibiotiques chez *E. coli* isolées des ovaires des poules reproductrices chair

Très peu d'études ont été menées sur la multi-résistance d'*E. coli* isolées des élevages reproducteurs. En Norvège, la présence de souches d'*E. coli* résistantes aux C3G a été rapportée, dans les élevages reproducteurs, ainsi qu'une co-résistance aux tétracyclines, au sulfaméthoxazole, au triméthoprime, à la gentamycine et à la streptomycine, avec des taux très faibles (Mo et al., 2014). Cette multi-résistance pourrait s'expliquer par la présence d'éléments génétiques mobiles tels que les plasmides, les transposons ou les cassettes d'intégrons contribuant à la co-résistance, à la co-expression et à la co-sélection (Woodford et al., 2011).

3.3. Mise en évidence de gènes de β -lactamases à spectre étendu

Quatre souches d'*E. coli* productrices de BLSE ont été détectées dans les différents élevages de reproducteurs. Tous ces isolats étaient multi-résistants aux antibiotiques. Les valeurs des CMI pour le céfotaxime, la ceftazidime, l'aztréonam, le céfépime et la ceftriaxone allaient de 1,5 à > 32 $\mu\text{g/ml}$, de 2 à 16 $\mu\text{g/ml}$, de 4 à 12 $\mu\text{g/ml}$, de 1 à 16 $\mu\text{g/ml}$ et de 3 à > 256 $\mu\text{g/ml}$, respectivement (Tableau 4). La caractérisation moléculaire a révélé la présence du gène *bla*_{CTX-M-1} dans trois isolats d'*E. coli* et du gène *bla*_{SHV-12} dans un seul isolat. De plus, le gène *bla*_{TEM-1} a été également détecté chez un isolat d'*E. coli* porteur de gène *bla*_{CTX-M-1}.

Tableau 4 : Caractéristiques des souches d'*E. coli* productrices de BLSE isolées des ovaires des poules reproductrices chair saines.

Isolat	Profil de résistance	CMI ($\mu\text{g/ml}$)					Gènes
		CTX	CAZ	FEP	ATM	CRO	
<i>E. coli</i> [S1]	AMP, XNL, NA, UB, CIP, LVX, TE, SSS.	>32	2	8	4	64	CTX-M-1, TEM-1
<i>E. coli</i> [S2]	AMP, XNL, NA, UB, TE, SSS, TMP, SXT.	>32	3	16	12	>252	CTX-M-1
<i>E. coli</i> [S3]	AMP, XNL, NA, UB, TE, SSS.	>32	3	12	6	64	CTX-M-1
<i>E. coli</i> [S4]	AMP, XNL, NA, UB, CIP, LVX, TE, SSS, TMP, SXT.	1.5	16	1	8	3	SHV-12

Des souches d'*E. coli* productrices de BLSE/AmpC ont également été détectées à tous les niveaux de la filière du poulet de chair aux Pays-Bas et en Norvège (Dierikx et al., 2013, Mo et al., 2014). Plus récemment, la propagation clonale d'*E. coli* résistantes aux céphalosporines et aux quinolones a été signalée dans la filière chair dans trois pays nordiques en l'occurrence la Suède, la Norvège et l'Islande (Myrenås et al., 2018). En Algérie, la présence des souches d'*E. coli* productrices de BLSE a été signalée chez le poulet de chair au cours de ces dernières années (Belmahdi et al., 2016 ; Chabou et al., 2017 ; Meguenni et al., 2015). Des BLSE de type CTX-M-1, SHV-12 et TEM-1 ont été détectés dans des souches d'*E. coli* isolées à partir d'intestins de poulets abattus (Belmahdi et al., 2016) et de type CTX-M-1- et CTX-M-15 dans des souches d'*E. coli* d'origine aviaire dans la région centre de l'Algérie (Meguenni et al., 2015). Les résultats de notre étude rejoignent ceux de l'étude menée aux Pays-Bas qui a démontré la présence de souches d'*E. coli* porteuses du gène CTX-M-1 dans des couvoirs, chez des poussins d'un jour qui n'ont reçus aucun traitement antibiotique (Dierikx et al., 2013). La présente étude a montré que des poules reproductrices chair saines pouvaient constituer un réservoir pour ces isolats et qu'ils joueraient ainsi un rôle important dans la transmission et la dissémination d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques dans la filière du poulet de chair.

Les gènes codant pour la résistance aux céphalosporines sont généralement localisés sur des plasmides conjugatifs (Agerso et al., 2014, Mo et al., 2016), ce qui facilite leurs large dissémination dans le monde bactérien. La dissémination et la persistance d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques pourraient également être attribuables à d'autres voies de contamination possibles. Par exemple; la transmission horizontale dans les fermes et les couvoirs (Dierikx et al., 2013), le transport national et l'échange commercial international de poules de et vers de nombreux pays du monde (Börjesson et al., 2015).

La dissémination mondiale d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques chez le poulet de chair constitue une préoccupation réelle en matière de santé humaine et animale et la transférabilité des souches d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques ou des déterminants génétiques mobiles de la résistance des poulets aux humains est désormais établie (Agabou et al., 2015, Johnson et al., 2006).

4. Conclusion

En conclusion, la colonisation des ovaires des poules reproductrices chair saines par *E. coli* multi-résistantes aux antibiotiques pourrait entraîner la contamination des œufs à couver et pourrait être un facteur important dans la dissémination des souches d'*E. coli* multi-résistantes aux antibiotiques dans la filière du poulet de chair. Par conséquent, la mise en œuvre de nouvelles stratégies de prévention dans les élevages reproducteurs et les couvoirs devient obligatoire et urgente.

Cette étude a donné lieu à une publication intitulée: “*Detection of multidrug resistant Escherichia coli in the ovaries of healthy broiler breeders with emphasis on extended-spectrum β -lactamases producers*”, dans la revue: Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases. (2019) (Impact factor: 1.871).

Auteurs : Benameur Q, Tali-Maamar H, Assaous F, Guettou B, Rahal K et Ben-Mahdi M-H.



Detection of multidrug resistant *Escherichia coli* in the ovaries of healthy broiler breeders with emphasis on extended-spectrum β -lactamases producers

Qada Benameur^{a,b,*}, Hassiba Tali-Maamar^c, Farida Assaous^c, Badia Guettou^c, Kheira Rahal^c, Meriem-Hind Ben-Mahdi^{b,d}

^a Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, 27000, Mostaganem, Algeria

^b Laboratoire de Recherche « Santé et Production Animale », Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'El-Harrach, 16000, Algiers, Algeria

^c Laboratoire de Bactériologie Médicale, Institut Pasteur d'Algérie, 16000, Algiers, Algeria

^d Ecole Supérieure des Sciences de l'Aliment et des Industries Agroalimentaires, 16000, Algiers, Algeria

ARTICLE INFO

Keywords:

Escherichia coli
Multidrug resistance
Healthy broiler breeders
Ovaries
*bla*_{CTX-M-1}

ABSTRACT

In the last few years, antimicrobial resistant (AMR) *Escherichia coli* have been detected in newborn chickens suggesting their vertical transmission from breeding birds to their offspring. However, little is known about the presence of AMR *E. coli* in the reproductive organs of broiler breeders. The aim of this study was to investigate the presence of *E. coli* in the ovaries of healthy broiler breeders and to study their antimicrobial resistance. Samples from broiler breeders (n = 80) collected from 80 different broiler breeder flocks were included in this study. Antibiotic susceptibility testing was performed using disk diffusion method according to Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines. Minimal inhibitory concentrations (MICs) of five antimicrobial agents were determined by Etest. PCR and sequencing were used to detect the *bla*_{ESBL} genes. *E. coli* were detected in the ovaries of thirty seven out of 80 (46.25%) sampled flocks. High levels of resistance to various first-line antimicrobial agents were recorded in *E. coli* isolates. This study showed that 89.18% of *E. coli* isolates were multidrug resistant (MDR). Furthermore, MDR extended-spectrum β -lactamases (ESBL)-producing *E. coli* were detected in the ovaries of four different broiler breeder flocks. Molecular characterization revealed that three isolates harboured *bla*_{CTX-M-1} gene and one isolate expressed *bla*_{SHV-12} gene. In addition, one *bla*_{CTX-M-1}-producing *E. coli* co-harboured the *bla*_{TEM-1} gene. These findings would contribute to a better epidemiological understanding of MDR *E. coli* for improve existing preventive strategies in order to reduce the dissemination of antimicrobial resistance in the broiler production system.

1. Introduction

Escherichia coli is as a major pathogen of widespread importance in commercially produced poultry [1], contributing to heavy economic losses in broiler chickens both in broiler breeders and their progeny. Simultaneously, *E. coli* is a highly versatile microorganism and is used as a model organism for detecting the presence of antimicrobial resistance (AMR) [2]. The surveillance data shows that the prevalence of multidrug resistant *E. coli* (resistant to three or more classes of therapeutic antibiotics such as β -lactams and quinolone) in food-producing animals increased in the last decade [3], constituting an important reservoir for transmissible resistance genes. The production of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) is the most encountered mechanism responsible for resistance to third-generation cephalosporins. In the last

years, CTX-M-type ESBL have been frequently isolated, and due to its increasing prevalence (higher than TEM and SHV), some authors have announced the “CTX-M ESBL pandemic” [4]. In veterinary medicine, resistance to multiple antimicrobials was found more often in *E. coli* from broiler chickens compared to *E. coli* from other meat producing animals or from laying hens [5,6]. Various authors have reported a relatively high prevalence of AMR *E. coli* in birds sampled from all levels of broiler production pyramid, including broilers sampled few days before slaughtering and/or retail meat, and also in several countries with a low antimicrobial usage profile [7,8]. It has been hypothesized that particular AMR *E. coli* clones are introduced through imported breeding birds, and disseminated via vertical transmission through the broiler production pyramid. Indeed, cephalosporins resistant *E. coli* were recently detected in newborn broilers in several countries [9–11].

* Corresponding author. Tel.: +213 770 69 34 85/+213 550 41 73 62.

E-mail address: qada.benameur@univ-mosta.dz (Q. Benameur).

<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.03.009>

Received 18 November 2018; Received in revised form 6 March 2019; Accepted 7 March 2019

0147-9571/© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

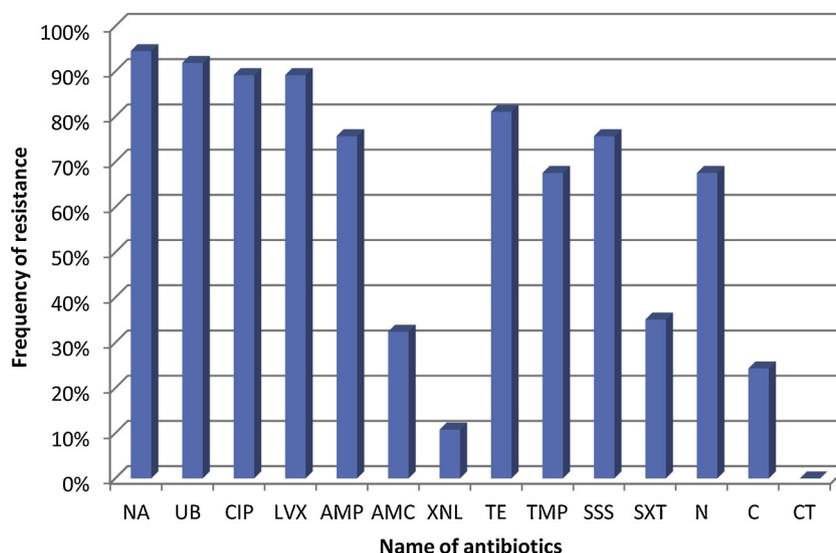


Fig. 1. Antimicrobial resistance rates of *E. coli* strains isolated from the ovaries of healthy broiler breeders.

All previous studies conducted to investigate the detection of AMR *E. coli* in broiler production used samples from the digestive tract of birds or their environment. However, very few studies have been conducted to investigate the ability of AMR *E. coli* to colonize the reproductive organs of broiler breeder chickens. The objective of this study was to demonstrate the colonization of the ovaries of healthy broiler breeders by *E. coli* and to evaluate their antimicrobial resistance.

2. Materials and methods

2.1. Study area and sampling

Eighty broiler breeder flocks situated in seven provinces of western Algeria (including Mostaganem, Oran, Mascara, Relizane, Chlef, Tiaret, and Tissemsilt) were chosen to carry out this study. A total of 400 healthy broiler breeders collected from 80 different broiler breeder flocks, between February 2017 and March 2018, were analyzed in this study. Healthy broiler breeder samples (five broiler breeders by sample) were randomly taken from different broiler breeder flocks. In general, one broiler breeder flock was sampled at one time point to represent the status of the flock. Samples were transported to the Laboratoire Vétérinaire Régional de Mostaganem, Algeria, and processed immediately for bacterial isolation.

2.2. Bacterial strains

The samples were processed immediately upon arrival using aseptic techniques. Broiler breeders were necropsied in the laboratory and only the ovaries were collected. On each occasion, 5 ovaries originating from the same sample were pooled together in a sterile tube. The organs were examined using a previously described method [12], with slight modifications. Briefly, the organs were flamed using a Bunsen burner and cut into a small dice. One gram of the pooled sample of the ovaries was inoculated with 9 ml of buffered peptone water, vortexed and incubated at 37 °C overnight. To isolate *E. coli*, a drop of broth was streaked on MacConkey agar. *E. coli* isolates were identified using the API 20E System (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

2.3. Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility of the isolates was tested using the disk diffusion method on Muller–Hinton agar following Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines [13]. The isolates were tested

against a panel of fourteen antimicrobials including many critically important antimicrobials for public and veterinary health: nalidixic acid (NA, 30 µg), flumequin (UB, 30 µg), ciprofloxacin (CIP, 5 µg), levofloxacin (LVX, 5 µg), ampicillin (AMP, 10 µg), amoxicillin-clavulanic acid (AMC, 20/10 µg), ceftiofur (XNL, 30 µg), tetracycline (TE, 30 µg), trimethoprim (TMP, 5 µg), sulfonamides (SSS, 300 µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT, 1,25/23,75 µg), neomycin (N, 30 µg), chloramphenicol (C, 30 µg), and colistin (CT, 50 µg) (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Minimum inhibitory concentrations (MICs) against cefotaxime, ceftazidime, aztreonam, cefepime and ceftiofur were determined by the E-test method (AES, AB Biodisk, Solna, Sweden). *E. coli* ATCC® 25922 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) was used as a quality control strain.

2.4. Phenotypic detection of ESBL

Isolates showing a phenotype of resistance (or reduced susceptibility) to ceftiofur were identified as potential ESBL producers. Screening of the isolates to test for ESBL secretion in *E. coli* strains was performed by double disk synergy test (DDST) as previously described [14]. The presence of ESBL was revealed by a champagne cork aspect.

2.5. Characterization of resistance genes

The phenotypically confirmed ESBL-producing isolates were screened using PCR as described previously for *bla*_{CTX-M} genes of groups 1, 2, 8 and 9 [15], *bla*_{SHV} [15], and *bla*_{TEM} [16], after extraction of total DNA by the boiling method. PCR amplicons were confirmed by sequencing and the DNA sequences obtained were compared with those in the GenBank using the BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

3. Results

3.1. Study area and sampling/bacterial strains

In total, the reproductive organs of 37 out of 80 sampled flocks were found colonized by *E. coli* isolates. However, no apparent lesion was observed in the ovaries on post-mortem examination.

3.2. Antimicrobial susceptibility testing

Resistance rates of *E. coli* isolates are displayed in Fig. 1.

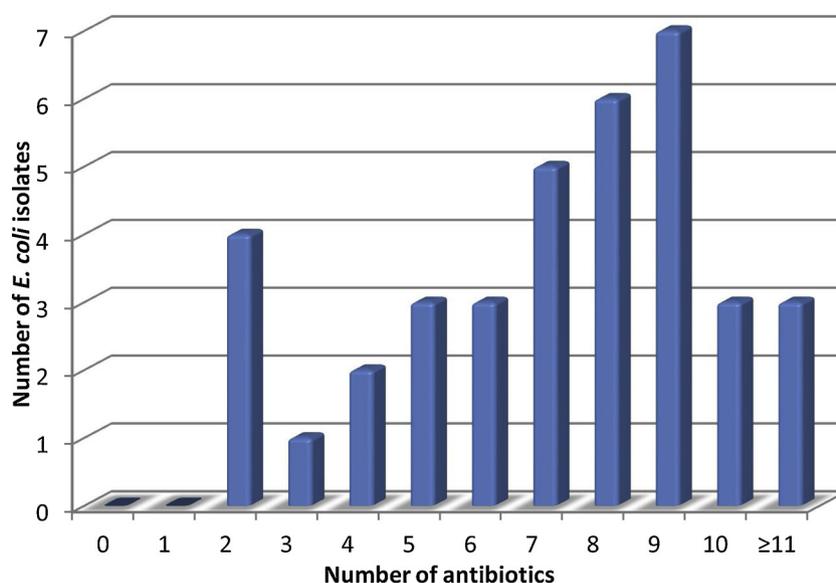


Fig. 2. Multidrug resistant *E. coli* strains isolated from the ovaries of healthy broiler breeders.

Interestingly, the most frequent resistance rates were observed against nalidixic acid 94.5% (n = 35), flumequin 91.8% (n = 34), ciprofloxacin 89.1% (n = 33), levofloxacin 89.1% (n = 33) and tetracycline 81% (n = 30) and the lowest resistance rate was observed against ceftiofur 10.8% (n = 4). All isolates remained susceptible to colistin. Nine *E. coli* isolates (24.3%) showed resistance to chloramphenicol. *E. coli* found resistant to three or more different antimicrobial agents belonging to different classes of antibiotics were considered as multidrug resistant (MDR) isolates. This study showed that 89.18% (n = 33) of *E. coli* isolates were MDR. Most of the *E. coli* isolates were resistant to more than 6 antibiotics as indicated in Fig. 2. Three isolates was found to be resistant to more than 10 antibiotics out of 14 antibiotics tested.

3.3. Phenotypic description of ESBL

Four phenotypically confirmed ESBL-producing *E. coli* were detected in different broiler breeder flocks. All of these isolates were MDR. MICs for cefotaxime, ceftazidime, aztreonam, cefepime and ceftriaxone ranged from 1.5 to > 32 µg/mL, 2–16 µg/mL, 4–12 µg/mL, 1–16 µg/mL and 3 to > 256 µg/mL, respectively (Table 1).

3.4. Characterization of resistance genes

Molecular characterization revealed that three isolates harboured *bla*_{CTX-M-1} gene and one isolate produced *bla*_{SHV-12} gene. In addition, one *bla*_{CTX-M-1}-producing *E. coli* co-harboured the *bla*_{TEM-1} gene.

Table 1

Characteristics of ESBL-producing *E. coli* strains isolated from the ovaries of healthy broiler breeders.

Isolate	Region	Resistance profile	MICs (µg/ml)					Bla genes
			CTX	CAZ	FEP	ATM	CRO	
<i>E. coli</i> [S1]	Tiaret	AMP, XNL, NA, UB, CIP, LVX, TE, SSS.	> 32	2	8	4	64	CTX-M-1, TEM-1
<i>E. coli</i> [S2]	Oran	AMP, XNL, NA, UB, TE, SSS, TMP, SXT.	> 32	3	16	12	> 256	CTX-M-1
<i>E. coli</i> [S3]	Chlef	AMP, XNL, NA, UB, TE, SSS.	> 32	3	12	6	64	CTX-M-1
<i>E. coli</i> [S4]	Tiaret	AMP, XNL, NA, UB, CIP, LVX, TE, SSS, TMP, SXT.	1.5	16	1	8	3	SHV-12

MIC, minimum inhibitory concentration ; AMP, ampicillin ; XNL, ceftiofur ; CTX, cefotaxime ; CAZ, ceftazidime ; FEP : cefepime ; ATM, aztreonam ; CRO, ceftriaxone ; NA, nalidixic acid ; UB, flumequin ; CIP, ciprofloxacin ; LVX, levofloxacin ; TE, tetracycline ; SSS, sulfonamides ; TMP, trimethoprim ; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole.

4. Discussion

4.1. *E. coli* strains isolated from the ovaries show resistance against many first line antimicrobial agents

The epidemiology of AMR *E. coli* is both evolving and complex, and the potential role of breeding birds as a possible reservoir of AMR *E. coli* is currently being analyzed from different perspectives [7,8,17]. The results of the present study demonstrated the ability of AMR *E. coli* isolates to colonize the ovaries of healthy broiler breeders. In the recent last years, several findings highlighted the presence of AMR *E. coli* at all levels of broiler production pyramid also in several countries with a low antimicrobial usage profile, suggesting vertical transmission of AMR *E. coli* from broiler breeders to their offspring [7–9,18]. However, there is little published literature on the colonization of the reproductive organs by *E. coli*. The low antimicrobial use in several countries indicates that factors other than selective pressure must have impact on the success of the resistant bacteria.

Antibiotic susceptibility testing was performed for all *E. coli* isolates with 14 antibiotics including many that are frequently used in human and veterinary medicine. The high resistance rates to the first-line antimicrobial agents tested in *E. coli* from broiler breeders were troubling given their important use in poultry. Compared to our study, nalidixic acid-resistant *E. coli* have been detected in Swedish broiler population and also in imported breeding birds, despite the lack of a known selective pressure [7]. Cephalosporins-resistant *E. coli* have been detected in broiler production chain in the Netherland and Norway [8,9]. Most recently, the clonal spread of cephalosporins- and quinolones-resistant *E. coli* has been reported in the broiler production in the three Nordic

countries; Sweden, Norway and Iceland [17]. Resistance to chloramphenicol was also observed in our study. This drug is not approved for use in food animals in Algeria. It is approved only for human clinical use. Persistence of chloramphenicol resistance in *E. coli* has also been observed previously [19,20], and this could be explained by co-selection of mobile resistance elements for the chloramphenicol-resistance [21].

4.2. *E. coli* isolates exhibit resistance to multiple antibiotics

To our knowledge, very few studies have been conducted to investigate coresistance in AMR *E. coli* isolates from broiler breeders. Among them, one study on third generation cephalosporin-resistant *E. coli* reported coresistance with tetracyclines, sulfamethoxazole, trimethoprim, gentamycin and streptomycin with very low rates [8]. The presence of ampicillin- and nalidixic acid-resistant *E. coli* have also been detected in faecal samples in all the flocks sampled from the broiler production pyramid in South Africa, despite the absence of antibiotics usage [18]. However, in that study, resistance to ciprofloxacin was detected at a very low frequency and resistance towards ceftiofur was not recorded. This multidrug resistance could be explained by the presence of mobile genetic elements contributing to co-resistance, co-expression, and co-selection [22].

4.3. Extended spectrum beta-lactamase genes

In Algeria, the occurrence of *bla*_{ESBL}-producing *E. coli* has been increasingly reported for broilers over the past few years [23,24]. However, the genetic background for cephalosporins resistance in *E. coli* from poultry in Algeria has not been extensively investigated. CTX-M-1, SHV-12 and TEM-1 have been detected in *E. coli* strains isolated from slaughtered broiler intestines [23], and CTX-M-1- and CTX-M-15-producing *E. coli* have been reported in samples of poultry origin in Algerian central regions [24]. The results of this study are in a good agreement with the study conducted in the Netherlands which showed the presence of *bla*_{CTX-M-1}-producing *E. coli* in commercial hatchery, in one day old parent broilers that had not been treated with antimicrobial before [9]. Furthermore, treatment with third-generation cephalosporin has also been reported as an important risk factor for occurrence and persistence of cephalosporin-resistant *E. coli* in one-day-old chicks [25]. All the previously cited investigations reported the presence of AMR *E. coli* in the gastrointestinal tract of birds or their environment. There is very little published data regarding the presence of AMR *E. coli* in the reproductive organs of broiler breeders. Recently, ESBLs-producing *E. coli* have been detected in the reproductive tract of broiler breeding roosters [26]. More recently, Benameur et al. (2018) described the first isolation of *E. coli* carrying *bla*_{CTX-M-1} gene in a pooled ovaries sample of a diseased broiler breeder flock [27].

Our finding showed that broiler breeders may be a reservoir for these isolates and they could play an important role in the transmission and dissemination of AMR *E. coli* within broiler production pyramid. Vertical transmission can be the result of infection of the ovaries of a laying hen via systemic infection, or also from an ascending infection from the contaminated cloaca to the vagina and lower regions of the oviduct [28,29]. These could lead to contamination of the yolk, albumen, eggshell membranes or eggshells before oviposition. Thus, 3GC-resistant *E. coli* may be introduced in the hatchery facilities, either from true vertical transmission when parental poultry stocks are contaminated or from very early contamination in the hatchery itself. Dissemination and persistence of AMR *E. coli* might also be contributed by other possible contamination events. i.e; horizontal transmission in breeder and broiler farms and hatcheries [9], national transport and transfer of similar chickens and also through international trade to many different countries around the world [7]. Genes encoding cephalosporins resistance from broilers are commonly located on self-transmissible plasmids [30,31]. These plasmids may be promiscuous

and are able to disseminate into a broad range of hosts. The global spread of MDR *E. coli* in broiler production pyramid is a real concern in human and veterinary medicine and the transferability of AMR *E. coli* or mobile resistance determinants from chickens to humans has been indicated in several studies [32,33].

In conclusion, this study demonstrated the contamination of the ovaries of healthy broiler breeders by MDR *E. coli*. It is therefore worrying that MDR *E. coli* isolates are already present in the reproductive organs of healthy broiler breeder chickens. Contamination of the ovaries with MDR *E. coli* could lead to contamination of hatching eggs and could be an important factor in the dissemination of MDR *E. coli* in the poultry industry. Therefore, implementation of new and improve existing prevention strategies in broiler production system are becoming mandatory.

Funding

None declared.

Ethical approval

Not required.

Acknowledgements

We are appreciative of the staff of the veterinary practitioners for providing sampling. A special thanks to Dr. Ben-Mahdi Tarek, the ex-Director of the Laboratoire Vétérinaire Régional de Mostaganem, Algeria, dr. Benbernou senia, dr. Sebai ali, and Ms Benkhamkham Naziha for their skilled assistance in the laboratory work.

References

- [1] A.M. Hammerum, O.E. Heuer, Human health hazards from antimicrobial-resistant *Escherichia coli* of animal origin, *Clin. Infect. Dis.* 48 (2009) 916–921.
- [2] T. Radimersky, P. Frolkova, D. Janoszowska, M. Dolejska, P. Svec, E. Roubalova, P. Cikova, A. Cizek, I. Literak, Antibiotic resistance in faecal bacteria (*Escherichia coli*, *Enterococcus* spp.) in feral pigeons, *J. Appl. Microbiol.* 109 (2010) 1687–1695.
- [3] D.J. Mevius, M.G.J. Koene, B. Wit, W. van Pelt, N. Bont, MARAN-2008-Monitoring Of Antimicrobial Resistance and Antibiotic Usage in Animals in the Netherlands in 2008, Central Veterinary Institute of Wageningen UK, Lelystad, 2010.
- [4] R. Canton, T.M. Coque, The CTX-M β -lactamase pandemic, *Curr. Opin. Biotechnol.* 9 (2006) 466–475.
- [5] D. Persoons, J. Dewulf, A. Smet, L. Herman, M. Heyndrickx, A. Martel, Catry B, P. Butaye, F. Haesebrouck, Antimicrobial use in Belgian broiler production, *Prev. Vet. Med.* 105 (2012) 320–325.
- [6] A.A. Sheikh, S. Checkley, B. Avery, G. Chalmers, V. Bohaychuk, P. Boer-lin, R. Reid-Smith, M. Aslam, Antimicrobial resistance and resistance genes in *Escherichia coli* isolated from retail meat purchased in Alberta, Canada, *Foodborne Pathog. Dis.* 9 (2012) 625–631.
- [7] S. Börjesson, T. Guillard, A. Landen, B. Bengtsson, O. Nilsson, Introduction of quinolone resistant *Escherichia coli* to Swedish broiler population by imported breeding animals, *Vet. Microbiol.* 194 (2015) 74–78.
- [8] S.S. Mo, M. Norström, J.S. Slettemeås, A. Lövland, A.M. Urdahl, M. Sunde, Emergence of AmpC-producing *Escherichia coli* in the broiler production chain in a country with a low antimicrobial usage profile, *Vet. Microbiol.* 171 (2014) 315–320.
- [9] C.M. Dierikx, J.A. van der Goot, H.E. Smith, A. Kant, D.J. Mevius, Presence of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in the broiler production pyramid: a descriptive study, *PLoS One* 8 (2013) e79005.
- [10] M. Yossapol, M. Sugiyama, T. Asai, The occurrence of CTX-M-25-producing Enterobacteriaceae in day-old broiler chicks in Japan, *J. Vet. Med. Sci.* 79 (2017) 1644–1647.
- [11] G.A. Elmowalid, A.A.M. Ahmad, M.N. Hassan, N.K. Abd El-Aziz, A.M. Abd-Elwahab, S.I. Elwan, Molecular detection of new SHV- β -lactamase variants in clinical *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Egypt, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.09.013>.
- [12] V. Livrelli, R. Bonnet, B. Joly, Darfeuille-michaud, *Escherichia coli* et autres *Escherichia, shigella*, in: J. Freney, R. François, R. Leclercq, P. Riegek (Eds.), *Précis De Bactériologie Clinique*, Editions ESKA, 2007, pp. 989–1004.
- [13] Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twenty-fifth Informational Supplement Document M100-S22, 26th ed, CLSI, Wayne, PA, 2016.
- [14] V. Jarlier, M.H. Nicolas, G. Fournier, A. Philippon, Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in

- Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns, *Rev. Infect. Dis.* 10 (1988) 867–878.
- [15] G. Arlet, M. Rouveau, A. Philippon, Substitution of alanine for aspartate at position 179 in the SHV-6 extended-spectrum beta-lactamase, *FEMS Microbiol. Lett.* 152 (1997) 163–167.
- [16] C. Mabilat, S. Goussard, PCR detection and identification of genes for extended-spectrum β -lactamases, in: D.H. Persing, T.H. Smith, F.C. Tenover, T.J. White (Eds.), *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*, American Society for Microbiology, Washington DC, 1993.
- [17] M. Myrenäs, J.S. Slettemeås, T.R. Thorsteinsdóttir, B. Bengtsson, S. Börjesson, O. Nilsson, A. Landén, M. Sunde, Clonal spread of *Escherichia coli* resistant to cephalosporins and quinolones in the Nordic broiler production, *Vet. Microbiol.* 213 (2018) 123–128.
- [18] V. Bortolaia, M. Bisgaard, A.M. Bojesen, Distribution and possible transmission of ampicillin- and nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* within the broiler industry, *Vet. Microbiol.* 142 (2010) 379–386.
- [19] K.M. Bischoff, D.G. White, M.E. Hume, T.L. Poole, D.J. Nisbet, The chloramphenicol resistance gene *cmlA* is disseminated on transferable plasmids that confer multiple-drug resistance in swine *Escherichia coli*, *FEMS Microbiol. Lett.* 243 (2004) 285–291.
- [20] Q. Benameur, H. Tali-Maamar, F. Assaous, B. Guettou, M. Boutaiba Benklaouz, K. Rahal, M.H. Ben-Mahdi, Characterization of quinolone-resistant Enterobacteriaceae strains isolated from poultry in Western Algeria: first report of *qnrS* in an *Enterobacter cloacae*, *Vet. World* 11 (2018) 469–473.
- [21] K. Harada, T. Asai, A. Kojima, K. Ishihara, T. Takahashi, Role of coresistance in the development of resistance to chloramphenicol in *Escherichia coli* isolated from sick cattle and pigs, *Am. J. Vet. Res.* 67 (2006) 230–235.
- [22] N. Woodford, J.F. Turton, D.M. Livermore, Multiresistant gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance, *FEMS Microbiol. Rev.* 5 (2011) 35 736e755.
- [23] M. Belmahdi, S. Bakour, C. Al Bayssari, A. Touati, J.M. Rolain, Molecular characterisation of extended-spectrum β -lactamase- and plasmid AmpC-producing *Escherichia coli* strains isolated from broilers in Béjaïa, Algeria, *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 6 (2016) 108–112.
- [24] N. Meguenni, L. Le Devendec, E. Jouy, M. Le Corvec, S. Bounar-Kechih, R. Bakour, I. Kempf, First description of an extended-spectrum cephalosporin- and fluoroquinolone-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* clone in Algeria, *Avian Dis.* 59 (2015) 20–23.
- [25] S. Baron, E. Jouly, F. Touzain, S. Bougeard, E. Larvor, C. de Boisseson, M. Amelot, A. Keita, I. Kempf, Impact of the administration of a third-generation cephalosporin (3GC) to one-day-old chicks on the persistence of 3GC-resistant *Escherichia coli* in intestinal flora: an in vivo experiment, *Vet. Microbiol.* 185 (2016) 29–33.
- [26] H. Mezhoud, F. Boyen, L.H. Touazi, A. Garmyn, N. Moula, A. Smet, F. Haesbrouck, A. Martel, M. Iguer-Ouada, A. Touati, Extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* in broiler breeding roosters: Presence in the reproductive tract and effect on sperm motility, *Anim. Reprod. Sci.* 159 (2015) 205–211, <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.06.021>.
- [27] Q. Benameur, H. Tali-Maamar, F. Assaous, B. Guettou, N. Tahrat, N. Aggoune, K. Rahal, M.H. Ben-Mahdi, Isolation of *Escherichia coli* carrying the *bla*_{CTX-M-1} and *qnrS1* genes from reproductive organs of broiler breeders and internal contents of hatching eggs, *J. Vet. Med. Sci.* 80 (2018) 1540–1543.
- [28] L.H. Keller, C.E. Benson, K. Krotec, R.J. Eckroade, *Salmonella* Enteritidis colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens, *Infect. Immun.* 63 (1995) 2443–2449.
- [29] T. Miyamoto, E. Baba, T. Tanaka, K. Sasai, T. Fukata, A. Arakawa, *Salmonella* Enteritidis contamination of eggs from hens inoculated by vaginal, cloacal and intravenous routes, *Avian Dis.* 41 (1997) 296–303.
- [30] Y. Agerso, J.D. Jensen, H. Hasman, K. Pedersen, Spread of extended spectrum cephalosporinase-producing *Escherichia coli* clones and plasmids from parent animals to broilers and to broiler meat in a production without use of cephalosporins, *Foodborne Pathog. Dis.* 11 (2014) 740–746.
- [31] S.S. Mo, J.S. Slettemeas, E.S. Berg, M. Norstrom, M. Sunde, Plasmid and host strain characteristics of *Escherichia coli* resistant to extended-spectrum cephalosporins in the Norwegian broiler production, *PLoS One* 11 (2016) e0154019.
- [32] A. Agabou, N. Lezzar, Z. Ouchenane, S. Khemissi, D. Satta, A. Sotto, J.P. Lavigne, A. Pantel, Clonal relationship between human and avian ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* isolates in North-Eastern Algeria, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 35 (2015) 227–234.
- [33] J.R. Johnson, M.A. Kuskowski, M. Menard, A. Gajewski, M. Xercavins, J. Garau, Similarity between human and chicken *Escherichia coli* isolates in relation to ciprofloxacin resistance status, *J. Infect. Dis.* 194 (2006) 71–78.

*Etude IV : Activité antibactérienne des huiles
essentielles de *Cladanthus arabicus* et de *Bubonium
imbricatum* seules et en combinaison avec des
antibiotiques conventionnels vis-à-vis des souches
d'entérobactéries multi-résistantes aux antibiotiques*

Etude IV : Activité antibactérienne des huiles essentielles de *Cladanthus arabicus* et de *Bubonium imbricatum* seules et en combinaison avec des antibiotiques conventionnels vis-à-vis des souches d'entérobactéries multi-résistantes aux antibiotiques

1. Introduction

La fréquence de la résistance aux antibiotiques de première intention a augmenté dans le monde entier en médecine humaine et vétérinaire au cours de ces dernières décennies (Paterson, 2006 ; Prestinaci et al., 2015), et elle atteint maintenant des proportions alarmantes dans toutes les régions du monde. L'augmentation de la résistance aux antibiotiques de première ligne rend plus difficile le choix empirique des traitements (Cantón et al., 2012a) et le développement de nouveaux agents antimicrobiens devient plus qu'urgent.

Les huiles essentielles (HE) extraites des plantes aromatiques constituent une source potentielle de molécules naturelles bioactives. Le potentiel antimicrobien alternatif des HE a fait l'objet de nombreuses investigations aussi bien dans le traitement des maladies infectieuses, que dans l'industrie agroalimentaire.

Cladanthus arabicus (*C. arabicus*) et *Bubonium imbricatum* (*B. imbricatum*) appartiennent à une famille endémique de la région méditerranéenne, les Asteraceae. Les propriétés antimicrobiennes de ces plantes, sélectionnées suite à des études ethnobotaniques, n'ont été explorées que très partiellement (Aghraz et al., 2016; Aghraz et al., 2017).

Par conséquent, cette étude a eu pour objectif l'évaluation de l'activité antibactérienne des HE de *C. arabicus* et de *B. imbricatum* vis-à-vis des souches d'entérobactéries multi-résistantes aux antibiotiques mais aussi et surtout d'une possible action synergique entre ces deux HE et des antibiotiques conventionnels.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Matériel végétal et procédure d'extraction

Les parties aériennes de *C. arabicus* (Figure 13) et de *B. imbricatum* (Figure 14) ont été récoltées dans les régions de Marrakech et d'Essaouira, respectivement, durant leur période de floraison en Avril 2016. L'identification taxonomique a été réalisée selon la procédure décrite par Fennane et Ibn Tattou. (2012). Les parties aériennes ont été séchées à l'ombre et à température ambiante pendant 2 semaines puis stockées dans des sacs en papier scellés. Les

HE ont été extraites par hydro-distillation pendant 3h (*C. arabicus*) et 4h (*B. imbricatum*) en utilisant un appareil de type Clevenger et stockées dans des flacons en verre ambré à 4°C jusqu'à l'analyse. L'étape de l'extraction a été faite dans le Laboratoire de Biotechnologie, Valorisation et Protection des Plantes du département de biologie de l'Université de Marrakech au Maroc.



Figure 13 : Partie aérienne de *Cladanthus arabicus*



Figure 14 : Partie aérienne de *Bubonium imbricatum*

2.2. Souches bactériennes et l'étude de la sensibilité aux antibiotiques

Sept souches d'entérobactéries d'origine aviaire, isolées dans le Laboratoire Vétérinaire Régional de Mostaganem ont été sélectionnées pour cette l'étude. Les protocoles d'isolement, d'identification et de l'antibiogramme sont les mêmes que ceux décrits dans l'étude I.

Les antibiotiques suivants ont été testés au cours de cette étude: acide nalidixique (NA, 30 µg), ciprofloxacine (CIP, 5 µg), lévofloxacine (LEV, 5 µg), amoxicilline (AML, 25 µg), amoxicilline/acide clavulanique (AMC, 20/10 µg), céfotaxime (CTX, 30 µg), tétracycline

(TE, 30 µg), sulfonamides (SSS, 300 µg), triméthoprimine (TMP, 5 µg), triméthoprimine/sulfaméthoxazole (SXT, 1,25 / 23,75 µg), néomycine (N, 30 µg) et chloramphénicol (C, 30 µg).

2.3. Détermination de l'activité antibactérienne des deux HE par la méthode de diffusion sur gélose

L'activité antibactérienne des deux l'HE vis-à-vis des souches sélectionnées a été évaluée par la technique de diffusion sur gélose décrite par Bauer et al. (1966). Des disques vierges stériles (de 6 mm de diamètre, Thermo Fisher, Italie) contenant 10 µl de l'HE ont été placés sur la surface des boîtes préalablement inoculées par la suspension bactérienne. Les boîtes ont été incubées pendant 24h à 37°C et les diamètres des zones d'inhibitions ont été mesurés en millimètres. Un disque imprégné d'eau distillée stérile a été utilisé comme témoin négatif et un disque d'antibiotique (CTX) a été utilisé comme témoin positif. Chaque essai est répété trois fois.

La synergie entre les antibiotiques conventionnels et les deux HE a été étudiée en premier lieu par la méthode décrite par Jarlier et al. (1988) avec de légères modifications. Brièvement, les antibiotiques ont été placés à côté des disques des HE à des distances variables, calculées selon les diamètres des zones d'inhibition des HE et des antibiotiques. La présence d'une image de synergie entre l'HE et l'antibiotique a été interprétée comme une interaction positive. Les antibiotiques présentant des images de synergie avec les HE ont été sélectionnés pour une étude ultérieure par la méthode Checkerboard.

2.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des deux HE et des antibiotiques conventionnels

La CMI a été déterminée en utilisant une méthode de dilution en série sur microplaque selon les recommandations du National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2003). Le bouillon Muller Hinton (BMH, Oxoid) a été utilisé pour dissoudre les HE et la plus forte concentration était de 12,8 mg ml⁻¹. Il a également été utilisé pour dissoudre les antibiotiques et les concentrations les plus élevées pour l'amoxicilline et la néomycine étaient de 256 µg ml⁻¹ et 128 µg ml⁻¹, respectivement. Brièvement, des dilutions doubles en série des HE ou des antibiotiques dans un BMH ont été préparées dans une microplaque à 96 puits. 100 µl d'une culture en croissance active de la souche testée ont été ajoutés à chacune des

dilutions, la microplaque a été ensuite incubée 24h à 37°C. La CMI a été définie comme la concentration la plus faible requise pour arrêter la croissance des bactéries au bout de 24h d'incubation. Un témoin positif, contenant du BMH et une culture bactérienne, et un témoin négatif ne contenant aucune bactérie ont été inclus dans chaque expérience. La densité optique de la suspension a été mesurée en utilisant un lecteur de microplaques à 630 nm (Fluostar Omega, BMG Labtech, Italie). Chaque essai est répété trois fois.

2.5. Test de synergie entre les HE et les antibiotiques conventionnels

L'étude de l'activité antibactérienne des deux HE en combinaison avec des antibiotiques conventionnels a été réalisée sur les souches d'entérobactéries multi-résistantes aux antibiotiques. Le test a été effectué par la méthode Checkerboard décrite par Noumedem et al. (2013). Les dilutions testées étaient basées sur la CMI des deux agents antimicrobiens qui sont mélangés de sorte que les puits de la microplaque puissent contenir diverses combinaisons de concentration des deux composés. Pour se faire, des dilutions en demi variant de la CMI à la CMI/32 et de la CMI à la CMI/128 ont été effectuées pour les HE et les antibiotiques, respectivement. 50 µl de la première gamme de dilution (HE) ont été ajoutées dans une orientation verticale et 50 µl de la seconde gamme de dilution (antibiotique) ont été ajoutées dans une orientation horizontale. Enfin, 100 µl de suspension bactérienne fraîche (10^6 CFU/ml) ont été ajoutées à chaque puits, la microplaque a été ensuite incubée 24h à 37°C. Les CMI obtenues en association des deux agents antibactériens ont été utilisées pour calculer l'indice de concentration inhibitrice fractionnaire (FICI) selon la formule suivante:

$FICI = \Sigma FIC = FIC (A) + FIC (B)$ où $FIC (A) = CMI \text{ de l'antibiotique en combinaison} / CMI \text{ de l'antibiotique seul}$ et $FIC (B) = CMI \text{ de l'HE en combinaison} / CMI \text{ de l'HE seule}$. L'interprétation des valeurs FICI a été définie comme: $FICI \leq 0,5 = \text{synergie}$, $0,5 < FICI \leq 0,75 = \text{additif}$, $0,75 < FICI \leq 2 = \text{indifférent}$, $FICI > 2 = \text{antagonisme}$ (Mulyaningsih et al., 2010). Chaque essai est répété trois fois.

2.6. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée via le logiciel XLSTAT 2019. Le test de l'ANOVA suivi par le test de Tukey ont permis de déterminer la significativité de la variance des moyennes des CMI des deux HE testées. La différence des moyennes a été considérée comme significative lorsque p est inférieur à 0,05.

3. Résultats et Discussion

3.1. Identification des souches bactériennes

Les souches d'entérobactéries sélectionnées pour cette étude sont : *E. coli* (n = 2), *K. pneumoniae* (n = 1), *E. cloacae* (n = 1), *P. mirabilis* (n = 1) et *Salmonella* sp. (n = 1). La souche de référence *E. coli* ATCC 25922 a été aussi incluse dans cette étude.

3.2. Sensibilité aux antibiotiques

Les résultats de l'antibiogramme ont révélé que tous les six souches d'entérobactéries étaient multi-résistantes aux antibiotiques. Le profil de résistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries est présenté dans le tableau 5. Tous les isolats étaient résistants à l'amoxicilline et à la néomycine et la majorité d'entre eux étaient résistants à l'acide nalidixique, à la ciprofloxacine et à la lévofloxacine.

Tableau 5: Profil de résistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries sélectionnées

Souche testée	Profil de résistance aux antibiotiques
<i>E. coli</i> (S33/16)	NA, CIP, LEV, AML, AMC, SXT, TE, C, N
<i>E. cloacae</i> (S54b/16)	AML, AMC, TE, N
<i>Salmonella</i> sp. (S12/14)	NA, CIP, LEV, AML, N
<i>K. pneumoniae</i> (S12b/16)	AML, SXT, TE, C, N
<i>E. coli</i> (S34/16)	NA, CIP, LEV, AML, N
<i>P. mirabilis</i> (S32/16)	NA, CIP, LEV, AML, TE, SXT, N

Au cours des dernières années, plusieurs études ont révélé des taux élevés de multi-résistance chez les entérobactéries d'origine aviaire en Algérie (Benameur et al., 2014 ; Benameur et al., 2016 ; Hamoudi et Aggad, 2008). Nos résultats confirment encore une fois les multi-résistances qui prévalent en Algérie. Ce qui n'est pas surprenant compte tenu de l'utilisation toujours croissante et inappropriée des différentes classes d'antibiotiques dans les élevages avicoles.

3.3. Activité antibactérienne des HE de *C. arabicus* et *B. imbricatum*

L'activité antibactérienne des HE de *C. arabicus* et de *B. imbricatum* a été évaluée vis-à-vis de sept souches d'entérobactéries, dont six sont multi-résistantes aux antibiotiques (*E. coli*

S33/16, *E. coli* S34/16, *E. cloacae* S5/16, *K. pneumoniae* S12/16, *P. mirabilis* S32/16 et *Salmonella* sp. S12/14). Les résultats du criblage préliminaire de l'activité antibactérienne des deux HE par la méthode de diffusion sur gélose vis-à-vis de sept souches d'entérobactéries et leurs interactions avec des antibiotiques conventionnels sont résumés dans le tableau 6. Les résultats présentés correspondent à la moyenne des trois essais effectués sur chaque souche \pm l'écart type.

Tableau 6 : Diamètres des zones d'inhibition des HE testées et leurs effets synergiques avec des antibiotiques conventionnels

Souche testée	HE	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	Effet synergique	
			amoxicilline	néomycine
<i>E. coli</i> (S33/16)	CA	8,28 \pm 0.14	N	N
	BI	8,06 \pm 0.2	N	N
<i>E. cloacae</i> (S5/16)	CA	8,5 \pm 0.3	P	N
	BI	9,6 \pm 0.2	P	N
<i>Salmonella</i> sp. (S12/14)	CA	10,12 \pm 0.2	P	N
	BI	13,1 \pm 0.11	P	N
<i>K. pneumoniae</i> (S12/16)	CA	10,4 \pm 0.2	N	N
	BI	10,45 \pm 0.14	N	P
<i>E. coli</i> (S34/16)	CA	10,35 \pm 0.32	N	N
	BI	9,14 \pm 0.15	N	P
<i>Proteus mirabilis</i> (S32/16)	CA	8,25 \pm 0.12	P	N
	BI	8,17 \pm 0.3	P	P
<i>E. coli</i> ATCC 25922	CA	8,23 \pm 0.09	P	N
	BI	8,05 \pm 0.1	P	P

CA: *Cladanthus arabicus*; BI: *Bubonium imbricatum*; P: positif, N: négatif.

Les résultats de cette étude ont montré que les HE de *C. arabicus* et *B. imbricatum* ont une activité antibactérienne vis-à-vis de toutes les souches d'entérobactéries testées avec des diamètres des zones d'inhibition variant entre 8,05 \pm 0,1 et 13,1 \pm 0,11 mm. Ces résultats sont cohérents avec ceux rapportés dans les études antérieures sur l'activité antibactérienne de ces deux HE (Aghraz et al., 2016; Aghraz et al., 2017). La méthode de diffusion sur gélose a permis non seulement la détermination des diamètres des zones d'inhibition mais aussi l'évaluation des effets synergiques entre les deux HE et les antibiotiques conventionnels.

L'HE de *B. imbricatum* a montré un effet synergique avec l'amoxicilline et la néomycine, tandis que celui de *C. arabicus* a montré un effet synergique uniquement avec l'amoxicilline. Les valeurs des CMI obtenues pour les deux HE vis-à-vis de sept souches d'entérobactéries testées sont indiquées dans le tableau 7.

Tableau 7 : Valeurs des CMI obtenues pour les HE de *C. arabicus* et *B. imbricatum*

Souche testée	CMI des HE (mg/ml)	
	<i>C. arabicus</i>	<i>B. imbricatum</i>
<i>E. coli</i> (S33/16)	0.2	1.6
<i>E. cloacae</i> (S5/16)	0.4	0.8
<i>Salmonella</i> sp. (S12/14)	0.8	0.4
<i>K. pneumoniae</i> (S12b/16)	0.8	0.8
<i>E. coli</i> (S34/16)	0.8	0.8
<i>P. mirabilis</i> (S32/16)	0.8	1.6
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.4	0.8

Les valeurs des CMI de l'HE de *C. arabicus* allaient de 0,2 mg ml⁻¹ à 0,8 mg ml⁻¹ et celles de l'HE de *B. imbricatum* de 0,4 mg ml⁻¹ à 1,6 mg ml⁻¹. Les deux HE ont présenté une activité antibactérienne contre toutes les souches étudiées. Cependant, l'activité antibactérienne de l'HE de *C. arabicus* était significativement meilleure que celle de l'HE de *B. imbricatum* (p<0,0001). La sensibilité des souches d'entérobactéries aux HE testées variait en fonction de l'espèce bactérienne. *E. coli* (S33/16) était la souche la plus sensible à l'HE de *C. arabicus* (p<0,0001) et *Salmonella* sp. (S12/14) était la souche la plus sensible à l'HE de *B. imbricatum* (p<0,0001). Ces résultats sont en accord avec ceux des études antérieures qui ont révélé que ces deux HE avaient une activité antimicrobienne vis-à-vis de trois bactéries à Gram- (*E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785 et *K. pneumoniae*) et trois bactéries à Gram+ (*Micrococcus luteus* ATCC 10240, *Staphylococcus aureus* CCMM B3 et *Bacillus cereus* ATCC 14579) (Aghraz et al., 2016, Aghraz et al., 2017).

L'activité antibactérienne des HE pourrait être associée à leurs composés majoritaires, avec la présence de proportions plus élevées de monoterpènes oxygénés (61,4%), en particulier l'acétate de cis-chrysanthényle (31,4%) et l'isobutyrate de thymol (3,4%) dans l'HE de *B. imbricatum* (Aghraz et al., 2016) et dans l'HE de *C. arabicus* par une forte teneur en hydrocarbures monoterpènes (75,8%) tels que le sabinène (31,1%), le β -pinène (16,7%), le

myrcène (12,3%) et l' α -pinène (5,3%) (Aghraz et al., 2017). En effet, il a été rapporté que les HE avec des quantités plus élevées d'hydrocarbures monoterpènes, comme l' α -pinène et le β -pinène, ont de bonnes propriétés antibactériennes (Chikhouné et al., 2013 ; Cosentino et al., 1999 ; Elaïssi et al., 2012,). Le mécanisme d'action déterminé pour les principaux composés des HE de *C. arabicus* et *B. imbricatum*, tels que le p-cymène, le γ -terpinène et l'isobutyrate de thymol, est la rupture membranaire (Di Pasqua et al., 2007; Di Pasqua et al., 2010 ; Oyedemi et al., 2009). En outre, la majorité des HE endommagent les bactéries en altérant leur membrane et entraînant ainsi la mort cellulaire, où en conduisant une perméabilité de leur membrane, entraînant la perte d'ions et d'ATP, l'effondrement des pompes à protons et finalement la libération de macromolécules en provoquant la lyse (Bakkali et al., 2008; Turgis et al., 2012). De plus, l'activité antibactérienne pourrait également résulter de l'effet synergique entre divers composés, comme rapporté précédemment (Balje et al., 2015 ; Stefanović et al., 2012). Néanmoins, d'autres composants même minoritaires présents dans l'HE pourraient aussi avoir un effet sur cette activité.

3.4. Effet synergique entre les HE et les antibiotiques

Les résultats de l'effet antibactérien des HE combinés avec des antibiotiques conventionnels vis-à-vis de sept souches d'entérobactéries sont présentés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Valeurs des FICI des HE en combinaison avec l'amoxicilline et la néomycine vis-à-vis des isolats d'entérobactéries

	<i>E. cloacae</i> (S5/16)	<i>Salmonella</i> sp. (S12/14)	<i>P. mirabilis</i> (S32/16)	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>K. pneumoniae</i> (S12b/16)	<i>E. coli</i> (S34/16)
AML/ CA	0,58 ^b	0.27 ^a	0.03 ^a	1,16 ^c	ND	ND
AML/BI	0.13 ^a	0.29 ^a	0.13 ^a	0.13 ^a	ND	ND
N/BI	ND	ND	0.13 ^a	0.26 ^a	0.52 ^b	0,52 ^b

^a: synergie, ^b: additif, ^c: pas d'effet, ND: Non Déterminé

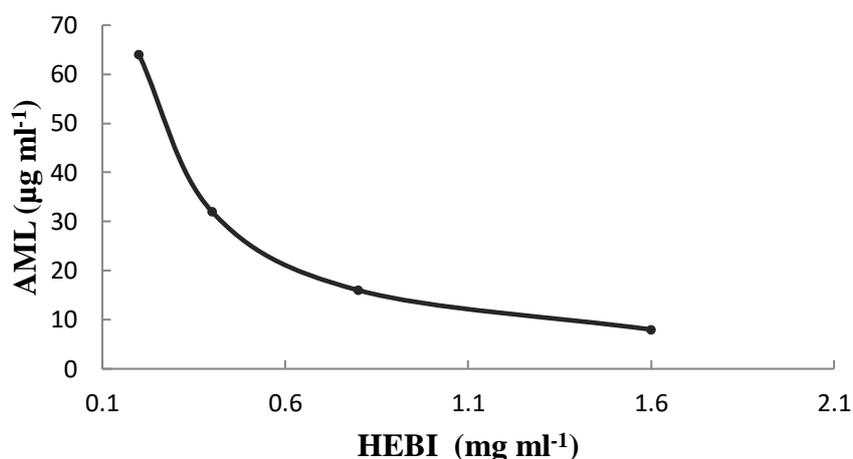
L'indice FIC a été calculé pour déterminer l'interaction des deux HE en combinaison avec l'amoxicilline et la néomycine. Les gains exprimés par la CMI de l'amoxicilline et de la néomycine en présence de l'HE de *B. imbricatum* et celui de *C. arabicus* sont résumés au tableau 9. L'HE de *B. imbricatum* a montré un effet synergique en association avec l'amoxicilline vis-à-vis de toutes les souches d'entérobactéries testées ($FICI \leq 0,5$) et elle a

également révélé une synergie en association avec la néomycine vis-à-vis de *P. mirabilis* et *E. coli* ATCC 25922. Cependant, l'HE de *C. arabicus* a montré un effet synergique avec l'amoxicilline vis-à-vis de *Salmonella* sp. et *P. mirabilis* et un effet additif vis-à-vis d'*E. cloacae* (S5/16). Les HE, comme certains mélanges à plusieurs composants, peuvent agir à différents niveaux contrairement à de nombreux antibiotiques conventionnels qui sont des composés purs et qui n'ont souvent qu'une seule cible (Yap et al., 2014). De plus, plusieurs études ont montré que l'activité antibactérienne des HE ou des combinaisons de composés sont plus efficaces que des constituants isolés (Junio et al., 2011 ; Wang et al., 2014). En effet, les associations d'HE, testées dans cette étude, avec des antibiotiques ont montré des résultats significatifs avec une augmentation de l'activité des antibiotiques. L'association de l'amoxicilline et de l'HE de *B. imbricatum* (CMI) a permis de doubler l'activité de 4 fois dans le cas de *Salmonella* sp. et de 8 fois dans le cas de *P. mirabilis* (Figure 15). La néomycine a également montré un effet synergique en combinaison avec l'HE de *B. imbricatum* et le gain obtenu a été multiplié par un facteur de 8 dans le cas de *P. mirabilis* (S32/16) et par un facteur de 4 dans le cas d'*E. coli* ATCC 25922. L'activité antibactérienne de l'amoxicilline a également été examinée en association avec l'HE de *C. arabicus*. Le gain le plus élevé a été obtenu vis-à-vis de *P. mirabilis* avec un facteur de 32 fois en utilisant de l'HE à la CMI (Figure 16).

Tableau 9: Gains des CMI obtenus pour l'amoxicilline et la néomycine en synergie avec les HE

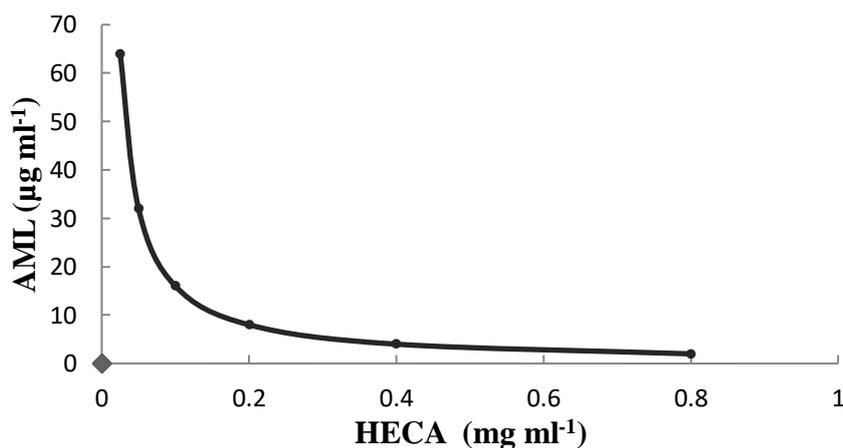
Souche testée	<i>C. arabicus</i>			<i>B. imbricatum</i>			<i>B. imbricatum</i>		
	AML	AML+	Gain	N	N+	Gain	AML	AML+	Gain
<i>E. cloacae</i> (S5/16)	64	32	2	ND	ND	ND	64	8	8
<i>Salmonella</i> sp. (S12/14)	64	16	4	ND	ND	ND	64	16	4
<i>E. coli</i> ATCC 25922	64	64	1	32	8	4	64	8	8
<i>P. mirabilis</i> (S32/16)	64	2	32	64	8	8	64	8	8
<i>E. coli</i> (S34/16)	ND	ND	ND	32	16	2	ND	ND	ND
<i>K. pneumoniae</i> (S12b/16)	ND	ND	ND	32	16	2	ND	ND	ND

ND : Non Déterminé



HEBI: Huile essentielle de *B. imbricatum*

Figure 15: Effet synergique entre l'HE de *B. imbricatum* et l'amoxicilline vis-à-vis de *Proteus mirabilis*



HECA : Huile essentielle de *C. arabicus*

Figure 16 : Effet synergique entre l'HE de *C. arabicus* et l'amoxicilline vis-à-vis de *Proteus mirabilis*

Les résultats obtenus dans cette étude rejoignent ceux de Yahiaoui et al. (2017), Ait Dra et al. (2017) et Behbahani et al. (2018) qui ont étudié l'importance de la synergie entre les antibiotiques et les HE dans la réduction de la consommation d'antibiotiques et la protection de la santé publique (Ait Dra et al., 2017 ; Behbahani et al., 2018 ; Yahiaoui et al., 2017). L'effet synergique entre les HE des deux plantes et l'amoxicilline et la néomycine pourrait constituer une solution alternative pour le traitement de plusieurs maladies causées par tels microorganismes.

4. Conclusion

Cette étude a permis la mise en évidence pour la première fois d'un effet synergique entre les HE de *C. arabicus* et de *B. imbricatum* et les antibiotiques conventionnels. Notre étude a montré que l'association de ces deux HE avec la néomycine et l'amoxicilline pourrait constituer un outil thérapeutique efficace contre les entérobactéries multi-résistantes aux antibiotiques. Cependant, d'autres investigations doivent être menées sur leur innocuité et leurs modes d'action afin d'en optimiser l'utilisation.

Cette étude a donné lieu à une publication intitulée : “*Antibacterial activity of Cladanthus arabicus and Bubonium imbricatum essential oils alone and in combination with conventional antibiotics against Enterobacteriaceae isolates*”, dans la revue : Letters in Applied Microbiology (2018) (Impact factor : 1.805).

Auteurs : Aghraz A, Benameur Q, Gervasi T, Ait dra L, Ben-Mahdi M.H, Larhsini M, Markouk M and Cicero N.

ORIGINAL ARTICLE

Antibacterial activity of *Cladanthus arabicus* and *Bubonium imbricatum* essential oils alone and in combination with conventional antibiotics against *Enterobacteriaceae* isolates

A. Aghraz¹, Q. Benameur^{2,3}, T. Gervasi⁴ , L. Ait dra¹, M.H. Ben-Mahdi², M. Larhsini¹, M. Markouk¹ and N. Cicero^{4,5}

1 Laboratory of Biotechnology, Protection and Valorisation of Plant Resources (URAC35 Association Unit), Department of Biology, Faculty of Sciences, Cadi Ayyad University, Marrakesh, Morocco

2 Research Laboratory "Animal Health and Production", Higher National Veterinary School, Algiers, Algeria

3 Nursing Department, Faculty of Natural Sciences and Life, Abdelhamid Ibn Badis University, Mostaganem, Algeria

4 Department of Biomedical and Dental Sciences and Morphofunctional Imaging, University of Messina, Messina, Italy

5 Science4Life, Spin Off Company, University of Messina, Messina, Italy

Significance and Impact of the Study: The development of antibiotic resistance is multifactorial, including the specific nature of the relationship of bacteria to antibiotics. This situation has forced scientists to search for new antimicrobial substances from various sources as novel antimicrobial chemotherapeutic agents. Recently, medicinal plants and their derivatives (essential oils, extracts) have become very important in therapeutics because they encounter minimal challenges of the emergence of resistance. In this direction, the antimicrobial activity of the endemic *Bubonium imbricatum* plant and medicinal *Cladanthus arabicus* plant essential oils against multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* strains was demonstrated.

Keywords

antibiotics, antimicrobials, bioproducts, enterobacteria, resistance.

Correspondence

Teresa Gervasi, Department of Biomedical and Dental Sciences and Morphofunctional Imaging, University of Messina, Italy.
E-mail: tgervasi@unime.it

2018/0077: received 12 January 2018, revised 1 May 2018 and accepted 2 May 2018

doi:10.1111/lam.13007

Abstract

Multidrug-resistant bacteria have become common all over the world, necessitating the development of new therapeutic strategies. Synergistic interactions between conventional antibiotics and natural bioactive may have therapeutic benefits in a clinical setting. There are plenty of medicinal plants that have proven efficacy against broad spectrum of micro-organisms. The aim of the work was to assess the antibacterial activity of *Cladanthus arabicus*, a Moroccan medicinal plant, and *Bubonium imbricatum*, a Moroccan endemic plant. The evaluation of the synergistic effect of extracted essential oils (EOs) together with some conventional antibiotics was also investigated. Checkerboard test was used to evaluate the interaction of EOs in combination with amoxicillin and neomycin. The results showed that EOs contain a potent activity against the tested *Enterobacteriaceae* isolates, with inhibition zones values in the range of 8.05 ± 0.1 and 13.1 ± 0.11 mm and MIC values between $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ to $800 \mu\text{g ml}^{-1}$ for *C. arabicus* and from $400 \mu\text{g ml}^{-1}$ to $1600 \mu\text{g ml}^{-1}$ for *B. imbricatum*, respectively. Moreover, the current study allowed concluding that both EOs showed not only satisfactory antibacterial properties but also active effects combined with conventional antibiotics demonstrated by the Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI). These findings are very interesting since there are no previous studies on synergistic interactions of these two plants with antibiotics.

Introduction

The frequency of resistance to first-line antimicrobial agents has been rising worldwide during the last decades in both human and veterinary medicine (Paterson 2006; Benameur *et al.* 2016), and now it reaches high proportions in many areas of the world. Infections caused by multidrug-resistant (MDR) *Enterobacteriaceae* are associated with increased morbidity and mortality than those caused by their susceptible counterparts (Rottier *et al.* 2012). The growing of antimicrobial resistance to first-line agents makes the selection of empirical therapy more difficult (Canton *et al.* 2012) and the development of new antimicrobial agents more urgent (Gervasi *et al.* 2014a,b). However, only few new agents have entered full clinical development. In order to find novel antimicrobial agents with new modes of action, medicinal plants have been explored as sources for the identification of new and effective antibacterial. They are also known to produce a variety of compounds as defences against a wide range of micro-organisms (Hayashi *et al.* 2013). It has also been confirmed that medicinal plants especially their essential oils (EOs) are an important source of alternative chemical reagents with potential therapeutic effects (Baytop 1999; Sarikurkcu *et al.* 2013). Recently, the use of EOs in combination with antibiotics against drug-resistant bacteria has gained much interest for scientific research. Several studies have demonstrated that EOs have an appreciable antibiotic spectrum with multiple drug targets (Khan *et al.* 2010; Lu *et al.* 2014). Some authors suggested that association of antibiotics with EOs targeting resistant bacteria may have a different mechanism of action and it may lead to new choices to overcome the problem of bacterial resistance (Yap *et al.* 2014).

Nowadays, EOs combined with antibiotics might be considered as an alternative strategy; the advantage of using a combination is the synergistic effect, in which the antimicrobial activity is greater than the individual contribution of each agent (Freitas *et al.* 2013; Yahiaoui *et al.* 2017).

The antimicrobial activity of *Cladanthus arabicus* and *Bubonium imbricatum* EOs was previously demonstrated (Aghraz *et al.* 2016, 2017). The present study focused on their antibacterial activity against MDR *Enterobacteriaceae* isolates. Furthermore, the possibility of synergistic interaction between essential oils and antibiotics was also explored.

Results and discussion

Bacterial strains identification

The isolates consisted of two *Escherichia coli*, one *Klebsiella pneumoniae*, one *Enterobacter cloacae*, one *Proteus Mirabilis* and one *Salmonella sp.*

Antimicrobial susceptibility testing

The results of antimicrobial susceptibility testing revealed that all the six *Enterobacteriaceae* isolates were MDR (resistant to three or more different antimicrobial agents belonging to different classes of antibiotics). Antimicrobial resistance profiles of the *Enterobacteriaceae* isolates are shown in Table 1. All the isolates were resistant to amoxicillin and neomycin and the majority of them were resistant to nalidixic acid, ciprofloxacin and levofloxacin. In the last few years, various investigations reported high levels of multidrug resistant *Enterobacteriaceae* isolated from poultry in Algeria (Hamoudi and Aggad 2008; Benameur *et al.* 2014, 2016). These data showed a worrying picture but in view of the whole range of antibiotics available in Algeria and their increasing and inappropriate use in poultry farms, the globally high incidence of antibiotic resistance observed in this country is not surprising.

Antibacterial activity of *C. arabicus* and *B. imbricatum* essential oils

The antibacterial activity of *C. arabicus* and *B. imbricatum* EOs extracted from aerial parts of the plants by steam distillation was tested against seven *Enterobacteriaceae* isolates, including six MDR isolates (*E. coli* S33/16, *E. coli* S34/16, *Enterobacter cloacae* S5/16, *Klebsiella pneumoniae* S12/16, *Proteus mirabilis* S32/16 and *Salmonella sp* S12/14) and *E. coli* ATCC 25922. The results of preliminary *in vitro* screening of antibacterial activity of the two EOs by the agar disk diffusion method against seven *Enterobacteriaceae* isolates and their interactions with conventional antibiotics are summarized in Table 2.

Table 1 Antimicrobial resistance patterns of the selected MDR *Enterobacteriaceae* strains

Isolate	Antimicrobial resistance pattern (Inhibition zones in mm)
<i>Escherichia coli</i> (S33/16)	NA (7), CIP (10), AML (7), AMC (12), SXT(7), TE (7), C (10), N (8)
<i>Enterobacter cloacae</i> (S54b/16)	AML(7), AMC (10), TE (8), N (9)
<i>Salmonella sp</i> (S12/14)	NA (8), CIP (18), AML (8), N (10)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (S12b/16)	AML (7), SXT (8), TE (7), C (11), N (9)
<i>Escherichia coli</i> (S34/16)	NA (7), CIP (8), AML (8), N(10)
<i>Proteus mirabilis</i> (S32/16)	NA (8), CIP (8), AML (7), TE (8), SXT (8), N (10)

AML, amoxicillin; NA, nalidixic acid; CIP, ciprofloxacin; AMC, amoxicillin-clavulanic acid; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole, TE, tetracycline; C, chloramphenicol; N, neomycin.

Table 2 Inhibition zones for *C. arabicus* (CA) and *B. imbricatum* (BI) essential oils alone and their synergistic effect in combination with antibiotics

Isolate	Essential oils	Essential oils Inhibition zones (mm)	Synergistic interaction	
			Amoxicillin	Neomycin
<i>Escherichia coli</i> (S33/16)	CA	8.28 ± 0.14	N	N
	BI	8.06 ± 0.2	N	N
<i>Enterobacter cloacae</i> (S5/16)	CA	8.5 ± 0.3	P	N
	BI	9.6 ± 0.2	P	N
<i>Salmonella sp</i> (S12/14)	CA	10.12 ± 0.2	P	N
	BI	13.1 ± 0.11	P	N
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (S12/16)	CA	10.4 ± 0.2	N	N
	BI	10.45 ± 0.14	N	P
<i>Escherichia coli</i> (S34/16)	CA	10.35 ± 0.32	N	N
	BI	9.14 ± 0.15	N	P
<i>Proteus mirabilis</i> (S32/16)	CA	8.25 ± 0.12	P	N
	BI	8.17 ± 0.3	P	P
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	CA	8.23 ± 0.09	P	N
	BI	8.05 ± 0.1	P	P

Values are expressed as mean ± SE (n = 3).

P, Positive synergistic interaction; **N**, No synergistic interaction.

The results showed that the EOs of *C. arabicus* and *B. imbricatum* have an antibacterial activity against all the tested *Enterobacteriaceae* isolates with different inhibition zones. The diameters of inhibition zones ranged between 8.05 ± 0.1 and 13.1 ± 0.11 mm. Those results confirmed several previous studies, which have shown a potent antibacterial activity of both plants EOs (Aghraz et al. 2016, 2017). The agar disk diffusion method allowed not only the determination of EOs inhibition zones diameters against seven bacteria but also the evaluation of synergistic effects between the essential oils and conventional antibiotics. *B. imbricatum* and *C. arabicus* EOs showed a synergistic effect with amoxicillin and neomycin (Table 2). The MIC values obtained for EOs, neomycin and amoxicillin against the seven *Enterobacteriaceae* isolates are shown in the Table 3. Both essential oils

exhibited potent antibacterial activity against all the examined strains. However, the sensitivity of these isolates to the EOs was observed to be different depending on the bacterial species. The MIC values of *C. arabicus* EO ranged from 200 µg ml⁻¹ to 800 µg ml⁻¹ and of *B. imbricatum* EO from 400 µg ml⁻¹ to 1600 µg ml⁻¹. Those results are in a good agreement with previous studies conducted with the same essential oil against non-MDR bacterial strains, which revealed that the two essential oils had a potent antimicrobial activity against three Gram-negative bacteria (*E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785, *Klebsiella pneumoniae*) and three Gram-positive bacteria (*Micrococcus luteus* ATCC 10240, *Staphylococcus aureus* CCMM B3 and *Bacillus cereus* ATCC 14579) (Aghraz et al. 2016, 2017).

The antibacterial EOs effect may originate from their major compounds, particularly in *B. imbricatum* EO for the presence of higher proportions of oxygenated monoterpenes (61.4%), particularly, cis-chrysanthenyl acetate (31.4%) and thymolisobutyrate (3.4%) (Aghraz et al. 2016) and in *C. arabicus* EO for monoterpenes hydrocarbons (75.8%), such as the main components were sabinene (31.1%), β-pinene (16.7%), myrcene (12.3%) and α-pinene (5.3%) (Aghraz et al. 2017). Indeed, it has been reported that EOs with higher amounts of monoterpenes hydrocarbon, such as α-pinene and β-pinene, have good antibacterial properties (Cosentino et al. 1999; Wilkinson et al. 2003; Elaissi et al. 2012; Chikhounne et al. 2013), and the mechanism of action determined for the main compounds of *C. arabicus* and *B. imbricatum* EOs, such as p-cymene, γ-terpinene and thymol isobutyrate, is membrane disruption (Di Pasqua et al. 2007, 2010; Oyedemi et al. 2009). In addition, the majority of EOs harm bacteria by affecting their cell membrane and causing cell death, or leading the permeability of their bacterial membrane, leading the loss of ions and ATP, collapse of proton pumps and finally the release of macromolecules and causing bacterial cell lysis (Bakkali et al. 2008; Turgis et al. 2012). Furthermore, the antibacterial activity also could result from the synergistic

Table 3 Minimal inhibitory concentration of *Cladanthus arabicus* and *Bubonium imbricatum* essential oils and antibiotics

Isolate	Essential oils (µg ml ⁻¹)		Antibiotics (µg ml ⁻¹)	
	<i>C. arabicus</i>	<i>B. imbricatum</i>	Amoxicillin	Neomycin
<i>Escherichia coli</i> (S33/16)	200	1600	64	64
<i>Enterobacter cloacae</i> (S5/16)	400	800	64	32
<i>Salmonella sp</i> (S12/14)	800	400	64	64
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (S12b/16)	800	800	64	32
<i>Escherichia coli</i> (S34/16)	800	800	64	32
<i>Proteus mirabilis</i> (S32/16)	800	1600	64	64
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	400	800	64	32

effect between various compounds, as previously reported by many studies (Stefanović *et al.* 2012; Balje *et al.* 2015). Nevertheless, other components or traces could have an effect on this activity.

Synergistic interactions between essential oils and antibiotics

The antibacterial effects of combined EOs with conventional antibiotics against seven *Enterobacteriaceae* isolates, including MDR isolates, were investigated by checkerboard method and the results are reported in Table 4.

The fractional inhibitory concentration (FIC) and the FIC index (FICI) were calculated to determine the interaction of the two EOs in combination with amoxicillin and neomycin. The gains expressed by the MIC of amoxicillin and neomycin in the presence of *B. imbricatum* and *C. arabicus* EOs are summarized in Table 5. The *B. imbricatum* EO showed total synergy in combination with amoxicillin against the majority of tested *Enterobacteriaceae* isolates (FIC < 0.5) and it also revealed a total synergy in combination with neomycin against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Proteus mirabilis*. However, *C. arabicus* EO showed a total synergy with amoxicillin against

Salmonella sp and *Proteus mirabilis* and a partial synergy against *Enterobacter cloacae*.

Essential oils, as some multicomponent mixtures, can act on different levels unlike many conventional antimicrobials which are pure compounds and they have only a single target site of action (Yap *et al.* 2014). Moreover, several studies showed that the antibacterial activity of EOs or the combinations of compounds are more effective than isolated constituents (Junio *et al.* 2011; Wang *et al.* 2014). Indeed, the combination of tested essential oils and antibiotics showed significant results, the activity of antibiotics increased while the antibiotics MICs decreased. The combination of amoxicillin and *B. imbricatum* essential oil (MIC) allowed to double the activity from four times in case of *Salmonella* sp. to eight times in case of *Proteus mirabilis* (Fig. 1). Neomycin showed also strong interaction with *B. imbricatum* essential oil, and the obtained gain ranged from two fold in case of *E. coli* (S34/16) to 16 fold in case of *Klebsiella pneumoniae* (Fig. 2).

The antibacterial activity of amoxicillin was then examined in combination with *C. arabicus* EO. The highest gain was obtained against *Proteus mirabilis* with 32-fold using EOs at MIC (Fig. 3). However, no effect was noted

Table 4 Synergistic interaction of *Cladanthus arabicus* (CA) and *Bubonium imbricatum* (BI) essential oils in combination with amoxicillin and neomycin against *Enterobacteriaceae* isolates

FICI	<i>Enterobacter cloacae</i> (S5/16)	<i>Salmonella</i> sp (S12/14)	<i>Proteus mirabilis</i> (S32/16)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (S12b/16)	<i>Escherichia coli</i> (S34/16)
AML/CA	0.58*	0.27†	0.03‡	1.16‡	NT	NT
AML/BI	0.13†	0.29†	0.13†	0.13†	NT	NT
N/BI	NT	NT	0.13†	0.26†	0.52*	0.52*

NT, Not tested; AML, amoxicillin.

*Partial synergism.

†Total synergism.

‡No effect.

Table 5 Gain of the MICs of amoxicillin and neomycin in synergy with *Cladanthus arabicus* and *Bubonium imbricatum* essential oils

Isolate	<i>C. arabicus</i>			<i>B. imbricatum</i>			<i>B. imbricatum</i>		
	AML	AML+	Gain	N	N+	Gain	AML	AML+	Gain
<i>Enterobacter cloacae</i> (S5/16)	64	32	2	NT	NT	NT	64	8	8
<i>Salmonella</i> sp (S12/14)	64	16	4	NT	NT	NT	64	16	4
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	64	64	1	32	8	4	64	8	8
<i>Proteus mirabilis</i> (S32/16)	64	2	32	64	8	8	64	8	8
<i>Escherichia coli</i> (S34/16)	NT	NT	NT	32	16	2	NT	NT	NT
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (S12b/16)	NT	NT	NT	32	2	16	NT	NT	NT

NT, Not tested; AML, amoxicillin.

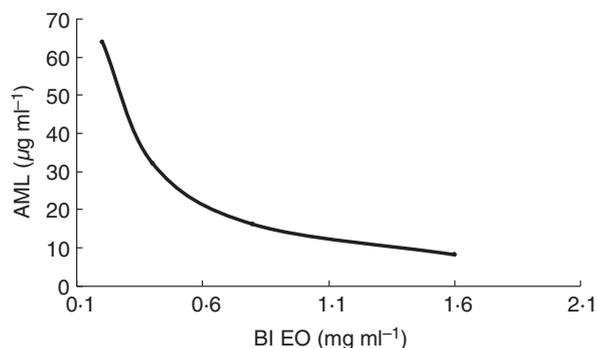


Figure 1 Synergistic interaction of *Bubonium imbricatum* Essential Oil (BI EO) in combination with AML against *Proteus mirabilis* (MIC, Minimum Inhibitory Concentration; AML, Amoxicillin).

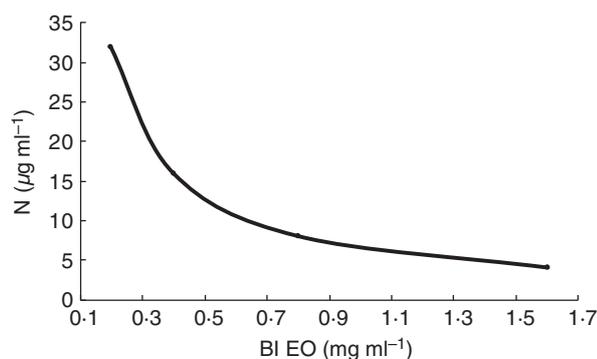


Figure 2 Synergistic interaction of *Bubonium imbricatum* Essential Oil (BI EO) in combination with neomycin against *Klebsiella pneumoniae* (MIC, Minimum Inhibitory Concentration; N, Neomycin).

when amoxicillin was used in the combination with *C. arabicus* essential oil against *E. coli* ATCC 25922.

The study indicates that the interactions between EOs of both plants and the standard antibiotics (amoxicillin and neomycin) have proven to be particularly effective, which may permit to find the treatment of several diseases caused by the micro-organisms. Definitely, the obtained results are in good agreement with previous studies (Ait-Dra et al. 2017; Behbahani et al. 2018) which investigated the importance of the synergy between antibiotics and EOs as an alternative way to reduce antibiotics consumption and protect the human's health.

No previous study exists on synergistic interaction between these *C. arabicus* and *B. imbricatum* EOs and antibiotics. Hence, the combination of both EOs with neomycin and amoxicillin would probably be a good therapeutic agent against these bacteria, valorizing the effectiveness of antibiotics, and decreasing the rate of antimicrobial resistance. Likewise, the *B. imbricatum* and *C. arabicus* EOs have shown a potent antibacterial activity and strong interaction with amoxicillin. Nevertheless, due

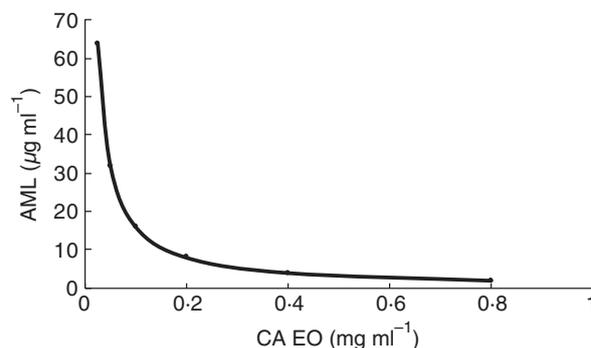


Figure 3 Synergistic interaction of *Cladanthus arabicus* Essential Oil (CA EO) in combination with AML against *Proteus mirabilis* (MIC, Minimum Inhibitory Concentration; AML, Amoxicillin).

to the diversity and the multitude of chemical composition in each plant EOs, the effects of their interaction with antibiotics are equally diverse and may lead to some toxic effects. For this reason, more investigations should be carried out on their probable toxicological effects and also their mode of action in order to optimize their use.

Materials and methods

Plant materials and extraction procedure

The aerial parts of the two plants (*Cladanthus arabicus* L.) Cass and *Bubonium imbricatum* ((Cav.) Litard) were collected in Marrakech and Essaouira regions, respectively, during their flowering period in 2016. The taxonomic identification was performed following the procedure described by Fennane and Ibn-Tattou (2012). Aerial parts were separated and dried at room temperature for 2 weeks in darkness and then stored in sealed paper bags. The EOs were extracted by steam distillation for 3 h (*C. arabicus*) and 4 h (*B. imbricatum*) using a Clevenger-type apparatus and stored in sealed glass vials at 4°C prior to analysis.

Evaluation of antimicrobial activity

Bacterial strains

Seven *Enterobacteriaceae* strains, isolated from poultry in the Regional Veterinary Laboratory of Mostaganem, Algeria, were selected to carry out the study. The strains were identified using Api20E systems (bioMerieux, France). *Escherichia coli* ATCC 25922 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) was used as a reference strain.

Antimicrobial susceptibility testing

The *Enterobacteriaceae* isolates were tested for antimicrobial susceptibility using disk diffusion method, on

Muller–Hinton agar (MHA, Oxoid, Milan, Italy), following Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI 2016). The isolates were tested against a panel of 12 antimicrobials: nalidixic acid (NA, 30 µg), ciprofloxacin (CIP, 5 µg), levofloxacin (LEV, 5 µg), amoxicillin (AML, 25 µg), amoxicillin/clavulanic acid (AMC, 20/10 µg), cefotaxime (CTX, 30 µg), tetracycline (TE, 30 µg), sulpho-namides (SSS, 300 µg), trimethoprim (TMP, 5 µg), trimethoprim/sulphamethoxazole (SXT, 1-25/23-75 µg), neomycin (N, 30 µg) and chloramphenicol (C, 30 µg) (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). Results were obtained after incubation for 16–18 h at 37°C and were interpreted according to CLSI previously cited guidelines.

Determination of antibacterial activity of *C. arabicus* and *B. imbricatum* EOs by disc diffusion assay

The disc diffusion method was conducted to evaluate the antibacterial activity of EOs according to the method previously described (Bauer *et al.* 1966). The suspension is prepared from an overnight culture for each micro-organism then evenly distributed on a Mueller Hinton agar (MHA). Sterile paper discs were impregnated with 10 µl of pure EO. The plates were then placed at 4°C for 2 h and incubated for 24 h at 37°C. After incubation, the diameters of inhibition zones were measured in millimeters.

Disk impregnated with sterile distilled water served as a negative control and disk containing antibiotic (CTX: Cefotaxime) served as positive control. Each test was performed in triplicate. All results have been expressed as mean ± SD.

Determination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of *C. arabicus*, *B. imbricatum* EOs and antibiotics

The broth micro-dilution method was used to determine the Minimal Inhibitory Concentration (MIC), according to NCCLS guidelines (2003). The tests were performed in Mueller Hinton broth (MHB, Oxoid). Bacterial cultures of a cool night in log phase were used to prepare the suspension of cells adjusted to 10⁶ CFU in MHB, and 100 µl were added to each well of 96 well plates. MHB was used to dissolve the EOs and then diluted to the highest concentration (128 µg ml⁻¹). It was also used to dissolve the antibiotics and the highest concentration for amoxicillin and neomycin was 256 µg ml⁻¹ and 128 µg ml⁻¹, respectively.

A positive growth control containing MHB and bacterial culture without compounds, and a negative control containing no bacteria were included in each experiment. The plates were incubated in aerobiosis at 37°C for 24 h, and amount of growth was monitored by measuring the increased turbidity, as indicated by solution optical density (OD) at 630 nm on a plate reader. The MIC is the lowest concentration at which the bacteria failed to grow so that no increase in optical density was detected. Tested

EOs and antibiotics were soluble in MHB and each test was performed in triplicate.

Evaluation of synergistic interaction between EOs and antibiotics by checkerboard test

The synergy between conventional antibiotics and EOs has been studied firstly by the evaluation of the inhibition zones between EOs and several antibiotics using the disc diffusion method. The test was performed as described by Jarlier *et al.* (1988) with slight modifications. Briefly, the antibiotics were placed away from the EOs disc depending to their inhibition zone. A clear extension of the edge of the inhibition zone of any of the antibiotics towards the disc EOs was interpreted as positive interaction. The antibiotics showed synergistic effect according to disk diffusion method results were selected for further study by checkerboard test. Checkerboard method was used for the determination of the MIC of antibiotics in the presence of EOs at a low concentration (MIC) as described by Noumedem *et al.* (2013). Fifty microliters of the of six serial twofold dilutions of the two tested EOs (from MIC to MIC/32) were added to each well, containing 50 µl of eight serial twofold dilutions (from MIC to MIC/128) of antibiotic and inoculated after that with 100 µl of cell suspension (10⁶ CFU per ml). MIC was defined as the lowest concentration of antibiotic, in combination with EOs at MIC that inhibits the visible growth of tested strains. The combined effects of the antibiotic and essential oils were calculated and expressed in terms of a fractional inhibitor concentration index (FICI) using the following formula:

$$FICI = \sum FIC = FIC(A) + FIC(B)$$

where FIC (A) = MIC value of antibiotic combined with essential oil/MIC value of antibiotic alone and FIC (B) = MIC value of essential oil combined with antibiotic/MIC value of essential oil alone. Interpretation of FICI values were defined as; total synergism (FICI ≤ 0.5), partial synergism (0.5 < FICI ≤ 0.75), no effect (0.75 < FICI ≤ 2) or antagonism (FICI > 2) (Mulyaningsih *et al.* 2010). Each test was performed in triplicate.

Acknowledgements

The author's would like to acknowledge a program Erasmus+ for financial support under Grant number: 2015-1-IT02-KA107-014704. We also thank the CNRST (Centre National de Recherche Scientifique et Technique, Morocco) for financial support [Grant URAC 35].

Conflict of Interest

We declare that we have no conflict of interest.

References

- Aghraz, A., Jürgen, W., Erich, S., Aitdra, L., Aitsidibrahim, M., Tabanca, N., Abbas, A., Hassani, L. et al. (2016) Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and insecticidal activities of essential oil from a Moroccan endemic plant: *Bubonium imbricatum*. *Nat Prod Commun* **11**, 1717–1720.
- Aghraz, A., Jürgen, W., Erich, S., Aitdra, L., Aitsidibrahim, M., Tabanca, N., Abbas, A., Hassani, L. et al. (2017) Chemical composition, in vitro antioxidant, antimicrobial and insecticidal activities of essential oil from *Cladanthus arabicus*. *J Essent Oil-Bearing Plants* **3**, 601–609.
- Ait-Dra, L., Brahim, M.A.S., Boualy, B., Aghraz, A., Barakate, M., Oubaassine, S. and Larhsini, M. (2017) Chemical composition, antioxidant and evidence antimicrobial synergistic effects of *Periploca laevigata* essential oil with conventional antibiotics. *Ind Crops Prod* **109**, 746–752.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. (2008) Biological effects of essential oils. *Food Chem Toxicol* **46**, 446–475.
- Balje, S.Y., Simmy, G., Ritika, Y. and Roshanlal, Y. (2015) Antimicrobial activity of individual and combined extracts of selected spices against some pathogenic and food spoilage microorganisms. *Int Food Res J* **22**, 2594–2600.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C. and Turck, M. (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* **45**, 493–496.
- Baytop, T. (1999) *Therapy with Medicinal Plants in Turkey; Today and in Future*. Istanbul, Turkey: Istanbul University Press.
- Behbahani, B.A., Yazdi, F.T., Vasiee, A. and Mortazavi, S.A. (2018) *Oliveria decumbens* essential oil: chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some clinical and standard strains causing infection. *Microb Pathog* **114**, 449–452.
- Benameur, Q., Guemourb, D., Hammoudi, A., Aoudia, K., Aggad, H., Humblet, M.F. and Saegermang, C. (2014) Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from chickens in West of Algeria. *Int J Sci: Basic Appl Res* **13**, 366–370.
- Benameur, Q., Ben-Mahdi, M.H., Boutaiba Benklaouz, M., Tali-Maamar, H., Assaous, F., Guettou, B. and Rahal, K. (2016) Analysis of high levels of multidrug resistant *Escherichia coli* from healthy broiler chickens in Western Algeria. *Afr J Microbiol Res* **10**, 1792–1797.
- Canton, R., Akova, M., Carmeli, Y., Giske, C., Glupczynski, Y. and Gniadkowski, M. (2012) Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* **18**, 413–431.
- Chikhoun, A., Hazzit, M., Kerbouche, L., Baaliouamer, A. and Aissat, K. (2013) *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters essential oils: chemical composition and biological activities. *J Essential Oil Res* **25**, 300–3073.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2016) *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-sixth Informational Supplement document M100S* Wayne, PA, USA.
- Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M.L., Mascia, V., Arzedi, E. and Palmas, F. (1999) In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian thymus essential oils. *Lett Appl Microbiol* **29**, 130–135.
- Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D. and Mauriello, G. (2007) Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *J Agric Food Chem* **55**, 4863–4870.
- Di Pasqua, R., Mamone, G., Ferranti, P., Ercolini, D. and Mauriello, G. (2010) Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. *Proteomics* **10**, 1040–1049.
- Elaissi, A., Rouis, Z., Mabrouk, S., Bel Haj Salah, K., Aouni, M., Larbi, K.M., Farhat, F., Chemli, R. et al. (2012) Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils from fifteen *eucalyptus* species growing in the Korbous and Jbel Abderrahman Arboreta (North East Tunisia). *Molecules* **17**, 3044–3057.
- Fennane, M. and Ibn-Tattou, M. (2012) Statistiques et commentaires sur l'inventaire actuel de la flore vasculaire du Maroc. *Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, section Sciences de la Vie* **34**, 1–9.
- Freitas, E., Aires, A., Rosa, E.A.D.S. and Saavedra, M.J. (2013) Antibacterial activity and synergistic effect between watercress extracts, 2-phenylethyl isothiocyanate and antibiotics against 11 isolates of *Escherichia coli* from clinical and animal source. *Lett Appl Microbiol* **57**, 266–273.
- Gervasi, T., Horn, N., Wegmann, U., Dugo, G., Narbad, A. and Mayer, M.J. (2014a) Expression and delivery of an endolysin to combat *Clostridium perfringens*. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**, 2495–2505.
- Gervasi, T., Lo Curto, R., Minniti, E., Narbad, A. and Mayer, M.J. (2014b) Application of *Lactobacillus johnsonii* expressing phage endolysin for control of *Clostridium perfringens*. *Lett Appl Microbiol* **59**, 355–361.
- Hamoudi, A. and Aggad, H. (2008) Antibioresistance of *Escherichia coli* strains isolated from chicken colibacillosis in western Algeria. *Turk J Vet Anim Sci* **32**, 123–126.
- Hayashi, M.A., Bizerra, F.C. and Da Silva, Junior P.I. (2013) Antimicrobial compounds from natural sources. *Front Microbiol* **4**, 195.
- Jarlier, V., Nicolas, M.H., Fournier, G. and Philippon, A. (1988) Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Clin Infect Dis* **10**, 867–878.
- Junio, H.A., Sy-Cordero, A.A., Ettetfagh, K.A., Burns, J.T., Micko, K.T., Graf, T.N. and Cech, N.B. (2011) Synergy-directed fractionation of botanical medicines: a case study with goldenseal (*Hydrastis canadensis*). *J Nat Prod* **74**, 1621–1629.

- Khan, W., Bernier, S.P., Kuchma, S.L., Hammond, J.H., Hasan, F. and O'Toole, G.A. (2010) Aminoglycoside resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms modulated by extracellular polysaccharide. *Int Microbiol* **13**, 207–212.
- Lu, J., Turnbull, L., Burke, C.M., Liu, M., Carter, D.A., Schlothauer, R.C. and Harry, E.J. (2014) Manuka-type honeys can eradicate biofilms produced by *Staphylococcus aureus* strains with different biofilm-forming abilities. *Peer J* **2**, 326.
- Mulyaningsih, S., Sporer, F., Zimmermann, S., Reichling, J. and Wink, M. (2010) Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic susceptible and antibiotic resistant pathogens. *Phytomedicine* **17**, 1061–1066.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). (2003) *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard M7-A6*, 6th ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- Noumedem, J.A.K., Mihasan, M. and Kuate, J.R. (2013) In vitro antibacterial and antibiotic potentiation activities of four edible plants against multidrug-resistant gram-negative species. *BMC Complement Altern Med* **13**, 190–194.
- Oyedemi, S.O., Okoh, A.I., Mabinya, L.V., Pirochenna, G. and Afolayan, A.J. (2009) The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, (-terpineol and (-terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. *Afr J Biotec* **8**, 1280–1290.
- Paterson, D. (2006) Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *Am J Infect Ctrl* **34**, 20–28.
- Rottier, W., Ammerlaan, H. and Bonten, M. (2012) Effects of confounders and intermediates on the association of bacteraemia caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and patient outcome: a meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* **67**, 1311–1320.
- Sarikurkcu, C., Sabih Ozer, M., Cakir, A., Eskici, M. and Mete, E. (2013) GC/MS evaluation and in vitro antioxidant activity of essential oil and solvent extracts of an endemic plant used as folk remedy in Turkey: *Phlomis bourgaei* Boiss. *Evid Based Complement Alternate Med* **2013**, 293080.
- Stefanović, O.D., Stanojević, D.D. and Comić, L.R. (2012) Synergistic antibacterial activity of *Salvia officinalis* and *Cichorium intybus* extracts and antibiotics. *Acta Pol Pharm Drug Res* **69**, 457–463.
- Turgis, M., Vu, K.D., Dupont, C. and Lacroix, M. (2012) Combined antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against foodborne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Res Int* **48**, 696–702.
- Wang, S.Y., Sun, Z.L., Liu, T., Gibbons, S., Zhang, W.J. and Qing, M. (2014) Flavonoids from *Sophoramoocroftiana* and their synergistic antibacterial effects on MRSA. *Phytotherapy Res* **28**, 1071–1076.
- Wilkinson, J.M., Hipwell, M., Ryan, T. and Cavanagh, H.M.A. (2003) Bioactivity of *Backhousia citriodora*: antibacterial and antifungal activity. *J Agr Food Chem* **51**, 76–81.
- Yahiaoui, F., Benameur, Q. and Ben-Mahdi, M.H. (2017) Antibacterial activity of *Mentha Pulegium* essential oil against avian isolated ESBL producing bacteria and its synergistic potential with antibiotics. *Int J Pharm and Pharma Sci* **9**, 35–41.
- Yap, P.S., Yiap, B.C., Ping, H.C. and Lim, S.H. (2014) Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *Open Microbiol J* **8**, 6–14.

*Etude V : Etude de l'activité antibactérienne de l'huile
essentielle de Thymus vulgaris seul ou associé au
céfotaxime vis-à-vis des souches d'entérobactéries
productrices de BLSE*

Etude V : Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* seul ou associé au céfotaxime vis-à-vis des souches d'entérobactéries productrices de BLSE

1. Introduction

La production de BLSE est un mécanisme de résistance important qui peut être responsable d'une perte d'efficacité de l'antibiothérapie lors des infections causées par des entérobactéries productrices de BLSE. Il constitue de ce fait une menace sérieuse aux solutions thérapeutiques antibiotiques disponibles (Shaikh et al., 2015). Les huiles essentielles (HE) extraites de différentes plantes aromatiques constituent une source potentielle de molécules naturelles bioactives. En raison de leurs propriétés biologiques, diverses investigations ont été menées sur les potentiels antimicrobiens alternatifs des HE pour le traitement des maladies infectieuses et comme conservateurs naturels en industrie agroalimentaire notamment. En effet, certaines études ont montré que les HE de certains végétaux possédaient une puissante activité vis-à-vis des agents pathogènes multi-résistants aux antibiotiques (Saeidi et al., 2015). Récemment, l'efficacité de l'utilisation des HE en association avec des antibiotiques contre des bactéries résistantes aux antibiotiques a été rapportée par certains auteurs (Van Vuuren et al., 2009 ; Yahiaoui et al., 2017).

Il a été démontré que l'HE de *Thymus vulgaris* (HETV) présentait une meilleure activité antibactérienne contre certaines espèces d'entérobactéries, en particulier *E. coli* (Rota et al., 2008, Santurio et al., 2014). Cependant, peu d'informations sont disponibles sur l'activité antibactérienne de HETV vis-à-vis des souches d'entérobactéries productrices de BLSE (Anžlovar et al., 2014) et aucune étude n'a été menée pour étudier son effet synergique avec le céfotaxime (CTX).

Thymus vulgaris est une plante aromatique, appartenant à la famille des Lamiaceae. Cette dernière est l'une des familles végétales les plus utilisées comme source mondiale d'aromates et d'extraits médicinaux végétaux. Actuellement, cette plante est largement cultivée en Algérie comme plante ornementale et pour son usage culinaire. Elle est largement utilisée en médecine traditionnelle (Yakhlef et al., 2011). En outre, l'HETV a un potentiel important dans l'amélioration des performances zootechniques de la volaille de par ses propriétés antimicrobiennes et antioxydantes (Ben-Mahdi et al., 2010).

Par conséquent, cette étude a eu pour objectif l'évaluation de la sensibilité des souches d'entérobactéries productrices de BLSE à l'HETV et d'étudier une potentielle action synergique entre l'HETV et le CTX.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Source de matériel

L'HETV a été produite et achetée en Slovaquie (société CALENDULA a.s., Nová Ľubovňa, Slovaquie). Cette HE a été extraite de la partie aérienne de *Thymus vulgaris* (Figure 17). L'échantillon a été fourni dans un flacon stérile et transporté dans une glacière au Laboratoire de Microbiologie et Chimie Alimentaire du département des sciences biomédicales, dentaires et de l'imagerie morpho-fonctionnelle de l'Université de Messine, Italie, pour sa caractérisation chimique et biologique.



Figure 17 : Partie aérienne de *Thymus vulgaris*

2.2. Analyse chimique de l'HETV par chromatographie en phase gazeuse/spectrophotométrie de masse (CPG/SM)

L'HETV a été analysé en utilisant un système CPG 7890B équipé de 5977A MSD (Agilent, USA). Les composés ont été séparés sur une colonne capillaire HP-5ms de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Agilent, USA). La température initiale de la colonne a été maintenue à 50°C pendant 2 min, puis augmentée à 250°C à une vitesse de 4°C min⁻¹, puis maintenue isotherme pendant 10 min et après augmentée à nouveau à 280°C à 10°C min⁻¹. La température de l'injecteur était de 280°C. L'HE a été diluée dans de l'hexane standard (Sigma Aldrich, Italie)

à 90% (v/v), et 1 µl a été injecté en mode fractionné (1/50). L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur (0,7 ml /min). Les données spectrales de masse ont été acquises dans le mode de balayage dans la gamme de masse de 40-800 Da. Les indices de rétention de Kovats ont été déterminés par rapport aux valeurs des temps de rétention (TR) d'une série homologue de n-alcane (C10-C35) (Sigma Aldrich, Italie) en utilisant les mêmes conditions opératoires. Les constituants de l'huile ont été identifiés par une recherche combinée des TR et des spectres de masses (documents de bibliothèque NIST et Adams).

2.3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

Sept souches d'entérobactéries d'origine aviaire, isolées dans le Laboratoire Vétérinaire Régional de Mostaganem, ont été sélectionnées pour réaliser cette étude. Les protocoles d'isolement, d'identification, de l'antibiogramme et de la recherche des gènes de résistance aux BLSE ont déjà été détaillés dans l'étude II.

Les antibiotiques suivants ont été testés au cours de cette étude: acide nalidixique (NAL, 30 µg), ciprofloxacine (CIP, 5 µg), lévofloxacine (LEV, 5 µg), amoxicilline (AML, 25 µg), amoxicilline/acide clavulanique (AMC, 20/10 µg), ticarcilline (TIC, 75 µg), pipéracilline (PIP, 100 µg), céfazolline (CZ, 30 µg), céphalothine (CF, 30 µg), ceftazidime (CAZ, 30 µg), céfotaxime (CTX, 30 µg), aztréonam (ATM, 30 µg), tétracycline (TE, 30 µg), sulfonamides (SSS, 300 µg), triméthoprim (TMP, 5 µg), triméthoprim/sulfaméthoxazole (SXT, 1,25 / 23,75 µg), imipénème (IMP, 10 µg), néomycine (N, 30 µg), chloramphénicol (C, 30 µg), colistine (CT, 50 µg), et nitrofurantoïne (FT, 300 µg).

2.4. Évaluation de l'activité antimicrobienne

L'activité antibactérienne de l'HETV a été étudiée par la méthode de diffusion sur gélose, la méthode de microdilution en bouillon et le test de synergie (méthode Checkerboard) comme préalablement décrit dans l'étude IV.

2.5. Analyse statistique

L'analyse statistique a été effectuée à un intervalle de confiance de 95% en utilisant le logiciel XLSTAT 2019. Le test de l'ANOVA à un facteur suivi par des comparaisons post-hoc (HSD) ont permis de déterminer la significativité de la variance des moyennes des CMI de l'HETV.

3. Résultats et Discussion

3.1. Composition chimique de l'HETV

Les analyses chromatographiques (CPG/SM) ont permis d'identifier trois composants majeurs dans l'HETV (Tableau 10). Le thymol (34,50%) était présent à la plus forte concentration, suivi par le p-cymène (22,27%) et le linalool (5,35%). Une variation dans la composition chimique de l'HETV a été observée en comparant nos résultats avec ceux des études antérieures. Mancini et al. (2015) ont constaté que le principal composant de l'HETV était le thymol, suivi du carvacrol et de l'oxyde de caryophyllène (Mancini et al., 2015). Cependant, Šegvić-Klarić et al. (2007) et El Hattabi et al. (2016) ont décrit le carvacrol comme le principal constituant de cette HE, suivi du p-cymène et de l'E-caryophyllène (El Hattabi et al., 2016 ; Šegvić-Klarić et al., 2007). En Algérie, Cheurfa et al. (2013) ont rapporté que les composants majeurs d'HETV étaient dans l'ordre le carvacrol (34,62 %) et le thymol (27,43 %) (Cheurfa et al., 2013). Une autre étude menée par Sidali et al. (2014) a signalé que les constituants majoritaires étaient le carvacrol (55,2%), le γ -terpinène (12,6%), le p-cymène (9,3%), le linalool (3,9%) et le α -terpinène (2,8%) (Sidali et al., 2014). Cette variation dans la composition chimique de l'HETV peut être attribuée à de nombreux facteurs tels que l'origine géographique, les facteurs génétiques, le matériel végétal ainsi que la saison de récolte (Dugo et al., 2014, Tuttolomondo et al., 2015).

Tableau 10 : Composition chimique de l'HETV déterminée par CPG/SM

N°	Composé	TR	%	N°	Composé	TR	%
1	α -pinène	8.45	2,8	15	endo-bornéol	16.691	1.1
2	camphène	8.943	1,2	16	α -terpinéol	17.702	1.5
3	β -pinène	9.894	0,9	17	γ -terpinéol	17.931	0.5
4	β -myrcène	10.387	1,2	18	thymol	21.346	34.5
5	p-mentha-1(7).8-diène	10.829	0,1	19	carvacrol	21.507	1.1
6	3-carène	11.058	Tr	20	Acétate de 4-terpinenyl	21.796	0.2
7	o-cymène	11.286	0,1	21	(-)- β -bourbonène	24.217	Tr
8	p-cymène	11.712	22,3	22	caryophyllène	25.339	1.9
9	D-limonène	11.78	1,1	23	γ -muurolène	26.912	0.1
10	1,8 cinéole	11.857	0,9	24	δ -cadinène	28.499	0.1
11	γ -terpinène	12.80	0,2	25	δ -cadinène	28.499	0.1
12	Linalool	14.363	5,3	26	oxyde de aryophyllène	30.309	0.9
13	fenchol	14.813	Tr	27			
14	isobornéol	16.359	0,6	28			
Total							78.7%

TR: Temps de rétention, %: Pourcentage des composés identifiés, Tr : Traces.

3.2. Sensibilité aux antibiotiques des souches sélectionnées

Les sept souches d'entérobactéries sélectionnées pour cette étude ont été : *E. coli* (n = 2), *K. pneumoniae* (n = 2), *E. cloacae* (n = 2) et *Salmonella* sp. (n = 1). Les résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques ont montré que toutes les souches étaient multi-résistantes (Tableau 11). Le test de synergie a démontré que quatre souches présentaient un phénotype BLSE. Les résultats de la PCR ont montré la présence du gène *bla*_{CTX-M-1} dans *E. coli* S22/12 et le gène *bla*_{SHV} dans *E. coli* S77/15 (tableau 11). Selon les résultats du séquençage, les variants exprimés étaient *bla*_{CTX-M-1} et *bla*_{SHV-12}.

Tableau 11 : Caractéristiques des souches d'entérobactéries testées

Souche testée	TS	Profil de résistance aux antibiotiques	Gene
<i>K. pneumoniae</i> S34/15	+	NA, CIP, LVX, AM, AMC, TIC, PIP, CZ, CF, CTX, SSS, TMP, SXT, TE, C, N	ND
<i>K. pneumoniae</i> S42/15	-	AM, SSS, TMP, SXT, TE, C, N	/
<i>E. coli</i> S22/12	+	NA, CIP, LVX, AM, TIC, PIP, CZ, CF, CTX, SSS, TE	CTX-M-1
<i>E. coli</i> S77/15	+	NA, CIP, LVX, AM, TIC, PIP, CZ, CF, CTX, SSS, TMP, SXT, TE	SHV-12
<i>E. cloacae</i> S63/15	+	NA, CIP, LVX, AM, AMC, TIC, PIP, CZ, CF, CTX, SSS, TMP, SXT, TE, N	ND
<i>E. cloacae</i> S29/15	-	AM, AMC, TIC, PIP, CZ, CF, TE, N	/
<i>Salmonella</i> sp. S61/15	-	NA, CIP, LVX, AM, TIC, PIP	/
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	/	/

TS : Test de synergie, ND : Non Déterminé.

L'émergence et la dissémination de souches d'entérobactéries productrices de BLSE, en particulier *E. coli*, ont été de plus en plus signalées au cours des dernières années parmi des souches d'origine humaine et vétérinaire (Ben Sallem et al., 2014). Parmi les BLSE, le groupe CTX-M-1 était dominant chez des souches d'origine aviaire dans la plupart des études africaines (Alonso et al., 2017). Les bactéries porteuses du gène CTX-M sont fréquemment résistantes à d'autres classes d'antibiotiques (Woodford et al., 2004). Bien que les enzymes SHV n'aient pas subi la dissémination explosive observée pour les variants de type CTX-M (Cantón et al., 2012b), elles ont été retrouvées ces dernières années dans plusieurs espèces d'entérobactéries (Liakopoulos et al., 2016). Les résultats de la présente étude ont signalé la dissémination des souches d'entérobactéries multi-résistantes et les déterminants de résistance aux C3G dans la filière du poulet de chair. Ceci confirme encore une fois nos précédents

résultats, qui ont mis en évidence ces déterminants de résistance dans les ovaires des poules reproductrices chair (Benameur et al., 2018b, Benameur et al., 2019) et dans le contenu interne des œufs à couver (Benameur et al., 2018b), contribuant ainsi à la dissémination des souches résistantes aux antibiotiques dans la filière du poulet de chair. Ces bactéries multi-résistantes aux antibiotiques peuvent être transférées de l'animal à l'homme majorant d'autant le risque d'échec thérapeutique.

3.3. Activité antimicrobienne de HETV

Les résultats de cette étude ont montré que l'HETV exerçait une forte activité antibactérienne vis-à-vis de toutes les souches d'entérobactéries testées avec des diamètres d'inhibition allant de 24 à 40 mm (Tableau 12). L'activité antimicrobienne des HE peut être classée en trois niveaux: absence d'activité (ZI <12 mm), activité modérée (ZI entre 12 et < 20 mm) et forte activité (ZI ≥ 20 mm) (Rota et al., 2008). Les valeurs des CMI rapportées sont comprises entre 2,85 et 11,5 µg/ml. L'activité antibactérienne était significativement plus élevée chez les souches d'entérobactéries productrices de BLSE excepté pour *E. coli* S77/15 porteuse du gène *bla_{SHV-12}* (p<0,0001). *E. coli* S22/12 porteuse du gène *bla_{CTX-M-1}* était plus sensible à l'HETV que *E. coli* ATCC 25922 (p<0,0001) et *K. pneumoniae* S34/15 productrice de BLSE était plus sensible à l'HETV que *K. pneumoniae* S42/15 non productrice de BLSE (p<0,0001). La propriété antimicrobienne des HE du genre *Thymus* vis-à-vis des souches bactériennes sensibles et résistantes aux antibiotiques a été rapportée par plusieurs auteurs (Mancini et al., 2015 ; Nabavi et al., 2015 ; Rota et al., 2008). La propriété antibactérienne de l'HETV pourrait être associée à sa teneur élevée en thymol comme démontré précédemment (Guarda et al., 2011) ainsi qu'à l'effet synergique entre les différents composés de l'HE, à savoir le thymol et le carvacrol (Guarda et al., 2011) et le p-cymène et le carvacrol (Ultee et al., 2002). Le mécanisme d'action de l'HE et de ses constituants n'est pas entièrement élucidé. La présence de nombreux composés phytochimiques dans l'HE font que son activité antibactérienne peut ne pas être attribuable à un mécanisme spécifique, mais serait probablement due à une action sur différentes cibles dans la cellule bactérienne (Burt, 2004). Carson et al. (2006) ont démontré que l'HE de thym provoquait un changement morphologique des cellules d'*E. coli* et leur lyse complète (Carson et al., 2006). L'HE de thym entraînerait des effets délétères sur l'homéostasie en potassium ainsi que sur la respiration glucose dépendante Chez *E. coli* (Degryse et al., 2008).

Tableau 12: Diamètres des zones d'inhibition et les valeurs des CMI de l'HETV

Souche testée	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	CMI ($\mu\text{g/ml}$) de l'HETV
<i>K. pneumoniae</i> S34/15 (ESBL)	39 \pm 0.5	2.857
<i>K. pneumoniae</i> S42/15	35 \pm 0.3	11.5
<i>E. coli</i> S22/12 (<i>bla</i> _{CTX-M-1})	40 \pm 0.3	2.857
<i>E. coli</i> S77/15 (<i>bla</i> _{SHV-12})	30 \pm 0.5	11.5
<i>E. cloacae</i> S63/15 (ESBL)	24 \pm 0.7	2.87
<i>E. cloacae</i> S29/15	35 \pm 0.3	11.5
<i>Salmonella</i> sp. S61/15	35 \pm 0.5	11.5
<i>E. coli</i> ATCC 25922	37 \pm 0.6	11.5

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice. HETV : Huile Essentielle de *Thymus Vulgaris*.

Les FICI de l'HETV combinées avec le CTX ont été calculés pour déterminer leurs interactions possibles vis-à-vis des souches d'entérobactéries productrices de BLSE. Des valeurs élevées de la CMI pour le CTX (32 $\mu\text{g/ml}$) ont été obtenues vis-à-vis de toutes les souches BLSE positives testées (Tableau 13). Les associations HETV/CTX ont montré un effet synergique vis-à-vis d'*E. coli* porteuse du gène *bla*_{SHV-12} (FICI 0,28), un effet additif vis-à-vis d'*E. cloacae* productrice de BLSE (FICI 0,987) et un effet antagoniste vis-à-vis d'*E. coli* porteuse du gène *bla*_{CTX-M-1} et de *K. pneumoniae* productrice de BLSE (9.064).

Tableau 13 : FICI de l'HETV en combinaison avec le CTX

Souches productrices de BLSE	CMI ($\mu\text{g/ml}$) de CTX	CMI ($\mu\text{g/ml}$) de HETV	CMI de l'HETV en combinaison	CMI de CTX en combinaison	FICI
<i>K. pneumoniae</i> S34/15	32	2.857	23	32	9.064
<i>E. coli</i> S22/12 (<i>bla</i> _{CTX-M-1})	32	2.857	23	32	9.064
<i>E. coli</i> S77/15 (<i>bla</i> _{SHV-12})	32	11.5	0.36	8	0.28
<i>E. cloacae</i> S63/15	32	2.87	1.38	16	0.987

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice, CTX : Cefotaxime, FICI : Indice de Concentration Inhibitrice Fractionnaire, HETV : Huile Essentielle de *Thymus Vulgaris*.

La présente étude a rapporté pour la première fois des effets synergiques de l'HETV en combinaison avec le CTX contre les bactéries productrices de BLSE. Cette activité synergique est certainement due au thymol, p-cymène, linalol et à d'autres composés phytochimiques, présents en faibles concentrations dans l'HETV, qui agissent simultanément

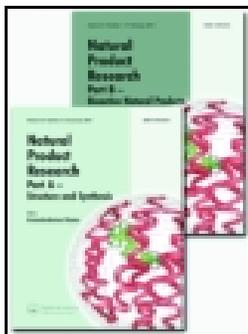
sur différentes cibles de la cellule bactérienne potentialisant ainsi l'activité du CTX. En outre, d'autres études ont démontré que certains composés de plantes pouvaient inhiber efficacement les pompes d'efflux impliqués dans les mécanismes de résistance aux antibiotiques (Mikulášová et al., 2016), ce qui pourrait conduire à la restauration de la sensibilité aux antibiotiques et à réduire leur dose minimale efficace.

4. Conclusion

Les résultats obtenus ont révélé une efficacité remarquable de l'HETV vis-à-vis de toutes les souches d'entérobactéries multi-résistantes aux antibiotiques testées, y compris les souches productrices de BLSE. En outre, son association au CTX a montré une action synergique vis-à-vis d'*E. coli* porteuse du gène *bla_{SHV-12}* et un effet additif vis-à-vis d'*E. cloacae* productrice de BLSE. Ces données démontrent que l'HETV pourrait représenter une alternative pertinente dans la lutte contre la multi-résistance aux antibiotiques chez les souches productrices de BLSE. Cependant, d'autres investigations restent nécessaires pour mieux comprendre le mode d'action de l'HETV en particulier et des HE en général.

Cette étude a donné lieu à une publication intitulée : “*Antibacterial activity of Thymus vulgaris essential oil alone and in combination with cefotaxime against bla_{ESBL} producing multidrug resistant Enterobacteriaceae isolates*”, dans la revue : Natural Product Research (2018) (Impact factor : 1.999).

Auteurs : Qada Benameur, Teresa Gervasi, Vito Pellizzeri, Mária Pľuchtová, Hassiba Tali-Maamar, Farida Assaous, Badia Guettou, Kheira Rahal, Daniela Grul'ová, Giacomo Dugo, Andreana Marino & Meriem-Hind Ben-Mahdi.



Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* essential oil alone and in combination with cefotaxime against bla_{ESBL} producing multidrug resistant Enterobacteriaceae isolates

Qada Benameur, Teresa Gervasi, Vito Pellizzeri, Mária Pľuchtová, Hassiba Tali-Maama, Farida Assaous, Badia Guettou, Kheira Rahal, Daniela Gruľová, Giacomo Dugo, Andreana Marino & Meriem-Hind Ben-Mahdi

To cite this article: Qada Benameur, Teresa Gervasi, Vito Pellizzeri, Mária Pľuchtová, Hassiba Tali-Maama, Farida Assaous, Badia Guettou, Kheira Rahal, Daniela Gruľová, Giacomo Dugo, Andreana Marino & Meriem-Hind Ben-Mahdi (2018): Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* essential oil alone and in combination with cefotaxime against bla_{ESBL} producing multidrug resistant Enterobacteriaceae isolates, *Natural Product Research*, DOI: [10.1080/14786419.2018.1466124](https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1466124)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1466124>

 View supplementary material 

 Published online: 04 May 2018.

 Submit your article to this journal 

 View related articles 

 View Crossmark data 



Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* essential oil alone and in combination with cefotaxime against *bla*_{ESBL} producing multidrug resistant *Enterobacteriaceae* isolates

Qada Benameur^{a,b}, Teresa Gervasi^c, Vito Pellizzeri^c, Mária Pľuchtová^d, Hassiba Tali-Maama^e, Farida Assaous^e, Badia Guettou^e, Kheira Rahal^e, Daniela Gruľová^d, Giacomo Dugo^{c,f} , Andreana Marino^g and Meriem-Hind Ben-Mahdi^{b,h}

^aFaculty of Natural Sciences and Life, Nursing Department, University of Abdelhamid Ibn Badis of Mostaganem, Mostaganem, Algeria; ^bLaboratoire de Recherche «Santé et Production Animale», Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'El-Harrach, Algiers, Algeria; ^cDepartment of Biomedical and Dental Sciences and Morphofunctional Imaging, University of Messina, Messina, Italy; ^dFaculty of Humanities and Natural Sciences, Department of Ecology, University of Prešov, Prešov, Slovakia; ^eLaboratoire de Bactériologie Médicale, Institut Pasteur d'Algérie, Algiers, Algeria; ^fScience4Life, Spin Off Company, University of Messina, Messina, Italy; ^gDepartment of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina, Messina, Italy; ^hEcole Supérieure des Sciences des Aliments et des Industries Agroalimentaires, Algiers, Algeria

ABSTRACT

The aim was to evaluate the susceptibility of *bla*_{ESBL} producing *Enterobacteriaceae* to Slovakian *Thymus vulgaris* essential oil (TVEO) alone and in combination with cefotaxime (CTX). TVEO composition was determined by gas chromatograph-mass spectrometer (GC/MS). Susceptibility to 21 antibiotics was determined by disc diffusion assay. Genes characterization for resistance to β -lactams was accomplished by polymerase chain reaction (PCR). The antibacterial activity was investigated by standard methods. The synergistic interaction was determined by checkerboard test. Thymol (34.5%), p-cymene (22.27%) and linalool (5.35%) were the major components present in the TVEO. The identified strains were multi-drug resistant (MDR). TVEO showed high activity against all MDR strains, including *bla*_{ESBL} producing isolates, with inhibition zones and MIC values in the range of 24–40 mm/10 μ L and 2.87–11.5 μ g/mL, respectively. TVEO in combination with CTX showed a synergistic action against *bla*_{SHV-12} producing *Escherichia coli* (FICI 0.28) and an additive effect vs ESBL producing *Enterobacter cloacae* (FICI 0.987).

ARTICLE HISTORY

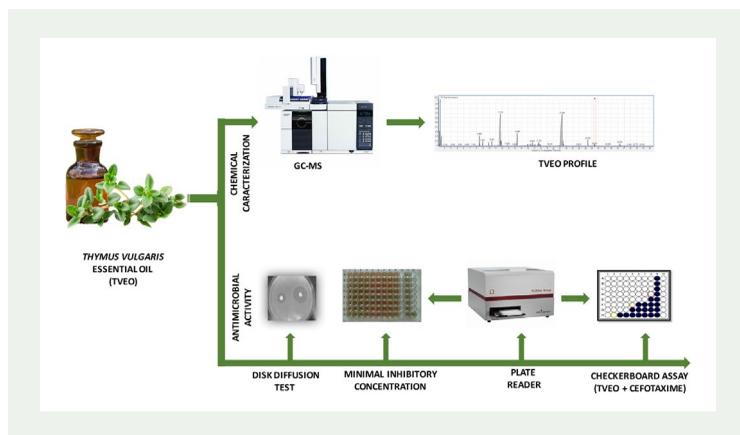
Received 12 December 2017
Accepted 13 April 2018

KEYWORDS

Thymus vulgaris; essential oil; antibacterial-resistance; *Enterobacteriaceae*; ESBL; synergism

CONTACT Teresa Gervasi  tgervasi@unime.it

 Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1466124>.



1. Introduction

One of the main sources of antibiotic resistant bacteria is represented by food-producing animals (Gervasi et al. 2014; Lambrecht et al. 2017).

β -lactam antibiotics including cephalosporins are one of the preferred therapeutic options for treating *Enterobacteriaceae* infections. The persistent exposure of bacterial strains to a multitude of β -lactams has induced dynamic and continuous production and mutation of β -lactamases in these bacteria, expanding their activity even against the newly developed β -lactam antibiotics. These enzymes are known as extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) (Pitout and Laupland 2008). Production of ESBLs is a significant resistance-mechanism that impedes the antimicrobial treatment of infections caused by *Enterobacteriaceae* and is a serious threat to the currently available antibiotic armory (Shaikh et al. 2015). Herbal medicines have always been a rich source of drug discovery programs, and many plant derived compounds have shown promising activity against multidrug resistant (MDR) pathogens (Saeidi et al. 2015). Currently innovative and promising antimicrobial molecules have been extensively studied (Marino et al. 2016). Potential synergy of some essential oils with antibiotics has also been previously postulated, with the aim to alleviate the burden of antimicrobial resistance to conventional antimicrobials (Yahiaoui et al. 2017). It has been showed that *Thymus vulgaris* essential oil (TVEO) had the best antibacterial activity against some *Enterobacteriaceae* species, especially *Escherichia coli* (Rota et al. 2008; Santurio et al. 2014). However, little information is available on the antibacterial activity of TVEO against ESBL producing *Enterobacteriaceae* strains (Anžlovar et al. 2014), and no study has been conducted to investigate its synergistic effect with cefotaxime (CTX) against ESBL producing *Enterobacteriaceae* strains. The aim of this study was to evaluate the susceptibility of *bla*_{ESBL} producing *Enterobacteriaceae* strains to Slovakian origin TVEO and the synergistic interactions between TVEO and CTX.

2. Results and discussion

2.1. Chemical composition of TVEO

The GC-MS analysis identified three major components in TVEO (Table 1). It was observed that thymol (34.50%) was present in the highest concentration in TVEO followed by p-cymene (22.27%) and linalool (5.35%). Significant variation is observed in the chemical composition of the TVEO. Mancini et al. (2015) found that the major component is thymol, followed by carvacrol and caryophyllene oxide. However, Šegvić Klarić et al. (2007) and El Hattabi et al. (2016) reported that the major constituent in this essential oil is carvacrol, followed by p-cymene and E-caryophyllene. As previously reported the variation of the chemical composition of the EOs may be due to many factors such as the geographical origin, genetic factors, plant material and harvesting season (Dugo et al. 2014; Tuttolomondo et al. 2015).

Chemical composition together with the contaminant amount investigation is very important for foods characterization (Di Stefano et al. 2014; Mallamace et al. 2014; Naccari et al. 2014; Cicero et al. 2015; Cacciola et al. 2016; Pantano et al. 2016).

2.2. Antimicrobial susceptibility testing

The seven *Enterobacteriaceae* strains isolated from poultry were identified as *E. coli* ($n = 2$), *Klebsiella pneumoniae* ($n = 2$), *Enterobacter cloacae* ($n = 2$) and *Salmonella* sp. ($n = 1$). Susceptibility testing results showed that all the isolates were MDR to three or more different antimicrobial agents belonging to different classes of antibiotics (Table 2). Among those strains, four phenotypically confirmed ESBL producing *Enterobacteriaceae* isolates were detected. PCR results showed the presence of bla_{CTX-M} gene in *E. coli* S22/12 and bla_{SHV} gene in *E. coli* S77/15 (Table 2). According to the BLAST analysis, the bla_{CTX-M} and bla_{SHV} genes harbored by *E. coli* isolates were $bla_{CTX-M-1}$ (97% query coverage, 98% sequence similarity) and bla_{SHV-12} (93% sequence coverage, 97% sequence identity).

Table 1. *Thymus vulgaris* essential oil composition.

N.	Compound name	RT	RI	%	N.	Compound name	RT	RI	%
1	α -pinene	8,45	939	2,8	15	endo-borneol	16.691	1166	1,1
2	camphene	8.943	951	1,2	16	α -terpineol	17.702	1190	1,5
3	β -pinene	9.894	974	0,9	17	γ -terpineol	17.931	1195	0,5
4	β -myrcene	10.387	992	1,2	18	thymol	21.346	1297	34,5
5	p-mentha-1(7).8-diene	10.829	1001	0,1	19	carvacrol	21.507	1307	1,1
6	3-carene	11.058	1007	Tr	20	4-terpinenyl acetate	21.796	1340	0,2
7	o-cymene	11.286	1020	0,1	21	(-)- β -bourbonene	24.217	1412	Tr
8	p-cymene	11.712	1026	22,3	22	caryophyllene	25.339	1417	1,9
9	D-limonene	11.78	1031	1,1	23	γ -muurolene	26.912	1474	0,1
10	1,8 cineole	11.857	1030	0,9	24	δ -cadinene	28.499	1519	0,1
11	γ -terpinene	12.80	1030	0,2	25	δ -cadinene	28.499	1519	0,1
12	Linalool	14.363	1100	5,3	26	caryophylleneoxide	30.309	1578	0,9
13	fenchol	14.813	1121	Tr	27				
14	isoborneol	16.359	1146	0,6	28				
Total identified									78,7

Notes: RT: Retention time, %: percentage of identified compound.

Table 2. Characteristic of tested *Enterobacteriaceae* strains.

Strain	Antimicrobial resistance profile	<i>Bla</i> gene
<i>Klebsiella pneumoniae</i> S34/15 (ESBL)	NA, CIP, LVX, AM, AMC, TIC, PIP, CZ, CF, CTX, SSS, TMP, SXT, TE, C, N	ND
<i>Klebsiella pneumoniae</i> S42/15	AM, SSS, TMP, SXT, TE, C, N	/
<i>Escherichia coli</i> S22/12 (ESBL)	NA, CIP, LVX, AM, TIC, PIP, CZ, CF, CTX, SSS, TE	CTX-M-1
<i>Escherichia coli</i> S77/15 (ESBL)	NA, CIP, LVX, AM, TIC, PIP, CZ, CF, CTX, SSS, TMP, SXT, TE	SHV-12
<i>Enterobacter cloacae</i> S63/15 (ESBL)	NA, CIP, LVX, AM, AMC, TIC, PIP, CZ, CF, CTX, SSS, TMP, SXT, TE, N	ND
<i>Enterobacter cloacae</i> S29/15	AM, AMC, TIC, PIP, CZ, CF, TE, N	/
<i>Salmonella</i> sp. S61/15	NA, CIP, LVX, AM, TIC, PIP	/
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25,922	/	/

Notes: ESBL: extended-spectrum β -lactamase; NA, nalidixicacid; CIP, ciprofloxacin; LVX, levofloxacin; AM, amoxicillin; AMC, amoxicillin+clavulanicacid; TIC, ticarcillin; PIP, piperacillin; CZ, cefazolin; CF, cephalothin; CTX, cefotaxime; SSS, sulfonamides, TMP, trimethoprim; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole, TE, tetracycline; C, chloramphenicol; N, neomycin; ND: Not determined.

The occurrence and dissemination of ESBL producing *Enterobacteriaceae* strains, especially *E. coli*, has been increasingly reported over the past few years, both in human (Fernandes et al. 2014) and veterinary medicine (Belmahdi et al. 2016). β -lactamases are the primary cause of resistance to β -lactams among members of the family *Enterobacteriaceae*. Based on primary structure (Ambler 1980), enzymatic properties and biochemical attributes (Bush et al. 1995), and the increasingly available amino acid sequences (Bush and Jacoby 2010) four major classes (A, B, C, D) can be acknowledged. Serine β -lactamases belonging to class A are the most abundant (Philippon et al. 2016), with more than 500 enzymes, including the most clinically significant extended spectrum β -lactamases (ESBL) variants, i.e. CTX-M-, TEM-, and SHV-type enzymes (Bush and Fisher 2011). Among ESBLs, the CTX-M-1 group was dominant in most African surveys on husbandry animals (Alonso et al. 2017). Bacteria that produce CTX-Ms. are frequently resistant to other classes of antimicrobial agents (Woodford et al. 2004). The MDR bacteria can be transmitted to human through the food chain adding serious burden to human health (Awad et al. 2016; Benameur et al. 2016).

Surveillance activities in healthy animals worldwide are generating a tremendous amount of data on ESBL distribution. Majority of SHV variants in this reservoir belong to *bla*_{SHV-2'}, *bla*_{SHV-2a'}, *bla*_{SHV-5'}, and *bla*_{SHV-12} (Liakopoulos et al. 2016). Although, SHV enzymes did not undergo the explosive dissemination observed for CTX-M-type variants (Cantón et al. 2012), in recent years they have been found in several *Enterobacteriaceae* (Liakopoulos et al. 2016).

2.3. Antibacterial activity of TVEO

The initial screening of the antibacterial activity of the TVEO showed its very strong activity against all the tested strains, with growth inhibition zones ranging from 24 to 40 mm in diameters (Table 3). The antimicrobial activity of EOs can be classified into three levels: no

Table 3. Diameters of inhibition zones and MIC values of TVEO.

Strains	Diameter of inhibition zone (mm) \pm SD (n = 3)	MIC (μ g/mL) of TVEO
<i>Klebsiella pneumoniae</i> S34/15 (ESBL)	39 \pm 0.5	2.857
<i>Klebsiella pneumoniae</i> S42/15	35 \pm 0.3	11.5
<i>Escherichia coli</i> S22/12 (<i>bla</i> _{CTX-M-1})	40 \pm 0.3	2.857
<i>Escherichia coli</i> S77/15 (<i>bla</i> _{SHV-12})	30 \pm 0.5	11.5
<i>Enterobacter cloacae</i> S63/15 (ESBL)	24 \pm 0.7	2.87
<i>Enterobacter cloacae</i> S29/15	35 \pm 0.3	11.5
<i>Salmonella</i> sp. S61/15	35 \pm 0.5	11.5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25,922	37 \pm 0.6	11.5

Notes: TVEO: Thymus vulgaris essential oil, ESBL: extended spectrum β -lactamase, SD: standard deviation.

Table 4. Fractional inhibitory concentration index (FICI) of TVEO tested in combination with CTX.

Strains	MIC ($\mu\text{g/mL}$) cefotaxime	MIC ($\mu\text{g/mL}$) of TVEO	MIC of TVEO combined with cefotaxime	MIC of cefotaxime combined with TVEO	FICI
<i>Klebsiella pneumoniae</i> S34/15 (ESBL)	32	2.87	23	32	9.064
<i>Escherichia coli</i> S22/12 ($bla_{\text{CTX-M-1}}$)	32	2.87	23	32	9.064
<i>Escherichia coli</i> S77/15 ($bla_{\text{SHV-12}}$)	32	11.5	0.36	8	0.28
<i>Enterobacter cloacae</i> S63/15 (ESBL)	32	2.87	1.38	16	0.987

Notes: ESBL: extended spectrum β -lactamase, TVEO: *Thymus vulgaris* essential oil, CTX: cefotaxime.

activity (inhibition zone < 12 mm), moderate activity (<20–12 mm) and strong activity (inhibition zone \geq 20 mm) (Rota et al. 2008).

The MICs values confirmed the results obtained by the agar disk diffusion method (Table 3). The values ranged from 11.5–2.87 $\mu\text{g/mL}$ against the tested strains. The highest antibacterial activity of TVEO was observed against $bla_{\text{CTX-M-1}}$ producing *E. coli* S22/12 and ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* S34/15 with MIC value of 2.87 $\mu\text{g/mL}$, with both methods. Moreover, $bla_{\text{CTX-M-1}}$ producing *E. coli* was more sensitive to TVEO than $bla_{\text{SHV-12}}$ producing *E. coli* S77/15. TVEO also exhibited significant antibacterial activity against ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* than non ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* S42/15.

The FICI of TVEO combined with CTX were calculated to determine their possible interactions against ESBL producing *Enterobacteriaceae* strains (Table 4). High MIC values for CTX (32 $\mu\text{g/mL}$) were obtained against all strains. Checkerboard test results showed a synergistic effect against $bla_{\text{SHV-12}}$ producing *E. coli* (FICI 0.28), an additive action against ESBL producing *Enterobacter cloacae* (FICI 0.987), and an antagonistic effect against $bla_{\text{CTX-M-1}}$ producing *E. coli* and ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* (9.064).

These dose-dependent effects are in agreement with other studies (Rota et al. 2008; Anžlovar et al. 2014). The antimicrobial properties of essential oils of genus *Thymus* against a wide range of resistant microbial strains have been documented extensively (Nabavi et al. 2015). The antimicrobial properties of TVEO could be associated with the thymol content, which has been tested previously and was found to have a significant antibiotic activity (Guarda et al. 2011). Also, the synergistic effect between the different oil's compounds, i.e., thymol and carvacrol (Guarda et al. 2011) and p-cymene and carvacrol (Ultee et al. 2002) has also been reported. The mechanism of action of EO and their constituents is not fully elucidated. This is complicated by the fact that there are many phytochemicals in EO and its antibacterial activity may not be attributable to one specific mechanism, but probably there are different targets in the bacterial cell (Burt 2004).

There are few published data on combination between CTX and essential oils (Yahiaoui et al. 2017). This is the first report concerning the synergistic effects of TVEO in combination with CTX against ESBL-producing bacteria. This synergistic activity can be attributed to thymol, p-cymene, linalool and other phytochemicals present in minor concentrations in TVEO and to their different targets in the bacterial cell that could potentiate the activity of CTX.

3. Experimental

See Supplementary materials for source of materials, gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS) analysis and evaluation of antimicrobial activity.

4. Conclusion

Extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* has been documented in humans as well as in food-producing birds, including chickens. In this study, the TVEO exhibited high activity against all studied MDR *Enterobacteriaceae* isolates, including ESBL strains. Moreover, TVEO in combination with CTX showed a synergistic action against *bla*_{SHV-12} producing *E. coli* and an additive effect vs ESBL producing *Enterobacter cloacae*.

These data suggest essential oil from Slovakian origin *Thymus vulgaris*, alone or in combination with CTX, has promising antibacterial activity against *bla*_{ESBL} producing MDR *Enterobacteriaceae* isolates and it could be used in several fields such as food and pharmaceuticals. However, further investigations are needed to understand the relation between TVEO and antibacterial-resistance.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

ORCID

Giacomo Dugo  <http://orcid.org/0000-0003-0185-6591>

References

- Alonso CA, Zarazaga M, Ben Sallem R, Jouini A, Ben Slama K, Torres C. 2017. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* in husbandry animals: the African perspective. *Lett Appl Microbiol.* 64(5):318–334.
- Ambler RP. 1980. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 289:321–331.
- Anžlovar S, Baričević D, Avguštin JA, Koce JD. 2014. Essential Oil of Common Thyme as a Natural Antimicrobial Food Additive. *Food Technol Biotechnol.* 52(2):263–268.
- Awad A, Arafat N, Elhadidy M. 2016. Genetic elements associated with antimicrobial resistance among avian pathogenic *Escherichia coli*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 15:299. doi:10.1186/s12941-016-0174-9.
- Belmahdi M, Bakour S, Al Bayssari C, Touati A, Rolain JM. 2016. Molecular characterisation of extended-spectrum β -lactamase- and plasmid AmpC-producing *Escherichia coli* strains isolated from broilers in Béjaïa. *Algeria J Glob Antimicrob Resist.* 6:108–112.
- Benameur Q, Ben-Mahdi MH, Boutaiba Benklaouz M, Tali-Maamar H, Assaous F, Guettou B, Rahal K. 2016. Analysis of high levels of multidrug resistant *Escherichia coli* from healthy broiler chickens in Western Algeria. *Af J Microbiol Res.* 10:1792–1797.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int J Food Microbiol.* 94:223–253.
- Bush K, Fisher JF. 2011. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -Lactamases from gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 65:455–478.
- Bush K, Jacoby GA. 2010. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 54:969–976.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 39:1211–1233.

- Cacciola F, Beccaria M, Oteri M, Utczas M, Giuffrida D, Cicero N, Dugo G, Dugo P, Mondello L. 2016. Chemical characterisation of old cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) seed oil by liquid chromatography and different spectroscopic detection systems. *Nat Prod Res.* 30:1646–1654.
- Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. 2012. CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Front Microbiol.* 3:110. doi:10.3389/fmicb.2012.00110.
- Cicero N, Corsaro C, Salvo A, Vasi S, Giofrè SV, Ferrantelli V, Di Stefano V, Mallamace D, Dugo G. 2015. The metabolic profile of lemon juice by proton HR-MAS NMR: the case of the PGI interdonato lemon of Messina. *Nat Prod Res.* 29:1894–1902.
- Di Stefano V, Pitonzo R, Cicero N, D'Oca MC. 2014. Mycotoxin contamination of animal feeding stuff: detoxification by gamma-irradiation and reduction of aflatoxins and ochratoxin A concentrations. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 31(12):2034–2039.
- Dugo G, Franchina FA, Scandinaro MR, Bonaccorsi I, Cicero N, Tranchida PQ, Mondello L. 2014. Elucidation of the volatile composition of Marsala wines by using comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Food Chem.* 142:262–268.
- El Hattabi L, El Madani N, Charrouf Z, Costa J, Desjobert JM, Tabyaoui M. 2016. Studies on chemical composition, phenolic contents and antioxidant activities of three *Thymus* essential oils from Morocco. *Der Pharma Chemica.* 8(7):7–15.
- Fernandes R, Amador P, Oliveira C, Prudêncio C. 2014. Molecular characterization of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Northern Portugal. *Sci World J.* 2014:782897.
- Gervasi T, Lo Curto R, Minniti E, Narbad A, Mayer MJ. 2014. Application of *Lactobacillus johnsonii* expressing phage endolysin for control of *Clostridium perfringens*. *Let Appl Microbiol.* 59:355–361.
- Guarda A, Rubilar JF, Miltz J, Galotto MJ. 2011. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *Int J Food Microbiol.* 146:144–150.
- Lambrecht E, Van Meervenue E, Boon N, Van de Wiele T, Wattiau P, Herman L, Heyndrickx M, Van Coillie E. 2017. Characterization of cefotaxime- and ciprofloxacin-resistant commensal *Escherichia coli* originating from Belgian farm animals indicates high antibiotic resistance transfer rates. *Microb Drug Resist.* doi:10.1089/mdr.2017.0226.
- Liakopoulos A, Mevius D, Ceccarelli D. 2016. A review of SHV extended-spectrum β -Lactamases: neglected yet ubiquitous. *Front Microbiol.* 7:1374. doi:10.3389/fmicb.2016.01374.
- Mallamace D, Corsaro C, Salvo A, Cicero N, Macaluso Giangrosso G, Ferrantelli V, Dugo G. 2014. A multivariate statistical analysis coming from the NMR metabolic profile of cherry tomatoes (The Sicilian Pachino case). *Physica A.* 401:112–117.
- Mancini E, Senatore F, Del Monte D, De Martino L, Grulova D, Scognamiglio M, Snoussi M, De Feo V. 2015. Studies on chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Five *Thymus vulgaris* L. *Essent Oils Mol.* 20:12016–12028.
- Marino A, Zengin G, Nostro A, Ginestra G, Dugo P, Cacciola F, Miceli N, Taviano MF, Filocamo A, Bisignano G, et al. 2016. X-ray Antimicrobial activities, toxicity and phenolic composition of *Asphodeline anatolica* E. Tuzlaci leaf extracts from Turkey. *Nat Prod Res.* 2:1–9.
- Nabavi SM, Marchese A, Izadi M, Curti V, Daglia M, Nabavi SF. 2015. Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: from farm to pharmacy. *Food Chem.* 173:339–347.
- Naccari C, Macaluso A, Giangrosso G, Naccari F, Ferrantelli V. 2014. Risk assessment of heavy metals and pesticides in honey From Sicily (Italy). *J Food Res.* doi:10.5539/jfr.v3n2p107.
- Pantano L, Lo Cascio G, Alongi A, Cammilleri G, Vella A, Macaluso A, Cicero N, Migliazzo A, Ferrantelli V. 2016. Fatty acids determination in Bronte pistachios by gas chromatographic method. *Nat Prod Res.* doi:10.1080/14786419.2016.1180599.
- Philippon A, Slama P, Dény P, Labia R. 2016. A structure-based classification of class A β -Lactamases, a broadly diverse family of enzymes. *Clin Microbiol Rev.* 29:29–57.
- Pitout JD, Laupland KB. 2008. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public health concern. *The Lan Infect Dis.* 8(3):159–166.
- Rota MC, Herrera A, Martínez RM, Sotomayor JA, Jordán MJ. 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control.* 19:681–687.

- Saeidi S, Boroujeni NA, Ahmadi H, Hassanshahian M. 2015. Antibacterial activity of some plant extracts against extended-Spectrum Beta-lactamase producing *Escherichia coli* Isolates. Jundishapur J Microbiol. 8(2):e15434.
- Santurio DF, Jesus FPK, Zanette RA, Schlemmer KB, Fraton A, Martins Fries LL. 2014. Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Thyme and of Thymol against *Escherichia coli* Strains. Acta Sci Vet. 42:1234.
- Šegvić Klarić M, Kosalec I, Mastelić J, Piecková E, Pepeljnak S. 2007. Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. Letters appl Microbiol. 44(1):36–42.
- Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi SM, Kamal MA. 2015. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. Saudi J Biol Sci. 22:90–101.
- Tuttolomondo T, Giacomo D, Giuseppe R, Leto C, Napoli EM, Cicero N, Gervasi T, Giuseppe V, Leone R, Licata M, La Bella S. 2015. Study of quantitative and qualitative variations in essential oils of Sicilian *Rosmarinus officinalis* L. Nat Prod Res. 29, 20:1928–1934.
- Ultee A, Bennik MH, Moezelaar R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the foodborne pathogens *Bacillus cereus*. Appl Environ Microbiol. 68:1561–1568.
- Woodford N, Ward ME, Kaufmann ME, Turton J, Fagan EJ, James D, Johnson AP, Pike R, Warner M, Cheasty T, et al. 2004. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum β -lactamases in the UK. J Antimicrob Chemother. 54(4):735–743.
- Yahiaoui F, Benameur Q, Ben-mahdi MH. 2017. antibacterial activity of *Mentha pulegium* essential oil against avian isolated ESBL producing bacteria and its synergistic potential with antibiotics. Int J Pharm Pharm Sci. 9(6):35–41.

Discussion générale

Discussion générale

La résistance aux antibiotiques est devenue une préoccupation majeure en santé humaine et animale en Algérie. En effet, ces dix dernières années ont été marquées par une importante augmentation de la résistance aux antibiotiques en particulier chez les entérobactéries. Les résultats de notre première étude ont montré un haut niveau de résistance à presque tous les antibiotiques couramment utilisés dans le traitement des pathologies aviaires tels que les β -lactamines et les fluoroquinolones. Cette haute proportion de résistance a également été signalée ces dernières années dans différentes régions d'Algérie (Ahmed Ammar et al., 2017 ; Halfaoui et al., 2017), où un usage souvent abusif et irréfléchi de ces molécules d'antibiotiques en aviculture est constaté.

La nature de cette résistance devient de plus en plus inquiétante avec l'émergence de nouveaux déterminants de résistance à de nombreuses familles d'antibiotiques d'importance critique tels que les fluoroquinolones et les C3G. Ces dernières années, la dissémination des souches d'*E. coli* porteuses des gènes *bla*_{ESBL} et/ou *qnr* a été de plus en plus rapportée dans la filière avicole chair en Algérie (Belmahdi et al., 2016 ; Chabou et al., 2017 ; Meguenni et al., 2015). En effet, les résultats obtenus lors de notre seconde étude ont révélé une association entre les gènes *qnrS1* et la *bla*_{CTX-M-1} dans des souches d'*E. coli*. Une autre étude a également démontré la présence de gène *qnrA* dans des souches d'*E. coli* d'origine aviaire productrices de BLSE de type CTX-M-1 et SHV-12, en Algérie (Belmahdi et al., 2016).

Il est actuellement prouvé que l'utilisation des antibiotiques, notamment les C3G à titre curatif est le facteur de risque le plus important dans le développement de résistances bactériennes (Rubin et Samore, 2002). Or, les C3G ne sont pas utilisés en aviculture en Algérie. Certains chercheurs ont suggéré que l'utilisation des quinolones serait liée à l'émergence de cette résistance aux C3G (Meradi et al., 2011).

En outre, l'importation d'animaux reproducteurs a été suggérée comme la source la plus probable d'introduction de la résistance aux antibiotiques dans la filière avicole chair dans plusieurs pays considérés comme de faibles utilisateurs d'antibiotiques (Dierikx et al., 2013; Mo et al., 2014). Les résultats de notre troisième étude ont mis en évidence, pour la première fois, la présence des *E. coli* productrices de BLSE de type CTX-M-1 et SHV-12 dans les ovaires des poules reproductrices chair saines et qui pourrait ainsi constituer un facteur important dans la dissémination des bactéries résistantes aux antibiotiques dans la filière avicole. En plus, nous avons mis en évidence, au cours de notre deuxième étude, un clone

d'*E. coli* porteur de gènes CTX-M-1 et *qnrS1* dans les ovaires d'un élevage de poules reproductrices chair et le contenu interne des œufs à couver produits par la même bande de poules reproductrices chair. Ces résultats sont venus confirmer l'hypothèse d'une transmission verticale d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques, des poules reproductrices à leur descendance, également récemment décrite dans d'autres pays (Börjesson et al., 2015 ; Dierikx et al., 2013 ; Mo et al., 2014).

Au-delà de la résistance aux quinolones et/ou aux C3G, les souches porteuses de ces déterminants de résistance sont, dans leur très grande majorité, aussi résistantes aux autres familles d'antibiotiques, notamment aux tétracyclines et au triméthoprim/sulfaméthoxazole. Cette multi-résistance est généralement associée aux éléments génétiques mobiles qui jouent un rôle très important dans la dissémination de plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques dans les isolats d'*E. coli*. Cette résistance peut persister même en absence de l'utilisation de ces molécules d'antibiotiques (Kempf et Zeitouni, 2012). En effet, le chloramphénicol et la gentamycine sont des antibiotiques interdits chez les animaux de rente en Algérie et pourtant notre étude ainsi que plusieurs études précédentes ont signalé des résistances d'*E. coli* d'origine animale à ces molécules d'antibiotiques (Halfaoui et al., 2017). Cette persistance de la résistance pourrait s'expliquer par le phénomène de co-sélection des résistances comme rapporté précédemment (Pai et al., 2006).

La lutte contre les entérobactéries multi-résistantes aux antibiotiques représente un enjeu majeur de santé humaine et animale, particulièrement illustrée par la dissémination des entérobactéries productrices de BLSE et de carbapénèmases en médecine humaine et vétérinaire, qui ne sont plus sensibles le plus souvent qu'à la colistine, devenu un traitement de dernier recours (Biswas et al., 2012). Le problème de la résistance aux polymyxines se pose plus particulièrement pour les souches d'entérobactéries productrices de BLSE. En effet, dans un grand nombre de cas les souches d'*E. coli* productrices de MCR-1 étaient également productrices d'une BLSE notamment dans certains pays tels que l'Italie (Cannatelli et al., 2016 ; Giufre et al., 2016) où l'utilisation de cette classe d'antibiotique est devenue routinière du fait de l'endémicité des entérobactéries productrices de BLSE et de carbapénèmases. Deux termes sont récemment apparus pour évoquer l'isolement possible de bactéries hautement résistantes (BHR) et celles toto-résistantes (BTR) (Magiorakos et al., 2012). Ces souches ont été récemment identifiées sous forme de petits foyers en médecine humaine dans le nord de l'Algérie (Bakour et al., 2012).

Face à l'endémicité des entérobactéries multi-résistantes aux antibiotiques et face à la menace d'impasse thérapeutique vis-à-vis des infections causées par les entérobactéries productrices de BLSE, il devient primordial de trouver des solutions alternatives innovantes. Ces dernières années, la communauté scientifique a montré un intérêt considérable pour l'étude de nouveaux antimicrobiens d'origine végétale. Des études récentes ont montré que les HE et leurs constituants présentaient un potentiel important en tant qu'agents antimicrobiens et ce dans plusieurs domaines aussi bien industriels que médicaux (Baser et al., 2000).

Les résultats de la quatrième et de la cinquième étude ont démontré que les HE de *C. arabicus*, *B. imbricatum* et surtout de *Thymus vulgaris* pourraient représenter une alternative pertinente dans la lutte contre la multi-résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries. En outre, notre étude a permis la mise en évidence pour la première fois un effet synergique entre les HE de *C. arabicus* et de *B. imbricatum* et certains antibiotiques conventionnels (la néomycine et l'amoxicilline) et entre l'HETV et le CTX vis-à-vis d'*E. coli* porteuse du gène *bla_{SHV-12}*. L'effet synergique résultant de la combinaison des antibiotiques avec les HE a déjà été signalé et souvent étudié par plusieurs auteurs (Ait Dra et al., 2017 ; Behbahani et al., 2018 ; Van Vuuren et al., 2009 ; Yahiaoui et al., 2017). L'aromathérapie représente en effet un outil thérapeutique très efficace qui permet d'élargir le champ des traitements médicaux conventionnels.

Les composés chimiques de grande efficacité sont les phénols (thymol, carvacrol), les alcools (α -terpinène et linalol), les aldéhydes, les cétones et plus rarement les terpènes. Des espèces de genre *Thymus* riches en phénols ont un spectre d'action antibactérien très large (Amarti et al., 2011). Les résultats de notre étude ont montré que l'HE de thym, dont le composé majoritaire est de nature phénolique, a une activité antibactérienne prometteuse vis-à-vis de toutes les souches d'entérobactéries testées (les valeurs des CMI rapportées variaient entre 2,87 et 11,5 $\mu\text{g/ml}$). Cette propriété antibactérienne serait en grande partie due aux composés phénoliques (thymol et carvacrol) présents majoritairement dans cette HE. En effet, les composés phénoliques peuvent causer des dommages au niveau de la membrane externe des bactéries, ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire aux protons et aux ions potassiums, une réduction des réserves de l'ATP intracellulaire, une perturbation de la force proton motrice et une dénaturation des protéines intracellulaires (Lambert et al., 2001). Cependant, les phénols ne sont pas les seuls responsables de l'intégralité de l'activité. En effet, certaines études ont prouvé que l'activité antimicrobienne des HE dans son

intégralité pouvait être supérieure à celle de ses composés majoritaires testés séparément (Lahlou, 2004).

En général, les HE possèdent un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celle des virus, des moisissures, et des levures. De plus, les HE possèdent, en plus de leur propriété anti-infectieuse, d'autres propriétés pharmacologiques : activités anti-inflammatoires et anti-oxydantes (Aghraz et al., 2017), des actions immunostimulantes (Haze, 2005), et des effets dans l'amélioration des performances zootechniques (Ben-Mahdi et al., 2010 ; Goodarzi et Nanekarani, 2014).

*Conclusion générale, recommandations
et perspectives*

Conclusion générale, recommandations et perspectives

La présente étude a permis de mettre en évidence des résistances de hauts niveaux vis-à-vis des antibiotiques habituellement utilisée dans le traitement des pathologies aviaires en Algérie. Les résultats obtenus étaient pour le moins alarmants dans la mesure où la majorité des souches d'*E. coli* étaient multi-résistantes à presque tous les antibiotiques d'importance critique en médecine vétérinaire. La caractérisation moléculaire des mécanismes de résistance aux quinolones et aux C3G a mis en évidence l'existence des gènes *qnrS1*, CTX-M-1, SHV-12 et TEM-1. Le gène *qnr* a été observé seul ou associées à la production des BLSE de type CTX-M-1.

Les résultats de notre étude sur la présence des *E. coli* productrices de BLSE de type CTX-M-1 et SHV-12 dans les ovaires des poules reproductrices chair saines et d'un clone d'*E. coli* porteur des gènes CTX-M-1 et *qnrS1* chez des poules reproductrices chair et le contenu interne des œufs à couver pourraient être les principaux facteurs de risque pour la dissémination de la multi-résistance dans tous les niveaux de la filière avicole chair en Algérie. D'une manière générale, l'ensemble des résultats obtenus au cours de notre étude va dans le sens d'une augmentation des niveaux de la multi-résistance.

Ainsi, au vu des résultats obtenus dans la présente étude, nous recommandons :

- Le retrait de certains antibiotiques, qui connaissent des niveaux alarmants de résistance, dans le traitement des pathologies aviaires en Algérie tels que ceux signalé dans la présente étude (tétracycline, amoxicilline, acide nalidixique et fluméquine) ou du moins d'en encadrer l'usage ;
- L'utilisation prudente et responsable des antibiotiques qui restent efficaces chez les animaux, comme la colistine, en rendant leur prescription obligatoire par le vétérinaire ;
- La lutte contre l'utilisation non réglementaire de certains antibiotiques qui sont interdits dans la filière des animaux de rente en Algérie tels que le chloramphénicol et la nitrofurantoïne ;
- La formation et la sensibilisation des éleveurs sur l'utilisation prudente et responsable des antibiotiques, le problème de l'antibiorésistance et les risques associés ;
- Renforcer les capacités techniques et logistiques pour la mise en œuvre des bonnes pratiques d'hygiène, aux niveaux des bâtiments d'élevages et des couvoirs, afin de

réduire la transmission horizontale et verticale des micro-organismes résistants dans la filière avicole ;

- L'installation des locaux modernes pour l'abattage et la sensibilisation des abatteurs de volaille au respect des conditions de l'hygiène lors des opérations d'abattage pour assurer une meilleure maîtrise des techniques modernes d'abattage ;
- Renforcement des capacités des laboratoires nationaux dans le domaine du suivi de la résistance aux antimicrobiens et de la détection des résidus d'agents antimicrobiens dans les produits alimentaires et l'environnement.

Ces recommandations devraient être considérées avec intérêt dans la mesure où elles rejoignent le plan mondial de l'OMS qui souligne la nécessité d'adopter une approche « One Health » pour combattre la résistance aux antibiotiques.

Les résultats de notre étude sur la colonisation des ovaires des poules reproductrices chair saines et le contenu interne des œufs à couver par *E. coli* multi-résistantes devront nécessairement être pris en compte dans l'élaboration d'un futur vaccin efficace contre ces souches. Il serait également intéressant de poursuivre l'étude sur la recherche des déterminants de résistance aux antibiotiques d'importance critique ainsi que ceux utilisés en dernier recours comme la colistine à tous les niveaux de la filière avicole, y compris chez les poussins reproducteurs chair d'un jour de l'importation, en utilisant les méthodes de typage épidémiologique moléculaire, afin de déterminer l'origine de ces bactéries et limiter la propagation de la résistance aux antibiotiques dans la filière avicole en Algérie.

La mise en place des systèmes de surveillance en continu de la consommation d'antibiotiques et de la résistance aux antibiotiques en médecine vétérinaire ainsi que la diffusion des données entre les différents secteurs au niveau national constitue également l'un de nos objectifs futurs.

En outre, le développement de nouveaux antibiotiques, l'optimisation des méthodes diagnostiques et le développement des solutions alternatives au traitement antibiotique (vaccins, peptides antibactériens, bactériophages...) restent des pistes intéressantes pour faire face au problème de la résistance aux antibiotiques.

Face à cette problématique, la seconde partie de notre travail a porté sur l'étude de l'activité antibactérienne des HE de trois plantes médicinales ; *C. arabicus*, *B. imbricatum* et *Thymus vulgaris*, et a permis de démontrer que ces huiles pouvaient représenter une alternative

pertinente dans la lutte contre la multi-résistance aux antibiotiques chez les souches d'entérobactéries. En plus, notre étude a permis la mise en évidence pour la première fois d'un effet synergique entre les HE de *C. arabicus* et de *B. imbricatum* et certains antibiotiques conventionnels tels que la néomycine et l'amoxicilline. L'association entre l'HETV et le CTX a également démontré un effet synergique vis-à-vis d'*E. coli* porteuse du gène *bla_{SHV-12}* et un effet additif vis-à-vis d'*E. cloacae* productrice de BLSE.

À la lumière des résultats obtenus, il apparaît certain que l'utilisation des HE en médecine vétérinaire comme produit antibactérien est envisageable pour résoudre le problème de la résistance aux antibiotiques. L'utilisation des HE, dans le domaine vétérinaire, à la place des antibiotiques tant en aromathérapie qu'en tant que complément alimentaire pour l'amélioration des performances zootechniques a été démontrée par plusieurs chercheurs et pourrait être envisagée dans le but de réduire l'utilisation des antibiotiques. En outre, l'exploitation des autres activités biologiques des HE (anti-inflammatoire, anti-oxydantes,...) est une mesure sanitaire et zootechnique intéressante pouvant s'avérer efficace dans le traitement et la prévention des différentes pathologies.

Des travaux approfondis restent nécessaires à mener sur l'innocuité et les modes d'action des HE testées afin de contribuer à leur valorisation dans le dessein d'une meilleure exploitation.

De nouvelles perspectives peuvent être envisagées par l'évaluation de leur effet inhibiteur du quorum sensing et leur effet anti-biofilm. Il serait également intéressant d'étudier l'activité antibactérienne des HE en mélange pour démontrer un éventuel effet synergique. En fin, nous espérons d'ici quelques années être en mesure de proposer des nouveaux produits antibactériens locaux plus efficaces et plus respectueux de la santé publique et de l'environnement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdelraouf, K., Braggs, K.H., Yin, T., Truong, L.D., Hu, M. and Tam, V.H. (2012) Characterization of polymyxin B-induced nephrotoxicity: implications for dosing regimen design. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 56: 4625-4629.
- Agabou, A., Lezzar, N., Ouchenane, Z., Khemissi, S., Satta, D., Sotto, A., Lavigne, J.P. and Pantel, A. (2015) Clonal relationship between human and avian ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* isolates in North-Eastern Algeria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 35: 227-234.
- Agerso, Y., Jensen, J.D., Hasman, H., and Pedersen, K. (2014) Spread of extended spectrum cephalosporinase-producing *Escherichia coli* clones and plasmids from parent animals to broilers and to broiler meat in a production without use of cephalosporins. *Foodborne. Pathog. Dis.*, 11: 740-746.
- Aggad, H., Ammar, Y.A., Hammoudi, A. and Kihal, M. (2010) Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis. *Glob. Vet.*, 4: 303-306.
- Aghraz, A., Jürgen, W., Erich, S., Aitdra, L., Aitsidibrahim, M., Tabanca, N., Abbas, A., Hassani, L., Markouk, M., Leopold, J. and Larhsini, M. (2016) Chemical Composition, Antioxidant, Antimicrobial and Insecticidal Activities of Essential Oil from a Moroccan Endemic Plant: *Buboniumimbricatum*. *Nat. Prod. Commun.*, 11: 1717–1720.
- Aghraz, A., Jürgen, W., Erich, S., Aitdra, L., Aitsidibrahim, M., Tabanca, N., Abbas, A., Hassani, L., Markouk, M., Leopold, J. and Larhsini, M. (2017) Chemical Composition, in vitro Antioxidant, Antimicrobial and Insecticidal Activities of Essential Oil from *Cladanthusarabicus*. *J. Essent. Oil-Bearing. Plants.*, 3: 601-609.
- Ahmed Ammar, Y., Moulay, M., Bouzid, R., Benameur, Q. and Aggad, A. (2017) Bacterial Resistance of Enterobacterea isolates in Western Algeria. *J. Appl. Environ. Biol. Sci.*, 7(1): 140-145.
- Aiba, Y., Suzuki, N., Kabir. A.M. et al (1998) Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Am. J. Gastroenterol.*, 93:2097-2101.
- Ait-Dra, L., Brahim, M. A. S., Boualy, B., Aghraz, A., Barakate, M., Oubaassine, S. and Larhsini, M. (2017) Chemical composition, antioxidant and evidence antimicrobial synergistic effects of *Periploca laevigata* essential oil with conventional antibiotics. *Ind. Crops. Prod.*, 109: 746-752.
- Akisu, M., Baka, M., Yalaz, M. et al (2003) Supplementation with *Saccharomyces boulardii* ameliorates hypoxia/reoxygenationinduced necrotizing enterocolitis in young mice. *Eur. J. Pediatr. Surg.*, 13:319-323.

- Alanis, A.J. (2005) Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? Arch. Med. Res., 36:697-705.
- Alekshun, M.N. and Levy, S.B. (2007) Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. Cell., 128: 1037-1050.
- Al-Hamad, A., Burnie, J. and Upton, M. (2011) Enhancement of antibiotic susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* using a polyclonal antibody developed against an ABC multidrug efflux pump. Can. J. Microbiol., 57:820-828.
- Alleman, F., Gabriel, I., Dufourcq, V., Perrin, F. and Gabarrou, J.F. (2013) Utilisation des huiles essentielles en alimentation des volailles. 1. Performances de croissance et réglementation. INRA. Prod. Anim., 26(1) : 3-12.
- Allou, N., Cambau, E., Massias, L., Chau, F. and Fantin, B. (2009) Impact of low-level resistanceto fluoroquinolones due to *qnrA1* and *qnrS1* genes or a *gyrA* mutation on ciprofloxacin bactericidal activity in a murine model of *Escherichia coli* urinary tract infection. Antimicrob. Agents. Chemother., 53:4292-4297.
- Alloui, N. (2011) Situation actuelle et perspectives de modernisation de la filiere avicole en Algerie. Neuviemes Journees de la Recherche Avicole, Tours, 29 et 30 mars 2011.
- Alonso, C.A., Zarazaga, M., Ben Sallem, R., Jouini, A., Ben Slama, K. and Torres, K. (2017) Antibiotic resistance in *Escherichia coli* in husbandry animals: the african perspective. Lett. Appl. Microbiol., 64(5):318-334.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol., 215(3):403-410.
- Amarti, F., Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A., Aarab, L., et al. (2010). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. Biotechnol. Agron. Soc. Environ., 14(1), pp. 141-148.
- Amarti, F., El Ajjouri, M., Ghanmi, M., et al. (2011) Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc. Phytothérapie., 9: 149-157.
- Ambler, R.P. (1980) The structure of beta-lactamases. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 289:321-331.
- Andremont, A. (2000) Conséquences de l'antibiothérapie sur l'écosystème intestinal. Ann. Fr. Anesth. Réani; 19: 395-402.
- Andriole, V.T. (2005) The quinolones: past, present, and future. Clin. Infect. Dis., 41 Suppl 2: 113-119.

- Antunes, L.C., Ferreira, R.B., Buckner, M.M., Finlay, B.B. (2010) Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology.*, 156:2271-2282.
- Anžlovar, S., Baričević, D., Avguštin, J.A. and Koce, J.D. (2014) Essential Oil of Common Thyme as a Natural Antimicrobial Food Additive. *Food. Technol. Biotechnol.*, 52(2): 263-268.
- Arlet, G., Rouveau, M., Philippon, A. (1997) Substitution of alanine for aspartate at position 179 in the SHV-6 extended-spectrum beta-lactamase, *FEMS. Microbiol. Lett.*, 152: 163-167.
- Arlet, R. (2006) Les nouvelles BLSE Conference Hopital Tenon. Université Pierre et Marie Curie. Disponible: <http://www.microbe-edu.org/mecanisme/conference/garicai.pdf>.
- Baba Ahmed-Kazi Tani, Z., Decré, D., Genel, N., Boucherit-Otmani, Z., Arlet, G. and Drissi, M. (2013) Molecular and epidemiological characterization of enterobacterial multi-drug-resistant strains in Tlemcen Hospital (Algeria) (2008–2010). *Microb. Drug. Resist.*, 19:185-190.
- Baba Ahmed-Kazi Tani, Z. and Arlet, G. (2014) Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie. *Pathol. Biol.*, 62 : 169-178.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., et al (2008) Biological effects of essential oils, a review. *Food. Chem. Toxicol.*, 46:446-475.
- Bakour, S., Kempf, M., Touati, A., Ait, A.A., Haouchine, D., Sahli, F., et al. (2012) Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in two university hospitals in Algeria. *J. Med. Microbiol.*, 61:1341-1343.
- Balje, S.Y., Simmy, G., Ritika, Y., Roshanlal, Y. (2015) Antimicrobial activity of individual and combined extracts of selected spices against some pathogenic and food spoilage microorganisms. *Int. Food. Res. J.*, 22: 2594-2600.
- Banque mondiale, (2016) Drug-resistant infections: A threat to our economic future. Part VI. Antimicrobial use in animals and AMR, pp. 65-78. Banque mondiale, Washington, DC., 20433.
- Baser, K.H.C., Demici, B., Demici, F., et al., (2000) Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Achillea multifida*. *Planta. Med.*, 68(10): 941-943.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., Turck, M. (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45: 493-496.
- Behbahani, B. A., Yazdi, F. T., Vasiee, A., Mortazavi, S. A. (2018) *Oliveria decumbens* essential oil: Chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some clinical and standard strains causing infection. *Microb. Pathog.*, 114: 449-452.

- Belmahdi, M., Bakour, S., Al Bayssari, C., Touati, A., Rolain, J.M. (2016) Molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase- and plasmid AmpC-producing *Escherichia coli* strains isolated from broilers in Béjaïa, Algeria. *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, 6: 108-112.
- Ben Sallem, R., Ben Slama, K., Rojo-Bezares, B., Porres-Osante, N., Jouini, A., et al. (2014) IncII plasmids carrying *bla*(CTX-M-1) or *bla*(CMY-2) genes in *Escherichia coli* from healthy humans and animals in Tunisia. *Microb. Drug. Resist.*, 20: 495-500.
- Benameur, Q., Guemour, D., Hammoudi, A., Aoudia, K., Aggad, H., Humblet, M.H., Saegermang, C. (2014) Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from chickens in West of Algeria. *Int. J. Sci. Basic. Appl. Res.*, 13: 366-370.
- Benameur, Q., Ben-Mahdi, M.H., Boutaiba Benklaouz, M., Tali-Maamar, H., Assaous, F., Guettou, B., Rahal, K. (2016) Analysis of high levels of multidrug resistant *Escherichia coli* from healthy broiler chickens in Western Algeria. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 10: 1792-1797.
- Benameur, Q., Tali-Maamar, H., Assaous, F., Guettou, B., Boutaiba Benklaouz, M., Rahal, K., Ben-Mahdi, M.H. (2018a) Characterization of quinolone-resistant Enterobacteriaceae strains isolated from poultry in Western Algeria: First report of *qnrS* in an *Enterobacter cloacae*. *Vet. World.*, 11: 469-473.
- Benameur, Q., Tali-Maamar, H., Assaous, F., Guettou, B., Tahrat, N., Aggoune, N., Rahal, K., Ben-Mahdi, M.H. (2018b) Isolation of *Escherichia coli* carrying the *bla*CTX-M-1 and *qnrS1* genes from reproductive organs of broiler breeders and internal contents of hatching eggs. *J. Vet. Med. Sci.*, <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0283>.
- Benameur, Q., Tali-Maamar, H., Assaous, F., Guettou, B., Rahal, K., Ben-Mahdi, M.H. (2019) Detection of multidrug resistant *Escherichia coli* in the ovaries of healthy broiler breeders with emphasis on extended-spectrum β -lactamases producers. *Comparative. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 64:163-167.
- Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A.V., et al (2008) A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Anim. Feed. Sci. Technol.*, 145:209-228.
- Ben-Mahdi, M.H., Djellout, B., Bouzagh-Belazouz, T., Yahiaoui, F., Ben-Mahdi, N.R. (2010) Intérêt de l'huile essentielle de thym dans l'amélioration des performances zootechniques et sanitaires du poulet de chair. *Livestock Res. Rural. Dev.*, 22, Article 112.
- Bennett, P. M. (2008) Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br. J. Pharmacol.*, 153 Suppl, 1:S347-57.

- Binda, E., Marinelli, F., Marcone, G. (2014) Old and new glycopeptide antibiotics: action and resistance. *Antibiotics.*, 3: 572-594.
- Bischoff, K.M., White, D.G., Hume, M.E., Poole, T.L., Nisbet, D.J., (2005) The chloramphenicol resistance gene *cmlA* is disseminated on transferable plasmids that confer multiple-drug resistance in swine *Escherichia coli*. *FEMS. Microbiol. Lett.*, 243: 285-291.
- Biswas, S., Brunel, J.M., Dubus, J.C., Reynaud-Gaubert, M., Rolain, J.M. (2012) Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert Rev Anti Infect Ther.*, 10:917-934.
- Boelens, M.H. (1996) Chemical and sensory evaluation of trace compounds in naturals. *Perfum. Flavor.*, 21:25-31.
- Bohlmann, J., Keeling, C.I. (2008) Harnessing plant biomass for biofuels and biomaterials. Terpenoid biomaterials. *Plant. J.*, 54:656-669.
- Bonnet, R., Sampaio, J.L., Labia, R., De Champs, C., Sirot, D., Chanal, C., Sirot, J. (2000) A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in céfotaxime resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 44:1936-1942.
- Bonnet, R. (2004) Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-Menzymes. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 48:1-14.
- Börjesson, S., Guillard, T., Landen, A., Bengtsson, B., Nilsson, O. (2015) Introduction of quinolone resistant *Escherichia coli* to Swedish broiler population by imported breeding animals. *Vet. Microbiol.*, <http://dx.doi.org/10.1016/J.vetmic.2015.11.004>.
- Bortolaia, V., Bisgaard, M., Bojesen, A.M. (2010) Distribution and possible transmission of ampicillin- and nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* within the broiler industry. *Vet. Microbiol.*, 142, 379-386.
- Boucher, Y., Labbate, M., Koenig, J.E., et al., (2007) Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. *Trends. Microbiol.*, 15:301-319.
- Boutal, H. (2017) Développement et validation de tests de détection rapide de la résistance aux antibiotiques. *Immunologie. Université Paris-Saclay., Français.* <NNT : 2017SACLS499>. <tel-01715103>.
- Bouyahya, A., Abrini, J., Bakri, Y., et al., (2016) Essential oils as anticancer agents: News on mode of action. *Phytothérapie.*, DOI 10.1007/s10298-016-1058-z.
- Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S., Abrini, J., Dakka, N. (2017) Resistance to antibiotics and mechanisms of action of essential oils against bacteria. *Phytothérapie.*, DOI 10.1007/s10298-017-1118-z.

- Bradford, P.A. (2001) Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14:933-51.
- Brenes, A., Roura, E. (2010) Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action. *Anim. Feed. Sci. Technol.*, 158, 1-14.
- Burt, S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods -a review. *Int. J. Food. Microbiol.*, 94:223-253.
- Burt, S.A., Reinders, R.D. (2003) Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.*, 36:162-167.
- Caillet, S., Lacroix, M. (2006) Effect of gamma radiation and oregano essential oil on murein and ATP concentration of *Listeria monocytogenes*. *J. Food. Prot.*, 69:2961-2969.
- Cambau, E., Lascols, C., Sougakoff, V., Bébéar, C., Bonnet, R., Cavallo, J.D., Gutmann, L., Ploy, M.C., Jarlier, V., Soussy, C.J., Robert, J. (2006) Occurrence of *qnrA*-positive clinical isolates in French teaching hospitals during 2002–2005. *Clin. Microbiol. Infect.*, 12: 1013-1020.
- Cambau, E., Matrat, S., Pan, X.S, et al., (2009) Target specificity of the new fluoroquinolone besifloxacin in *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 63:443-450.
- Campbell, E.A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A., Darst, S.A. (2001) Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell.*, 104:901-912.
- Cannatelli, A., Giani, T., Antonelli, A., Principe, L., Luzzaro, F., Rossolini, G.M. (2016) First detection of the *mcr-1* colistin resistance gene in *Escherichia coli* in Italy. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 60:3257-3258.
- Cantón, R., Coque, T.M. (2006) The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9:466-475.
- Cantón, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F., Coque, T.M.. (2008) Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.*, 1:144-153.
- Cantón, R., Akova, M., Carmeli, Y., Giske, C., Glupczynski, Y., Gniadkowski, M. (2012a) Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.*, 18:413–431.

- Cantón, R., González-Alba, J.M., Galán, J.C. (2012b) CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Front. Microbiol.*, 3:110. doi: 10.3389/fmicb.2012.00110.
- Carson, C.F., Hammer, K.A., Riley, T.V. (2006) *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin. Microbiol. Rev.*, 19(1): 50-62.
- Casadevall, A., Pirofski, L.A. (2003) Antibody-mediated regulation of cellular immunity and the inflammatory response. *Trends. Immunol.*, 24:474-478.
- Cattoir, V., Lesprit, P., Lascols, C. et al., (2006) In vivo selection during ofloxacin therapy of *Escherichia coli* with combined topoisomerase mutations that confer high resistance to ofloxacin but susceptibility to nalidixic acid. *J. Antimicrob. Chemother.*, 58: 1054-1057.
- Cattoir, V., Poirel, L., Nordmann, P. (2007) Plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrB4 identified in France in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate coexpressing a QnrS1 determinant. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 51: 2652-2653.
- Cattoir, V., Nordmann, P., Silva-Sanchez, J., Espinal, P., Poirel, L. (2008) ISEcp1-mediated transposition of qnrB-like gene in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 52(8): 2929-2932.
- Cavaco, L.M., Hendriksen, R.S., Aarestrup, F.M. (2007) Plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrS1* detected in *Salmonella enterica* serovar *Corvallis* strains isolated in Denmark and Thailand. *J. Antimicrob. Chemother.*, 60: 704-706.
- Cavaco, L.M., Korsgaard, H., Sorensen, G., Aarestrup, F.M. (2008) Plasmid mediated quinolone resistance due to *qnrB5* and *qnrS1* genes in *Salmonella enterica* serovars *Newport*, *Hadar* and *Saintpaul* isolated from turkey meat in Denmark. *J. Antimicrob. Chemother.*, 62:632-634.
- Cavaco, L.M., Hasman, H., Xia, S., Aarestrup, F.M. (2009) *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar *Kentucky* and *Bovis morbificans* strains of human origin. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 53(2):603-608.
- Chabou, S., Leulmi, H., Davoust, B., Aouadi, A., Rolain, J.M. (2017) Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase and carbapenemase-encoding genes in poultry feces from Algeria and Marseille, France. *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, 13:28-32.
- Charpentier, B. (2008) New therapeutic targets for antibodies and recombinant proteins in organ transplantation. *Bull. Acad. Natl. Med.*, 192:883-893.
- Chaudhary, A.S. (2016) A review of global initiatives to fight antibiotic resistance and recent antibiotics' discovery. *Acta. Pharm. Sin. B.*, 6:552-556.

- Chemat, F., Abert-Vian, M., Fernandez, X. (2013) Microwaveassisted extraction of essential oils and aromas. In: Chemat F (ed). Microwave-assisted extraction for bioactive compounds: theory and practice. Springer, New York, pp 53-66.
- Chen, S., Zhao, S., McDermott, P.F., Schroeder, C.M., White, D.G., Meng, J. (2005) A DNA microarray for identification of virulence and antimicrobial resistance genes in *Salmonella* serovars and *Escherichia coli*. Mol. Cell. Probes., 19:195-201.
- Cheung, T.K., Chu, Y.W., Chu, M.Y., Ma, C.H., Yung, R.W., Kam, K.M. (2005) Plasmid-mediated resistance to ciprofloxacin and cefotaxime in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* in Hong Kong. J. Antimicrob. Chemother., 56: 586-589.
- Chourfa, M., Allem, R., Sebahia, M., Belhiche, S. (2013) Effet de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* sur les bactéries pathogènes responsables de gastroentérites. Phytothérapie. Doi 10.1007/s10298-013-0777-7.
- Chikhoun, A., Hazzit, M., Kerbouche, L., Baaliouamer, A., Aissat, K. (2013) *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters essential oils: chemical composition and biological activities. J. Essential. Oil. Res., 25, 300-307.
- Chousalkar, K.K., Flynn, P., Sutherland, M., Roberts, J.R., Cheetham, B.F. (2010) Recovery of *Salmonella* and *Escherichia coli* from commercial egg shells and effect of translucency on bacterial penetration in eggs. Int. J. Food. Microbiol., 142 : 207-213.
- Clifford, M.N. (2000) Miscellaneous phenols in foods and beverages-nature, occurrence and dietary burden. J. Sci. Food. Agric., 80:1126-1137.
- CLSI, (2015) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-fifth Informational Supplement document M100S25. Wayne, PA, USA.
- CLSI (2016) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-sixth Informational Supplement document M100S Wayne, PA, USA.
- Connolly, J.D., Hill, R.A. (1991) Dictionary of terpenoids., vol. 1: Mono- and sesquiterpenoids, vol. 2: Di- and higher terpenoids, vol. 3: Indexes. Chapman & Hall London, New York, Tokyo, Melbourne, Madras.
- Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G, Pisano, B., et al. (1999) In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. Lett. Appl. Microbiol., 29(2): 130-135.
- Courvalin, P. (1994) Transfer of antibiotic resistance genes between Gram-positive and Gram-negative bacteria. Antimicrob. Agents. Chemother., 38:1447-1451.

- Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L. (2001) Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Appl. Microbiol.*, 91:492-499.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G. (2000) Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, B., Grissem, W., Jones, R; (eds) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, USA, pp 1250-1268.
- Crump, J.A., Kretsinger, K., Gay, K., et al., (2008) Clinical response and outcome of infection with *Salmonella enterica* serotype *Typhi* with decreased susceptibility to fluoroquinolones: a United States foodnet multicenter retrospective cohort study. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 52:1278-1284.
- Davies, J., Davies, D., (2010) Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 74:417-433.
- de Lastours, V., Fantin, B. (2014) Resistance to fluoroquinolones in 2013: What are the consequences in internal medicine? *Rev. Méd. Inter.*, 35:601-608.
- Degryse, A.C., Delepla, I., Voinier, M.A. (2008) Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. *Atelier santé et environnement.*, EHESP, pp. 1-94.
- Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B., et al., (2002) Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int. J. Food. Microbiol.*, 74:101-109.
- Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D., Mauriello, G. (2007) Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *J. Agric. Food. Chem.*, 55: 4863-4870.
- Di Pasqua, R., Mamone, G., Ferranti, P., Ercolini, D., Mauriello, G. (2010) Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar *Thompson* as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. *Proteomics.*, 10:1040-1049.
- Diallo, A.A. (2013) *Escherichia coli* pathogènes et résistantes aux antibiotiques dans les effluents d'origine humaine et animale : Prévalence et caractérisation avant et après traitement épuratoire. Thèse. Université Toulouse III - Paul Sabatier.
- Dierikx, C.M., Van Der Goot, J.A., Smith, H.E., Kant, A., Mevius, D.J. (2013) Presence of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in the broiler production pyramid: a descriptive study. *PLoS. ONE.*, 8(11): e79005.
- Djeflal, S., Bakour, S., Mamache, B., Elgroud, R., Agabou, A., Chabou, S., Hireche, S., Bouaziz, O., Rahal, K., Rolain, J.M. (2017) Prevalence and clonal relationship of ESBL-producing *Salmonella* strains from humans and poultry in northeastern Algeria. *BMC. Vet. Res.*, 13(132):1-9.

- Doit, C., Mariani-Kurkdjian, P., Bingen, E. (2010) Entérobactéries productrices de bêtalactamases à spectre étendu. *Arch. Pediatr.*, 17:140-144.
- Domadia, P., Swarup, S., Bhunia, A., et al., (2007) Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. *Biochem. Pharmacol.*, 74:831-840.
- Dortet, L., Bonnin, R., Jousset, A., Gauthier, L., Naas, T. (2016) Émergence de la résistance à la colistine chez les entérobactéries : une brèche dans le dernier rempart contre la pan-résistance ! *J. Anti-Infect.*, 18:139-159.
- Doublet, B., Bousquet-Mélou, A., Madec, J.Y. (2012) Le concept « One Health » en antibiorésistance et les flux de gènes. *Innov. agro.*, 24 : 79-90.
- Doyle, M.P. (2006) Antimicrobial resistance: implications for the food system. *Compr. Rev. Food. Sci. Food. Saf.*, 5:71-137.
- Drawz, S.M., Bonomo, R.A. (2010) Three decades of β -Lactamase inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.*, 23:160-201.
- Dubey, V.S., Bhalla, R., Luthra, R. (2003) An overview of the nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *J. Biosci.*, 28:637-646.
- Dugo, G., Franchina, F.A., Scandinaro, M.R., Bonaccorsi, I., Cicero, N., Tranchida, P.Q., Mondello, L. (2014) Elucidation of the volatile composition of Marsala wines by using comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Food. Chem.*, 42:262-268.
- Dung, N.T., Kim, J.M., Kang, S.C. (2008) Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds. *Food. Chem. Toxicol.*, 46:3632-3639.
- Duquénois, P., Anton, R. (1968) Search for derivatives of anthracene in 2 African Cassia: *Cassia nigricans* Vahl et *Cassia podocarpa* Guill. *Ann. Pharm. Fr.*, 26:607-614.
- Dutil, L., Irwin, R., Finley, R., Ng, L.K., Avery, B., Boerlin, P., Bourgault, A.M., Cole, L., Daignault, D., Desruisseau, A., Demczuk, W., Hoang, L., Horsman, G.B., Ismail, J., Jamieson, F., Maki, A., Pacagnella, A., Pillai, D.R., (2010) Ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. *Emerg Infect. Dis.*, 16: 48-54.
- Egli, A., Greub, G., Suter-Riniker, F., Schrenzel, J. (2018) Méthodes pour la détermination des résistances aux antibiotiques. *Swiss. Med. Forum.*, 18(46):950–956.
- El Hattabi, L., El Madani, N., Charrouf, Z., Costa, J., Desjobert, J.M., Tabyaoui, M. (2016) Studies on chemical composition, phenolic contents and antioxidant activities of three *Thymus* essential oils from Morocco. *Der. Pharma. Chemica.*, 8(7):7-15.

- Elaissi, A., Rouis, Z., Mabrouk, S., Bel Haj Salah, K., Aouni, M., Larbi K. M., Farhat, F., Chemli, R., Harzallah-Skhiri, F. (2012) Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils from fifteen *eucalyptus* species growing in the Korbousand Jbel Abderrahman Arboreta (North East Tunisia). *Molecules.*, 17: 3044-3057.
- Eliopoulos, G.M., Eliopoulos, C.T. (1988) Antibiotic combinations: should they be tested? *Clin. Microbiol. Rev.*, 1: 139-156.
- EUCAST, (2018) The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 8.0. Available online at: <http://www.eucast.org>
- Faleiro, M.L. (2011) The mode of antibacterial action of essential oils. In: Méndez-Vilas, A. (ed) Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Ed Brown Walker Press, Boca Raton, FL, USA, pp 1143-1156.
- Faye, K. (2005) Le point sur l'usage vétérinaire des antibiotiques : impact sur l'antibiorésistance des bactéries en santé animale et humaine. *Antibiotiques.*, 7 : 45-52.
- Fennane, M., Ibn-Tattou, M. (2012) Statistiques et commentaires sur l'inventaire actuel de la flore vasculaire du Maroc. *Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, section Sciences de la Vie.*, 34 :1-9.
- Fernandes, R., Amador, P., Prudêncio, C. (2013) β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Rev. Med. Microbiol.*, 24:7-17.
- Ferrari, R., Galiana, A., Cremades, R., Rodriguez, J.C., Magnani, M., Tognim, M.C.B., Oliveira, T.C.R.M., Royo, G. (2011) Plasmid-mediated quinolone resistance by genes *qnrA1* and *qnrB19* in *Salmonella* strains isolated in Brazil. *J. infect. Dev. Ctries.*, 5: 496-498.
- Fleming, A. (1929) On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.*, 10:226-236.
- Fortini, D., Fashae, K., Garcia-Fernandez, A., Villa, L. and Carattoli, A. (2011) Plasmid-mediated quinolone resistance and beta-lactamases in *Escherichia coli* from healthy animals from Nigeria. *J. Antimicrob. Chemother.*, 66: 1269-1272
- Friedrich, H. (1976) Phenylpropanoid constituents of essential oils. *Lloydia.*, 39:1-7.
- Gay, K., Robicsek, A., Strahilevitz, J., Park, C.H., Jacoby, G., Barrett, T.J., Medalla, F., Chiller, T.M., Hooper, D.C. (2006) Plasmid-mediated quinolone resistance in non-typhi serotypes of *Salmonella enterica*. *Clin. Infect. Dis.*, 43: 297-304.

- George, D.P. (2017) The macrolide antibiotic renaissance. *Br. J. Pharmacol.*, 174(18): 2967-2983.
- Geser, N., R. Stephan, and H. Hachler. (2012) Occurrence and characteristics of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC. Vet. Res.*, 8:21.
- Gharout-Sait, A., Touati, A., Benallaoua, S., Guillard, T., Brasm, T.J., de Champs, C. (2012) CTX-M from community acquired urinary tract infections in Algeria. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 6: 5306-5313.
- Giedraitiene, A., Vitkauskiene, A., Naginiene, R., et al., (2011) Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina.*, 47:137-144.
- Giufre, M., Monaco, M., Accogli, M., Pantosti, A., Cerquetti, M., Group, P.S. (2016) Emergence of the colistin resistance *mcr-1* determinant in commensal *Escherichia coli* from residents of long-term-care facilities in Italy. *J. Antimicrob. Chemother.*, 71:2329-2331.
- Gleckman, R., Blagg, N., Joubert, D.W. (1981) Trimethoprim: mechanisms of action, antimicrobial activity, bacterial resistance, pharmacokinetics, adverse reactions, and therapeutic indications. *Pharmacother. J. Hum. Pharmacol. Drug. Ther.*, 1:14-19.
- Goeke, A. (2002) Sulfur-containing odorants in fragrance chemistry. *J. Sulfur. Chem.*, 23:243-78.
- Goodarzi, M., Nanekarani, S. (2014) Effects of feeding *Mentha pulegium L.* as an alternative to antibiotics on performance of broilers. *APCBEE. Procedia.*, 8: 53-58.
- Goossens, H., Ferech, M., Vander Stichele, R., et al., (2005) Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study *Lancet.*, 365:579-587.
- Griffin, S.G., Wyllie, S.G., Markham, J.L. (1999) The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour. Fragrance. J.*, 14:322-332.
- Guarda, A., Rubilar, J.F., Miltz, J., Galotto, M.J. (2011) The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *Int. J. Food. Microbiol.*, 146:144-150.
- Guardabassi, L., Courvalin, P. (2006) Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. In : Aarestrup, F.M. (Ed.), *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin.* ASM Press : Washington., 1-18.
- Guillard, T., Cambau, E. (2012) A brief history of the plasmid-mediated quinolone resistance determinants. *J. Anti-infect.*, 15: 1-8.

- Gupta, V. (2007) An update on newer beta-lactamases. *Indian J Med Res.*, 126:417-427.
- Hakanen, A., Kotilainen, P., Jalava, J., Siitonen, A., Huovinen, P. (1999) Detection of decreased fluoroquinolone susceptibility in *Salmonellas* and validation of nalidixic acid screening test. *J. Clin. Microbiol.*, 37:3572-3577.
- Halfaoui, Z., Menoueri, N.M. and Bendali, L.M. (2017) Serogrouping and antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from broiler chicken with colibacillosis in center of Algeria. *Vet. World.*, 10(7): 830-835.
- Halkier, B.A., Gershenzon, J. (2006) Biology and biochemistry of glucosinolates. *Ann. Rev. Plant. Biol.*, 57:303-333.
- Hammoudi, A., Aggad, H. (2008) Antibioresistance of *Escherichia coli* strains isolated from chicken colibacillosis in Western Algeria. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 32: 123-126.
- Han, J.E., Kim, J.H., Cheresca, C.H., Shin, S.P., Jun, J.W., Chai, J.Y., Han, S.Y., Park, S.C. (2012) First description of the *qnrS* like (*qnrS5*) gene and analysis of quinolone resistance-determining regions in motile *Aeromonas* spp. from diseased fish and water. *Res. Microbiol.*, 163: 73-79.
- Hansen, L.H., Jensen, L.B., Sørensen, H.I., Sørensen, S.J. (2007) Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.*, 60(1):145-147.
- Harada, K., Asai, T., Kojima, A., Ishihara, K., Takahashi, T. (2006) Role of coresistance in the development of resistance to chloramphenicol in *Escherichia coli* isolated from sick cattle and pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 67: 230-235.
- Hata, M., Suzuki, M., Matsumoto, M., Takahashi, M., Sato, K., Ibe, S., Sakae, K. (2005) Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49:801-803.
- Haze, S. (2005) Application of the efficacy of aroma chemicals to cosmetic product development. *Fragrance.*, J 4: 14.
- Hennequin, C., Robin, F., Cabrolier, N., Bonnet, R., and Forestier, C. (2012) Characterization of a *DHA-1*-producing *Klebsiella pneumoniae* strain involved in an outbreak and role of the AmpR regulator in virulence. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 56(1): 288-294.
- Hirakawa, H., Tomita, H. (2013) Interference of bacterial cell-to-cell communication: a new concept of antimicrobial chemotherapy breaks antibiotic resistance. *Antimicrob. Resist. Chemother.*, 4:114.
- Honoré, S., Lascols, C., Malin, D., Targaouchi, R., Cattoir, V., Legrand, P., Soussy, C.J., Cambau, E. (2006) Emergence et diffusion chez les entérobactéries du nouveau

- mécanisme de résistance plasmidique aux quinolones Qnr (résultats hôpital Henri-Mondor 2002-2005). *Pathol. Biol.*, 54 :270-279.
- Hooper, D.C. (2000) Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis.*, 31:S24-28.
- Hooper, D.C. (2001) Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg. Infect. Dis.*, 7:337-341.
- Iabadene, H., Messai, Y., Ammari, H., Ramdani-Bouguessa, N., Lounes, S., Bakour, R. and Arlet, G. (2008) Dissemination of ESBL and Qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria. *J. Antimicrob. Chemother.*, 62: 133-136.
- Iredell, J., Brown, J., Tagg, K., (2016) Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: Mechanisms and clinical implications. *Brit. Med. J.*, 352. doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.h6420>.
- Iscan, G., Kirimer, N., Kurkcuoglu, M. et al., (2005) Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two endemic species from Turkey: *Sideritis cilicica* and *Sideritis bilgerana*. *Chem. Nat. Compd.*, 41:679-682.
- Jacoby, G.A., Chow, N., Waites, K.B. (2003) Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 47:559-562.
- Jacoby, G.A. (2005) Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin. Infect. Dis.*, 41:120-126.
- Jacoby, G.A., Walsh, K.E., Mills, D.M., Walker, V.J., Oh, H., Robicsek, A., Hooper, D.C. (2006) *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 50: 1178-1182.
- Jacoby, G.A., Cattoir, V., Hooper, D., Martínez-Martínez, L., Nordmann, P., Pascual, A. et al., (2008) *qnr* Gene nomenclature. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 52(7):2297-2299.
- Jana, S., Deb, J.K. (2006) Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 70:140-150.
- Jarlier, V., Nicolas, M.H., Fournier, G., Philippon, A. (1988) Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.*, 10:867-878.
- Johnson, J.R., Kuskowski, M.A., Menard, M., Gajewski, A., Xercavins, M., Garau, J. (2006) Similarity between human and chicken *Escherichia coli* isolates in relation to ciprofloxacin resistance status. *J. Infect. Dis.*, 194: 71-78.
- Johnston, A.M. (1998) Use of antimicrobial drugs in veterinary practice. *BMJ.*, 317: 665-667.

- Junio, H.A., Sy-Cordero, A.A., Ettefagh, K.A., Burns, J.T., Micko, K.T., Graf, T.N., Cech, N. B. (2011) Synergy-directed fractionation of botanical medicines: a case study with goldenseal (*Hydrastiscanadensis*). *J. Nat. Prod.*, 74:1621-1629.
- Kaloustian, J., Hadji-Minaglou, F. (2012) La connaissance des huiles essentielles : qualité et aromathérapie. ISBN 978-2-8178-0308-1 Springer Paris Berlin Heidelberg New York Springer-Verlag France, Paris.
- Kardos, N., Demain, A.L. (2013) Ernst Chain: a great man of science. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97:6613-6622.
- Kempf, I., Zeitouni, S. (2012) The cost of antibiotic resistance: Analysis and consequences. *Pathol. Biol.*, 60: e9-e14.
- Keszei, A., Brubaker, C.L., Foley, W.J. (2008) A molecular perspective on terpene variation in Australian Myrtaceae. *Aust. J. Bot.*, 56:197-213.
- Kilonzo-Nthenge, A., Rotich, E., Nahashon, S.N. (2013) Evaluation of drug-resistant Enterobacteriaceae in retail poultry and beef. *Poult. Sci.*, 92: 1098-1107.
- Kim, S.H., Kwak, Y., Lee, M., Kim, J., Jeong, Y., Kim, K. (2004) Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *E. coli* from Korea. In: Proceeding 44th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents. Chemother., Abstr C2-1711.
- Kimbaris, A.C., Siatis, N.G., Daferera, D.J. et al., (2006) Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). *Ultrason. Sonochem.*, 13:54-60.
- Kipnis, É., Dessein, R., Faure, K., Guery, B. (2012) Antiinfective therapies other than antibiotics. *Réanimation.*, 21:303-316.
- Kirchner, M., Wearing, H. and Teale, C. (2011) Plasmid-mediated quinolone resistance gene detected in *Escherichia coli* from cattle. *Vet. Microbiol.*, 148: 434-435.
- Klein, E.Y., Thomas, P., Van Boeckel, T.P., Eena, M., Martinez, E.M., Pant, S., Gandra, S., Levin, S.A., Goossens, H., Laxminarayan, R. (2018) Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *PNAS.*, 115(15): 3463-3470.
- Kong, K.F., Schneper, L., Mathee, K. (2010) Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS. Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, 118:1-36.
- La Rocca, T.J., Katona, L.I., Thanassi, D.G., Benach, J.L. (2008) Bactericidal action of a complement-independent antibody against relapsing fever *Borrelia* resides in its variable region. *J. Immunol.*, 180:6222-6228.

- Lahlou, M. (2004) Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytother. Res.*, 18: 435-448.
- Lambert, J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J., Nychas, G.J.E. (2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.*, 91:453-462.
- Lamoril, J., Ameziane, N., Deybach, J.C., Bouizegarène, P., Bogard, M. (2008) DNA sequencing technologies: A revolution in motion. Part one. *Immuno-anal. Biol. spécial.*, 23:260-279.
- Langenheim, J.H. (1994) Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *J. Chem. Ecol.*, 20:1223-1280.
- Lebranchu, Y. (2015) Complications infectieuses des anticorps thérapeutiques. *Rev. Med. Int.*, 36S:A19-A21.
- Lebranchu, Y. (2018) Séance des membres correspondants de la 1^{re} division : « Les biothérapies dans les maladies inflammatoires chroniques » : Histoire des anticorps thérapeutiques. *Bull. Acad. Natle Méd.*, 202:1909-1915.
- Leverstein-van Hall, M.A., Dierikx, C.M., Cohen Stuart, J., Voets, G.M., van den Munckhof, M.P. et al., (2011) Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin. Microbiol. Infect.*, 17: 873-880.
- Li, X.Z., Nikaido, H. (2009) Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs.*, 69:1555-1623.
- Liakopoulos, A., Mevius, D., Ceccarelli, D. (2016) A Review of SHV Extended-Spectrum β -Lactamases: neglected yet ubiquitous. *Front. Microbiol.*, 7:1374. doi: 10.3389/fmicb.2016.01374.
- Ling, T.X., Xiong, J., Yu, Y., Lee, C.C., Ye, H., Hawkey, P.M. (2006) Multicenter antimicrobial susceptibility survey of gram-negative bacteria isolated from patients with community-acquired infections in the people's republic of China. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 50: 374-378.
- Livermore, D.M. (1995) beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8:557-584.
- Livermore, D. M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G.M., Arlet, G., Ayala, J., Coque, T.M., Kern-Zdanowicz, I., Luzzaro, F., Poirel, L., Woodford, N. (2007) CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.*, 59:165-174.
- Lorian, V. (1996) *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 4th ed. Baltimore, Williams & Wilkins., 1238.

- Luciardi, M.C., Blázquez, M.A., Cartagena, E. (2016) Mandarin essential oils inhibit quorum sensing and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* LWT. Food. Sci. Technol., 68:373-380.
- Luís, A., Duarte, A., Gominho, J. et al., (2016) Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils. Ind. Crop. Prod., 79:274-182.
- Lutful Kabir, S.M. (2010) Avian Colibacillosis and Salmonellosis: A Closer Look at Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, Control and Public Health Concerns. Int. J. Environ. Res. Public. Health., 7: 89-114.
- Ma, J., Zeng, Z., Chen, Z., Xu, X., Wang, X., Deng, Y., Lue, D., Huang, L., Zhang, Y., Liu, L., Wang, M. (2009) High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, and *qepA* among ceftiofur-resistant Enterobacteriaceae isolates from companion and food-producing animals. Antimicrob. Agents. Chemother., 53: 519-524.
- Mabilat, C., Goussard, S. (1993) PCR detection and identification of genes for extended-spectrum β -lactamases, in: Persing, D.H., Smith, T.H., Tenover, F.C., White T.J. (Eds.), Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications, American Society for Microbiology, Washington DC., 1993.
- MADR, (2017) Ministère de l'Agriculture et de Développement Rural, Algérie. Rapport annuel.
- Magiorakos, A.P., Sirinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., alagas, M.E., Giske, C.G. et al., (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin. Microbiol. Infect., 18:268-281.
- Mahony, J., McAuliffe, O., Ross, R.P., van Sinderen, D. (2011) Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. Curr. Opin. Biotechnol., 22:157-163.
- Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M., Spratt, B. G. (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 95:3140-3145.
- Maiden, M. C. (2006) Multilocus sequence typing of bacteria. Annu Rev Microbiol., 60:561-588.
- Majamaa, H., Isolauri, E. (1997) Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. J. Allergy. Clin. Immunol., 99:179-185.

- Mancini, E., Senatore, F., Del Monte, D., De Martino, L., Grulova, D., Scognamiglio, M., Snoussi, M., De Feo, V. (2015) Studies on chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of five *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Molecules.*, 20:12016-12028.
- Mao, J.C.H., Putterman, M. (1968) Accumulation in Gram-positive and Gram-negative bacteria as a mechanism of resistance to erythromycin. *J. Bacteriol.*, 95:1111-1117.
- March, A., Aschbacher, R., Dhanji, H., Livermore, D.M., Bottcher, A., Sleghe, F. et al., (2009) Colonization of residents and staff of a long-term care facility and adjacent acute-care hospital geriatric unit by multiresistant bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.*, 16:934-944.
- Martinez, J. L. (2009) The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc. Biol. Sci.*, 276:2521-2530.
- Martínez-Martínez, L., Pascual, A., Jacoby, G.A. (1998) Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet.*, 351:797-799.
- Martinez-Martinez, L., Cano, M.E., Rodriguez-Martinez, J.M., Calvo, J., Pascual, A. (2008) Plasmid-mediated quinolone resistance. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.*, 6: 685-711.
- Mc Ewen, S.A., Fedorka-Cray, P.L. (2002) Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin. Infect. Dis.*, 34 : S93-106.
- Meguenni, N., Le Devendec, L., Jouy, E., Le Corvec, M., Bounar-Kechih, S., Rabah Bakour, D., Kempf, I. (2015) First Description of an Extended-Spectrum Cephalosporin- and Fluoroquinolone- Resistant Avian Pathogenic *Escherichia coli* Clone in Algeria. *Avian. Dis.*, 59: 20-23.
- Meradi, L., Djahoudi, A., Abdi, A., Bouchakour, M., Claude, J.D., Timinouni, M. (2011) Qnr and Aac(6')-Ib-cr types quinolone resistance among Enterobacteriaceae isolated in Annaba, Algeria. *Pathol. Biol.*, 59:73-78.
- Merens, A., Servonnet, A. (2010) Mécanismes et épidémiologie de la résistance aux fluoroquinolones en 2010. *Rev. Fran. Labo.*, 422 :33-41.
- Mezhoud, H., Chantziaras, I., Iguer-Ouada, M., Moula, N., Garmyn, A., Martel, A., Touati, A., Smet, A., Haesebrouck, F., Boyen, F. (2016) Presence of antimicrobial resistance in coliform bacteria from hatching broiler eggs with emphasis on ESBL/AmpC-producing bacteria. *Avian. Pathol.* DOI: 10.1080/03079457.2016. 1167837.
- Mikulášová, M., Chovanová, R., Vaverková, Š. (2016) Synergism between antibiotics and plant extracts or essential oils with efflux pump inhibitory activity in coping with multidrug-resistant staphylococci. *Phytochem. Rev.*, 15:651-662.

- Minarini, L.A., Poirel, L., Cattoir, V., Darini, A.L., Nordmann, P. (2008) Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. *J. Antimicrob. Chemother.*, 62:474-478.
- Mnif, B., Ktari, S., Rhimi, F. M., Hammami, A. (2012) Extensive dissemination of CTX M-1- and CMY-2-producing *Escherichia coli* in poultry farms in Tunisia. *Lett. Appl. Microbiol.*, 55: 407-413.
- Mo, S.S., Norström, M., Slettemeås, J.S., Løvland, A., Urdahl, A.M., Sunde, M. (2014) Emergence of AmpC-producing *Escherichia coli* in the broiler production chain in a country with a low antimicrobial usage profile. *Vet. Microbiol.*, 171:315-320.
- Mo, S.S., Slettemeas, J.S., Berg, E.S., Norstrom, M., Sunde, M. (2016) Plasmid and host strain characteristics of *Escherichia coli* resistant to extended-spectrum cephalosporins in the Norwegian broiler production. *PLOS. One.*, 11, e0154019.
- Mourey, A., Canillac, N. (2002) Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food. Control.*,13:289-292.
- Mulyaningsih, S., Sporer, F., Zimmermann, S., Reichling, J., Wink, M. (2010) Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic susceptible and antibiotic resistant pathogens. *Phytomedicine.*, 17:1061-1066.
- Muylaert, A., Mainil, J.G. (2012) Résistances bactériennes aux antibiotiques : les mécanismes et leur « contagiosité ». *Ann. Méd. Vét.*, 156:109-123.
- Muylaert, A., Mainil, J.G. (2013) Résistances aux fluoroquinolones : la situation actuelle. *Ann. Méd. Vét.*, 157 :15-26.
- Myrenås, M., Slettemeås, J.S., Thorsteinsdottir, T.R., Bengtsson, B., Börjesson, S., Nilsson, O., Landén, A., Sunde, M. (2018) Clonal spread of *Escherichia coli* resistant to cephalosporins and quinolones in the Nordic broiler production. *Vet. Microbiol.*, 213: 123-128.
- Myszka, K., Schmidt, M.T., Majcher, M. (2016) Inhibition of quorum sensing-related biofilm of *Pseudomonas fluorescens* KM121 by *Thymus vulgare* essential oil and its major bioactive compounds. *Int. Biodeterior. Biodegradation.*, 114:252–259.
- Nabavi, S.M., Marchese, A., Izadi, M., Curti, V., Daglia, M., Nabavi, S.F. (2015) Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: from farm to pharmacy. *Food. Chem.*, 173:339-347.
- Nahar, A., Awasthi, SP., Hatanaka, N., Okuno, K., Hoang, PH., Hassan, J., Hinenoya, A., Yamasaki, S. (2018) Prevalence and characteristics of extended spectrum β -lactamase-

- producing *Escherichia coli* in domestic and imported chicken meats in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 80:510-517.
- Nakaminami, H., Noguchi, N., Sasatsu, M. (2010) Fluoroquinolone efflux by the plasmid 339 mediated multidrug efflux pump QacB variant QacBIII in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 54(10):4107-4111.
- Nandi, S., Maurer, J.J., Hofacre, C. et al., (2004) Gram-positive bacteria are a major reservoir of Class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 101:7118-7122.
- Naseer, U., Sundsfjord, A. (2011) The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones. *Microb. Drug. Resist.*, 17:83-97.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L. et al., (2013) Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals.*, 6:1451-1474.
- NCCLS, (2003) National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard M7-A6*, 6th ed. Wayne, Pa.
- Nikaido, H. (2009) Multidrug resistance in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.*, 78:119-146.
- Nordmann, P., Poirel, L. (2002) Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin. Microbiol. Infect.*, 8:321-331.
- Nordmann, P., Poirel, L. (2005) Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.*, 56 : 463-469.
- Nordmann, P., Mammeri, H. (2007) Résistance plasmidique aux quinolones. *Antibiotiques.*, 9: 246-53.
- Noumedem, J.A.K., Mihasan, M., Kuate, J.R. (2013) In vitro antibacterial and antibiotic potentiation activities of four edible plants against multidrug-resistant gram-negative species. *BMC. Complement. Altern. Medicine.*, 13:190-194.
- OFAL, (2010) Observatoire des Filières Avicoles d'Algérie. Filière et marchés des produits avicoles en Algérie. Rapport, ITELV Algérie., 117p.
- OMS, (2015) Plan d'action mondial pour combattre la résistance aux antimicrobiens. Organisation mondiale de la santé, Genève, Suisse. Consultable à l'adresse : http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/193736/1/9789241509763_fr.pdf?ua=1.
- O'Neill, O.J. (2014) Antimicrobial Resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. https://amrreview.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf.

- Otte, J.M., Podolsky, D.K. (2004) Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.*, 286:613-626.
- Ouraini, D., Agoumi, A., Alaoui, M. I., Alaoui, K., Cherrah, Y., Benlemlih, M. et al., (2005) Approche thérapeutique des dermatophyties par les huiles essentielles de plantes aromatiques marocaines. *Phytothérapie.*, 1 :3-12.
- Oyedemi, S.O., Okoh, A.I., Mabinya, L.V., Pirochenva, G., Afolayan, A.J. (2009) The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, α -terpineol and γ -terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. *Afr. J. Biotec.*, 8:1280-1290.
- Pagès, J.M., James, C.E., Winterhalter, M. (2008) The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.*, 6:893-903.
- Pai, H., Kim, M.R., Seo, M.R., Choi, T.Y., Oh, S.H. (2006) A nosocomial outbreak of *Escherichia coli* producing CTX-M-15 and OXA-30 beta-lactamase. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, 27: 312-314.
- Paladino, J.A., Sunderlin, J.L., Singer, M.E., Adelman, M.H., Schentag, J.J. (2008) Influence of extended-spectrum β -lactams on gram-negative bacterial resistance. *Am. J. Health. Syst. Pharm.*, 65:1154-1159.
- Paterson, D. L., Bonomo, R. A. (2005) Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.*, 18:657-686.
- Paterson, D. (2006) Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am. J. Infect. Ctrl.*, 34:20-28.
- Pengelly, A. (2004) The constituents of medicinal plants. 2nd ed, Allen & Unwin, Sydney, Australia.
- Pérez-Moreno, M.O., Picó-Plana, E., De Toro, M., Grande-Armas, J., Quiles-Fortuny, V., Pons, M.J., Gomes, C., Sáenz, Y., Torres, C., Ruiz, J. (2013) β -lactamases, transferable quinolone resistance determinants, and class 1 integron-mediated antimicrobial resistance in human clinical *Salmonella enterica* isolates of non-typhimurium serotypes. *Int. J. Med. Microbiol.*, 303: 25-31.
- Périchon, B., Courvalin, P., Galimand, M. (2007) Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 51:2464-2469.

- Pezzotti, G., Serafin, A., Luzzi, I. et al., (2003) Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. *Int. J. Food. Microbiol.*, 82 : 281-287.
- Philippon, A. (2013) Les bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu (BLSE). *Immunol. Biol. Spec.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.immbio.2013.04.006>.
- Piddock, L.J. (1996) Does the use of antimicrobial agents in veterinary medicine and animal husbandry select antibiotic-resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy? *J. Antimicrob. Chemother.*, 38:1-3.
- Pinder, A.R. (1960) *The chemistry of terpenes*. Chapman & Hall London, New York.
- Piso, R.J., Kach, R., Pop, R. et al., (2017) A cross-sectional study of colonization rates with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in four Swiss refugee centres. *PLoS. One.*, 12(1):e0170251.
- Pitout, J.D., Nordmann, P., Laupland, K.B., Poirel, L. (2005) Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β - lactamases (ESBLs) in the community. *J. Antimicrob. Chemother.*, 56:52-59.
- Poirel, L., Rodriguezmartinez, J.M., Mammeri, H., Liard, A., Nordmann, P. (2005a) Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 49:3523-3525.
- Poirel, L., Leviandier, C., Nordmann, P. (2006) Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA and QnrS in Enterobacteriaceae isolates from a French university hospital. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 50: 3992-3997.
- Poole K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 2000;44:2233-41.
- Poole, K. (2004) Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci.*, 61:2200-2202.
- Poole, K. (2007) Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann. Med.*, 39(3):162-176.
- Reynolds, J.F.F. (1982) *Martindale: The Extra Pharmacopoeia*, Amer. Pharmaceutical. Assn., 30th edition.
- Richter, S.N., Frasson, I., Bergo, C., Manganelli, R., Cavallaro, A., Palu, G. (2010) Characterisation of *qnr* plasmid-mediated quinolone resistance in Enterobacteriaceae from Italy: Association of the *qnrB19* allele with the integron element ISCR1 in *Escherichia coli*. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 35: 578-583.

- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G.A. et al., (2006a) Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat. Med.*, 12:83-88.
- Robicsek, A., Jacoby, G.A., Hooper, D.C. (2006b) The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet. Infect. Dis.*, 6: 629-640.
- Rodriguez-Martinez, J.M., Velasco, C., Briales, A., Garcia, I., Conejo, M.C., Pascual, A. Qnr-like pentapeptide repeat proteins in gram-positive bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.*, 61: 1240-1243.
- Rossolini, G. M., D'Andrea, M. M., Mugnaioli, C. (2008) The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Infect.*, 1:33-41.
- Rota, M.C., Herrera, A., Martínez, R.M., Sotomayor, J.A., Jordán, M.J. (2008) Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food. Control.*, 19: 681-687.
- Rubin, M.A., Samore, M.H. (2012) Antimicrobial use and resistance. *Current. Infect. Dis. Rep.*, 4, 491. Doi:10.1007/s11908-002-0034-y.
- Ruiz, J. (2003) Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J. Antimicrob. Chemother.*, 51:1109-1117.
- Ruzicka, L. (1953) The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Cell. Mol. Life. Sci.*, 9:357-367.
- Saeidi, S., Boroujeni, N.A., Ahmadi, H., Hassanshahian, M. (2015) Antibacterial activity of some plant extracts against extended- spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolates. *Jundishapur. J. Microbiol.*, 8(2): e15434.
- Sanders, P. (1999) Traitements thérapeutiques et antibiorésistance. *Point Vét.*, 30: 23-30.
- Sanger, F., Air, G.M., Barrel, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, J.C., Hutchinson, C.A., Slocombe, P.M., Smith, M. (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *Nature.*, 265: 687-695.
- Sangwan, N.S., Farooqi, A.H.A., Shabih, F. et al., (2001) Regulation of essential oil production in plants. *Plant. Growth. Regul.*, 34:3-21.
- Santoyo, S., Caverro, S., Jaime, L. et al., (2005) Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *J. Food. Prot.*, 68:790-795.
- Santurio, D.F., Jesus, F.P.K., Zanette, R.A., Schlemmer, K.B., Fraton, A., Martins Fries, L.L. (2014) Antimicrobial activity of the essential oil of thyme and of thymol against *Escherichia coli* strains. *Acta. Sci. Vet.*, 42:1234.

- Schelz, S., Hohmann, J., Molnar, J. (2010). Recent advances in research of antimicrobial effects of essential oils and plant derived compounds on bacteria. *Ethnomedicine: A Source of Complementary Therapeutics.*, pp. 179-201 ISBN: 978-81-308-0390-6.
- Schwarz, S., Chaslus-Dancla, E. (2001a) Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet. Res.*, 32 : 201-225.
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Walsh, T.R. (2001b) Use of antimicrobials agents in veterinary medicine and food animal production. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 17 : 431-437.
- Šegvic Klaric, M., Kosalec, I., Mastelid, J., Pieckova, E., Pepeljnak, S. (2007) Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris L.*) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Letters. Appl. Microbial.*, 44(1): 36-42.
- Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S.M., Kamal, M.A. (2015) Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi. J. Biol. Sci.*, 22:90-101.
- Shopsin, B., Gomez, M., Montgomery, S.O., Smith, D.H., Waddington, M., Dodge, D.E. et al., (1999) Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.*, 37(11):3556-3563.
- Siamak, C., Khojasteh-Bakht, S.C., Koenigs, L.L. et al., (1998) (R)- (+)-Menthofuran is a potent, mechanism-based inactivator of human liver cytochrome P450 2A6. *Drug. Metab. Dispos.*, 26:701-704.
- Sidali, L., Brada, M., Fauconnier, M.L., Lognay, G. (2014) Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* du Nord d'Algérie. *Phyto. Chem. Bio. Sub. Journal.*, 8(3): 156-161.
- Silva-Sanchez, J., Barrios, H., Reyna-Flores, F., Bello-Diaz, M., Sanchez-Perez, A., Rojas, T., Bacterial Resistance Consortium., Garza-Ramos, U. (2011) Prevalence and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates in Mexico. *Microb. Drug. Resist.*, 17: 497-505.
- Slopek, S., Weber-Dabrowska, B., Dabrowski, M., Kucharewicz-Krukowska, A. (1987) Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981-1986. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, 35:569-583.
- Snyder, L., Champness, W. (2007) *Molecular genetics of bacteria*. Washington, D.C. ASM Press.
- Sommer, M.O.A., Dantas, G., Church, G.M. (2009) Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science.*, 325:1128-1131.

- Song, Y., Baer, M., Srinivasan, R., Lima, J., Yarranton, G., Bebbington, C., Lynch, S.V. (2011) PcrV antibody-antibiotic combination improves survival in *Pseudomonas aeruginosa*-infected mice. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 31(8):1837-1845
- Soussy, C.J. (2006) Quinolones et bactéries à GRAM négatif. In: Courvalin, P., Leclerk, R., Bingen, E. *Antibiogramme*. Paris. ESKA: 2^{ème} édition. Chapitre 21. P: 261-277.
- Stefanović, O.D., Stanojević, D.D., Comić, L.R. (2012) Synergistic antibacterial activity of *Salvia officinalis* and *Cichorium intybus* extracts and antibiotics. *Acta. Pol. Pharm. Drug. Res.*, 69:457-463.
- Stokes, H.W., Hall, R.M. (1989) A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol. Microbiol.*, 3:1669-1683.
- Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., Robicsek, A. (2009) Plasmid-mediated quinolone resistance: A multifaceted threat. *Clin. Microbiol. Rev.*, 22: 664-689.
- Sullivan, C. B., Diggle, M. A., Clarke, S. C. (2005) Multilocus sequence typing: data analysis in clinical microbiology and public health. *Mol. Biotechnol.*, 29:245-254.
- Szabo, D., Kocsis, B., Rokusz, L., Szentandrassy, J., Katona, K., Kristof, K. et al., (2008) First detection of plasmid-mediated, quinolone resistance determinants *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* and *aac(60)-Ib-cr* in extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in Budapest, Hungary. *J. Antimicrob. Chemother.*, 62:630-632.
- Talarmin, A. (2016) Résistance aux antibiotiques des entérobactéries en Guadeloupe : importance en milieu communautaire et diffusion environnementale. *Microbiologie*. Université des Antilles (Thèse).
- Talbaoui, A., Jamaly, N., Aneb, M. (2012) Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from six Moroccan plants. *J. Med. Plants. Res.*, 6:4593-4600.
- Tamang, M.D., Seol, S.Y., Oh, J.Y., Kang, H.Y., Lee, J.C., Lee, Y.C. et al., (2008) Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnrA*, *qnrB*, and *qnrS* among clinical isolates of Enterobacteriaceae in a Korean hospital. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 52:4159-4162.
- Tay, S., Yew, W. (2013) Development of Quorum-Based Anti-Virulence Therapeutics Targeting Gram-Negative Bacterial Pathogens. *Int. J. Mol. Sci.*,14(8):16570-16599.
- Tiwari, B.K., Valdramidis, V.P., O'Donnel, C.P. (2009) Application of natural antimicrobials for food preservation. *J. Agric. Food. Chem.*, 57:5987–6000.
- Tran, J.H., Jacoby, G.A. (2002) Mechanisms of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 99:5638-5642.

- Tran, J.H., Jacoby, G.A., Hooper, D.C. (2005a) Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 19:118-125.
- Tran, J.H., Jacoby, G.A., Hooper, D.C. (2005b) Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein QnrA with *Escherichia coli* topoisomerase IV. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 49: 3050-3052.
- Torpdahl, M., Hammerum, A.M., Zachariassen, C., Nielsen, E.M. (2009) Detection of *qnr* genes in *Salmonella* isolated from humans in Denmark. *J. Antimicrob. Chemother.*, 63: 406-408.
- Touati, A., Brasme, L., Benallaoua, S., Gharout, A., Madoux, J., De, C.C. (2008) First report of *qnrB*-producing *Enterobacter cloacae* and *qnrA*-producing *Acinetobacter baumannii* recovered from Algerian hospitals. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 60:287-290.
- Turgis, M., Han, J., Caillet, S. et al (2009) Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi*. *Food. Control.*, 20:1073-1079.
- Turgis, M., Vu, K. D., Dupont, C., Lacroix, M. (2012) Combined antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against foodborne pathogens and food spoilage bacteria. *Food. Res. Int.*, 48:696-702.
- Tuttolomondo, T., Giacomo, D., Giuseppe, R., Leto, C., Napoli, E.M., Cicero, N., Gervasi, T., Giuseppe, V., Leone, R., Licata, M., La Bella, S. (2015) Study of quantitative and qualitative variations in essential oils of Sicilian *Rosmarinus officinalis* L. *Nat. Prod. Res.*, 29(20):1928-1934.
- Ultee, A., Bennink, M.H., Moezelaar, R. (2002) The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the foodborne pathogens *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:1561-1568.
- Van Bambeke, F., Michot, J.M., Van Eldere, J., Tulkens, P.M. (2005) Quinolones in 2005: an update. *Clin. Microbiol. Infect.*, 11:256-280.
- Van Bambeke, F., Mingeot-Leclercq, M.P., Glupczynski, Y., Tulkens, P.M. (2017) Mechanisms of action, p. 1162-1180.e1. In *Infectious Diseases*. Elsevier.
- Van Boeckel, T.P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Robinson, T.P., Teillant, A., Laxminarayan, R. (2015) Global trends in antimicrobial use in food animals. *PNAS.*, 112(18):5649-5654.
- Van Den Bogaard, A.E., Stobberingh, E.E. (1999) Antibiotic usage in animals: impact on bacterial resistance and public health. *Drugs.*, 58 : 589-607.

- Van Vuuren, S.F., Suliman, S., Viljoen, A.M. (2009) The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Lett. Appl. Microbiol.*, 48(4):440-446.
- Varon, E., Houssaye, S., Grondin, S., Gutmann, L. (2006) Nonmolecular test for detection of low-level resistance to fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 50:572-579.
- Vasallo, F.J., Martín-Rabadán, P., Alcalá, L., García-Lechuz, J.M., Rodríguez-Créixems, M., Bouza, E. (1998) Failure of ciprofloxacin therapy for invasive nontyphoidal salmonellosis. *Clin. Infect. Dis.*, 26:535-536.
- Veldman, K., van Pelt, W., Mevius, D. (2008) First report of *qnr* genes in *Salmonella* in the Netherlands. *J. Antimicrob. Chemother.*, 61:452-453.
- Vetting, M.W., Hegde, S.S., Wang, M., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., Blanchard, J.S. (2011) Structure of QnrB1, a plasmid-mediated fluoroquinolone resistance factor. *J. Biol. Chem.*, 286(28):25265-25273.
- Walsh, T. R. (2006) Combinatorial genetic evolution of multiresistance. *Curr. Opin. Microbiol.*, 9:476-482.
- Wang, M., Tran, J.H., Jacoby, G.A., Zhang, Y., Wang, F., Hooper, D.C. (2003) Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 47:2242-2248.
- Wang, A., Yang, Y., Lu, Q., Wang, Y., Chen, Y., Deng, L. et al., (2008a) Occurrence of *qnr*-positive clinical isolates in *Klebsiella pneumoniae* producing ESBL or AmpC-type beta-lactamase from five pediatric hospitals in China. *FEMS. Microbiol. Lett.*, 283:112-116.
- Wang, A., Yang, Y., Lu, Q., Wang, Y., Chen, Y., Deng, L. et al. (2008b) Presence of *qnr* gene in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* resistant to ciprofloxacin isolated from pediatric patients in China. *BMC. Infect. Dis.*, 8:68.
- Wang, M., Sahm, D.F., Jacoby, G.A., Hooper, D.C. (2004) Emerging plasmid mediated quinolone resistance associated with the *qnr* gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 48:1295-1299.
- Wang, M., Guo, Q., Xu, X., Wang, X., Ye, X., Wu, S. et al., (2009) New plasmid mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 53(5):1892-1897.
- Wang, S.Y., Sun, Z.L., Liu, T., Gibbons, S., Zhang, W.J., Qing, M. (2014) Flavonoids from *Sophoramo orcroftiana* and their Synergistic Antibacterial Effects on MRSA. *Phytotherapy. Res.*, 28:1071-1076.

- Wang, Y., He, T., Han, J., Wang, J., Foley, S.L., Yang, G., Wan, S., Shen, J., Wu, C. (2012) Prevalence of ESBLs and PMQR genes in fecal *Escherichia coli* isolated from the non-human primates in six zoos in China. *Vet. Microbiol.*,159: 53-59.
- Weber-Dabrowska, B., Mulczyk, M., Górski, A. (2003) Bacteriophages as an efficient therapy for antibiotic-resistant septicemia in man. *Transplant. Proc.*, 35:1385-1386.
- Weidenhamer, J.D., Macias, F.A., Fischer, F. (1993) Just how insoluble are monoterpenes? *J. Chem. Ecol.*, 19:1799-1807.
- Wenzel, R.P. (2004) The antibiotic pipeline-challenges, costs, and values. *N. Engl. J. Med.*, 351: 523-526.
- White, D.G., Zhao, S., Sudler, R. et al., The isolation of antibiotic-resistant *Salmonella* from retail ground meats. *N. Engl. J. Med.*, 345:1147-1154.
- WHO, (2014) Public Health Importance of Antimicrobial Resistance. World Health Organization., https://www.who.int /drugresistance/AMR_Importance/en/.
- Wiegand, I., Khalaf, N., Al-Agamy, M.H.N., Wiedemann, B. (2004) First detection of the transferable quinolone resistance determinant in clinical *Providencia stuartii* strains in Egypt. In: Proceedings 14th Eur Congr. Clin. Microbiol. Infect. Dis., Abstr. O347.
- Woodford, N., Ward, M.E., Kaufmann, M.E., Turton, J., Fagan, E.J., James, D., Johnson, A.P., Pike, R., Warner, M., Cheasty, T., Pearson, A., Harry, S., Leach, J.B., Loughrey, A., Lowes, J.A., Warren, R.E., Livermore, D.M. (2004) Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum β -lactamases in the UK. *J. Antimicrob. Chemother.*, 54(4):735-743.
- Woodford, N., Turton, J.F., Livermore, D.M. (2011) Multiresistant gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS. Microbiol. Rev.*, 35(5),736e755.
- Yadav, K.K., Adhikari, N., Khadka, R., Pant, A.D., Shah, B. (2015) Multidrug resistant Enterobacteriaceae and extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli*: A cross-sectional study in national kidney center, Nepal. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.*, 4: 42.
- Yahiaoui, F., Benameur, Q., Ben-Mahdi, M.H. (2017) Antibacterial activity of *Mentha Pulegium* essential oil against avian isolated ESBL producing bacteria and its synergistic potential with antibiotics. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 9 (6): 35-41.
- Yakhlef, G., Laroui, S., Hambaba, L., Aberkane, M.C., Ayachi, A. (2011) Évaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurus nobilis*, plantes utilisées en médecine traditionnelle. *Phytothérapie.*, 9:209-218.

- Yang, H., Chen, S., White, D.G. et al., (2004) Characterization of multiple antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. *J. Clin. Microbiol.*, 42:3483-3489.
- Yap, P.S., Yiap, B.C., Ping, H.C., Lim, S.H. (2014) Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *Open. Microbiol. J.*, 8:6-14.
- Yossapol, M., Sugiyama, M., Asai, T. (2017) The occurrence of CTX-M-25-producing Enterobacteriaceae in day-old broiler chicks in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 79: 1644–1647.
- Yousfi, M., Mairi, A., Touati, A., Hassissene, L., Brasme, L., Guillard, T., De Champs, C. (2016) Extended spectrum β -lactamase and plasmid mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* fecal isolates from healthy companion animals in Algeria. *J. Infect. Chemother.*, 22: 431-435.
- Yue, L., Jiang, H.X., Liao, X.P., Liu, J.H., Li, S.J., Chen, X.Y., Chen, C.X., Lu, D.H., Liu, Y.H. (2008) Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in poultry and swine clinical isolates of *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.*, 132:414-420.
- Zamfir, M., Callewaert, R., Cornea, P.C. et al., (1999) Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. *J. Appl. Microbiol.*, 87:923-931.
- Zhou, L., Zheng, H., Tang, Y. et al., (2013) Eugenol inhibits quorum sensing at sub-inhibitory concentrations. *Biotechnol. Lett.*, 35:631-637.