

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE IBN KHLADOUN -TIARET-  
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES



## MEMOIRE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MAGISTER EN SCIENCES VETERINAIRES

OPTION : Microbiologie Appliquée

THEME

**ETUDE DE LA COLIBACILLOSE AVIAIRE :  
ISOLEMENT ET ANTIBIOGRAMME  
(Régions de Tiaret et Tissemsilt)**

PRESENTE PAR :  
BOULBAIR Ismail

Jury

<b>Mr. BENALLOU Bouabdellah.</b> Université de Tiaret.	<b>Président</b>	<b>Professeur</b>
<b>Mr. HAMMOUDI Abdelhamid.</b> Université de Tiaret.	<b>Promoteur</b>	<b>Professeur</b>
<b>Mr. BOUCIF Ahmed.</b> Université de Tiaret.	<b>Examineur</b>	<b>Professeur</b>
<b>Mr. ABDELHADI Si Ameer.</b> Université de Tiaret.	<b>Examineur</b>	<b>MCA</b>
<b>Mr. OUARED Khaled.</b> Université de Tiaret.	<b>Invité</b>	<b>MCB</b>

Année universitaire :

2016/2017

## **Remerciements**

*Avant tout je remercie Dieu à qui je dois obéissance et reconnaissance.*

*Je voudrais tout d'abord adresser toute ma reconnaissance et ma gratitude à mon encadreur, Monsieur HAMMOUDI Abdelhamid pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils.*

*Mes sincères remerciements et ma gratitude vont aussi au Pr BENALLOU Bouabdellah pour avoir accepté de juger et d'en présider le jury de soutenance.*

*Que vous soyez assuré de mon entière reconnaissance.*

*Mes remerciements vont également à Monsieur ABDELHADI Si Ameer qui a accepté de juger ce travail en tant qu'examineur. Je lui adresse mes sentiments les plus respectueux.*

*Mes remerciements vont également à Monsieur BOUCIF Ahmed qui a accepté de juger ce travail en tant qu'examineur. Que vous soyez assuré de mon entière reconnaissance.*

*Mes sincères remerciements s'adressent à Monsieur OUARED Khaled Pour l'intérêt qu'il a manifesté en participant en qualité de membre invité à ce jury.*

*Je rends hommage au personnel du laboratoire de microbiologie de l'institut vétérinaire de Tiaret : Mohamed El Amine, Oualid, Abdelhamid Pour leur aide et leur soutien durant la réalisation de ce travail.*

*Une pensée particulière pour ...*

*Mes parents, sans qui je n'en serai pas là aujourd'hui, merci pour tout leur amour et leur soutien depuis toujours. Ils ont su me donner toutes les chances pour réussir. Qu'ils trouvent, dans la réalisation de ce travail, l'aboutissement de leurs efforts ainsi que l'expression de ma plus affectueuse gratitude. Je vous dédie ce mémoire en guise de remerciement et de reconnaissance pour votre soutien constant et votre présence à mes côtés.*

*Ma femme Soumia, celle qui partage ma vie, mes doutes et mes joies.  
A la mémoire de mes grands-parents, qui m'ont inculqué les valeurs de la vie.  
Toute ma famille et tous mes amis qui me sont chers.*

*Finalement, je remercie tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail à :*

*Mes très chers parents leur présence et leur générosité du cœur m'apportent beaucoup de force pour arriver à mes buts que cet humble travail leur soit le témoin de mon admiration, de mon affection et exprime ma tendresse.*

*Ma très chère épouse Soumia.*

*Mon cher fils Tadj Eddine.*

*Mon très cher frère Seyyid Ahmed.*

*A toute la famille BOUTBARRA.*

*A toute la famille BOULEFRED.*

*A tous mes collègues.*

*A toute ma promotion.*

## الملخص:

ان بكتيريا الاشريشيا كولاي الممرضة للدواجن رغم اعتبارها من طرف الكثيرين كمسبب ثانوي للمرض الا انها تتسبب بخسائر اقتصادية معتبرة لقطاع تربية الدواجن، وتعتبر من بين الأسباب الأساسية لرفض ذبائح الطيور الداجنة على مستوى المذابح.

مئة بكتيريا قولونية (الاشريشيا كولاي) تم عزلها من الدواجن المشكوك في اصابتها بداء الكوليباسيلوز تم جمعها على مستوى ولايتي تيارت وتيسمسيلت.

المطابقة البيو كيميائية أظهرت وجود بكتيريا الاشريشيا كولاي.

اظهر اختبار الحساسية للمضادات الحيوية وجود نسبة عالية من المقاومة ضد الأمبيسيلين (100 %)، الاموكسيسيلين+حمض الكلافولانيك (100 %)، التينتراسيكلين (99 %)، الحمض النالديكسي (96 %)، الاونروفلوكساسين (79 %)، تريميتوبريم مع سيلفاميتوكسازول (78 %)، كما أظهر وجود نسبة متوسطة من المقاومة ضد الكاناميسين (68 %). غير ان المقاومة كانت ضعيفة ضد الجنتاميسين (29 %)، الكلورامفينيكول (21 %). و غياب أي مقاومة للكوليستين.

اختبار المقاومة اظهر وجود مقاومة مكثفة، اغلب البكتيريا القولونية صمدت ضد ثلاث مضادات حيوية (100 %)، في حين 96 % صمدت ضد خمسة مضادات حيوية.

ارتفاع المقاومة للمضادات الحيوية يندر بالاستعمال العقلاني لهذه المواد في مجال تربية الدواجن.

الكلمات المفتاح: كوليباسيلوز، اشريشيا كولاي، المقاومة للمضادات الحيوية، الدواجن.

## Résumé :

Les *Escherichia coli* aviaires, bien que considérés par beaucoup comme pathogènes secondaires, représentent à l'heure actuelle l'une des plus importantes cause de pertes économiques dans le secteur avicole et constitue aussi l'un des motifs de saisie les plus fréquents à l'abattoir.

Cent cultures d'*Escherichia coli* ont été isolées à partir de sujets suspects de colibacillose aviaire, provenant de deux régions : Tiaret et tissemsilt.

L'identification biochimique a montré que les isolats sont des *E. coli* typiques.

L'antibiogramme a montré des fréquences de résistance élevées à l'ampicilline (100%), Amoxicilline/acide clavulanique (100%), Tétracyclines (99%), acide nalidixique (96%), enrofloxacin (79%), co-trimoxazole (78%). Il a aussi montré une fréquence de résistance moyenne à la kanamycine (68 %). Par contre des fréquences relativement faibles ont été notées pour la gentamycine (29 %), chloramphénicol (21%), et aucune résistance n'a été observée envers la colistine.

Des taux inquiétants de la multirésistance ont été enregistrés, 100% des isolats étaient résistants à au moins trois antibiotiques, tandis que plus des trois quarts des isolats (96 %) étaient résistants à au moins 5 antibiotiques.

Cette antibiorésistance est alarmante et nécessite un usage judicieux des antibiotiques en élevage avicole.

**Mots clés** : colibacillose, *Escherichia coli*, antibiorésistance, poulet.

## **Abstract :**

The avian pathogenic *Escherichia coli* strains, although considered by almost like opportunist pathogen, represent actually one of the most important cause of economic losses in the poultry sector and is one of the most frequent cause of carcass rejection in the slaughter house.

One hundred cultures of *Escherichia coli* were isolated from chicken flocks suspected of colibacillosis from different poultry farms in Tiaret and Tissemsilt.

Biochemical identification showed that the isolates are typical *E.coli*.

Antibiogram showed high frequencies of resistance to : Ampicillin (100%), Amoxicillin +clavulanic acid (100%), Tetracycline (96%) Nalidixic acid (96%), enrofloxacin (79%), co-trimoxazole (78 %). Average frequency of resistance to Kanamycin (68%). Relatively low frequencies of resistance were observed for gentamycin (29%), chloramphenicol (21 %) and no resistance to colistin was noticed.

Multi-drug-resistance appears as a veritable problem, as 100% of *E. coli* isolates were resistant to at least three antibiotics, while over three quarters (96 %) were resistant to at least 5 antibiotics.

The significant increase in the incidence of antibioresistance must lead to a prudent use of antimicrobials agents in avian species.

**Keywords :** colibacillosis, *Escherichia coli*, antibioresistance, chicken.

# SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	I
-------------------	---

## Synthèse bibliographique

### Chapitre I : Données générales sur *E. coli*

1. <i>Escherichia coli</i> .....	1
1.1. Historique.....	1
1.2. Habitat.....	1
1.3. Taxonomie d' <i>Escherichia coli</i> .....	1
1.4. Caractères morphologiques.....	2
1.5. Caractères culturels.....	2
1.6. Caractères biochimiques.....	3
1.7. Caractères antigéniques.....	3
1.8. Résistance aux agents physiques et chimiques.....	5
2. Classification des souches :.....	5
2.1. Pathovars responsables d'infections intestinales :.....	5
2.1.1. Les <i>Escherichia coli</i> entéro-pathogènes (EPEC).....	5
2.1.2. Les <i>Escherichia coli</i> entéro-toxinogènes (ETEC).....	5
2.1.3. Les <i>Escherichia coli</i> entéro- invasifs (EIEC).....	7
2.1.4. Les <i>Escherichia coli</i> à adhérence diffuse (DAEC).....	7
2.1.5. Les <i>Escherichia coli</i> entérohémorragiques (EHEC).....	7
2.1.6. Les <i>Escherichia coli</i> entéro-agrégatifs (EAaggEC).....	8
2.2. Pathovars à infections extra- intestinales.....	8
2.2.1. Les <i>Escherichia coli</i> pathogènes aviaire (APEC).....	8
2.2.1.1. Facteurs de virulences associés aux APEC.....	9
2.2.1.2. Sérotypes.....	12
2.2.1.3. Distribution environnementale.....	13

## **Chapitre II : la colibacillose aviaire**

1. La colibacillose aviaire.....	14
1.1. Pathologies associées au syndrome de la colibacillose aviaire .....	14
1.1.1. Mortalités embryonnaires et du jeune poussin.....	14
1.1.2. Septicémie et complexe respiratoire chronique.....	15
1.1.3. Swollen head disease.....	15
1.1.4. Ovarites et salpingites .....	16
1.1.5. Dermate nécrotique .....	16
1.1.6. Granulomes à <i>Escherichia coli</i> (" Hjarres's disease ") .....	16
1.2. Pathogénie de la colibacillose aviaire .....	17
1.2.1. Colonisation du tractus respiratoire.....	17
1.2.2. Pénétration de la muqueuse.....	18
1.2.3. Dissémination dans l'organisme .....	18
1.3. Diagnostic.....	18
1.3.1. Diagnostic différentiel.....	18
1.3.2. Isolement et identification de l'agent responsable .....	19
1.4. Traitement et prophylaxie .....	19
1.4.1. Traitement .....	19
1.4.2. Prophylaxie.....	19

## **Chapitre III : Antibiotiques et antibioresistance**

1. Les antibiotiques .....	21
1.1. Historique .....	21
1.2. Définition .....	21
1.3. Modes d'action des antibiotiques .....	22
2. résistance aux antibiotiques.....	24
2.1. Définitions de l'antibiorésistance.....	24

2.2. Origine génétique de la résistance et modalités de transfert génétique.....	25
2.2.1. Résistance naturelle.....	25
2.2.2. Résistance acquise.....	25
2.2.2.1. Les mécanismes génétiques de la résistance acquise .....	26
2.3. Les mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	31
2.4. L'évolution des résistances .....	35
2.5. Diffusion des bactéries résistantes entre l'animal et l'homme.....	36

## **Etude expérimentale**

### **Matériels et méthodes**

I. Animaux.....	38
II. Matériels .....	38
1. Milieux de culture .....	38
2. Produits de laboratoire .....	38
3. Matériel d'autopsie.....	39
III. Méthodes .....	40
1. Examen clinique des poulets malades .....	41
2. Autopsie et réalisation des prélèvements .....	41
2.1. Autopsie .....	41
2.2. Prélèvement des Organes .....	41
3. Isolement bactériologique .....	42
4. Purification des isolats .....	42
5. identifications des isolats .....	42
5.1. Analyses préliminaires des isolats.....	42
5.1.1. Observation microscopique (coloration de Gram).....	42
5.1.2. Test d'Oxydase.....	43
5.2. Identification biochimique par galerie Api 20E.....	44
6. Antibiogramme.....	46

Résultats et discussion.....	50
Conclusion.....	60
Recommandations .....	61
Références bibliographiques .....	62
Annexes.	

## Liste des tableaux

Tableau N° 1 : les principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques de diverses familles .....	35
Tableau N° 2 : Répartition des sujets autopsiés .....	38
Tableau N° 3 : Antibiotiques utilisés .....	48
Tableau N° 4 : Répartition des lésions selon leur fréquence.....	51
Tableau N° 5 : Répartition des isolats d' <i>E.coli</i> .....	51
Tableau N° 6 : Résultats de l'antibiogramme des isolats récoltés .....	54
Tableau N° 7 : Pourcentage de multi résistance des isolats .....	55

## Liste des figures

Figure N° 1 : Colonies lactose positives d' <i>E. coli</i> sur gélose Mac Conkey .....	02
Figure N° 2 : Mode d'action des antibiotiques .....	23
Figure N° 3 : Les trois voies de transmission des résistances bactériennes .....	29
Figure N° 4 : Exemple des mécanismes de résistances qui peuvent être portés par l'ADN Plasmidique .....	30
Figure N° 5 : Mécanismes de résistance par altération (ou modification) des sites de liaison	33
Figure N° 6 : Protocol expérimental .....	40
Figure N° 7 : Antibiogramme avant incubation .....	47
Figure N° 8 : Tubes de disques imprégnés d'antibiotiques.....	48
Figure N° 9 : Périhépatite fibrineuse.....	50
Figure N° 10 : Péricardite fibrineuse.....	50
Figure N° 11 : Splénomégalie .....	50
Figure N° 12 : Aérosaculite.....	50
Figure N° 13 : Colonies d' <i>E. coli</i> sur gélose Mac Conkey après 24h d'incubation à 37°C .....	52
Figure N° 14 : exemple d'un profil biochimique d' <i>E. coli</i> sur Galerie api 20 E .....	52
Figure N° 15 : Antibiogramme après 18h d'incubation à 37°C.....	53
Figure N° 16 : Antibiogramme après 18h d'incubation à 37°C.....	53
Figure N° 17 : Taux de résistance aux différents antibiotiques testés .....	55
Figure N° 18 : pourcentages de multirésistance des isolats récoltés.....	56

## Liste des abréviations

- ADH : Adénine Déshydrogénase.
- ADN : Acide désoxyribonucléique.
- AFSSA : Agence Française de sécurité sanitaire des aliments.
- AMC : Amoxicilline+acide clavulanique.
- AMP : Ampicilline.
- AMY : Amygdaline.
- APEC : Avian pathogenic *Escherichia coli*.
- ARA : Arabinose.
- ARNm : Acide ribonucléique messenger.
- ARNt : Acide ribonucléique de transfert.
- ATB : Antibiotique.
- ATCC : American type Culture Collection.
- C : Composant du complément.
- CIT : Citrate.
- CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute
- CN : Gentamicine.
- COT : Co-trimoxazole
- CT : Colistine.
- DAEC : Diffuse Adherence *Escherichia coli*.
- DHF : Dihydrofolate.
- E. coli* : *Escherichia coli*.
- EHEC : Enterohemorrhagic *Escherichia coli*.
- EIEC : Entero-invasive *Escherichia coli*.
- EMB : Eosine methylene blue.
- ENR : Enrofloxacin.
- EPEC : Entéropathogenic *Escherichia coli*.
- ERV : Entérocoque résistant à la Vancomycine.
- ETEC : Enterotoxinogenic *Escherichia coli*.
- Ex PEC : Extraintestinal pathogenic *E. coli*.
- F : Antigène fimbriaire.
- GEL : Gélatine.
- GLU : Glucose.
- H : Antigène flagellaire.
- H<sub>2</sub>S : Sulfure d'hydrogène.

-IND : Indole.  
-INO : Inositol.  
-K : Antigène capsulaire.  
-LDC : Lysine Décarboxylase.  
-LT : Heat labile Toxin.  
-MAN : Mannitol  
-MEL : Melibiose.  
-mn : Minute.  
-mm : Millimètre.  
-ml : Millilitre  
-  $\mu\text{m}$  : Micromètre.  
-ONPG : Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside.  
-ODC : Orthinine Décarboxylase  
-PABA : Acide para-amino-benzoïque.  
-PH : Potentiel d'hydrogène.  
-PCR : Polymerase Chain Reaction.  
-PLP : Protéines liants la pénicilline.  
-Qnr : Quinolone resistance.  
-RHA : Rhamnose.  
-SAC : Saccharose.  
-SOR : Sorbitol  
-Spp : Sous espèce.  
-ST : Heat stable enterotoxin.  
-STX : Shigatoxin.  
-TDA : Tryptophane désaminase  
-TE : Tétracyclines.  
-THF : Tétrahydrofolate.  
-Tsh : Hémagglutinine sensible à la température.  
-UPEC : Uropathogenic *Escherichia coli*.  
-URE : Urée.  
-VP : Voges-Proskauer.  
-VT : Verotoxine.  
-VAN : Vancomycine

# *INTRODUCTION*

## INTRODUCTION

Depuis un demi-siècle, la production avicole dans le monde a connu des changements profonds, et ce généralement, grâce aux progrès en génétique et en nutrition, lesquels ont favorisé l'expansion phénoménale de cette production, qui par ce biais, a su répondre à l'augmentation remarquable de la demande en produits avicoles.

Les performances du secteur avicole sont freinées par plusieurs obstacles, car, les modes de production actuels, tout en permettant une plus grande productivité, ont vraisemblablement introduit des facteurs de risque qui leur sont intrinsèques. En effet, alors que l'industrie avicole passe généralement par une bonne maîtrise des facteurs d'ambiance, les importantes densités d'animaux en élevage impliquent des risques sanitaires parmi lesquels la colibacillose aviaire n'est pas des moindres.

Les *Escherichia coli* sont des hôtes commensaux du tractus digestif de la volaille, dont la plupart des souches ne sont pas pathogènes. Cependant, un certain nombre de ces dernières appartenant à des sérotypes bien particuliers appelées "Avian Pathogenic *E. coli*" ou APEC sont associées au syndrome de la colibacillose.

En filière avicole, la colibacillose aviaire est la pathologie bactérienne la plus fréquente (Robineau et Moalic, 2010). Même si elle est le plus souvent considérée comme une infection secondaire (Nakamura *et al.*, 1992 ; Barnes *et al.*, 2008), elle affecte tous les systèmes de production et engendre de lourdes pertes économiques. En effet, elle cause de la mortalité, une diminution des performances, une chute de l'éclosabilité et représente une importante cause de saisie à l'abattoir. A cela viennent s'ajouter les frais en antibiothérapie qu'engendrent les diverses manifestations de cette maladie. (Barnes *et al.*, 2008).

Etant donnée le peu de connaissance sur l'énorme diversité des souches d'*E. coli* aviaires en matière de facteurs de virulence, aucun vaccin n'est disponible à l'heure actuelle pour lutter efficacement contre la maladie. En conséquence, l'antibiothérapie basée sur un diagnostic adéquat ainsi que la prophylaxie, restent encore les seuls moyens de lutte contre cette maladie (Stordeur et Mainil, 2002).

D'un autre côté, l'usage croissant des antibiotiques dans un but thérapeutique et prophylactique s'est malheureusement traduit par une augmentation progressive du nombre des bactéries résistantes.

Ce problème est aussi à l'origine d'un risque pour la santé publique. En effet la volaille représente un réservoir de souches résistantes transmises à l'homme via la chaîne alimentaire (Tancrede, 1983).

La tendance élevée à la multi résistance est une des caractéristiques des souches d'*Escherichia coli* (Amara, 1996). Elle est à l'origine de la réduction de l'efficacité thérapeutique et prophylactique de plusieurs antibiotiques utilisés chez la volaille.

### **Objectifs de l'étude :**

En l'absence de données épidémiologiques suffisantes, quant à la résistance des *Escherichia coli* aux antibiotiques ; de par cette étude nous avons tenté d'apporter notre contribution à ce volet.

Pour ce faire l'objectif de notre étude a été :

- L'isolement des *Escherichia coli* à partir de cas suspects de colibacillose aviaire.
- Ainsi que ; l'évaluation des niveaux de résistance de ces bactéries aux antibiotiques selon les normes CLSI.

Et ce au niveau de deux régions : Tiaret et Tissemsilt.

*CHAPITRE I*  
*DONNEES GENERALES*  
*SUR E. COLI*

## 1. *Escherichia coli*

### 1.1. Historique

*Escherichia coli* est une bactérie Gram-négatif, appartenant à la famille des entérobactéries, isolée et décrite en 1885 par le pédiatre allemand, Theodor Escherich (1857-1911) dans les selles des nourrissons, en 1919, en hommage aux travaux d'Escherich, Castellani et Chalmers proposent de nommer cette bactérie *E. coli* (Grimont, 1987).

Plusieurs travaux tendent à confirmer le rôle pathogène de cet agent dans les entérites des nouveau-nés, ainsi que dans des troubles divers atteignant de nombreuses espèces animales notamment les volailles qui ont fait l'objet de plusieurs recherches (Fedde, 1998).

Lignieres, en 1894 décrit dans une étude expérimentale chez les volailles une affection de type systémique, en provoquant la maladie par injection à des poules en intraveineuse des cultures d'*E. coli* (Martel, 1997).

Martel, en 1997 démontre que l'inoculation du germe dans les muscles pectoraux des poules provoque des lésions de péricardite, des conjonctivites, des entérites, des omphalites, des granulomatoses (Quinn *et al.*, 1994).

### 1.2. Habitat

*Escherichia coli* est une espèce habituelle et commensale du tractus gastro-intestinal, associé à de nombreuses pathologies intestinales et extra-intestinales, tant chez l'homme que chez les animaux domestiques. Il colonise l'intestin dès la première heure après la naissance et occasionne chez les nouveau-nés et nourrissons, des diarrhées fréquentes très souvent mortelles (Derycke, 1991 ; Pohl, 1993).

Les *Escherichia coli* n'existent pas normalement dans l'eau et le sol, leur présence est le témoin d'une contamination fécale récente qui rend l'eau impropre à la consommation (Avril *et al.*, 1992 ; Bornert, 1998).

### 1.3. Taxonomie d'*Escherichia coli*

L'espèce *Escherichia coli* appartient au genre *Escherichia* de la famille des *Enterobacteriaceae* qui a son tour fait partie de l'ordre des *Enterobacteriales*, du règne des bactéries (*bacteria*) (Bergey et Holt, 1994).

#### 1.4. Caractères morphologiques

*Escherichia coli* est un bacille gram négatif aux extrémités arrondies, uniformément coloré, non sporulé, appartenant à la famille des entérobactéries, Sa taille (2-3 x 0.6 µm) et sa forme peuvent varier et de nombreuses souches possédant des flagelles péritriches (mobiles), certaines souches sont capsulés et donnent des colonies mucoïdes sur milieu solide (Payne, 1988).

#### 1.5. Caractères cultureux

Aérobie facultatif, elle cultive bien en 24 heures à 37 °C sur les milieux gélosés en donnant des colonies rondes ; lisses, à bords régulier, de 2 à 3mm de diamètre (Marchal *et al.*, 1991).

Sur milieu liquide, elle occasionne un trouble uniforme du bouillon. Les cultures se font en principe sur des milieux plus sélectifs qui permettent l'identification et l'isolement des *E. Coli*. Ils contiennent des inhibiteurs vis-à-vis des bactéries à gram positif, mais aussi des indicateurs colorés de pH (rouge phénol). Ces milieux facilitent l'isolement de ces bactéries en vue de l'identification (le Minor et Viron, 1989).

Sur milieu Mac Conkey : les colonies sont lisses, translucides, brillantes et rosâtres (figure 1) (Cloud *et al.*, 1985).



**Figure N° 01** : Colonies lactose positives d'*E. coli* sur gélose Mac Conkey (Hans, 2015).

## 1.6. Caractères biochimiques

C'est sur l'étude des caractères biochimiques qui repose en pratique le diagnostic de genre et d'espèce qui ne doit être abordé qu'après que le diagnostic de famille ait été établi avec certitude (Pilet *et al.*, 1981).

Les principaux caractères sont : absence de production d'oxydase, absence d'uréase, fermentation de lactose, production d'indole, absence de croissance sur le citrate et pas de production de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) (Minor et Richard, 1993).

Selon Guechi (2002) environ 70 % des souches mobiles donnent les Caractères suivants :

- Gaz en glucose positif en général.
- Production d'indole positif.
- Lactose, mannitol, sorbitol positif.
- β-galactosidase (ONPG) positive.
- Phénylalanine-désaminase, uérase, oxydase, gélatinase, malonate, anoditol, inositol, H<sub>2</sub>S, Citrate de Simmons négatifs.
- Rouge de méthyle positif.
- Vogues Proskauer (VP) négative.

On peut rencontrer des variant négatifs pour un caractère habituellement positif par exemple l'indole ; ceci est consécutif à une mutation.

A l'inverse, on peut exceptionnellement rencontrer des variantes positives pour un caractère habituellement négatif. Ce caractère peut être codé par un plasmide dont l'existence a été démontrée dans certains cas (H<sub>2</sub>S, citrate de Simmons) (Pilet *et al.*, 1981).

## 1.7. Caractères antigéniques

*E. coli* possède des antigènes associés à quatre types de structures (Alain et Bernard, 2002).

Les antigènes de paroi (somatiques) ou antigènes O qui correspondent aux polysides fixés sur les lipopolysaccharides (LPS), les antigènes de flagelles ou antigènes H de nature protéique, constitués de flagelline, les antigènes de surface de type F qui sont présents chez les souches ayant des propriétés d'adhésion, et les antigènes d'enveloppe K qui sont de nature polysaccharidiques (Alain et Bernard, 2002).

Le sérotypage représente une méthode intéressante pour caractériser des souches pathogènes d'*Escherichia coli*, et n'a d'intérêt en pratique que dans la mesure où l'on peut faire une relation entre le sérotype et le pouvoir pathogène des souches (Nataro et Kaper, 1998 ; LeBlanc, 2003).

#### **a-Antigène O ou antigène somatique**

Sa nature est lipopolysaccharidique. Chaque antigène O permet de définir un sérotype O correspondant, grâce à des réactions d'agglutination.

Les antigènes O sont particulièrement importants, car ils conditionnent le pouvoir pathogène des souches, ainsi que l'immunité conférée, c'est pourquoi certains sérotypes semblent plus impliqués que d'autres dans le processus pathologiques. On a distingué jusqu'à présent, plus de 171 antigènes O différents chez *Escherichia coli* (Pilet *et al.*, 1981).

#### **b-Antigène K ou antigène capsulaire**

Les antigènes de surface aussi appelés antigènes de capsule ou d'enveloppe ou encore antigène Vi chez *Salmonella* sont des polyosides acides qui ont été initialement divisés en trois types A, B et L.

- **L'antigène L** : thermolabile, est le plus fréquent. Le chauffage à 100°C pendant une demi-heure le détruit et démasque l'antigène O le rendant accessible aux techniques de sérogroupage.
- **L'antigène A** : est plus rare et correspond véritablement à un antigène capsulaire. Le chauffage à 100°C ne suffit pas à le détruire. Seul un autoclavage à 121°C durant une heure permet de démasquer l'antigène somatique.
- **L'antigène B** : possède une thermolabilité intermédiaire entre les Ag L et A. Un chauffage à 100°C permet le sérogroupage mais ne supprime pas totalement l'antigène B. Un chauffage plus prolongé peut permettre de le détruire totalement.

L'antigène K qui entoure la paroi de certaines entérobactéries peut masquer l'antigène O (Avril *et al.*, 2002).

#### **c-Antigène H ou antigène flagellaire**

Il n'existe que chez les bactéries mobiles, donc pourvues de flagelle. A cet antigène H correspond une agglutination H faite d'agglutinats floconneux, lâches et facilement dissociés par agitation. Les bactéries sont agglutinées par leurs flagelles on en connaît 56 types.

Les antigènes O, K, H sont à la base d'un schéma de diagnostic antigénique (Kaeckenbeek, 1993).

### **d-Antigène F ou antigène fimbriaire**

Ils sont présents dans les structures fimbriaires de certaines adhésines de virulence. Le terme " fimbriae" est utilisé pour décrire les adhésines de surface dont la fonction est l'attachement de la bactérie à l'épithélium intestinal. Ces fimbriae sont encore appelés pili ou facteurs de colonisation. Ils forment autour du corps bactérien de fins filaments non flagellaires ayant une spécificité antigénique propre (Pilet *et al.*, 1981).

Ils sont un important facteur de pathogénicité, car ils confèrent aux bactéries des propriétés d'adhésion aux cellules, telles les cellules intestinales ou rénales et hémagglutinantes des bactéries qui les possèdent (Joly et Alain, 2003).

## **1.8. Résistance aux agents physiques et chimiques**

*Escherichia coli* est relativement sensible aux agents physiques et chimiques, dans la majorité des cas, une température de 55°C pendant une heure ou 60°C pendant 20 mn est mortelle pour ces organismes et ils sont tués en autoclave à 120°C pendant 20 mn (Mao *et al.*, 2003).

Elle peut survivre des semaines ou des mois dans l'eau, les matières fécales et dans les poussières des animaux domestiques, elle est hautement sensible à l'action létale du phénol et du crésol, mais l'efficacité de ces désinfectants est réduite en présence du mucus et des fèces (Guechi, 2002).

## **2. Classification des souches :**

### **2.1. Pathovars responsables d'infections intestinales :**

#### **2.1.1. Les *Escherichia coli* entéro-pathogènes (EPEC)**

Ces souches étaient responsables, dans les années 50, de diarrhées infantiles graves ou toxiques survenant par épidémies dans des crèches ou des maternités. Ces souches encore appelées *E. coli* G.E.I (des gastro-entérites infantiles) sont plus rarement rencontrées aujourd'hui, elles sont alors isolées de cas sporadiques (Andrade *et al.*, 1989 ; Jerse *et al.*, 1990).

#### **2.1.2. Les *Escherichia coli* entéro-toxinogènes (ETEC)**

Elles sont responsables chez l'homme de diarrhées très liquides survenant dans les pays en développement. Ces diarrhées s'observent principalement chez les voyageurs d'où

l'appellation de « diarrhée des voyageurs » ou « turista ». Elles sont souvent épidémiques chez les enfants de ces pays (Levine, 1987).

Les ETEC se distinguent des souches commensales par leur capacité de produire des facteurs de virulence : des adhésines et des toxines permettant la colonisation sélective de l'intestin grêle (Derycke, 1991).

La première étape de l'infection à ETEC est la colonisation et l'adhésion des bactéries aux microvillosités des entérocytes grâce à des facteurs d'attachement (adhésines) de type fimbriaire (Avril *et al.*, 1992 ; Mainil, 1993).

La deuxième étape est caractérisée par la production d'une ou plusieurs entérotoxines qui vont provoquer une diarrhée (popoff, 1996).

- **Les entérotoxines**

Les entérotoxines désignent des toxines dont l'organe cible est l'intestin et sont responsable de la sécrétion accrue d'eau et d'électrolytes d'où diarrhée. Mais certaines agissent sur la muqueuse intestinales en produisant des nécroses (Bywater, 1982 ; Popoff, 1996).

Les souches entérotoxinogènes synthétisent deux sortes de toxines :

- **-Les entérotoxines thermolabiles (LT)**

Elles sont mises en évidence par leur pouvoir de dilatation de l'anse intestinale ligaturée de lapin et de diverses espèces animales décrites par Smith *et al.*, 1970 cités par Pohl, 1993, mais pas celle du porc (Levine, 1987).

La toxine (LT) est une protéine qui ne résiste pas à un chauffage et est détruite à 65 °C pendant 30 minutes (Kingsbury et Wagner, 1990).

- **-Les entérotoxines thermostables (ST)**

Ces toxines sont à l'origine de diarrhées intenses, elles se différencient des autres entérotoxines par leur petite taille et leur résistance à la chaleur, elles ne sont pas détruites après un chauffage de 30 minutes à 100°C (Kings Bury et Wagner, 1990).

### 2.1.3. Les *Escherichia coli* entéro- invasifs (EIEC)

Les EIEC sont responsables de diarrhées aqueuses qui, dans de rares cas, vont évoluer vers une dysenterie suggérant que leur pouvoir pathogène est similaire à celui des *shigella* (Nataro et Kaper, 1998)

Les souches EIEC sont uniquement présentes chez l'homme et les singes supérieurs (Pohl, 1993).

Les EIEC paraissent relativement rares, mais cette rareté peut être due au fait qu'ils peuvent être aisément confondus avec les *shigella*, étant donné que leur pouvoir pathogène est comparable à celui des *shigella* tant par leurs caractères biochimiques qu'antigéniques c'est-à-dire sérologique.

Les EIEC sont capables comme les *shigella* d'envahir la muqueuse du colon par internalisation dans les entérocytes et la détruisent en provoquant des dysentéries tant chez l'adulte que chez l'enfant. La présence de leucocytes dans les selles est le processus témoignant du processus invasif.

Comme les *shigella*, les EIEC hébergent un plasmide qui présente des zones d'homologie avec ceux des *shigella* et qui sont corrélées avec la virulence de ces souches. Jusqu'à présent *Escherichia coli* invasif n'a pas été observé chez des animaux domestiques (Avril *et al.*, 1992 ;pohl,1993).

### 2.1.4. Les *Escherichia coli* à adhérence diffuse (DAEC)

Les DAEC sont toute une nouvelle catégorie de souches associées à des diarrhées aqueuses aiguës ou persistantes survenant surtout chez les enfants (plus particulièrement ceux âgés de 2 à 6 ans) (Garcia et Le Bouguenec, 1996).

### 2.1.5. Les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC)

Ces souches ont été décrites en Amérique du Nord, au Japon et en Europe, Elles sont responsables d'épidémies de diarrhées aqueuses puis hémorragiques (colite hémorragique). Elles appartiennent à quelques sérotypes particuliers (O157 :H7, O103 :H2, O26 :H11, O111 :H38). Les EHEC sont capables de produire une ou plusieurs cytotoxines appelées verotoxines capables de tuer in vitro les cellules Vero (cellules rénales du singe vert africain) par inhibition de la synthèse protéique. Les toxines sont appelées également Shiga-Like-Toxin en raison de leurs similitudes avec la toxine de *Shigella dysenteriae* type 1. Deux types de verotoxines existent STX1, STX2 avec plusieurs variants de STX2, STX2 serait mille fois

plus cytotoxique sur les cellules endothéliales rénales humaines que STX1. L'homologie entre STX1 et STX2 varie de 50 à 60% avec des régions de faibles ou de très hautes homologies (Karmali, 1989).

### **2.1.6. Les *Escherichia coli* entéro-agrégatifs (EAaggEC)**

Les EAEC sont une catégorie de souches pathogènes associés, à des diarrhées aqueuses pouvant évoluer vers des formes persistantes (Huang *et al.*, 2006). Ils élaborent une entérotoxine thermostables et une entérotoxine thermolabile (Kaper *et al.*, 2004).

## **2.2. Pathovars à infections extra- intestinales**

Les souches d'*Escherichia coli* pathogènes extra-intestinales ExPEC se caractérisent par leur pouvoir de coloniser d'autres systèmes en dehors du système gastro-intestinal (russo et johnson, 2000) et elles représentent un risque sanitaire plus élevé que celui des *E. coli* pathogènes intestinales. Ce groupe comprend les *E. coli* uropathogènes (UPEC) responsables d'infections urinaires (cystites, pyélonéphrites), les *E. coli* associées à des méningites et des septicémies (neonatal meningitis *E. coli* ou NMEC) ainsi que le pathovar aviaire « *Avian Pathogenic E. coli* » (APEC).

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

### **2.2.1. Les *Escherichia coli* pathogènes aviaire (APEC)**

*Escherichia coli* (*E. coli*) est une espèce bactérienne présente naturellement dans la flore de l'intestin, à la surface des muqueuses des volailles, ainsi que dans leur environnement. Bien que la plupart des souches d'*E. coli* soient commensales, certaines souches sont susceptibles d'induire une pathologie, faisant généralement suite à l'action de facteurs prédisposant. Tels qu'une atteinte virale, mycoplasmique, ou des conditions environnementales défavorables (Gross, 1994).

Les APEC sont responsables de nombreuses pathologies aviaires dont, les aérosacculites, les péricardites, les péritonites, les salpingites, les ostéomyélites, les omphalites, l'infection la plus importante étant celle des voies respiratoires. Les sérotypes prédominants sont O1 :K1 ; O2 :K1 ; et O78 : K80 (Janben *et al.*, 2001 ; Blanco *et al.*, 1997).

### 2.2.1.1. Facteurs de virulences associés aux APEC

Le pouvoir pathogène des *E. coli* aviaires implique la propriété des souches à coloniser l'appareil respiratoire, la résistance aux défenses immunitaires, l'aptitude à se multiplier dans les liquides physiologiques de l'animal dans des conditions de carence en fer et la capacité de produire des effets cytotoxiques, en relation avec ces propriétés.

Plusieurs facteurs de virulence ont été décrits chez les APEC, on distingue principalement les adhésines, les systèmes d'acquisition du fer, les capsules K1 et K80, l'hémagglutinine thermosensible, les protéines de la membrane externe. Plusieurs gènes de ces facteurs de virulence sont portés par des larges plasmides qui sont communs chez les APEC (Mellata *et al.*, 2010).

#### a-Les adhésines fimbriales

Les fimbriae sont de fins filaments protéiques extracellulaires, disposés de façon péritriche autour de la bactérie.

##### - Les fimbriae de type 1 ou F1

Les Fimbriae F1 sont des hétéropolymères de protéines, constitués d'une protéine majoritaire (Fim A) et de protéines minoritaires (FimF, FimG et FimH). la protéine FimH généralement située à l'extrémité des Fimbriae, constitue l'adhésine, responsable des propriétés hémagglutinines des fimbriae et impliquée dans l'adhésion aux cellules eucaryotes ce qui est en rapport avec sa grande affinité pour les mannosides. Les fimbriae de type 1 sont codés par le locus chromosomique *fim* (Orndorff, 1994).

Ces fimbriae permettent aux APEC d'adhérer aux cellules épithéliales de la trachée et du pharynx des poulets *in vivo*. Les fimbriae de type 1 sont souvent exprimés par des bactéries isolées de la trachée, des poumons, et des sacs aériens des poulets infectés mais pas par celles isolées des organes internes ou du sang (Dozois *et al.*, 1994 ; Pourbakhsh *et al.*, 1997).

Le rôle du fimbriae de type 1 dans la pathogénie des APEC est encore controversé. Selon certaines études, le fimbriae de type 1 permettrait aux bactéries d'adhérer à la trachée du poulet et ainsi contribuer à la virulence des APEC (Dho et Lafont, 1984 ; Pourbakhsh *et al.*, 1997).

D'autres travaux ont par contre démontré que ni le fimbriae F1, ni l'adhésine fimH ne sont requis à la colonisation du tractus respiratoire des poulets (Arne *et al.*, 2000; Marc *et al.*, 1998). Selon Leclerc *et al.* (2003) le fimbriae de type 1 permettrait aux *E. coli* responsables des cellulites aviaires d'adhérer à la peau des poulets.

#### - Les Fimbriae de type P

Les fimbriae P sont le plus souvent associés aux souches d'*E. coli* responsables des infections urinaire (UTI) chez l'homme (Johnson, 1991).

Ils jouent un rôle important dans l'adhérence aux cellules uro-épithéliales et dans le développement des pyélonéphrites. Les fimbriae de type P sont codés par un ensemble composé de 11 gènes situé sur le chromosome. Le fimbriae est constitué d'une sous-unité majeure (PapA) et d'une adhésine terminale (PapG). L'adhésine possède 3 variants différents (I, II et III) reconnaissant différents iso-récepteurs d'un glycolipide. La présence des fimbriae de type P est significativement plus fréquente chez les souches isolées de poulets septicémiques que chez des souches isolées de poulets sains (Dozois *et al.*, 1992).

Les fimbriae P n'adhèrent pas *in vitro* aux cellules épithéliales du pharynx et de la trachée de poulets (Van Den Bosch *et al.*, 1993) et ne sont pas exprimés *in vivo* à ces localisations, Cependant l'expression des fimbriae P a été mise en évidence *in vivo*, au niveau des sacs aériens et des organes internes (Pourbakhsh *et al.*, 1997). ces résultats suggèrent que, si les fimbriae P ne jouent aucun rôle dans la colonisation initiale de l'appareil respiratoire. Ils pourraient intervenir dans les stades plus tardifs de l'infection.

#### **b-Résistance au sérum**

La résistance à l'effet bactéricide du complément dans le sérum, médiée par différentes structures bactériennes comme la capsule, le lipopolysaccharide, des protéines de membrane externe, est associée aux souches APEC, surtout celles isolées de lésions de septicémie. Ainsi, il a été démontré qu'une corrélation existe entre la résistance au sérum et la virulence des souches inoculées par voie intraveineuse chez des dindes de trois semaines (Ellis *et al.*, 1988).

D'autre part, il a été démontré qu'une forte corrélation existe entre la résistance au sérum et le taux de létalité chez des poussins d'un jour (Ike *et al.*, 1992).

### c-Les capsules

Plus de 80 capsules polysaccharidiques (antigène K) chimiquement distinctes ont été décrites chez les *E. coli*, cependant très peu d'entre elles sont associées aux infections invasives (Orskov et Orskov, 1992). Les capsules confèrent à la bactérie de la résistance à l'immunité spécifique et non spécifique de l'hôte. En absence d'anticorps spécifiques, la capsule joue un rôle de protection de la bactérie contre l'effet bactéricide du sérum et contre la phagocytose (Howard et Glynn, 1971). La capsule K1 est fréquemment associée aux APEC de séro groupe O1, O2 et non typables (Gross *et al.*, 1991; Nakazato *et al.*, 2009; Dho Moulin and Fairbrother, 1999). La capsule K80 est associée au séro groupe O78 (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999). En effet, Pourbakhsh *et al.* (1997) ont démontré que 3 souches APEC exprimant la capsule K1 étaient plus résistantes aux effets bactéricides du sérum comparativement aux autres souches APEC qui expriment d'autres antigènes K. Ces résultats ont été confirmés par ceux de Mellata *et al.* (2003), qui ont démontré que la capsule K1 augmente la résistance au sérum des souches APEC, de même que la capacité de colonisation des organes internes chez les volailles. Ainsi, la capsule K1 est associée aux souches septicémiques humaines et animales (Ngeleka *et al.*, 1996).

### d-Aérobactine

La faible quantité de fer disponible dans les liquides physiologiques ne permet pas aux bactéries de pouvoir s'y multiplier. C'est pourquoi, elles ont acquis un système très efficace de captation du fer leur permettant de survivre en présence de faibles concentrations en fer. Plusieurs études ont montré que la plupart des souches APEC (73-98%) possède le système d'acquisition du fer appelé aérobactine, alors que les souches non pathogènes le produisent moins fréquemment (Dho et Lafont, 1984 ; Lafont *et al.*, 1987; Emery *et al.*, 1992).

Ce système, dont l'opéron est situé sur un grand plasmide (80Kb), fonctionne *in vivo* et son rôle principal serait de permettre aux bactéries de pouvoir se multiplier dans le sang ou les organes autres que l'intestin (Williams, 1979 ; Vidotto *et al.*, 1991; Wooley *et al.*, 2000).

D'autre part, la corrélation élevée entre la production de l'aérobactine et la virulence des souches APEC, a permis le développement d'un test de diagnostic basé sur la détection par réaction immunologique de la protéine IutA, qui est le récepteur membranaire pour le complexe aérobactine- fer (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999).

### e-Toxines

Quelques études ont démontré que les souches APEC sont capables de produire des toxines pouvant être impliquées dans le processus pathogénique. Cependant, hormis la toxine VT2y (semblable à la toxine VT2v associée à la maladie de l'œdème du porc) présente chez 72 % des souches associées à la "Swollen head disease" (Katwa et White, 1992 ; Parreira *et al.*, 1998) et l' "Escherichia coli vacuolating factor" ou ECVF, toxine ressemblant à la toxine VacA d'*Helicobacter pylori*, décrit chez une trentaine de souches aviaires pathogènes (Salvadori *et al.*, 2001) et l' "Escherichia coli vacuolating factor" ou ECVF, toxine ressemblant à la toxine VacA d'*Helicobacter pylori*, décrit chez une trentaine de souches aviaires pathogènes (Salvadori *et al.*, 2001).

### f-Hémagglutinine

Récemment, il a été montré que le gène *tsh* isolé d'une souche APEC de poulet et localisé sur un plasmide codant pour une hémagglutinine sensible à la température, est associé préférentiellement à ces souches et ne se retrouve pas chez des souches d'*E. coli* isolées de fèces d'animaux sains (Provence et Curtiss III, 1994).

La prévalence du gène *tsh* a été d'ailleurs investiguée sur une collection de 300 souches APEC testées sur le modèle du poussin d'un jour. Les résultats indiquent que parmi les souches possédant le gène *tsh*, 90,6 % font partie des souches les plus virulentes (Dozois *et al.*, 2000).

De plus, des études menées avec un mutant *tsh* montrent que Tsh peut contribuer au développement des lésions dans les sacs aériens, mais n'est pas nécessaire à la bactérie pour coloniser l'ensemble de l'animal et créer des lésions de péricardite, périhépatite et induire de la septicémie (Dozois *et al.*, 2000).

#### 2.2.1.2. Sérotypes

Les premières études menées sur les colibacilles aviaires par Sojka et Carnaghan (1961) montrent que les sérogroupes les plus fréquents sont O1, O2, O35 et O78. Plus récemment, des études menées sur 112 souches d'*E. coli* isolées de cas de colibacillose au Canada par Dozois *et al.* (1992), ont montré que 16 sérogroupes étaient représentés parmi lesquels les sérogroupes O78 (52 %) et O1 (6 %) étaient les plus fréquemment rencontrés. Les dernières études réalisées montrent que les plus présents et les plus pathogènes sont les sérotypes O1, O2 et O78, représentant de 15 à 61 % des souches isolées bien que d'autres soient aussi présents. Les autres sérotypes représentés de manière significative sont : O8, O15, O18, O35,

O88, O109, O115 et O116 (Brée *et al.*, 1989 ; Dho-Moulin *et al.*,1990 ; Babai *et al.*,1997 ; Blanco *et al.*,1997 ; Dho-Moulin et Fairbrother,1999).

### 2.2.1.3. Distribution environnementale

Le plus important réservoir des *E. coli* aviaires est le tractus digestif de l'animal dont 10 à 15 % de la population colibacillaire appartiennent à des sérotypes potentiellement pathogènes. Chez le poulet, les concentrations sont de l'ordre de  $10^6$  colibacilles par gramme de matière fécale. Les plus grandes concentrations étant retrouvées chez les animaux de moins de 3 semaines, essentiellement au niveau du tractus digestif postérieur (Gross, 1994 ; Dho-Moulin et Fairbrother, 1999).

Les *Escherichia coli* sont très facilement véhiculés par la poussière qui constitue une source importante de contamination en élevage (Oyetunde, 1978). Ainsi, il a été démontré que la poussière présente dans les élevages pouvaient contenir jusqu'à  $10^6$  colibacilles par gramme et que les sérotypes s'y retrouvant s'avéraient être identiques à ceux retrouvés dans les lésions

septicémiques (Gross, 1994). On peut aussi retrouver ces bactéries dans l'alimentation et l'eau de boisson.

*SYNTHESE*  
*BIBLIOGRAPHIQUE*

*CHAPITRE II*  
*LA COLIBACILLOSE*  
*AVIAIRE*

## 1. La colibacillose aviaire

Les *Escherichia coli* sont des hôtes commensaux du tractus digestif de la volaille et la plupart des souches ne sont pas pathogènes. Cependant, un certain nombre de celles-ci appelées "Avian Pathogenic *E. coli*" ou APEC et appartenant à des sérotypes bien particuliers sont associées au syndrome de la colibacillose, dont les lésions et les manifestations peuvent être variables suivant l'âge de l'animal (infection de la vésicule vitelline, colisepticémie, maladie respiratoire chronique, salpingite, péritonite, affection chronique de la peau, "swollen-head disease", ostéomyélite) (Gross, 1994).

### 1.1. Pathologies associées au syndrome de la colibacillose aviaire

#### 1.1.1. Mortalités embryonnaires et du jeune poussin

Cette expression de la colibacillose constitue probablement avec les erreurs d'élevage, la cause la plus importante de mortalité chez les poussins âgés de moins d'une semaine. La contamination de l'œuf et plus précisément de la membrane vitelline, se fait essentiellement lors de la ponte, au passage de celui-ci par le cloaque. Les bactéries alors présentes dans les matières fécales de la poule viennent se déposer à la surface de l'œuf. Ensuite, celles-ci pénètrent à travers les membranes coquillières et vont contaminer la membrane vitelline. La possibilité de contamination des œufs à partir de lésions de salpingite ou d'ovarite existe mais reste peu fréquente (Gross, 1994).

De 0,5 à 6% des œufs sont contaminés par *E. coli*. Dans cette pathologie, on peut considérer que celle-ci est l'agent primaire de l'infection (Jordan et Pattison, 1996 ; Dho-Moulin et Fairbrother, 1999). Les mortalités embryonnaires sont constatées un peu avant l'éclosion : les œufs contaminés présentent une coquille de moindre qualité ; sont plus chauds et leur surface est mouillée. Les mortalités se poursuivent encore après l'éclosion et ce, pendant une période de 3 semaines.

Les retards d'involution de la vésicule vitelline sont fréquents chez les poussins contaminés et peuvent parfois s'accompagner de lésions d'omphalite ; ceux qui passent le cap des 3 semaines présentent bien souvent des lésions de péricardite. Parfois cependant, la seule manifestation de la maladie est la réduction du gain quotidien moyen (Jordan et Pattison, 1996).

### 1.1.2. Septicémie et complexe respiratoire chronique

L'infection du tractus respiratoire est souvent observée chez des individus âgés de 2 à 12 semaines. Il s'agit de l'une des infections les plus communes qui affecte particulièrement les poulets de chair. Les pertes économiques sont liées aux taux de mortalités qui peuvent aller de 30 à 50%, et de morbidité pouvant dépasser les 50%, mais également à une réduction significative de la croissance et du coût élevé de médication (Yogaratnam, 1995 ; Elfadil *et al.*, 1996).

La contamination se fait par voie respiratoire et est secondaire à une infection à mycoplasmes (*Mycoplasma gallisepticum*), à une virose à tropisme respiratoire (bronchite infectieuse) ou immunosuppressive (maladie de Gumboro), à un accident de vaccination ou à une concentration trop élevée en agents irritants dans l'air (poussière ou ammoniac) (Oyetunde *et al.*, 1978; Nakamura *et al.*, 1992). Le premier signe clinique rencontré est une chute importante de la consommation alimentaire. Ensuite, de l'abattement accompagné d'hyperthermie (42 à 44°C) se manifestent. Les animaux les plus atteints présentent alors des signes de détresse respiratoire (bec ouvert, respiration accélérée et irrégulière). Au niveau lésionnel, les organes les plus touchés sont les sacs aériens (aérosacculite), le foie (périhépatite), le cœur (péricardite) et par contiguïté de tissu, la cavité abdominale (péritonite). Au niveau du cœur, le péricarde prend un aspect opaque et œdémateux et se remplit d'un exsudat fibrineux. Les sacs aériens quant à eux perdent leur transparence, s'épaississent et présentent un aspect congestif. Quant aux autres organes, tels que le foie et la rate, les lésions sont surtout localisées en périphérie de ceux-ci, et sont caractérisées par de la congestion, un épaississement du tissu et un dépôt de fibrine. Ce dépôt est parfois tellement important que la surface de l'organe prend l'aspect d'une crêpe (Jordan et Pattison, 1996). Les premiers signes microscopiques consistent en l'apparition d'un œdème suivi d'une infiltration d'hétérophiles.

Ensuite, dans un second temps apparaissent les phagocytes qui deviennent rapidement majoritaires. Les lésions sont alors caractérisées par la présence de ceux-ci, de cellules géantes et de débris nécrotiques caséux (Gross, 1994).

### 1.1.3. Swollen head disease

Le syndrome infectieux du gonflement de la tête («swollen head syndrome») est caractérisé par une inflammation aïgue et subaïgue de la peau et du tissu sous cutané de la tête

et des régions périorbitales. La colonisation des tissus par les colibacilles est secondaire à une infection par des agents prédisposants comme les virus (pneumovirus, paramyxovirus, coronavirus) ou des teneurs élevées en ammoniac (White *et al.*, 1990). La morbidité est souvent faible (1 %), mais les animaux présentant les symptômes en meurent dans la majorité des cas (Parreira *et al.*, 1998).

La maladie apparaît le plus souvent aux alentours de la 30<sup>e</sup> semaine et les conséquences les plus importantes sont des retards de croissance qui résultent de l'infection et entraînent des pertes économiques conséquentes.

Les lésions microscopiques consistent en l'apparition d'un œdème de la tête et de la région périorbitaire, d'un exsudat caséux dans le tissu conjonctif de ces mêmes régions ainsi qu'au niveau des glandes lacrymales (Pattison *et al.*, 1989).

#### **1.1.4. Ovarites et salpingites**

Ces troubles du tractus génital, peuvent être soit la conséquence d'une infection par voie ascendante consécutive à une insémination artificielle, soit associés à des lésions de péritonite et/ou d'impaction de l'oviducte.

Cette maladie, plus souvent chronique, apparaît lorsque le sac aérien abdominal gauche est atteint par les *E. coli*. Les bactéries se propagent alors, par contiguïté de tissu, pour atteindre l'oviducte et y persister quelques temps. Les animaux malades mourant dans les 6 mois suivant l'infection. D'un point de vue histologique, les lésions consistent en une diminution de l'épaisseur des parois de l'oviducte, la présence d'hétérophiles, de fibrine et de débris nécrotiques caséifiés (Gross, 1994).

Cet aspect de la colibacillose, rencontré de plus en plus fréquemment, n'est pas à négliger. Toutefois, il semblerait que la transmission de la bactérie au poussin, via les ovaires ou les oviductes infectés, ne constitue pas une voie majeure de l'infection de la vésicule vitelline à la naissance (Jordan et Pattison, 1996).

#### **1.1.5. Dermatite nécrotique**

La dermatite nécrotique, décrite pour la première fois par Randall *et al.* (1984), touche principalement les poulets de chair âgés de plus de 4 semaines. Elle n'entraîne ni mortalité, ni signes cliniques. Elle se caractérise par l'apparition des lésions fibrineuses sous-cutanées. Les endroits les plus touchés sont la face ventrale de l'abdomen entre les cuisses et le cloaque. Les lésions sont souvent découvertes à l'abattoir, ceux-ci entraînent des saisies et par conséquent

des pertes économiques importantes. Dans ce type de lésions, *E. coli* est isolé dans 60% des prélèvements, mais les cellulites peuvent parfois être associées à des pasteurelles ou à des streptocoques. Des lésions ont pu être reproduites par inoculation des follicules plumifères à l'aide de la souche *E.coli* O78 (Barnes et Gross, 1997). Des lésions de grattages et des mauvaises conditions d'hygiène sont généralement les principaux facteurs de risque.

#### 1.1.6. Granulomes à *Escherichia coli* ("Hjarres's disease")

L'expression de cette maladie est retrouvée à l'âge adulte et associée à des mortalités sporadiques. Elle est peu fréquente, mais peut cependant entraîner un taux de mortalité avoisinant 75 % dans certains lots. Les lésions sont caractérisées par l'apparition de granulomes dans le foie, le caecum, le duodénum et le mésentère ressemblant à des lésions de leucose.

Les animaux présentent peu de symptômes avant leur mort si ce n'est une perte de condition et de l'abattement. La mort survient suite à la rupture de ces granulomes.

### 1.2. Pathogénie de la colibacillose aviaire

La reproduction expérimentale de la colibacillose chez la volaille a permis de montrer que la porte d'entrée des souches APEC dans l'organisme est le tractus respiratoire.

La pathogénie de l'infection colibacillaire a été largement étudiée afin de connaître les mécanismes exacts impliqués dedans. Elle peut être schématisée de la manière suivante :

#### 1.2.1. Colonisation du tractus respiratoire

Elle est précédée par l'adhésion et la fixation des souches bactériennes à la muqueuse respiratoire grâce à des pilis et des adhésines (permettant la fixation des bactéries sur les récepteurs membranaires).

Les fimbriae de type 1 et P sont respectivement impliqués dans la colonisation initiale du tractus respiratoire supérieur et dans des étapes systématiques subséquentes durant le développement de la septicémie associée aux *E. coli* chez le poulet (Pourbaksh *et al.*, 1997).

Il a été démontré que les cellules responsables de la défense sont absentes au niveau des sacs aériens et de la région des échanges gazeux ce qui les oblige à faire appel aux neutrophiles pour constituer la première ligne de défense cellulaire, c'est pour cette raison, ces régions sont vulnérables à la colonisation et l'invasion bactérienne (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999).

### 1.2.2. Pénétration de la muqueuse

Les APEC ne sont pas capables de traverser seules la muqueuse respiratoire, leur passage nécessite la présence d'autres agents infectieux (mycoplasmes, virus,...) ou physicochimiques (forte concentration d'ammoniac, poussières) qui provoquent des altérations de la muqueuse respiratoire (Bree *et al.*, 1989).

### 1.2.3. Dissémination dans l'organisme

Une fois dans le courant sanguin, les APEC font face à de sévères dangers : l'opsonisation par les composants C3b du système complément, l'activité bactéricide du complexe d'attaque membranaire (MAC) formé par les composants du système complément (C5b, C6, C8 et C9) et la phagocytose. La présence de la capsule à la surface de la bactérie permet aux APEC de se défendre en évitant la phagocytose.

## 1.3. Diagnostic

Le diagnostic de la colibacillose aviaire repose d'abord sur le tableau clinique et la présence de lésions telles que de l'aérosacculite, parfois accompagnée de périhépatite et de péricardite. Il faut cependant garder à l'esprit que ces lésions peuvent aussi être engendrées par d'autres agents pathogènes.

### 1.3.1. Diagnostic différentiel

L'aérosacculite peut être la conséquence d'une infection à *Mycoplasma* spp. ou *Chlamydia* spp. (dinde), la péricardite peut être parfois associée à *Chlamydia* spp., et la périhépatite peut être liée à des infections par *Salmonella* spp. ou *Pasteurella* spp. Les autres manifestations de la colibacillose peuvent aussi avoir des étiologies variées. Ainsi, des organismes tels que *Aerobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. ou *Enterococcus* spp. sont fréquemment isolés de la membrane vitelline en culture pure (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999). Les septicémies aiguës peuvent résulter d'infections à *Pasteurella* spp., *Salmonella* spp., ou *Streptococcus* spp. Les synovites ou arthrites peuvent être la conséquence d'infections virales, à *Mycoplasma synoviae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. ou *Streptobacillus moniliformis*. Les granulomes résultent parfois d'infections virales (maladie de Marek) ou bactériennes (*Mycobacterium avium*, bactéries anaérobies telles que *Eubacterium* ou *Bacteroides*) (Gross, 1994).

### 1.3.2. Isolement et identification de l'agent responsable

En présence de lésions évoquant la colibacillose, seuls un isolement et une identification de l'agent responsable sur base de réactions biochimiques permettront de confirmer la maladie. Les prélèvements seront réalisés à partir du sang du cœur et des tissus affectés (foie, rate, sac péricardique) en évitant toute contamination par le contenu intestinal. Les prélèvements seront ensemencés en milieux appropriés (bleu d'éosine méthylène ou EMB, MacConkey agar ou Drigalski agar). Les indicateurs biochimiques sont la production d'indole, la fermentation du glucose en milieu aérobie, la présence de  $\beta$ -galactosidase, l'absence de production de sulfite d'hydrogène et d'uréase, ainsi que la non utilisation du citrate comme source de carbone (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999).

L'appartenance à des sérotypes reconnus comme pathogènes (O1, O2 et O78) et la présence d'un certain nombre de facteurs de virulence bien définis (fimbriae P, l'aérobactine et la protéine Tsh) permettront de confirmer le diagnostic. La sérotypie et la recherche du système de l'aérobactine peuvent être réalisées par des méthodes immunologiques. Les autres facteurs de virulence étant recherchés par des méthodes de biologie moléculaire telles que la PCR.

## 1.4. Traitement et prophylaxie

### 1.4.1. Traitement

A l'heure actuelle, celui-ci repose encore essentiellement sur l'antibiothérapie. Les antibiotiques les plus utilisés sont les sulfamidés, les tétracyclines, les aminosides les bétalactamines, et les quinolones (Gross, 1994).

### 1.4.2. Prophylaxie

#### ▪ Prophylaxie sanitaire

Elle vise à contrôler les contaminations environnementales, les vecteurs animés ou inanimés, afin de réduire au maximum les facteurs prédisposants aux infections respiratoires. Une des méthodes consiste à réduire et à mieux contrôler les contaminations fécales par des sérogroupes pathogènes par exemple, en réduisant la transmission des *E. coli* de la poule au poussin par une fumigation des œufs dans les 2 heures qui suivent la ponte, en les récoltant le plus vite possible après la ponte et en écartant ceux en mauvais état ou présentant des souillures fécales à leur surface (Gross, 1994).

Les infections du tractus respiratoire des animaux peuvent être réduites en garantissant des animaux indemnes de mycoplasmes et en contrôlant mieux certains facteurs

environnementaux comme l'humidité, la ventilation, la teneur en poussière et en ammoniac dans l'air (Oyetunde *et al.*, 1978). Les rongeurs, les insectes parasites, coprophages, nécrophages sont aussi des réservoirs potentiels de colibacilles et doivent être systématiquement détruits.

La qualité de l'eau de boisson est aussi très importante, il faut dès lors veiller à la changer très régulièrement. Des mesures générales de séparation des animaux par classes d'âge et par espèce, de nettoyage, de désinfection et de vide sanitaire entre chaque lot sont aussi des mesures de prévention indispensables dans le cadre de la lutte contre la colibacillose (Jordan et Pattison, 1996).

Enfin, les systèmes de vaccination employant la technique du spray/ nébulisation chez les poussins d'un jour ne sont peut-être pas les méthodes les plus appropriées pour empêcher la propagation des colibacilles par voie aérienne.

- **Prophylaxie médicale**

Aucun vaccin efficace n'est disponible sur le marché vétérinaire pour lutter efficacement contre la colibacillose. Cependant, même si un certain nombre d'essais vaccinaux ont été effectués à l'aide de souches atténuées en modèles expérimentaux et couronnés de succès avec des souches homologues, ils n'en restent pas moins inefficaces envers des infections avec des souches hétérologues de terrain (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999 ; La Ragione *et al.*, 2013 ). De la même façon, une immunisation passive des jeunes animaux est satisfaisante, mais uniquement vis-à-vis de la souche homologue. Ceci n'est pas surprenant, étant donné l'énorme diversité que représentent les souches APEC en matière de facteurs de virulence et le peu de données concrètes à leur sujet.



*CHAPITRE III*  
*ANTIBIOTIQUES ET*  
*ANTIBIORESISTANCE*

## 1. Les antibiotiques

### 1.1. Historique

Alors même que la notion d'agent infectieux était inconnue, certains peuples tels que les Chinois ou les Egyptiens utilisaient déjà des préparations à base de moisissures du genre *Penicillium* pour traiter certaines infections de la peau.

Ce n'est qu'au cours du 18<sup>ème</sup> siècle que l'invention du microscope permet de mettre en évidence le développement des bactéries et, de ce fait, de mettre en doute la théorie de la maladie comme phénomène spontané (Chatellet, 2007).

La première pierre à l'édifice de la lutte antimicrobienne est apportée en 1877 par Pasteur et Joubert qui montrèrent que l'injection, à un animal, de bactéries responsables de la maladie du charbon, *Bacillus anthracis*, en même temps que des bactéries communes, ces dernières empêchaient les premières de se développer. Cette découverte fait naître la notion d'antibiose par opposition à celle de symbiose. C'est en 1928 que Fleming permet d'élucider cette notion en contaminant involontairement des cultures de staphylocoques par des souches de *Penicillium notatum* (Philippon, 2010).

La difficulté à isoler et purifier la substance chimique – ici, la pénicilline – complique l'avancée des recherches de Fleming. Ce n'est que 10 ans plus tard que ses travaux sont récupérés par Florey et Chain permettant ainsi l'isolement d'un sel sodique de pénicilline. La réalisation de tests sur diverses espèces animales afin de vérifier l'innocuité du traitement, permet l'investissement d'un industriel Américain, Pfizer, et la production à grande échelle de la pénicilline dès 1943 (Philippon, 2010 ; Chatellet, 2007).

Parallèlement, de nombreuses autres recherches sont réalisées pour trouver d'autres substances antimicrobiennes provenant de champignons ou de micro-organismes.

Au bilan, les antibiotiques peuvent aujourd'hui être d'origine naturelle, semi-synthétique ou produits totalement par génie chimique. Les antibiotiques actuellement utilisés en médecine vétérinaire sont généralement issus de bactéries actinomycétales du genre *Streptomyces*, de bacilles ou de champignons (Chatellet, 2007).

### 1.2. Définition

Un antibiotique est une substance antibactérienne naturelle ou synthétique d'origine microbienne ou synthétisée chimiquement, capable d'inhiber spécifiquement la croissance

d'autres micro-organismes par un mécanisme particulier jouant sur les mécanismes vitaux du germe (Gogny *et al.*, 2001).

Pour qu'il soit actif, un antibiotique doit pénétrer dans la bactérie, sans être détruit ni être modifié, se fixer sur une cible et perturber la physiologie bactérienne (Ogawara, 1981).

### 1.3. Modes d'action des antibiotiques

A la différence des antiseptiques et des désinfectants, les antibiotiques agissent en général de façon spécifique sur certaines structures de la cellule bactérienne, cette grande spécificité d'action explique pourquoi les antibiotiques sont actifs à très faible concentration. Cette action s'exerce selon les molécules sur des sites variés. (Figure2) (Mevius *et al.*, 1999 ; Oxoby, 2002).

Les antibiotiques peuvent agir sur :

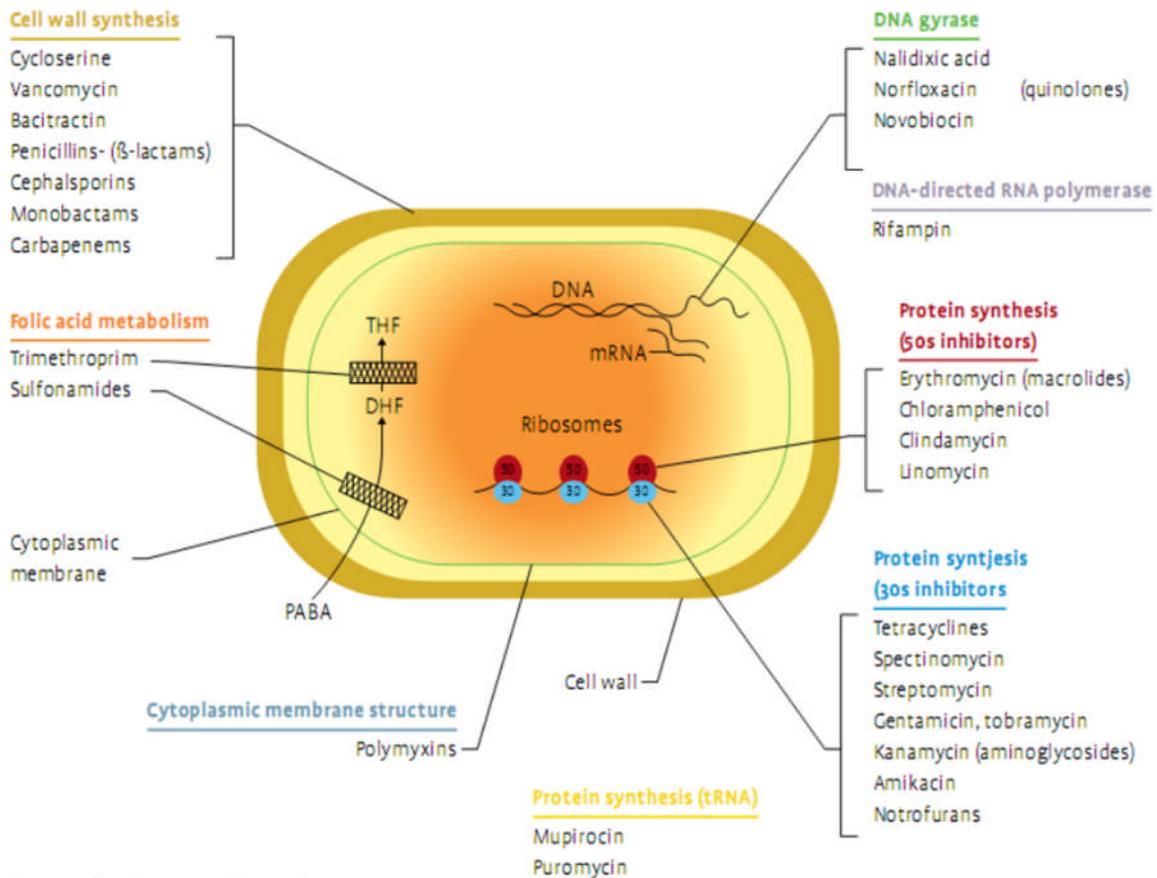
- **La paroi bactérienne :** bacitracine, pénicilline et céphalosporines agissent sur les germes en croissance, inhibent la dernière étape de la biosynthèse du peptidoglycane (muréine composant essentiel de la paroi bactérienne, qui confère à la bactérie sa forme de rigidité, ce qui lui permet de résister à la forte pression osmotique intra cytoplasmique) au cours de la multiplication cellulaire. La nouvelle bactérie n'est plus protégée entraînant ainsi une lyse bactérienne (Zeba, 2005).
- **La membrane cellulaire :** en désorganisant sa structure et son fonctionnement, ce qui produit des graves troubles d'échanges électrolytiques avec le milieu extérieur. Les polymyxines, dont fait partie la colistine, sont des antibiotiques décapeptidiques cationiques à structure cyclique, produits par *Paenibacillus* (anciennement *Bacillus*) *polymyxa* (Stansly et Schlosser, 1947 ; Dowling, 2013). Il existe cinq molécules différentes de polymyxines (A à E), dont deux sont utilisées en clinique : les polymyxines B et E (ou colistine). Les polymyxines interagissent avec la partie anionique du lipide A (endotoxine) du lipopolysaccharide (LPS) de la membrane externe des bactéries Gram- et sont transférées jusqu'à hauteur de la membrane cytoplasmique, dont elles perturbent les fonctions de perméabilité. Leur action est bactéricide.
- **L'ADN :** certaines familles d'antibiotiques empêchent la réplication d'ADN en bloquant la progression de l'ADN polymérase. L'actinomycine bloque la progression de l'ARN polymérase. Les sulfamides provoquent une inhibition de la synthèse des bases

nucléiques et la cellule meurt par carence en bases nucléiques (Flandrois *et al.*, 1997), les quinolones et fluoroquinolones inhibent l'ADN gyrase (chopra,1998).

- **Le ribosome bactérien :** sur les ribosomes : ce qui entraîne l'arrêt de la biosynthèse des protéines ou la formation de protéines anormales.

Les aminoglycosides ou aminosides (streptomycine, gentamicine, amikacine) empêchent la traduction de l'ARNm en se fixant sur la petite sous unité des ribosomes (Hermann, 2005). Les phénicolés (chloramphénicol, thiamphénicol) bloquent la formation de la liaison peptidique sur la grosse sous unité du ribosome bactérien. Les cyclines (tétracycline, doxycycline) bloquent l'élongation de la chaîne peptidique en se fixant sur la petite sous unité (Flandrois *et al.*, 1997).

Les macrolides et les kétolides (érythromycine, azithromycine) bloquent l'élongation de la chaîne peptidique (Nilius et Ma, 2002). La puromycine copie l'extrémité de l'ARNt, prend sa place dans le ribosome et bloque l'élongation de la chaîne peptidique.



Source: (Madigan *et al.* 2000)

**Figure N° 2** : Mode d'action des antibiotiques (Madigan *et al.*, 2000).

## 2. résistance aux antibiotiques

### 2.1. Définitions de l'antibiorésistance

Il existe plusieurs définitions de l'antibiorésistance en fonction du domaine dans lequel on l'étudie (Guillemot *et al.*, 2006):

- Pour le **clinicien**, une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si le traitement n'est pas efficace ;
- Pour le **pharmacologue**, une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si les concentrations atteintes au site d'action, sont inférieures à la concentration minimale inhibitrice ;
- Pour le **microbiologiste**, une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si elle dispose d'un mécanisme de résistance augmentant la valeur de la concentration minimale inhibitrice ;
- Pour l'**épidémiologiste**, une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si elle a une concentration minimale inhibitrice significativement différente de celle de la population habituelle.

Une définition générale et synthétique de l'antibiorésistance a été donné par Chabbert : « Une souche est dite résistante à un antibiotique lorsqu'une modification de son capital génétique lui permet de tolérer des concentrations d'antibiotique nettement plus élevées que celles qui inhibent la croissance *in vitro* de la majorité des autres souches de la même espèce dites sensibles » (Guerin-Fauble, 2010).

Il existe des résistances dites à « haut niveau » si l'augmentation relative de la CMI chez la souche considérée est importante, et des résistances dites à « bas niveau », si l'augmentation relative de la CMI est faible (Guerin-Fauble, 2010).

C'est en comparant un ensemble de gènes vieux de 30 000 ans codant des résistances aux bêta-lactamases, aux tétracyclines et aux antibiotiques glycopeptidiques avec des gènes plus récents que des chercheurs ont pu mettre en évidence la similarité, la complexité et l'ancienneté des origines de ces mécanismes de résistances (D'costa *et al.*, 2011).

Il faut donc comprendre que la résistance est une réponse physiologique des bactéries à tout usage d'antibiotique, réponse liée à des « gènes de résistance » qui existaient bien avant la découverte et l'utilisation des antibiotiques (AFSSA, 2006).

## 2.2. Origine génétique de la résistance et modalités de transfert génétique

La résistance bactérienne à un antibiotique est d'origine génétique. Les gènes de résistance se trouvent soit dans le chromosome (résistance chromosomique), soit dans des éléments mobiles, comme plasmides, éléments transposables ou intégrons (résistance extra chromosomique). La résistance peut être soit naturelle soit acquise (Mandell *et al.*, 2009).

### 2.2.1. Résistance naturelle

Les gènes de résistance font partie du patrimoine génétique de la bactérie, la résistance naturelle est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce. Ce type de résistance est détecté dès les premières études réalisées sur l'antibiotique à fin de déterminer son activité et contribue à définir son spectre antibactérien. Cette résistance peut être due à l'inaccessibilité de la cible pour l'antibiotique ou encore à l'absence de la cible. Par exemple, la résistance des entérobactéries et de *Pseudomonas* aux macrolides ou des bactéries à Gram négatif à la vancomycine est naturelle. La résistance intrinsèque est permanente, stable et transmissible à la descendance (transmission verticale) lors de la division cellulaire, mais elle n'est généralement pas transférable d'une bactérie à l'autre (transmission horizontale) (Mandell *et al.*, 2009).

### 2.2.2. Résistance acquise

Plus inquiétante, la résistance acquise entraîne la résistance à un ou plusieurs antibiotiques auxquels la bactérie était sensible auparavant. Cette résistance peut survenir *via* une mutation (directement sur le chromosome bactérien) ou plus fréquemment par acquisition de matériel génétique mobile (plasmide, transposon, intégrons ...) permettant dans les deux cas de contourner l'effet délétère de l'antibiotique (Scott, 2009 ; Guerin-Fauble, 2010).

La résistance acquise possède généralement un faible risque de transmission horizontale lorsque la résistance est la suite d'une mutation chromosomique. En revanche, la résistance acquise est considérée comme ayant un potentiel plus élevé pour la diffusion horizontale de résistance aux antibiotiques, lorsque les gènes de résistance sont présents sur des éléments génétiques mobiles (plasmides, transposons). (Khachatourians, 1998 ; commission européenne, 2008).

En général, les mutations permettent aux bactéries de se doter d'une résistance à un antibiotique ou une famille d'antibiotique, alors que, *via* un plasmide, elles peuvent acquérir simultanément une résistance pour plusieurs antibiotiques ou plusieurs familles d'antibiotiques.

### 2.2.2.1. Les mécanismes génétiques de la résistance acquise

Une bactérie peut acquérir une résistance aux antibiotiques selon deux mécanismes génétiques. L'un a pour support le chromosome, il s'agit de la résistance chromosomique ; l'autre a pour support les plasmides, les transposons ou les intégrons, il s'agit de la résistance extra-chromosomique. (Lozniewski et Rabaud, 2010).

#### a. La résistance chromosomique

Elle résulte d'une mutation. C'est un phénomène rare, dû au hasard. Il n'est pas provoqué par la présence de l'antibiotique. Mais l'antibiotique révèle la mutation de résistance en sélectionnant les bactéries mutantes résistantes (ou plus exactement, en détruisant les autres bactéries de l'espèce, celles restées sensibles à l'action de l'antibiotique). Elle est transmissible sur un mode vertical, de la bactérie mère aux bactéries filles. (Lozniewski et Rabaud, 2010).

La transmission de ce type de résistance est purement héréditaire et ne concerne généralement qu'un antibiotique à la fois. Par exemple, c'est une mutation de la protéine S12 du ribosome qui confère à *Escherichia coli* sa résistance à la streptomycine (AFSSA, 2006 ; Perrot, 1998 ; Scott, 2009).

La mutation chromosomique spontanée constitue un mécanisme de résistance aux antibiotiques chez environ 10 à 20 % des bactéries. Elle se produit environ une fois pour chaque milliard de divisions cellulaires (Pallasch, 2003).

#### b. La résistance extra-chromosomique

Les gènes peuvent provenir du chromosome d'espèces différentes ou être véhiculés par des éléments génétiques mobiles pouvant être transférés d'une bactérie à l'autre, on parle alors de transmission horizontale (Galimand *et al.*, 2005). L'ADN exogène peut provenir de cellules bactériennes appartenant à une autre souche de la même espèce ou même d'une espèce, voire d'un genre différent (Fauchère et Avril, 2002). Ce type de transfert de résistance concerne souvent plusieurs familles d'antibiotiques simultanément (Davison *et al.*, 2000). Le plus souvent, lors de ce transfert, les gènes sont véhiculés par des éléments génétiques mobiles, plasmides ou transposons (Ploy *et al.*, 2005).

Comme pour la résistance chromosomique, les gènes de la résistance extra-chromosomique ne sont pas induits par l'utilisation des antibiotiques qui se contentent de sélectionner les bactéries porteuses de tels gènes. Il est important de noter que la résistance

extra-chromosomique étant souvent une multi-résistance, l'utilisation d'un seul antibiotique va sélectionner des bactéries multi-résistantes qui ne sont pas contre-sélectionnées en l'absence d'antibiotique (Lozniewski et Rabaud, 2010).

Les gènes ou les groupes de gènes de résistance peuvent s'acquérir par transformation, transduction ou conjugaison (Carattoli, 2001).

- **La transformation**

La transformation est un processus actif qui permet le transfert et l'échange de gènes, ce phénomène naturel est contrôlé par des gènes chromosomiques qui permettent l'absorption de l'ADN exogène libre par une cellule compétente (Bacon *et al.*, 2003). C'est un mécanisme d'échange de gènes très répandu, mais pas universel entre les souches bactériennes (Wolfgang *et al.*, 1999).

Beaucoup de bactéries transformables libèrent leur ADN pendant la croissance. Ainsi, au moins 50 bactéries différentes ont été démontrées comme étant compétentes pour acquérir des gènes libérés dans l'environnement par d'autres organismes, même d'origine eucaryote (plantes, levures et animaux) (Havarstein *et al.*, 1998). Les gènes acquis après transformation doivent être intégrés dans un plasmide ou un chromosome pour être fonctionnel (Levy *et al.*, 1998).

- **La transduction**

La transduction est un mécanisme de transfert de l'ADN d'une bactérie à d'une autre, dont le vecteur est un virus bactérien appelé *bactériophage*. Ce mécanisme se produit généralement lorsqu'un virus porte accidentellement de l'ADN d'une cellule bactérienne et l'injecte dans une autre essentiellement à la même espèce. Deux types de transduction sont rencontrés : la transduction généralisée et la transduction spécialisée (Davison *et al.*, 1999).

- **Transduction généralisée**

Elle résulte d'une erreur rare lors de l'assemblage d'un phage, lorsqu'un segment de génome de l'hôte est emporté avec l'ADN du phage. Cet ADN sera injecté à l'intérieur de la bactérie réceptrice et pourra apporter des gènes de résistances aux antibiotiques transmis verticalement à la descendance. S'il n'est pas intégré au chromosome de la réceptrice il sera perdu par dilution au cours des divisions bactériennes.

### - Transduction spécialisée

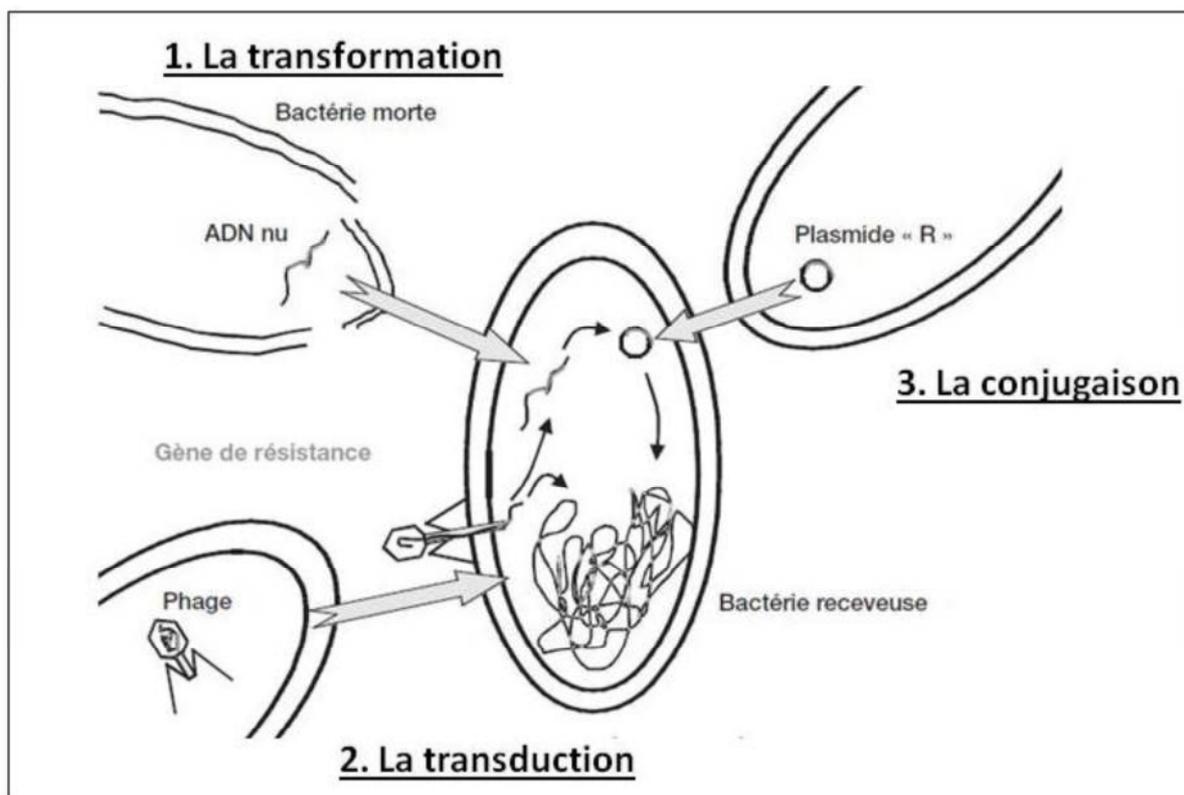
C'est une caractéristique de certains phages lysogènes qui sont restés intègres dans le chromosome de l'hôte un certain temps. A l'activation, l'excision du génome viral emporte des gènes adjacents de leur site d'intégration, l'infection d'une autre bactérie par ces virions apportera à celle-ci des nouveaux gènes qui pourront être des gènes de résistances aux antibiotiques.

### • La conjugaison

Les plasmides sont souvent transférés par conjugaison. Durant la conjugaison entre deux cellules bactérienne, un ADN simple brin est généré, puis transféré d'une cellule donatrice à une cellule réceptrice. Puis le simple brin est répliqué pour générer un plasmide circulaire (Samouelian *et al.*, 2009).

La conjugaison entre bactéries est possible si les cellules contiennent un plasmide particulier, appelé le facteur F (F pour fertilité). Les cellules F<sup>+</sup> ou *donatrices*, possèdent à leur surface de longs filaments tubulaires (les filaments sexuels, ou pili). Un ou plusieurs pili peuvent se lier à des récepteurs spécifiques de la surface des cellules qui ne contiennent pas le facteur F (cellules F<sup>-</sup>, ou cellules *réceptrices*). Le pilus forme alors un tunnel reliant les deux cellules. Lors de la conjugaison, un des brins du facteur F passe dans la cellule F<sup>-</sup> où son brin complémentaire sera synthétisé. La cellule F<sup>-</sup> devient ainsi une cellule F<sup>+</sup> puisqu'elle contient à présent le facteur F normal bicaténaire.

Les trois mécanismes de transfert génétique sont illustrés dans la figure N° 03.



**Figure N° 3 :** Les trois voies de transmission des résistances bactériennes (AFSSA, 2006).

#### 2.2.2.2. Les éléments génétiques mobiles

- **Plasmides**

Un plasmide est une petite molécule d'ADN bicaténaire (de 3 à 10 kb) circulaire extra-chromosomique capable de se répliquer (indépendamment du chromosome bactérien) dans une cellule bactérienne et d'être transférée dans une autre (Tagu et Moussard, 2003). Les plasmides peuvent porter des gènes codant pour des toxines, rendre la bactérie plus apte à s'établir dans l'organisme ou contribuer à sa résistance aux défenses de l'hôte. Ils confèrent souvent la résistance aux antibiotiques chez les bactéries qui les contiennent (Figure 4).

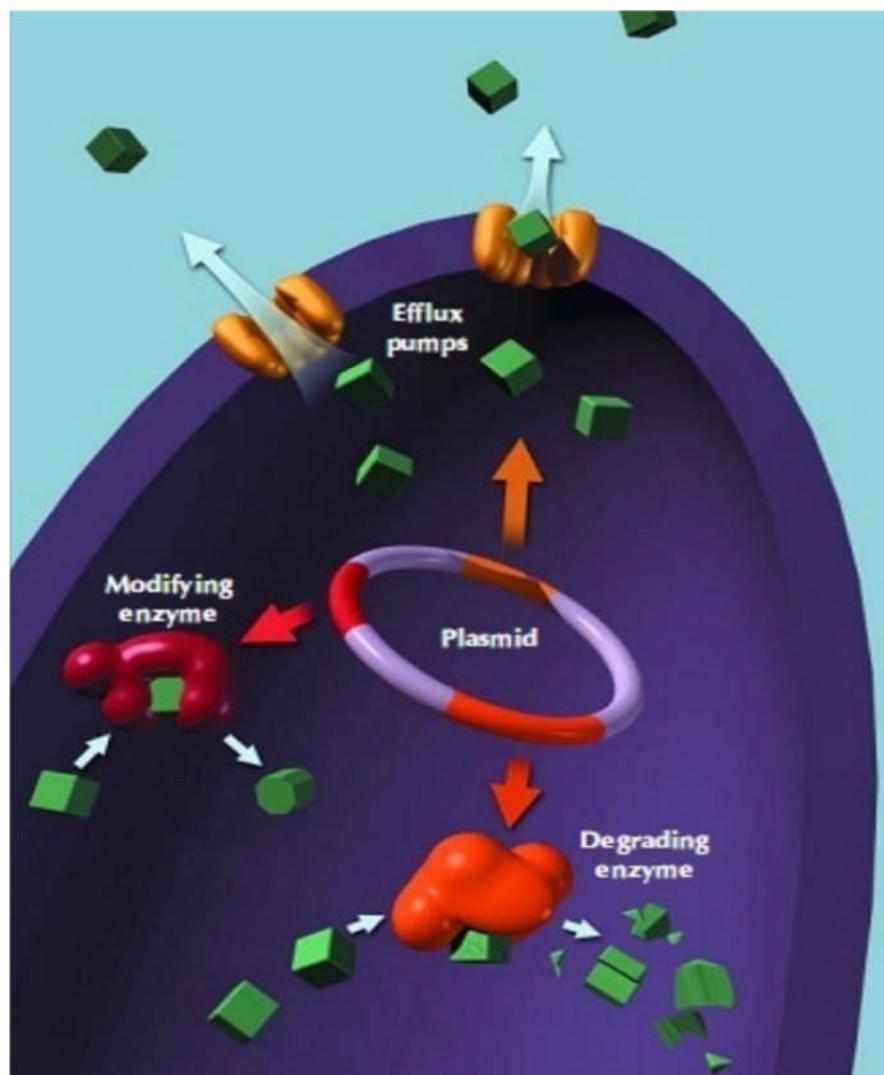
- **Transposons**

Les transposons sont des fragments d'ADN capables de s'insérer ou de s'exciser du chromosome bactérien. Ils permettent le passage de gènes du chromosome vers les plasmides, de plasmide à plasmide ou d'un plasmide vers le chromosome. La transposition peut se faire entre germes d'espèces voire de genres différents. C'est par exemple le cas du gène de résistance à la gentamicine, qui est passé des staphylocoques aux entérocoques puis aux streptocoques par un gène de résistance transposable. La possibilité des gènes de résistance de « sauter » d'un plasmide à un autre est donc un moyen très puissant de transférer les

résistances. Ceci s'accompagne d'une duplication, ainsi le plasmide donneur reste porteur du gène transposé (Enriquez, 2002).

#### ▪ Intégrons

Au cours des années 1980, de nouveaux éléments génétiques susceptibles d'acquérir ou de perdre des gènes de résistance aux antibiotiques ont été décrits par Stokes et Hall et désignés sous le nom d'intégrons (Miriagou *et al.*, 2006; Ploy *et al.*, 2005). Les intégrons constituent un système de capture et d'expression de gènes contenus dans des cassettes. Les intégrons ne sont pas mobiles par eux-mêmes ; ils sont incapables d'autoréplication et sont généralement portés par des plasmides ou des transposons (Fluit *et al.*, 2004).



**Figure N° 4 :** Exemple des mécanismes de résistances qui peuvent être portés par l'ADN plasmidique (George *et al.*, 1998).

### 2.3. Les mécanismes de résistance aux antibiotiques

Le tableau N°1 résume les mécanismes de résistance majeurs des principales classes d'antibiotiques.

- **L'inactivation enzymatique**

Le micro-organisme produit une enzyme qui détruit ou inactive l'antibiotique. La production enzymatique peut être induite par un facteur externe (un antibiotique) ou constante (non affectée par des stimuli externes). On appelle *inductible* une résistance qui se produit à la suite d'une exposition à un agent d'une classe pharmacologique donnée et *constitutive* lorsque les gènes à l'origine de la résistance s'expriment en permanence, même en l'absence de tout antibiotique.

Les bêta-lactamases sont des enzymes produites par les bactéries et transmises par des chromosomes ou des plasmides. Elles constituent un mécanisme de résistance très efficace. Les bêta-lactamases inactivent les bêta-lactamines en détruisant le lien amide sur le cycle lactame. Puisque ce sont les antibiotiques les plus prescrits au monde, il n'est pas étonnant que la résistance à cette importante classe d'antibiotique pose un problème inquiétant.

Récemment, l'hyperproduction de céphalosporinases chromosomiques de très haut niveau a conféré également une nouvelle sorte de résistance aux céphalosporines de troisième génération. Ces enzymes ne détruisent pas l'antibiotique mais inhibent l'accès à son site d'action. Elles sont synthétisées chez des espèces naturellement productrices de céphalosporinases inductibles (Entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa*) qui, à la suite d'une mutation, en produisent en très grandes quantités. Il s'agit d'un phénotype qualifié de «hyperproduction de céphalosporinases» ou de «céphalosporinases déréprimées» (Sanders *et al.*, 1992).

- **Réduction de la perméabilité cellulaire**

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires : une membrane cytoplasmique sépare leur cytoplasme du milieu externe. Les bactéries à Gram négatif sont également munies d'une enveloppe additionnelle, la paroi externe, qui sert de barrière et protège les protéines de liaison aux pénicillines (PLP) du milieu externe. Les nutriments et les antibiotiques doivent traverser cette enveloppe pour pénétrer dans la bactérie. Le passage se fait par diffusion passive à travers les canaux que forment les protéines caniculaires nommées *porines* (Knothe *et al.*, 1983).

La réduction de la perméabilité cellulaire se produit par diminution de l'entrée de l'antibiotique sur son site, provoquée par une modification de la perméabilité de la membrane interne ou externe de la bactérie. Une altération des porines dans la paroi des bactéries à Gram négatif peut réduire ou bloquer la pénétration de l'antibiotique jusqu'à son site d'action. Les mutations des porines joueraient un rôle important dans l'émergence d'une résistance, particulièrement à la suite d'une réduction du calibre des canaux ou du nombre de porines. L'imperméabilité liée aux porines s'associe souvent à la synthèse de bêtalactamases pour conférer une résistance à la bactérie. Il arrive à l'occasion qu'une bactérie ne devienne résistante que lorsque deux phénomènes se produisent simultanément : modification de la perméabilité cellulaire et hausse de la synthèse des bêtalactamases chromosomiques (Pitout *et al.*, 1996).

- **Altération (ou modification) des sites de liaison**

Phénomène engendré par des chromosomes ou des plasmides, ce mécanisme de résistance produit une baisse de l'affinité de l'antibiotique pour son site d'action (Yamashita *et al.*, 2000 ; Pitout *et al.*, 2004). Voici quelques exemples de ce mécanisme de résistance :

- **Altération des protéines de liaison aux pénicillines (PLP) aussi connues sous PBP (Penicillin Binding Protein)**

Ce phénomène réduit l'affinité de la cible (PLP) pour les bêta-lactamines soit par une mutation des gènes chromosomiques, soit par l'acquisition de gènes supplémentaires exprimant de nouvelles PLP. Ce mécanisme de résistance est important chez les cocci à Gram positif, alors qu'il serait beaucoup plus rare chez les bactéries à Gram négatif.

- **Altération des sites de liaison ribosomiaux**

L'altération intracellulaire de la sous-unité ribosomale ciblée dans la bactérie peut atténuer les effets antibactériens des macrolides, de la tétracycline, des aminosides ou du chloramphénicol, cette altération va empêcher l'antibiotique d'inhiber la synthèse protéique et donc la croissance bactérienne car il ne peut plus se lier au site ribosomal.

- **Altération de l'ADN-gyrase et de la topoisomérase**

L'ADN gyrase est une enzyme nécessaire à l'activité des quinolones. Des mutations spontanées d'un seul acide aminé de l'ADN gyrase engendrent de la résistance à des antibiotiques. Il en est de même pour les mutations de la topoisomérase.

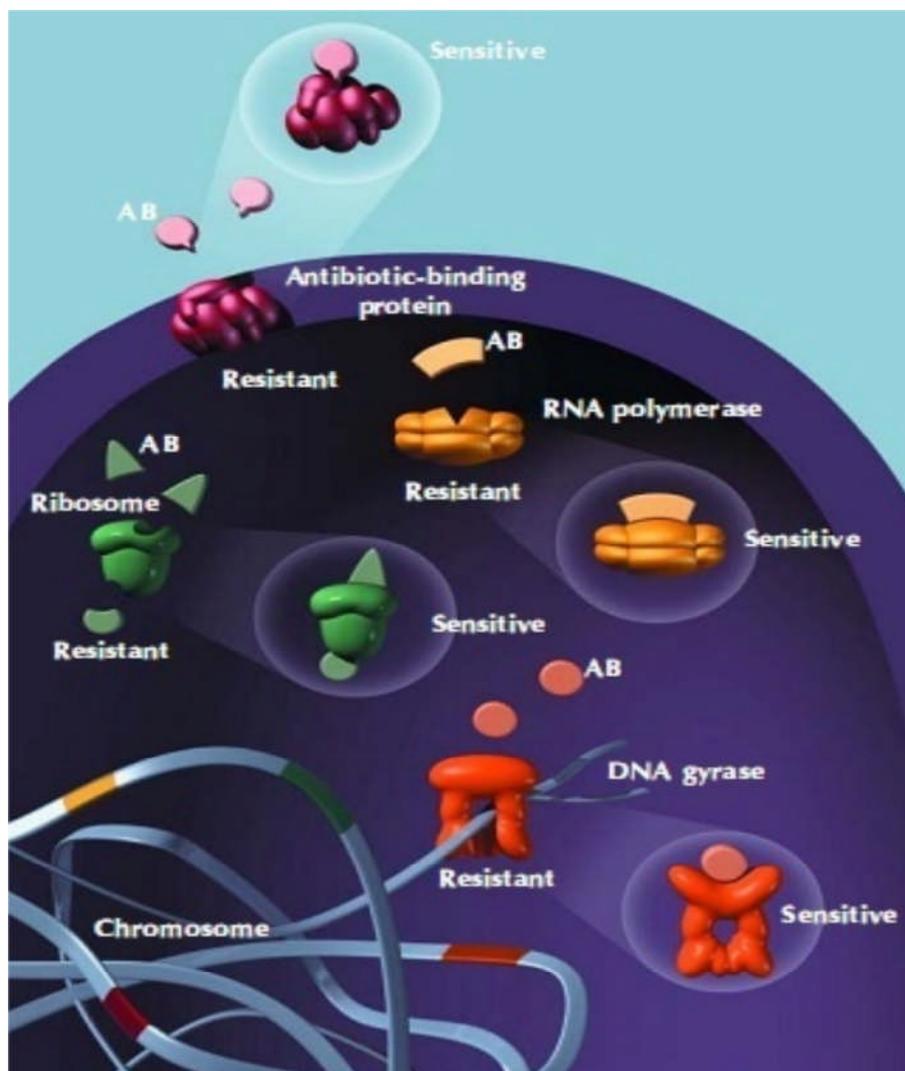
- **Altération des précurseurs cibles de la paroi cellulaire bactérienne**

Ce phénomène peut être induit par l'utilisation de la vancomycine, comme pour l'entérocoque résistant à la vancomycine.

- **Altération des enzymes cibles**

Une modification de la dihydroptéroate synthétase résistant à la liaison avec les sulfamides et de la dihydroptéroate réductase insensible au triméthoprime entraîne également une résistance. La résistance des bactéries à Gram négatif envers les sulfamides est attribuable aux plasmides générant des enzymes résistantes.

La figure N° 5 illustre les différents mécanismes permettant l'altération (ou modification) des sites de liaison.



**Figure N° 5 :** Mécanismes de résistance par altération (ou modification) des sites de liaison (George *et al.*, 1998).

- **Pompes (transporteurs) à efflux**

L'antibiotique ne peut atteindre son site d'action par pompage actif de l'antibiotique vers l'extérieur de la bactérie (efflux). Les transporteurs d'efflux de plusieurs antibiotiques sont des composants normaux des cellules bactériennes et contribuent pour une large part à la résistance intrinsèque des bactéries à de nombreux agents antibactériens. Ces pompes ont besoin d'énergie. L'exposition aux antibiotiques favorise une surexpression par mutation de transporteurs, entraînant une hausse de la résistance bactérienne. Il est également possible qu'une résistance par efflux apparaisse à cause de l'exposition à un antibiotique d'une autre classe. Ainsi, on sait que la ciprofloxacine peut favoriser l'émergence d'une résistance à la céphalosporine et aux macrolides par la voie de ce mécanisme.

**Tableau N° 1 :** les principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques de diverses familles. (Avorn *et al.*, 2001 ; Dellit *et al.*, 2007 ; Mandell *et al.*, 2009)

Antibiotiques	Résistance chromosomique	Résistance extrachromosomique
<b>Aminosides</b>	Diminution de la perméabilité, Modification de la cible (protéine S12 de la sous-unité 30S).	Inactivation par acétyltransférases,
<b>bêta-lactamines</b>	Diminution de la perméabilité, Diminution de l'affinité des PLP, Diminution de la synthèse des PLP, Synthèse de nouvelles PLP, Inactivation enzymatique par des céphalosporinases.	Inactivation par diverses $\beta$ -lactamases ou carbapénémases.
<b>bêta-lactamines et inhibiteurs de bêta-lactamases</b>	Inactivation par des céphalosporinases chromosomiques.	Inactivation par $\beta$ -lactamases Hyperproduites et $\beta$ -lactamases résistantes aux inhibiteurs.
<b>Glycopeptides</b>		Modification de la cible, Diminution de l'affinité, ERV, 6 gènes de résistance identifiés (VanA, VanB, etc).
<b>Macrolides</b>		Méthylation du ribosome bactérien (ARN 23S).
<b>Chloramphénicol</b>	Diminution de la perméabilité	Efflux actif, Inactivation par acétyltransférases
<b>Quinolones</b>	Modification de la cible ADN-gyrase ou topoisomérase IV (gène <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> ou par C) par mutation spontanée, Diminution de la perméabilité.	Proteines Qnr, réduction de l'affinité des topoisomérases pour l'ADN
<b>Rifampicine</b>	Modification de la cible (ARN polymérase ADN dépendante).	
<b>Sulfamidés</b>	Diminution de la perméabilité, Modification par mutation de la dihydroptéroate synthétase.	Dihydroptéroate synthétase additionnelle sans affinité pour sulfamidés.
<b>Tétracyclines</b>	Diminution de la perméabilité	Efflux actif spécifique.
<b>Triméthoprime</b>	Diminution de la perméabilité, Mutation de dihydrofolate réductase.	Dihydrofolate réductase additionnelle Insensible au triméthoprime.

#### 2.4. L'évolution des résistances

Une bactérie peut développer des résistances de manière indépendante à la présence d'antibiotique dans le milieu. Seulement, l'utilisation de ces deniers peut être un facteur de l'augmentation de cette résistance par sélection des germes résistants. Ainsi, une bactérie

résistante à un antibiotique peut devenir, à terme, multirésistante (Neely et Holder, 1999). Au sens littéral du terme, une bactérie multirésistante est une bactérie résistante à plus de un antibiotique mais aucune définition standardisée n'a encore été définie par la communauté médicale. Les définitions les plus répandues définissent la bactérie multirésistante aux antibiotiques comme (Magiorakos *et al.*, 2012) :

-Une bactérie résistante à **3 familles d'antibiotiques ou plus** (Magiorakos *et al.*, 2012).

-Une bactérie résistante à **1 ou plusieurs familles d'antibiotiques clés** (Siegel *et al.*, 2007).

Deux phénomènes peuvent contribuer à cette multi-résistance :

- **La résistance croisée**

Les auteurs définissent la **résistance croisée** comme un phénomène par lequel une bactérie qui a développé une résistance à l'un des antibiotiques d'une classe devient aussi résistante aux autres membres de la même classe. Cela même si elle n'a jamais été exposée à ces molécules. C'est cette résistance croisée qui permet aux  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) présentes chez les bactéries Gram négatifs d'avoir une résistance si étendue ( $\beta$ -lactamines et céphalosporines) à tel point qu'elles deviennent un véritable enjeu en santé humaine.

- **La co-résistance**

La co-résistance est liée au fait que les gènes de résistance à différentes classes d'antibiotiques sont souvent portés par le même plasmide. Par exemple, pour *Escherichia coli*, un seul plasmide régule la sensibilité aux céphalosporines, pénicillines, chloramphénicol, tétracycline et fluoroquinolones. Ainsi, l'acquisition d'une résistance à l'une de ces molécules, entraîne une résistance aux autres familles. (Neely et Holder, 1999 ; Giguère *et al.*, 2007).

Il est très important de garder en tête que la diffusion et l'acquisition de résistances sont indépendantes de l'utilisation d'antibiotique(s) mais que l'utilisation de ce dernier, sans connaître le statut de sensibilité des germes, peut rapidement entraîner la **sélection de souches multirésistantes** (AFSSA, 2006).

## 2.5. Diffusion des bactéries résistantes entre l'animal et l'homme

Les agents antimicrobiens couramment utilisés chez les animaux appartiennent essentiellement aux mêmes classes de composés que ceux utilisés en médecine humaine.

Chez les animaux, les antibiotiques sont utilisés pour trois différentes raisons : pour le traitement des infections bactériennes (usage thérapeutique), pour prévenir les infections chez les animaux (Utilisation prophylactique) et utilisés comme promoteurs de croissance dans l'alimentation animale à titre d'additif en vue d'améliorer la croissance et les performances des animaux (facteur de croissance) (Singer *et al.*, 2003 ; Dibner *et al.*, 2005). L'utilisation inappropriée d'antibiotique chez les animaux et surtout comme facteur de croissance a facilité la propagation des résistances acquises. Ce phénomène d'antibiorésistance est constaté comme l'un des problèmes mondial de santé publique (Levy et Marshall, 2004). De plus, les bactéries isolées chez les animaux et celles isolées chez l'Homme, que ce soit lors d'une infection ou en situation de colonisation, partagent les mêmes mécanismes de résistance. Cela est un argument extrêmement solide de l'absence d'étanchéité entre le monde animal et les populations humaines. Les animaux de rente et les animaux de compagnie, tout comme les humains, peuvent être des réservoirs de bactéries résistantes, et le développement de ces germes résistants peut se produire aussi bien chez l'Homme que chez l'animal (Bates *et al.*, 1994).

La dissémination de ces bactéries résistantes entre les différents hôtes (animal-animal, humain-humain, animal-humain ou humain-animal) peut se produire par *contact direct* ou par *contact avec des matières contenant des bactéries* (salive, fèces, ...) mais peut également se produire par *la contamination de la nourriture* (la chaîne alimentaire), *de l'air ou de l'eau* (l'environnement). Lorsqu'elle atteint un nouvel hôte, la bactérie peut coloniser ou infecter. Elle peut alors disséminer ses gènes de résistance aux autres bactéries présentes dans cet écosystème (bactéries commensales ou pathogènes dans le cas d'infection du tractus gastro-intestinal) mais également recevoir elle-même des gènes de résistance présentés chez d'autres bactéries.

La diffusion de bactéries résistantes aux antibiotiques de l'animal à l'homme est donc non seulement possible, mais de nombreux arguments attestent de sa réalité pour certains pathogènes. Dès 1969 un rapport de Swann au Royaume Uni a attiré l'attention sur le potentiel de dissémination des bactéries résistantes issues d'animaux traités par des antibiotiques *via* la chaîne alimentaire (Swann *et al.*, 1969). Depuis, différentes études ont mis en évidence des transferts des bactéries résistantes (*E. coli*, *Salmonella* et *Campylobacter*) de l'animal à l'Homme via la chaîne alimentaire ou par un contact direct, conduisant à l'établissement d'un réservoir de gènes de résistances (Levy *et al.*, 1976 ; Van Den et Stobberingh, 1999).

*ETUDE  
EXPERIMENTALE*

*MATERIELS ET  
METHODES*

**MATERIEL ET METHODES****I. Animaux**

Notre étude a porté sur 100 poulets provenant de deux régions : Tiaret-Tissemsilt sur une période s'étalant du 05/01/2016 au 16/07/2016.

**Tableau N° 2 :** répartition des sujets autopsiés.

région	Nombre de sujets
Tiaret	80
Tissemsilt	20
Total	100

Les poulets suspects de colibacillose, âgés entre 1 et 6 semaines et provenant de différents élevages de poulet de chair, ont été acheminés vers le service de pathologie aviaire de l'institut vétérinaire de Tiaret afin qu'une autopsie soit réalisée.

**II. Matériels****1. Milieux de culture**

- Gélose Mac Conkey : est un milieu à la fois sélectif et différentiel utilisé pour l'isolement des entérobactéries, il permet de faire la distinction entre les bactéries suivant leur aptitude à fermenter ou non le lactose, CONDA, Espagne ;
- Gélose nutritive : milieu qui permet la culture des bactéries non exigeantes, Institut Pasteur d'Algérie ;
- La gélose Mueller-Hinton : est utilisé pour la réalisation de l'antibiogramme, CONDA, Espagne ;

**2. Produits de laboratoire**

- Colorants : violet de gentiane, fuchsine de ziehl.
- Lugol.
- Alcool 70°.
- Eau distillée.
- Eau physiologique 0.9 %.
- Disques d'oxydase, Himedia ; Inde ;
- Réactif Kovacs, bio Mérieux ; France ;
- Réactif TDA, bio Mérieux ; France ;
- Réactif VP 1, VP2 ; institut pasteur d'Algérie ;

- Disques d'antibiotiques : Bioanalyse (Turquie), Bio Maxima (Pologne), Himedia (Inde), Liofilchem (Italie) ;
- Galerie Api 20 E, Bio Mérieux ; France ;

### **3. Matériel d'autopsie**

Le matériel utilisé pour l'autopsie était composé d'instruments métalliques faciles à désinfecter : couteaux, pince à dent de souris, ciseaux fins et forts, lames bistouris stériles, sonde cannelée, et un appareil photographique numérique.

Le matériel de prélèvement est constitué de boîtes de pétri stériles.

### III. Méthodes

la méthodologie adoptée dans cette étude est récapitulée dans la figure N° 6 :



**Figure N° 6:** Protocol expérimental.

## **1. Examen clinique des poulets malades**

L'examen clinique des volailles a consisté à observer les poulets malades lors des consultations cliniques. Ainsi, certains éléments de suspicion (non spécifiques) de la colibacillose ont été recherchés comme :

- ❖ L'hétérogénéité des animaux présents.
- ❖ Le retard de croissance.
- ❖ l'Abattement et l'anorexie.
- ❖ Signes de détresse respiratoire (bec ouvert, cou tendu, respiration accélérée et irrégulière).

## **2. Autopsie et réalisation des prélèvements**

### **2.1. Autopsie**

L'autopsie a été réalisée sur des cadavres suite à une mort naturelle ou à l'euthanasie des animaux malades. L'euthanasie des animaux s'est faite par luxation de l'articulation atloïdo-occipitale. L'autopsie a été réalisée selon la procédure classique. Brièvement, elle a consisté à l'examen externe des cadavres, les incisions cutanées, l'ouverture des cavités (abdominale et thoracique), suivies par l'examen macroscopique proprement dit des organes, afin de détecter les éventuelles modifications lésionnelles :

- a-Examen du tube digestif et de ses glandes annexes ;
- b-Examen de du cœur et de l'appareil respiratoire ;
- c-Examen de l'appareil génital et urinaire ;
- d-Examen des organes hématolymphopoeitiques ;
- e-Examen du système nerveux ;
- f-Examen de l'appareil locomoteur.

Au cours de l'autopsie, les lésions pouvant faire suspecter une colibacillose aviaire ont été notées et photographiées.

### **2.2. Prélèvement des Organes**

Le foie, le cœur, et la rate ont été prélevés sur les cadavres d'animaux autopsiés.

Les prélèvements ont été réalisés dans des conditions aseptiques pour éviter la contamination. Les organes prélevés (foie, cœur, rate) ont été placés immédiatement dans des boîtes de Pétri stériles et acheminés au laboratoire de microbiologie de l'institut vétérinaire de Tiaret.

### **3. Isolement bactériologique**

L'isolement direct a été effectué aseptiquement à partir des organes précités. La technique a consisté à flamber l'organe pour éliminer les germes de contamination suivie par une incision à l'aide d'un bistouri stérile, le sang a été récolté par écouvillonnage pour être ensuiteensemencé directement sur la gélose Mac Conkey. Les différentes boîtes ensemencées ont été ensuite incubées à 37°C pendant 24 heures.

### **4. Purification des isolats**

Après l'incubation, Les colonies apparues ont été observées sur le plan macroscopique puis une colonie rose présumée d'*E. coli* a été purifiée par repiquage selon la méthode de stries sur le même milieu d'isolement.

Après 24 heures d'incubation à 37 °C, l'isolat ainsi obtenu a été ensuite ensemencé dans des boites de pétri contenant de la gélose nutritive pour une utilisation ultérieure.

Les différentes boites ont été incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures.

### **5. identifications des isolats**

#### **5.1. Analyses préliminaires des isolats**

##### **5.1.1. Observation microscopique (coloration de Gram)**

La coloration de Gram a été effectuée selon le protocole décrit par Prescott *et al.* (2003) :

- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre.
- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène.
- Coloration primaire : Couvrir le frottis avec du cristal violet et laisser agir pendant 60 secondes ; Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée.
- Mordantage au lugol (solution d'iode iodo-iodurée) : recouvrir le frottis de lugol et laisser agir pendant 30 secondes ; Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.
- Décoloration à l'alcool : Rincer immédiatement le frottis à l'alcool en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette ; Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.

- Contre-coloration à la fuchsine : recouvrir le Frottis de fuchsine et laisser agir pendant 15 secondes ; Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes puis séchage entre deux feuilles de papier essuie-tout.
- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope Optique à un fort grossissement (à l'objectif X 100). Les cellules Gram+ absorbent la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.

### **5.1.2. Test d'Oxydase**

La recherche de l'oxydase est un des critères les plus discriminatifs et les plus employés pour l'identification des bactéries, surtout celle des bacilles à Gram négatif. Cette recherche consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée à oxyder la forme réduite incolore de dérivés méthylés du paraphénylène diamine, en leur forme oxydée semi-quinonique rose violacé.

- **Principe**

Ce test permet la détection de la phénylène-diamine-oxydase ou le cytochrome oxydase ;

Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N-diméthylparaphénylène diamine.

Ce réactif est incolore et en présence de l'enzyme, il libère un composé rose-rouge, noircissant à l'air.

- **La technique**

- Sur une lame, déposer un disque imprégné de N-diméthyl-p-phénylène diamine.
- Humidifier le disque avec quelques gouttes d'eau distillée stérile
- Prélever à l'aide d'une pipette pasteur une fraction de colonie (culture de 18-24 heures) et la déposer sur le disque.

- **Lecture**

Une réaction positive se traduit par un virage rapide (10 à 15 secondes) du réactif de l'incolore au violet. Sinon il reste incolore.

## 5.2. Identification biochimique par galerie Api 20E

- **La galerie Api 20 E**

Les cultures présentant des coccobacilles à Gram négatif, oxydase négative ont été identifiées à l'aide de la Galerie API 20 E.

La Galerie API 20 E est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries à Gram négatif, dont les entérobactéries.

Elle comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée, il s'agit essentiellement de :

- ONPG, recherche de la  $\beta$ -galactosidase.
- LDC, ODC, ADH : le diagnostic différentiel des espèces appartenant aux entérobactéries est souvent facilité par la recherche de la Lysine décarboxylase (LDC), Ornithine décarboxylase (ODC) et Arginine dihydrolase (ADH).
- Citrate de Simmons (CIT) : permet la recherche de l'utilisation du citrate de sodium comme seule source de carbone.
- H<sub>2</sub>S : recherche de la production de sulfure d'hydrogène
- URE : recherche d'une uréase.
- TDA : recherche du tryptophane désaminase.
- IND : recherche de la production d'indole
- VP : réaction de Voges-Proskauer, la réaction positive se caractérise par la présence de l'acétyl-méthyl carbinol (acétoïne), ce composé est un produit de dégradation de l'acide pyruvique.
- GEL : recherche de la production d'une gélatinase.
- GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA : l'oxydation ou la fermentation des carbohydrates.

Ces microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux.

Les réactions produites pendant la période d'incubation (18h-24h à 37C°) se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions est réalisée à l'aide du tableau de lecture.

- **Préparation de la Galerie API 20 E**

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5ml d'eau distillée ou déminéralisé dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la souche sur languette latérale de la boîte.
- Sortir la galerie de son emballage individuel.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

- **Préparation de l'inoculum**

- Utiliser un tube de 05 ml d'eau physiologique 0.85%, stérile sans additif
- A l'aide d'une pipette pasteur, prélever une colonie bien isolée à partir d'une culture jeune (18-24 heures) sur milieu gélosé.
- Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu.
- Calibrer la densité optique (DO) de la suspension bactérienne obtenue avec un spectrophotomètre, à une DO de 0,08-0,1 à une longueur d'onde de 625 nm, qui correspond à  $10^8$  UFC/ml. Cette suspension doit être inoculée extemporanément.

- **Inoculation de la Galerie**

- Remplir tubes et cupules des tests : CIT, VP et GEL avec la suspension bactérienne et avec la pipette ayant servi au prélèvement.
- Remplir uniquement les tubes et non les cupules des autres tests.
- Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H<sub>2</sub>S en remplissant leur cupule d'huile de paraffine. Refermer la boîte d'incubation et la placer à 37°C pendant 18 à 24 Heures.

- **Lecture de la Galerie**

Les réactions produites pendant la période d'incubation (18h-24h à 37C°) se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture.

Noter sur la fiche des résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :

Test TDA : ajouter 1 goutte de réactif TDA. Une couleur **marron-rougeâtre** indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats.

Test IND : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs. Un anneau rose ou une couleur **rose** diffusant dans toute la cupule indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats.

Test VP : ajouter 1 goutte des réactifs VP 1(KOH) et VP 2 (alpha-naphtol). Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur **rose** ou **rouge** indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration **rose** apparaissant après 10 minutes doit être considérée **négative**.

- **Détermination du profil numérique**

Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupe de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres qui constituent le profil numérique et l'identification est réalisée à l'aide du logiciel d'identification API<sup>WEB</sup>.

## **6. Antibiogramme**

L'étude des profils de la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées a été effectuée par l'établissement d'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé (méthode des disques), sur gélose Mueller-Hinton selon la méthode recommandée par l'OMS et répondant aux critères définis par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008) et standardisées depuis 1999 en médecine vétérinaire en Algérie.

- **Technique**

La gélose Mueller Hinton stérile doit être coulée dans des boîtes de pétri de 90 mm de diamètre jusqu'à une épaisseur de 4 mm et séchées avant l'emploi.

- **Préparation de l'inoculum**

L'inoculum a été préparé à partir d'une culture jeune de 18 à 24 h sur milieu gélosé non sélectif. 3 à 5 colonies bien distinctes sont suspendues dans l'eau physiologique 0.9 %, ensuite, la suspension est ajustée au standard 0.5 McFarland avec un spectrophotomètre à 625 nm qui correspond à une densité optique de 0.08 – 0.1. Donc, la suspension bactérienne contient approximativement  $1 \text{ à } 2 \times 10^8$  UFC/ml.

L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum.

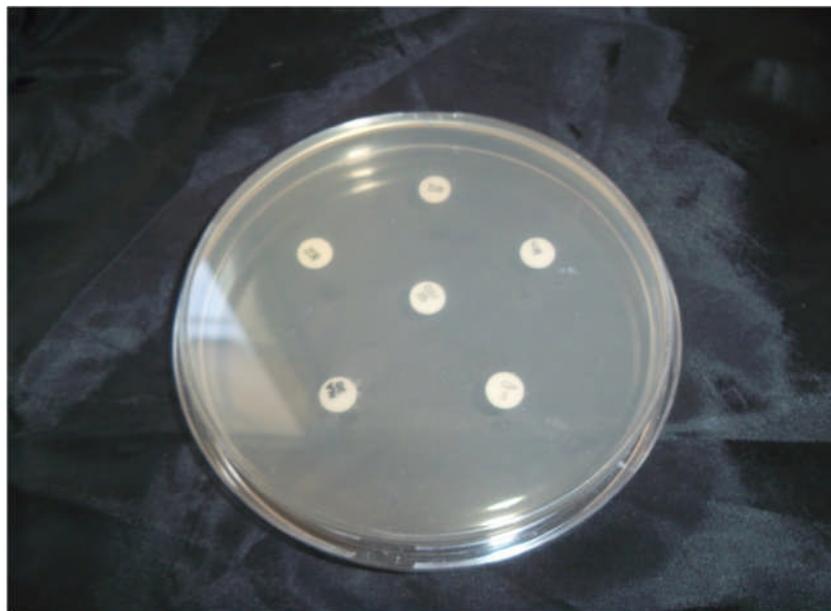
- **Ensemencement**

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- L'essorer en le pressant fermement sur la paroi interne du tube afin de la décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas par stries serrées.
- Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois et il faut pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

- **Application des disques d'antibiotiques**

Les disques d'antibiotiques correspondant ont été déposés à l'aide d'une pince stérile à la surface de la gélose Mueller Hinton préalablement ensemencée en appuyant légèrement.

Il ne faut pas mettre plus de 6 disques d'antibiotiques dans une boîte de 90 mm de diamètre (figure N° 7).



**Figure N° 7 :** Antibiogramme avant incubation.

Les antibiotiques utilisés figurent dans le tableau suivant :

**Tableau N°3** : Antibiotiques utilisés.

Famille	Antibiotiques	Code	Charge (µg)
Bétalactamines	Amoxicilline +Acide clavulanique	AMC	30
	Ampicilline	AMP	10
Aminosides	Gentamicine	CN	10
	Kanamycine	K	30
Sulfamides et associés	Triméthoprim+ Sulfaméthoxazole	COT	25
Tétracyclines	Tétracyclines	TE	30
Quinolones	Acide nalidixique	NA	30
	Enrofloxacin	ENR	5
Polypeptides	Colistine	CT	10
Phénicolés	Chloramphénicol	C	30

La figure suivante montre six tubes de disques d'antibiotiques : Chloramphénicol, Kanamycine, Colistine, Tétracyclines, Triméthoprim+ Sulfaméthoxazole, Ampicilline.



**Figure N° 8** : Tubes de disques imprégnés d'antibiotiques.

- **Incubation**

Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures.

- **Lecture**

Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés à l'aide d'une règle, à l'extérieur de la boîte fermée, puis les résultats ont été comparés aux valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition des entérobactéries et analysés à l'aide du logiciel WHONET 5.6.

- **Contrôle de qualité**

La précision et l'exactitude des tests sont vérifiées par l'utilisation parallèle d'une souche témoin d'*Escherichia coli* (ATCC 25922) dans les mêmes conditions expérimentales, cette dernière fournie par le laboratoire d'amélioration et valorisation des productions animales locales, possède une sensibilité connue aux antimicrobiens, ainsi 10 tests de contrôle de qualité ont été réalisés. Sachant que les diamètres des zones d'inhibition en relation avec le germe témoin doivent s'inscrire dans l'intervalle des valeurs critiques, les résultats tombant en dehors de cet intervalle, signifient une erreur technique de manipulation ou une défectuosité des réactifs.



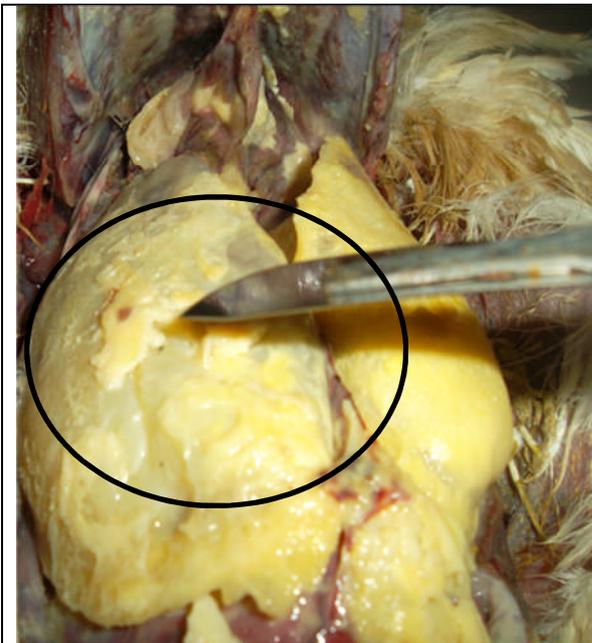
*RESULTATS ET  
DISCUSSION*

**Résultats et discussion**

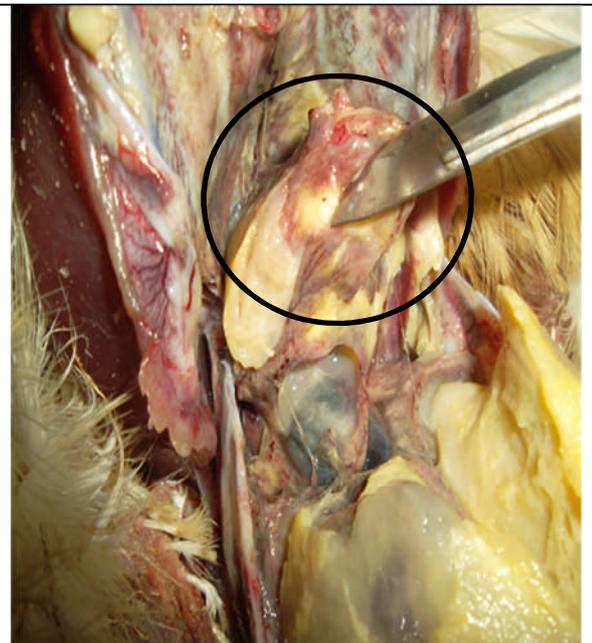
**Résultats**

**1. Lésions**

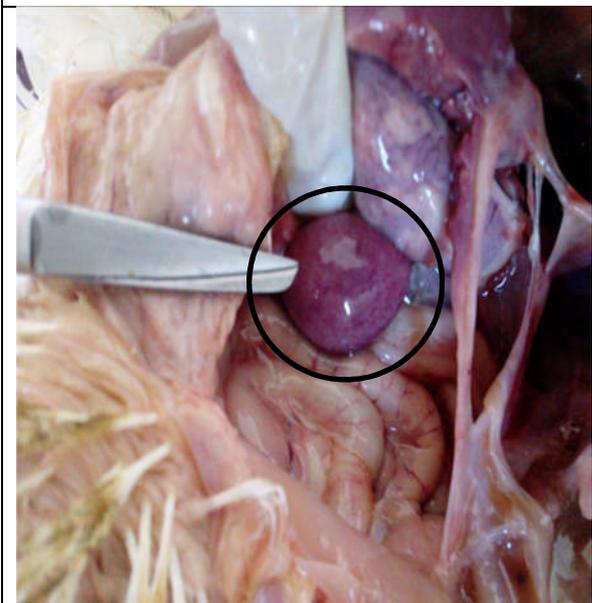
L'examen nécropsique a révélé des lésions qui peuvent être liées à la colibacillose aviaire : aérosaculite, splénomégalie, péricardite et périhépatite (figure 9, 10, 11 et 12).



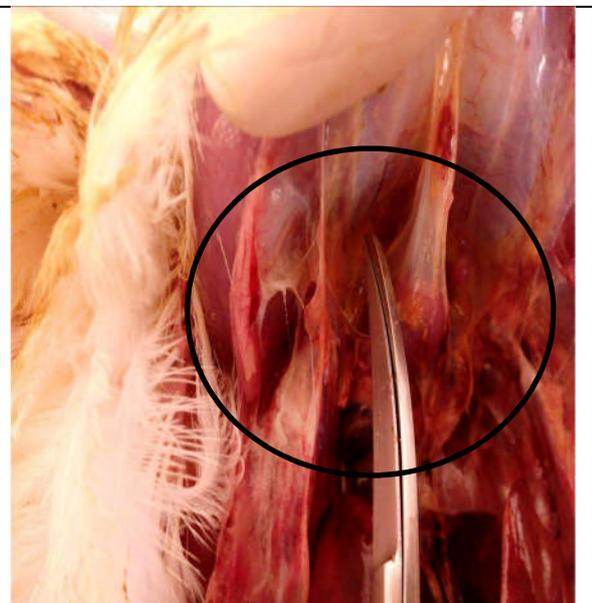
**Figure N° 9** : périhépatite fibrineuse.



**Figure N° 10** : péricardite fibrineuse.



**Figure N° 11** : Splénomégalie.



**Figure N° 12** : Aérosaculite.

La répartition de ces lésions est illustrée dans le tableau suivant :

**Tableau N°4 :** Répartition des lésions selon leur fréquence.

Lésions	Nombre de sujets	Pourcentage
Périhépatite fibrineuse	54	54 %
Péricardite fibrineuse	29	29%
Aérosaculite fibrineuse	47	47%
Splénomégalie	38	38%

Nos résultats montrent que les lésions les plus couramment trouvés sont : la périhépatite fibrineuse (54%), l'aérosaculite fibrineuse (47%), la splénomégalie et la péricardite fibrineuse avec des taux respectifs de 38 et 29 %.

Parmi les 100 poulets autopsiés ; 17 % (17 poulets) n'ont pas manifesté les lésions citées ci-dessus, néanmoins un retard de croissance a été remarqué.

## 2. bactériologie :

A partir des 100 sujets autopsiés, 100 Isolats ont été récoltés et identifiés comme appartenant à *E. coli* (Figure N° 13 et 14).

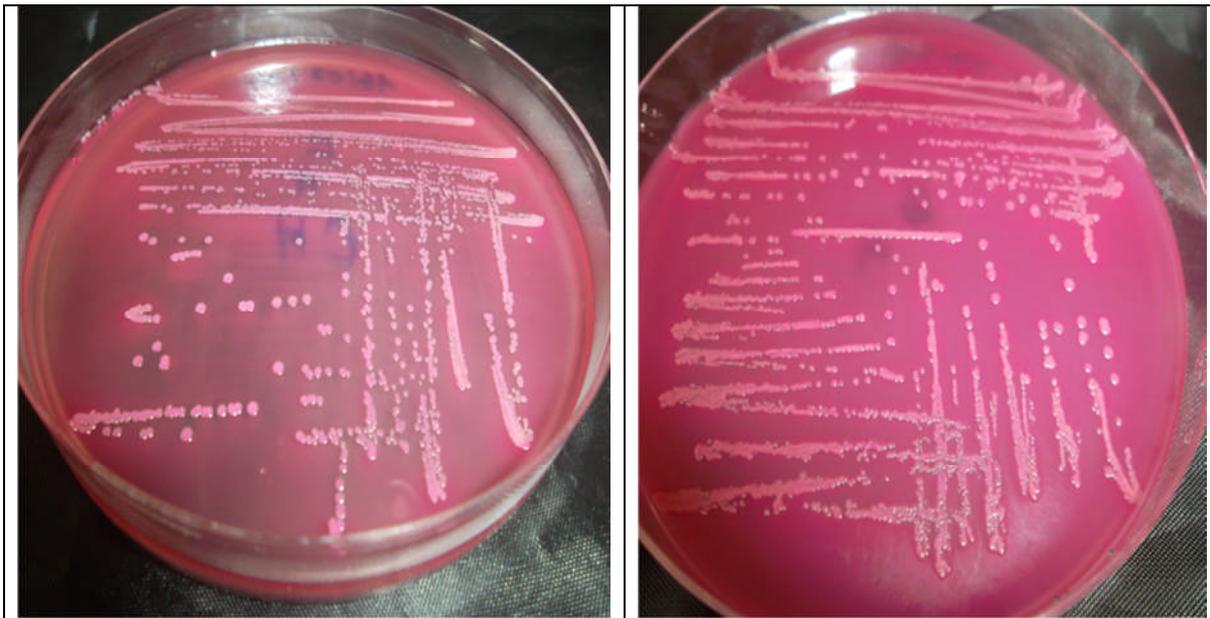
L'analyse préliminaire des isolats (coloration de Gram et Test d'oxydase) a mis en évidence des coccobacilles à Gram négatif et à oxydase négatif.

L'identification des 100 isolats a été globalement réalisée par galerie api 20 E. Les principaux caractères biochimiques sont : absence de production d'oxydase, absence d'uréase, Fermentation de lactose, production d'indole, absence de croissance sur le citrate, absence de production d'acétoïne (Réaction de Voges-proskauer négative) et pas de production d'H<sub>2</sub>S.

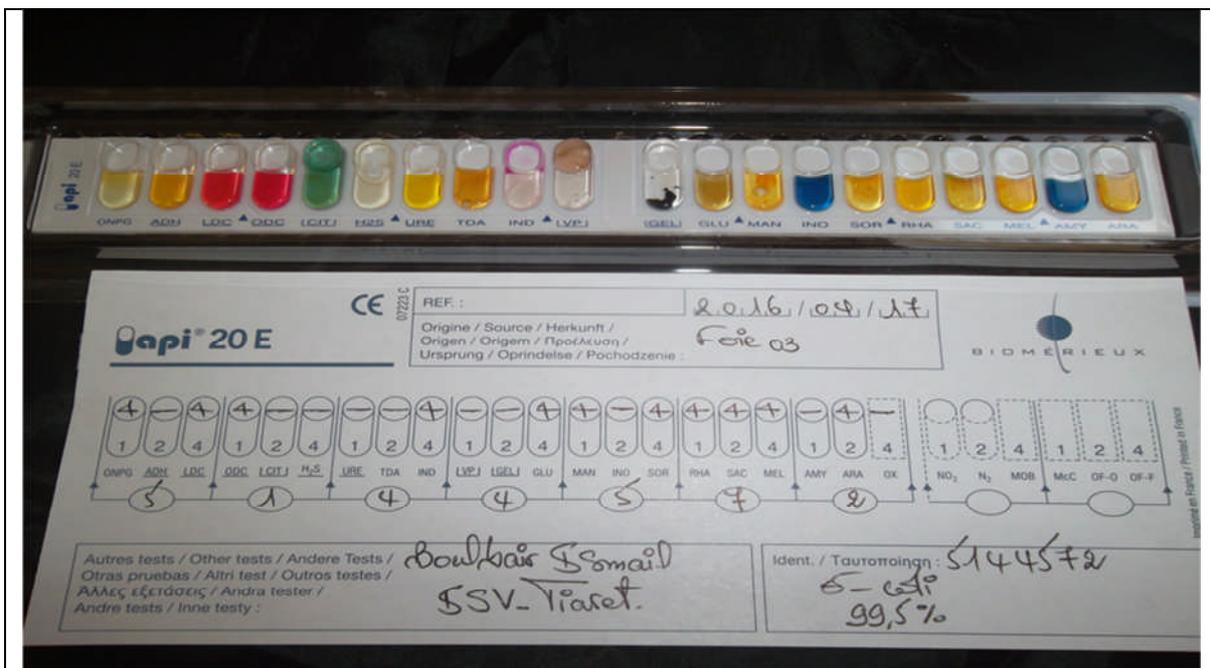
Le tableau suivant récapitule la répartition des Isolats d'*E. coli* récoltés à partir des sujets autopsiés.

**Tableau N° 5 :** répartition des isolats d'*E. coli*.

Région	Nombre de sujets	Nombre d'isolats
Tiaret	80	80
Tissemsilt	20	20



**Figure N° 13 :** colonies d'*E. coli* sur gélose Mac Conkey après 24h d'incubation à 37°C. Les colonies sont rondes, brillantes et rosâtres (lactose +).



**Figure N° 14 :** exemple d'un profil biochimique d'*E. coli* sur Galerie api 20 E.

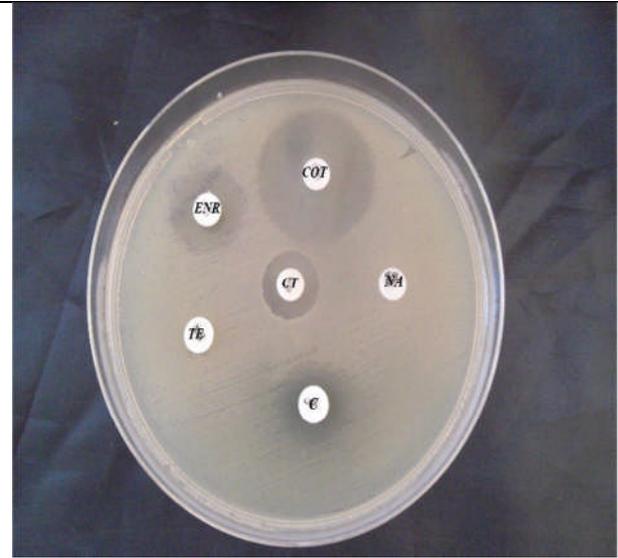
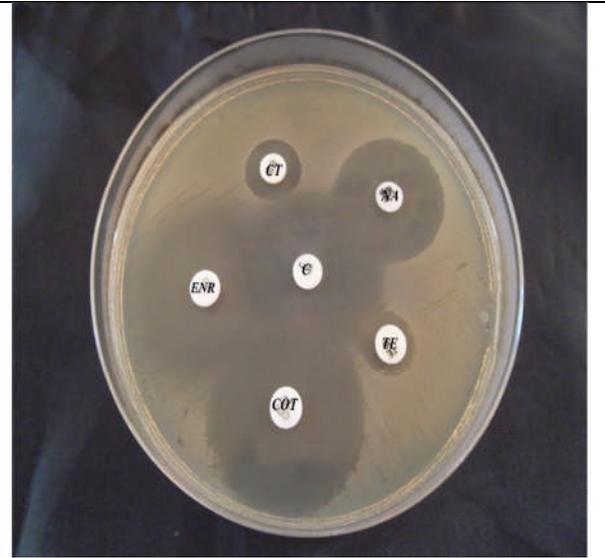
ONPG+,ADH-,LDC+,ODC+,CIT-,H2S-,URE-,TDA-,IND+,VP-,GEL-,GLU+,MAN+,INO-,SOR+,RHA+,SAC+,MEL+,AMY-,ARA+.

**3. Antibiogramme :**

La sensibilité et la résistance des 100 isolats d'*E. coli* ont été testées vis à vis des dix antibiotiques énumérés dans le chapitre matériels et méthodes.

Pour les résultats de la souche ATCC, les 10 antibiotiques ont donné des valeurs qui s'inscrivent à l'intérieur de l'intervalle des valeurs critiques. Ceci dénote que la méthode de recherche de la résistance aux antibiotiques a été faite dans de bonnes conditions, ce qui a pour conséquence une interprétation valable de l'ensemble des résultats obtenus sur les isolats testés.

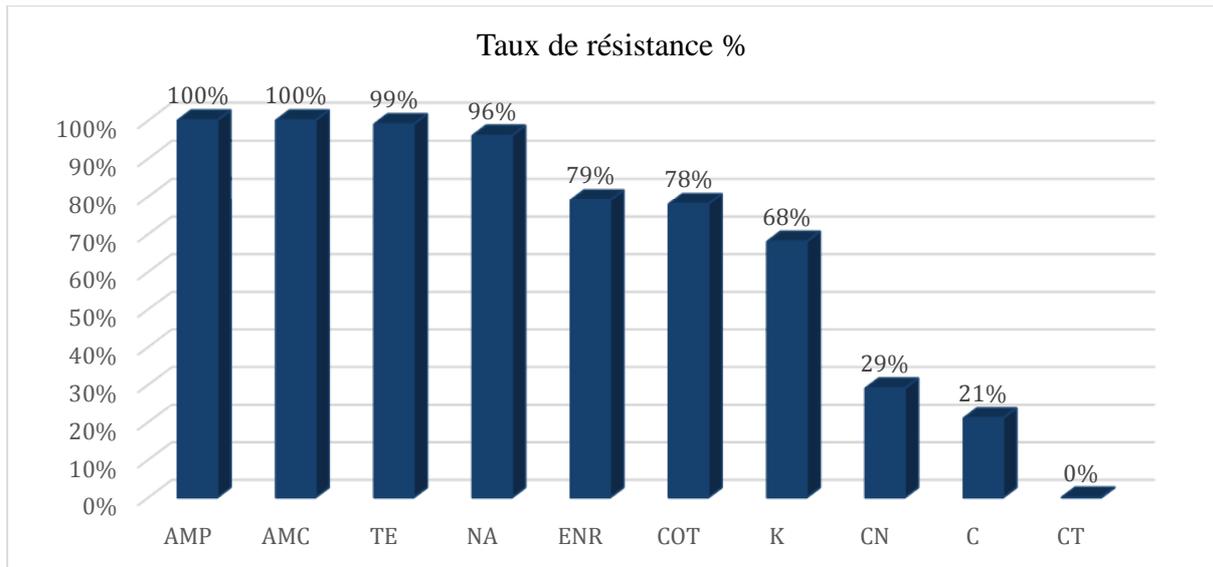
Les figures suivantes montrent les résultats d'antibiogramme :

	
<p><b>Figure N° 15 :</b> Antibiogramme après 18h d'incubation à 37°C. Présence de résistances à 3 antibiotiques (Chloramphénicol, Acide nalidixique, Tétracyclines).</p>	<p><b>Figure N° 16 :</b> Antibiogramme après 18h d'incubation à 37°C. Présence de sensibilité à 5 antibiotiques (Chloramphénicol, Acide nalidixique, Enrofloxacin, Colistine, Triméthoprim + Sulfaméthoxazole).</p>

**Tableau N° 6 :** Résultats de l'antibiogramme des isolats récoltés.

Régions Antibiotiques			Tiaret		Tissemsilt		Total	
			N	%	N	%	N	%
β-lactamines	AMP	R	80	80	20	20	100	<b>100</b>
		I	0	0	0	0	0	0
		S	0	0	0	0	0	0
	AMC	R	80	80	20	20	100	<b>100</b>
		S	0	0	0	0	0	0
		I	0	0	0	0	0	0
Tétracyclines	TE	R	79	79	20	20	99	<b>99</b>
		I	0	0	0	0	0	0
		S	01	01	0	0	01	01
Quinolones	NA	R	76	76	20	20	96	<b>96</b>
		I	0	0	0	0	0	0
		S	04	04	0	0	04	04
	ENR	R	61	61	18	18	79	<b>79</b>
		I	07	07	02	02	09	09
		S	12	12	00	00	12	12
Aminosides	K	R	55	55	13	13	68	<b>68</b>
		I	14	14	05	05	19	19
		S	11	11	02	02	13	13
	CN	R	25	25	04	04	29	<b>29</b>
		I	07	07	02	02	09	09
		S	48	48	14	14	62	62
Sulfamides et associés	COT	R	64	64	14	14	78	<b>78</b>
		I	0	0	0	0	0	0
		S	16	16	06	06	22	22
Polypeptides	CT	R	0	0	0	0	0	<b>0</b>
		I	0	0	0	0	0	0
		S	80	80	20	20	100	100
phénicolés	C	R	12	12	09	09	21	<b>21</b>
		I	18	18	04	04	22	22
		S	50	50	07	07	57	57

S : Sensible    R : Résistant    I : intermédiaire    N : Nombre d'isolats



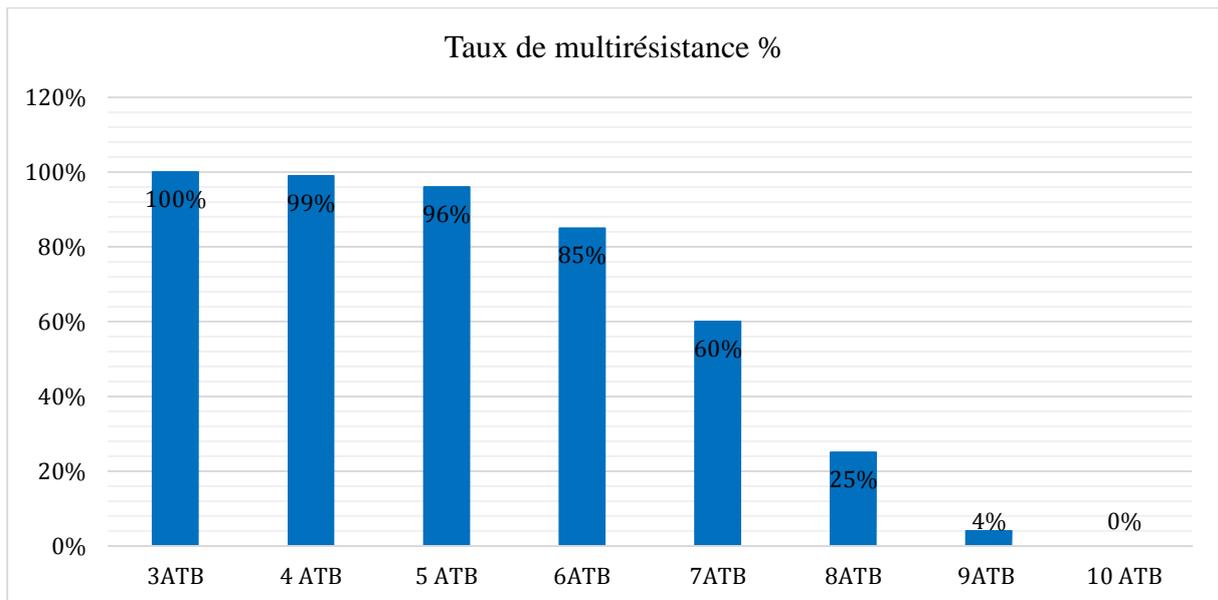
**Figure N° 17 :** Taux de résistance aux différents antibiotiques testés.

Nos résultats montre des taux de résistance élevés vis-à-vis de : l’ampicilline (100%), l’amoxicilline/acide clavulanique (100 %), tétracyclines (99%), l’acide nalidixique (96 %), Enrofloxacin (79%), Triméthoprime+ Sulfaméthoxazole (78 %).une fréquence de résistance moyenne à la Kanamycine (68%).De faibles taux de résistance pour la gentamycine (29%), le chloramphénicol (21 %) et aucun isolat n’a montré de résistance envers la colistine.

**Taux de la multirésistance :**

**Tableau N°7 :** Pourcentage de multi résistance des isolats.

Nombre d’antibiotiques	Pourcentage d’isolats résistants (%)
0	0
1	0
2	0
3	1
4	3
5	11
6	25
7	35
8	21
9	4
10	0



**Figure N° 18 :** pourcentages de multirésistance des isolats d'*E. coli* récoltés.

Les résultats nous montrent que 100 % des isolats sont résistants à au moins trois antibiotique, 99 % sont résistants à au moins 4 antibiotiques, 96 % à au moins 5 antibiotiques, 85% à au moins 6 antibiotiques, 60 % à au moins 7 antibiotiques, 25% à au moins 8 antibiotiques, et finalement 04 % des isolats sont résistants à au moins 9 antibiotiques.

## Discussion

### 1. Lésions

Les lésions, hépatiques et cardio-respiratoires sont dominées par une inflammation fibrineuse, associées dans certains cas à une splénomégalie caractérisant ainsi une colisepticémie à point de départ respiratoire. C'est la forme la plus commune et la plus fréquente de la colibacillose aviaire selon Barnes *et al.* (2003).

47% des sujets ont présenté une aérosaculite, étant donné que les mécanismes de défense sont limités particulièrement au niveau des sacs aériens, sites qui sont vulnérables à la colonisation et l'invasion des bactéries à cause de l'absence des macrophages résidents selon Stearns *et al.*(1987), cela nous amène à considérer que la voie respiratoire est la voie d'entrée principale du germe pathogène.

Jordan et Pattison (1996) rapportent qu'une fois les sacs aériens colonisés ; la bactérie infecte les organes internes comme le cœur, le foie et la rate via la voie sanguine (colisepticémie) et provoque leur altération, ce qui explique la périhépatite (54 %), la péricardite (29 %) et la splénomégalie (38%).

## 2. Bactériologie

L'identification biochimique n'est qu'une étape préliminaire pour la réalisation des antibiogrammes.

## 3. Résultats de l'Antibiogramme

- **$\beta$ -lactamines**

Nos résultats ont mis en évidence une forte résistance des isolats d'*E. coli* à l'Ampicilline avec un taux de 100 %. Ces résultats sont largement supérieurs à ceux rapportés par : Aggad *et al.* en 2010 (0 %) ; Rahimi en 2013 (66,2 %), mais se rapprochent de ceux rapportés par Messai *et al.* (2015), qui ont révélé un taux de résistance de 89 %.

Concernant l'association (amoxicilline/acide clavulanique), le pourcentage de résistance est de 100 %, il est supérieur à celui obtenu par Benameur *et al.* en 2014 (92,1%).

Les taux de résistance élevés pour les deux antibiotiques de cette famille seraient probablement la conséquence d'une utilisation accrue et indiscriminée des  $\beta$ -lactamines et la diversité des mécanismes de résistance d'*E. coli* comme rapporté par Quintiliani et Courvalin (1995).

- **Tétracyclines**

La fréquence de résistance est très élevée pour les Tétracyclines (99%), ce résultat est similaire à celui rapporté par différentes études, à savoir : Rahimi (2013), 85,1 % ; Aggad *et al.* (2010) ,87% ; Benameur *et al.* (2016), 92,15 % ; au Maroc, Hafed *et al.* (2016), 97,05% ; Messai *et al.* (2015), 100 %.cette résistance est due au fait que les Tétracyclines représentent la plus ancienne molécule utilisée en thérapie.

- **Quinolones**

Les taux de résistance pour les deux antibiotiques de cette famille ont été importants. Avec 96 %, 76 % pour l'acide nalidixique et l'enrofloxaciné respectivement. Cette résistance multiple est due au fait que la résistance est croisée entre les quinolones, et par voie de conséquence la résistance vis-à-vis de l'une, confère automatiquement la résistance aux autres molécules de cette famille d'antibiotique.

Des résultats similaires ont été révélés par l'étude de Benameur *et al.* (2016) avec des taux de résistance de 100% pour l'acide nalidixique, et 84,31 % pour l'enrofloxaciné.

Cette fréquence élevée de résistance peut être expliquée par la forte utilisation de ces molécules grâce à leur grande disponibilité sur le marché Algérien surtout les génériques à des prix abordables.

- **Les Polypeptides**

Aucune résistance n'a été observée pour la colistine, ce résultat concorde avec ceux obtenus par : Benameur *et al.* (2016) ,0% ; Messai *et al.* (2015), 0%.Ce qui est tout à fait l'inverse pour les résultats antérieurs. Saberfar *et al.* (2008), Benameur *et al.* (2014), Aggad *et al.* (2010), Rahimi (2013) ont obtenus respectivement les résultats suivants : 100, 31,6 ,13 et 66,9 % cela pourrait être en rapport avec une utilisation modérée de cet antibiotique en élevage avicole dans les régions de l'étude, chose qui a été confirmé par certains vétérinaires.

- **Les phénicolés**

Pour le chloramphénicol le pourcentage de résistance est faible, il a été de 21 %, ce taux est analogue à celui signalé par : Benameur *et al.* (2016), 27, 45 % ; Messai *et al.* (2015), 23 %.

Ce faible taux de résistance est vraisemblablement dû au fait qu'en Algérie ce médicament n'est plus utilisé en thérapie vétérinaire.

- **Sulfamides et associés**

Avec un taux de 78 %, la fréquence de résistance au Triméthoprime+ Sulfaméthoxazole est assez conséquente, elle a été de 42 % dans l'enquête de Hammoudi et Aggad (2008), 70 % dans celle de Aggad *et al.* (2010), 72 % en Iran dans l'étude de Saberfar *et al.* (2008), et finalement 80,39 % dans celle de Benameur *et al.* (2016).Nous constatons que nos résultats sont en accord avec ceux de Benameur *et al.* (2016) par contre il y a une augmentation par rapport aux fréquences enregistrées par Hammoudi et Aggad (2008), Saberfar *et al.* (2008), Aggad *et al.* (2010), ce qui pourrait probablement se traduire par une utilisation anarchique de cette molécule en élevage avicole.

- **Les Aminosides**

Une fréquence de résistance moyenne a été enregistrée pour la Kanamycine (68 %), ce qui est superposable aux résultats obtenus en Iran par Rahimi (2013) qui a révélé un taux de

résistance de 68, 2 % à la Néomycine (Selon le Clinical and Laboratory Standards Institute, la réponse à la Kanamycine est valable pour la Néomycine).

Cependant, ces chiffres sont supérieurs à ceux de 49 % signalés par Messai *et al.* (2015) en ce qui concerne la résistance à la néomycine.

Cette fréquence serait probablement due à une large utilisation de ces molécules dans les régions étudiées.

Concernant la gentamicine, le taux de résistance est de 29 %, il est proche de celui signalé par Oukala *et al.* (2014), 24 %.

### **La multirésistance**

Les résultats nous montrent que 100 % des isolats sont résistants à au moins trois antibiotique, 96 % à au moins 5 antibiotiques.

Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Benameur *et al.* (2016) qui sont de 100 % et (91, 17%) à au moins 3 et 5 antibiotiques respectivement.

Cette forte multirésistance pourrait être due à l'automédication par les aviculteurs et l'utilisation des molécules alternatives avant que le premier traitement ne donne des résultats. En effet, de nombreux antibiotiques sont souvent administrés simultanément à des fins prophylactiques ou thérapeutiques. L'utilisation abusive et aveugle des antibiotiques constitue probablement la genèse de cette multi résistance d'*E. coli* dans l'élevage avicole. De telles pratiques, particulièrement sans avoir eu recours à un antibiogramme préalable peuvent mener à la sélection d'un nombre croissant des clones résistants d'*E. coli* comme rapporté par Hammoudi et Aggad (2008).

Cette forte multirésistance est inquiétante car elle présente un énorme risque pour l'élevage avicole lors des transmissions plasmidiques des résistances d'où l'échec de traitement, et par conséquent, une diminution de la productivité à cause de l'augmentation du taux de morbidité et de mortalité. D'autre part, la contamination de l'homme par ces bactéries multirésistantes par exemple, (lors des opérations d'abattage ou via la chaîne alimentaire) constituerait l'une des causes majeures de difficultés de traitements rencontrés chez l'homme.

*CONCLUSION ET*  
*RECOMMANDATIONS*

### **Conclusion**

La totalité des isolats testés ont montré une résistance totale aux  $\beta$ -lactamines (Ampicilline et Amoxicilline/acide clavulanique : 100%).

Les taux de résistance ont été aussi importants pour les Tétracyclines (99 %) et les quinolones (acide nalidixique : 96 % ; l'enrofloxacin : 79 %) qui sont des produits largement disponibles avec des prix abordables.

Cette forte résistance pour ces trois antibiotiques les rend inefficaces dans la lutte contre les colibacillooses.

Les taux de résistance sont aussi élevés pour le Triméthoprime+ Sulfaméthoxazole avec 78 % et la Kanamycine ou il était de 68 %.

Aucun isolat n'a montré de résistance envers la colistine.

L'utilisation anarchique des antibiotiques par les aviculteurs sans avis vétérinaire est une pratique qui devient de plus en plus courante. Cette pratique détermine la sélection de bactéries résistantes et l'augmentation de la multirésistance : Observation de taux alarmant pour l'antibiorésistance multiple (96 % à au moins 5 antibiotiques, 85 % à au moins 6 antibiotiques, 60 % à au moins 7 antibiotiques) pour les isolats testés.

Cette multirésistance est responsable de pertes économiques considérables (diminution de productivité) au niveau des élevages avicoles à cause de l'échec du traitement, d'une part et d'autre part, elle présente un énorme risque pour la santé humaine, suite à la transmission des bactéries incriminées à l'homme.

La caractérisation moléculaire des mécanismes de résistance aux antibiotiques a mis en évidence l'existence de structures génétiques mobiles qui jouent un rôle très important dans la déssimination des résistances : les plasmides, les intégrons et les transposons.

Dans ce contexte, il serait intéressant d'initier des recherches portant sur un nombre d'échantillons élevé et représentatif, de faire l'étude sur le plan régional voire national et de faire recours à la technique de PCR afin de pouvoir identifier les facteurs de virulence et les mécanismes de résistance.

### **Recommandations**

Les antibiotiques sont des médicaments vitaux pour traiter les infections, leur utilisation excessive dans la production des animaux d'élevage a pour conséquence en santé publique l'apparition d'agents pathogènes résistants susceptibles d'être transmis à l'homme via la chaîne alimentaire.

En vue de réduire leur utilisation anarchique, et de lutter efficacement contre la colibacillose, nous ne saurions que trop conseiller de suivre ces recommandations :

- ❖ L'organisation de l'utilisation des antibiotiques chez les animaux en rendant leur prescription obligatoire par le vétérinaire.
- ❖ La surveillance plus étroite que jamais des résistances et des souches circulantes nous paraît évidente mais nécessiterait le développement d'outils de laboratoire performants et accessibles.
- ❖ La Sensibilisation des éleveurs sur l'utilisation des antibiotiques sans avis du vétérinaire.
- ❖ Conseils à l'intention des vétérinaires afin de réduire l'utilisation erronée des antibiotiques chez les animaux d'élevage.
- ❖ L'application des règles d'hygiène : désinfection, nettoyage, vide sanitaire, ventilation.

*REFERENCES*  
*BIBLIOGRAPHIQUES*

1. AFSSA. (2006). *Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine*. Rapport du groupe de travail "Antibiorésistance". [En ligne]. Maisons-Alfort : AFSSA, 214 pages. Disponible sur : <http://www.afssa.fr/Documents/SANT-Ra-ABR.pdf>.
2. Aggad H, Ahmed Ammar Y, Hammoudi A, Kihal M (2010). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis. *Glob. Vet.* 4(3):303-306.
3. Alain R., Bernard J. (2002). Entérobactéries. Ed lavoisier. P : 29-38.
4. Amara, A. (1996) Données épidémiologiques et épizootiologiques sur les colibacilloses aviaires au Maroc. *Maghreb Vétérinaire* 8 : (32).
5. Andrade, J. R., V. F. Da Veiga, M. R. De Santa Rosa, et Suassuna, I. (1989). An endocytic process in HEp-2 cells induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Med Microbiol.* 28 :49-57.
6. Arne, P., Marc, D., Bree, A., Schouler, C., Dho-Moulin, M. (2000). Increased tracheal colonization in chickens without impairing pathogenic properties of avian pathogenic *Escherichia coli* MT78 with a fimH deletion. *Avian Dis.* 44 : 343-355.
7. Avorn, J.L., Barrett, J.F., Davey, P.G., McEwen, S.A., O'Brien, T.F., Levy, S.B., (2001). Organisation mondiale de la santé (OMS). Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups: alliance for the prudent use of antibiotics, 2001. [http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO\\_CDS\\_CSR\\_DRS\\_2001.10.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO_CDS_CSR_DRS_2001.10.pdf)
8. Avril J-L., Dabernat H., Denis F., Monteil H. (1992). Bactériologie Clinique 2<sup>ème</sup> Edition. Paris : Ellipses : p 149-151.
9. Avril J-L., Dabernat H., Denis F., H., Monteil, H. (2000). Bactériologie Clinique 3<sup>ème</sup> édition. Paris : Ellipses ; 601 p.
10. Babai, R., Blum-Oehler, G., Stern, B.E., Hacker, J., Ron, E.Z. (1997) Virulence patterns from septicemic *Escherichia coli* O78 strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 149, 99-105.
11. Bacon, R.T., Sofos, J.N., Kendall, P.A., Belk, K.E. and Smith, G.C. (2003). Comparative analysis of acid resistance between susceptible and multi-antimicrobial-resistant *salmonella* strains cultured under stationary-phase acid tolerance-inducing and non-inducing conditions. *Journal of Food Protection.* 66, 732-740.
12. Barnes, H. J., et W. B. Gross. (1997). Colibacillosis. In. B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, L R. McDougald and Y. M. Saif. (eds.). Diseases of poultry. Pp.131- 141. Iowa State University Press Ames, Iowa, USA.

13. Barnes, H. J., J.-P. Vaillancourt, and W. B. Gross. (2003). Colibacillosis, p. 631-652. *In* Y. M. Saif, H. J. Barnes, J. R. Glisson, A. M. Fadly, L. R. McDougald, and D. E. Swayne (ed.), *Diseases of poultry*, 11th ed. Iowa State University Press, Ames, IA.
14. Barnes, J., Nolan, L., Vaillancourt, J. (2008). Colibacillosis. *Diseases of Poultry*. Saif YM. Iowa, Blackwell Publishing Professional. 12: 716-762.
15. Bates, J., Jordens, Z.J., Griffiths, D.T. (1994). Farm animals as a putative reservoir for vancomycinresistant enterococcal infection in man. *J. Antimicrob Chemother.* 34, 507-516.
16. Benameur,Q., Guemour,D., Hammoudi,A., Aoudia,H.,Aggad,H., Humblet, M. F.,Saegerman,C.,(2014) Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Chickens in West of Algeria *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR) (2014) Volume 13, No 1, pp 366-370.*
17. Benameur,Q., Ben-Mahdi, M.H., Boutaiba,. B. 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, *African Journal of Microbiology Research Vol. 10(42), pp. 1792-1797.*
18. Bergey, D.H., Holt, J.G. (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th ed. Williams and Wilkins, USA. p. 787.
19. Blanco, J. E., M. Blanco, A. Mora, and J. Blanco. (1997). Production of toxins (enterotoxins, verotoxins, and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens : relationship with in vivo pathogenicity. *J Clin Microbiol.* 35:2953-2957.
20. Bornet, G. (1998). Les microorganismes indicateurs de contamination fécale de l'eau et des aliments. *Revue Med. Vet.*, vol. 149, n°7, pp. 727-738.
21. Bree, A., Dho, M., and Lafont, J.P. (1989). Comparative infectivity for axenic and specific-pathogen-free chickens of O2 *Escherichia coli* strains with or without virulence factors. *Avian Dis.* 33 (1), 134-139.
22. Bywater, R.J. (1982).Pathophysiology and treatment of Calf diarrhea. XII World Congress of Diseases in Cattle, Amsterdam, Netherlands. p 291-297.
23. Carattoli, A. (2001). Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Veterinary Research.*32, 243-259.
24. Chatellet, M-C. (2007). Modalités d'utilisation des antibiotiques en élevage bovin. Th.Méd. Vét. Maisons-Alfort.

25. Chopra, I., (1998). Research and development of antibacterial agents. *Current opinion in Microbiology*, 1, 495-501.
26. Cloud, S.S., K.Rosenberger, J., Fries, P.A., Wilson, R.A. and Odor, E.M. (1985) *In Vitro* and *in Vivo* Characterization of Avian *Escherichia coli*. I. Serotypes, Metabolic Activity, and Antibiotic Sensitivity. *Avian Disease*, 29, 1084-1093.
27. CLSI. (2008). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 3rd Edn., Approved Standard, CLSI Document M31-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
28. Davidson, B.E., Kordias, N., Dobos, M., Hillier, A.J., (1996). Genomic organization of lactic acid bacteria. In : Venema, G., Huisint Veld, J.H.J., Hugenholtz, J. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands*. 65-87.
29. D'Costa, V.M., King, C.E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W.W.L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G.B., Poinar, H.N., Wright, G.D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 477(7365), 457-61.
30. Dellit, T.H., Owens, R.C., McGowan, J.E., Gerding, D.N., Weinstein, R.A., Burke, J.P., and coll., (2007). Infectious diseases society of America and the society for healthcare epidemiology of America guidelines for developing an institutional program to enhance antimicrobial stewardship. *Clin Infect Dis*. 44, 159-77.
31. De Rycke, J. (1991). Les colibacilles producteurs de cytotoxines : importance en médecine vétérinaire et en santé publique. *Annales de Recherches Vétérinaires, INRA Editions, 1991, 22 (2)*, pp.105-126.
32. Dho, M., Lafont, J.P. (1984). Adhesive properties and iron uptake ability in *Escherichia coli* lethal and nonlethal for chicks. *Avian Dis*. 28:1016-1025.
33. Dho-Moulin, M., van den Bosch, J.F., Girardeau, J.P., Bree, A., Barat, T., Lafont, J.P. (1990). Surface antigens from *Escherichia coli* O2 and O78 strains of Avian Origin. *Infection and Immunity*, 58 (3), 740-745.
34. Dho-Moulin, M., Fairbrother, J.M. (1999). Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.* 30:299-316.
35. Dibner, J.J., and Richards, J.D. (2005). Antibiotic growth promoters in agriculture : history and mode of action. *Poult Sci*. 84, 634-643.

36. Dowling, P.M. (2013) Peptide antibiotics: polymyxins, glycopeptides, bacitracin, and fosfomycin. IN: Antimicrobial therapy in veterinary medicine, 5th Edition (Giguère S, Prescott JF, Dowling PM Eds). Wiley Blackwell, 189-192. ISBN 978-0-470-96302-9.
37. Dozois, C.M., Fairbrother, J.M., Harel, J., Bosse, M. (1992). Pap- and pil-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. *Infect.Immun.*60 : 2648-56.
38. Dozois, C.M., Chanteloup, N., Dho-Moulin, M., Bree, A., Desautels, C., Fairbrother, J.M. (1994). Bacterial colonization and in vivo expression of F1 (Type 1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Dis*, 38, 231-239.
39. Dozois, C. M., Dho-Moulin, M., Bree, A., Fairbrother, J. M., Desautels, C., Curtiss III, R. (2000). Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infect. Immun.* 68:4145-4154.
40. Elfadil, A. A., Vaillancourt, J.P., Meek, A.H., Julian, R.J. & Gyles, C.L.. (1996). Description of cellulitis lesions and associations between cellulitis and other categories of condemnation. *Avian Diseases*, 40, 690–698.
41. Ellis, M.G., Arp, L.H., Lamont, S.J. (1988). Serum resistance and virulence of *Escherichia coli* isolated from turkeys. *Am. J. Vet. Res.* 49: 2034-2037.
42. Emery, D.A., Nagaraja, K.V., Shaw, D.P., Newman, J.A. & White, D.G. (1992). Virulence factors of *Escherichia coli* associated with colisepticemia in chicken and turkeys. *Avian Dis.* 36:504-511.
43. Enriquez, B. (2002). Les antibiotiques en médecine vétérinaire : pharmacologie et toxicologie expérimentales et cliniques, Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité de Pharmacie et toxicologie, 157.
44. European Commission. (2008) Technical guidance prepared by the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *The EFSA J*, 1-15.
45. Fauchère, J.L., Avril J.L. (2002). Bactériologie générale et médicale. Ellipses Edition Marketing. Paris. p 250-260.
46. Fedde, M. R. (1998). Relationship of structure and function of the avian respiratory system to disease susceptibility. *Poultry Science*, 77, 1130—1138.

47. Flandrois, J.C., Courco, L., Lemeland, J.F., Ramuc, M., Sirot, J. et Souny, C.J. (1997). Bacteriologie médicale. *Presses Universitaire de Lyon*. ISBN 2 7297 05678.
48. Garcia, M.I., Le Bouguenec, C. (1996). Role of adhesion in pathogenicity of human uropathogenic and diarrhoeogenic *Escherichia coli*. *Bull. Inst. Pasteur* 94:201–236.
49. George, G., Khachatourians, B.A. (1998). Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *Canadian Medical Association* ; 159, 1129-1136.
50. Giguere, S., Prescott, J.F., Baggot J.D., Walkern, R.D., Dowling, P.M. (2007). *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. 4th ed, Blackwell Scientific Publications, Wiley-Blackwell, USA, 626 pages.
51. Gogny. M, Puyt. J.D, Pellerin. J.L. (2001). Classification des principes actifs. L'arsenal thérapeutique vétérinaire, *Editions le point vétérinaire*. p 165-168.
52. Grimont P.A. (1987). Taxonomie des *Escherichia coli*. *Médecine et Maladies Infectieuses*. p : 6-10.
53. Gross W.B. (1991). Colibacillosis, p.138-144. In : Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., Reid W.M. & Yoder J.H.W. (Eds), *Disease of Poultry*. 9th ed. Iowa State University Press, Ames.
54. Gross, W.G. (1994). Diseases due to *Escherichia coli* in poultry. In : In : C.L. Gyles (ed.), *Escherichia coli in Domestic Animals and Humans*, (CAB International, Wallingford), 237-259.
55. Guechi, Z. (2002). Microbiologie des viandes et des produits carnés. Cours Nationales d'hygiène et de microbiologie des aliments. *Institut Pasteur d'Algérie*. 38:140-145.
56. Guerin-Fauble, V. (2010). Les mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques. In : Journées Nationales des GTV, Lille, 26-27-28 juillet 2010, 93-102.
57. Guillemot D, Brisabois A, Brugere H, Guillot J F, Laval A, Millemann Y et al. (2006). *Usage vétérinaire des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine*. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. Disponible en ligne [<http://lesrapports.ladocumentationfrancaise.fr/BRP/074000079/0000.pdf>].
58. Hafed,Z.,Benguedour,R.,Aboussaleh,Y.,zaghari,L.,MahjoubA.,Berrid,N.,Abouchouaib,N., Sbaibi.R., (2015) profil d'antibioresistance d'*Escherichia coli* d'origine aviaire : cas de poulet de chair dans la region de grande casablanca –MAROC. *Am. J. innov. res. appl. Sci* ; 2(2) :50-54.

59. Hammoudi, A, Aggad, H. (2008). Antibioresistance of *Escherichia coli* Strains Isolated from Chicken Colibacillosis in Western Algeria. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 32(2):123-126.
60. Hans, N. (2015) .Microbiology in pictures. En ligne <http://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/escherichia-coli-photos/escherichia-coli-bile-macconkey.html> , consulté le 26/09/2016.
61. Havarstein, L.S. (1998). Bacterial gene transfer by natural genetic biotransformation. *ActaPathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica.* 106, 84-55.
62. Hermann, T. (2005). Drugs targeting the ribosome. *Corrent opinion in Microbiology.* 15, 355-366.
63. Howard, C. J., and Glynn, A. A. (1971) The virulence for mice of strains of *Escherichia coli* related to the effects of K antigens on their resistance to phagocytosis and killing by complement. *Immunology* 20,767-777.
64. Huang, D. B., Mohanty, A., DuPont, H. L., Okhuysen, P. C. & Chiang, T. (2006). A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* 55, 1303–1311.
65. Ike, K., Kawahara, K., Danbara, H., Kume, K. (1992). Serum resistance and aerobactin iron uptake in avian *Escherichia coli* mediated by conjugative 100-megadalton plasmid. *J. Vet. Med. Sci.*54 : 1091-1098.
66. Janben, T., C. Schwarz, P. Preikschat, M. Voss, H. C. Philipp, and L. H. Wieler. (2001). Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *Int J Med Microbiol.* 291:371-378.
67. Jerse, A.E., Yu, J., Tall, B.D., Kaper, J.B. (1990). A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl. Acad.Sci. USA.* 87:7839–7843.
68. Johnson, J. R. (1991) Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection, *Clin Microbiol Rev* 4, 80-128.
69. Joly B. and Alain R. (2003). Entérobactéries : systématique et méthodes de diagnostic. *Ed : Lavoisier, Paris*, 356 : 29-38.
70. Jordan, F.T.W., Pattison, M. (1996). Poultry diseases W.B Sanders Company: London, 38-43.

## Références bibliographiques

---

71. Kaeckenbeeck, A. (1993). Le diagnostic des souches *pathogènes* d'*Escherichia coli* : petites et grandes histoires, *Ann. Méd. Vet.* 137: 337-340.
72. Kaper, J. B., Nataro, J. P. et Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2, 123–140.
73. Karmali, M.A. (1989). Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 2 :15-38.
74. Katwa, L.C., White, A.A. (1992) Presence of fonctional receptors for the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin in the gastrointestinal tract of the chicken. *Infect. Immun.* 60 :3546-3551.
75. Khachatourians, G.G. (1998) Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *Can Medic Assoc J.* 159, 1129-1136.
76. kingsbury, D.T., and Wagner. G.E. (1990). Microbiology. 2<sup>nd</sup> Edition. John Wiely & Sons. Inc., USA. pp 315-320.
77. Knothe, G.P., Shah, P., Kremery, V., Antai, M., Mitsuhashi, S. (1983). Transferable resistance to cefotaxime, ceftiofex, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumonia* and *Serratia marcescens*. *Infection.* 11, 315-317.
78. Lafont, J.P., Dho, M., d'Hauteville, H.M., Bree, A., Sansonetti, P.J. (1987). Presence and expression of aerobactin genes in virulent avian strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 55 : 193–197.
79. La Ragione, R.M., Woodward, M.J., Kumar, M., Rodenberg, J., Fan, H., Wales, A.D., Karaca, K. (2013). Efficacy of a live attenuated *Escherichia coli* O78 and K80 vaccine in chickens and turkeys. *Avian Dis*, 57:273–279.
80. LeBlanc, J.J. (2003). Implication of virulence factors in *Escherichia coli* O157 :H7 pathogenesis. *Crit Rev Microbiol.* 29: 277-296.
81. Leclerc, B., Fairbrother J.M., Boulianne M., Messier S. (2003). Evaluation of the adhesive capacity of *Escherichia coli* isolates associated with avian cellulitis. *Av Dis* 47:21-31.
82. Le Minor, L., Veron, M. (1989) eds. Bactériologie médicale, 2<sup>ème</sup> édition. Paris : Flammarion.
83. Le Minor L. and Richard C. (1993). Méthode de laboratoire pour l'identification des Entérobactéries. Institut Pasteur. Paris, 310-324.

- 84.** Levine, M.M. (1987). *Escherichia coli* that cause diarrhea : Enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 155 :377-389.
- 85.** Levy, S.B., FitzGerald, G.B. and Maccone, A.B. (1976). Changes in intestinal flora of farm personnel after introduction of a tetracycline-supplemented feed on a farm. *N Engl J Med* 295, 583-588.
- 86.** Levy, S.B., Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine Reviews.* 10, 122-129.
- 87.** Lozniewski, A., Rabaud, C. (2010). Résistance bactérienne aux antibiotiques. Fiche conseil pour la prévention du risque infectieux. Centre de Coordination de lutte contre les infections Nosocomiales-Sud Est.
- 88.** Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. (2000). In : Brockbiology of microorganisms, Prentice Hall Upper Saddle River, NJ, USA. *Ninth Edition*, pp. 749-771.
- 89.** Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R.B., *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.
- 90.** Mainil, J.G. (1993). Les colibacilloses dans l'espèce bovine, *Ann. Med. Vet.*, nr. 137, 343-357.
- 91.** Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R., Mandell, D.B., (2009). Principles and practice of infectious diseases. *Sixième édition, Elsevier, Churchill Livingstone éditeurs, USA.* Édition en ligne. [Http://www.ppidon-line.com](http://www.ppidon-line.com).
- 92.** Mao Y., Zhu, C. and Boedeker E.C. (2003). Foodborne enteric infections. *Curr Opin Gastroenterol.* 19:11-22.
- 93.** Marc, P., Arne, P., Bree, A., Dho-Moulin, M. (1998) Colonization ability and pathogenic properties of a fim mutant of an avian strain of *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* 149 :473-485.
- 94.** Marchal N., Bourdon J. and Richard C. L. (1991). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. *Ed. Doin.* p. 65-149.
- 95.** Martel M. (1997). Maladie à colibacille de la poule et la dinde. *comp.rend.Soc.de biol,* 49,500.

96. Mellata M., Dho-Moulin M., Dozois C.M., Curtiss III R., Brown P.K., Arné P., Breé A., Desautels C. & Fairbrother J.M. (2003). Role of virulence factor in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. *Infect. Immun.* 71:536-540.
97. Mellata, M., Ameiss, K., Mo, H., Curtiss III, R. (2010). Characterization of the contribution to virulence of three large plasmids of avian pathogenic *Escherichia coli* chi 7122 (O78 :K80 :H9). *Infection and Immunity.* 78: 1528–1541.
98. Messaï, C.R., Aït-Oudhia, K., Khelef, D., Hamdi, T.M., Chenouf, N.S., Messaï, M.R. (2015) Serogroups and antibiotics susceptibility pattern of avian pathogenic *Escherichia coli* strains responsible for colibacillosis in broiler breeding farms in the east of Algeria, *African Journal of microbiology Research Vol. 9(49)*, pp. 2358-2363.
99. Mevius, D.J., Rutter, J.M, Hart, C.A., Imberechts, H., Kempf, G., Lafont, J.P., Luthman, J., Moreno, M.A, Pantosti, A., Pohl, P., Willadsen, C.M.(1999). Antibiotic resistance in the European Union associated with therapeutic use of veterinary medicines. Report and qualitative risk assessment by the committee for veterinary medicinal products, *Editions Le point vétérinaire.* p 1-57.
100. Miriagou, V., Carattoli, A. Fanning, S. (2006). Antimicrobial resistance islands : resistance gene clusters in *Salmonella* chromosome and plasmids. *Microbes and Infection ; 8:* 1923-1930.
101. Nakamura, K., Cook, J.K.A., Frazier, J.A. and Narita, M. (1992). *Escherichia coli* multiplication and lesions in the respiratory tract of chickens inoculated with infectious bronchitis virus and/or *E. coli*. *Avian Diseases*, 36, 881-890.
102. Nakazato, G, T. Amabile de Campos, E. Guedes stehling, *et al.* (2009) : Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Pesq. Vet. Bras.* 29(7) ,479-486.
103. Nataro J.P, and Kaper J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 11: 142-201.
104. Neelyn A.N., Holder, I.A. (1999). Antimicrobial resistance. *Burns*, (25), 17–24.
105. Ngeleka, M., Kwaga, J.K., White, D.G., Whittam, T.S., Riddell, C., Goodhope, R., Potter, A.A. & Allan, B. (1996). *Escherichia coli* cellulitis in broiler chickens: clonal relationships among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from diseased birds. *Infection and Immunity*, 64, 3118-3126.
106. Nilius, A.M., Et Ma, Z., (2002). Ketolides: the future of microlides? *Current Opinion in pharmacology.* 2, 1-8.

- 107.** Ogawara, H., (1981). Antibiotic resistance in pathogenic and producing bacteria with special reference to betalactam antibiotics. *Microbial. Rev.* 45 (4), 591-619.
- 108.** Orskov, F., Orskov, I. (1992). *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can. J. Microbiol.* 38, 699–704.
- 109.** Oukala,N., Salmi ,A., Belmahdi, M. , Touati, A.(2014) study of antibiotic resistance of *escherichia coli* strains isolated from broiler attained by colibacillosis iii eme symposium de la recherche avicole20-21 octobre 2014 batna-algérie :p33.
- 110.** Oxoby, M. (2002) Etudes sur la synthèse totale des antibiotiques naturels de la famille des angucyclinones, Thèse de docteur en chimie organique de l'université Bordeaux I, école doctorale des sciences chimiques. p 3-12.
- 111.** Oyetunde, O.O.F., Thomson, R.G., Carlson, H.C.(1978). Aerosol exposure of ammonia, dust and *Escherichia coli* in broiler chickens. *Can. Vet. J.* 19:187-193.
- 112.** Pallasch, T.J. (2003). Antibiotic resistance. *Dental Clinics of North America.* 47, 623-639.
- 113.** Parreira, V. R., Arns, C. W., Yano,T. (1998). Virulence factors of avian *Escherichia coli* associated with swollen head syndrome. *Avian Pathol* 27:148—154.
- 114.** Pattison, M., Chettle, N., Randall, C.J. & Wyeth, P.J. (1989). Observations on swollen head syndrome in broiler and broiler breeder chickens. *Veterinary Record*, 125, 229-2.
- 115.** Payne, S.M. (1988). Iron and virulence in the family Enterobacteriaceae. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 16:81–111.
- 116.** Perrot, V. (1998). Une évolution sans doute réversible. *La Recherche*, 314, 68–69.
- 117.** Philippon, A. (2010). Résistance des bactéries aux antibiotiques. Cours de la Faculté de Médecine de Paris Descartes. [Enligne]. Disponible sur : <http://cstvn.free.fr/Downloads/Philippon1.pdf>
- 118.** Pilet C., Bourdon, J.L., Toma, B., Marchal N. and Balbastre C. (1981). Bactériologie médicale et vétérinaire.biologie appliquée. ISBN 2-7040-0362-9.
- 119.** Pitout, J.D., Hanson, N.D., Church, D.L., Laupland, K.B. (2004). Population-based laboratory surveillance for *Escherichia coli*-producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: importance of community isolates with blaCTX-M Genes. *Clin Infect Dis.* 38, 1736-1741.

- 120.** Ploy, M.C., Gassama,A., Chainier, D., Denis, F. (2005). Les intégrons en tant que support génétique de résistance aux antibiotiques. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée* ; 20:343-352.
- 121.** Pohl P. (1993). Les souches pathogènes d'*Escherichia coli*, histoire et classification. *Ann Méd Vét* ; 137 : 325-333.
- 122.** Popoff, M.R. (1996). Entérotoxines bactériennes : structure, mode d'action et approche vaccinale.- *Revue Médecine Vétérinaire*, 1996, 147, 6, 425-438.
- 123.** Pourbakhsh, S.A., Dho-Moulin, M., Bree, A.,Desautels, C., Martineau-doize, B., Fairbrother, J.M.(1997). Localization of the *in vivo* expression of P and F1 *fimbriae* in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. *Microb. Pathog.*22 :331-341.
- 124.** Provence, D.L., Curtiss III, R. (1994). Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect. Immun.* 62, 1369–138.
- 125.** Quinn, P.J., Carter M.E., Markey, B. and Carter G.R. (1994) *Clinical Veterinary Microbiology*. : Mosby Wolfe.
- 126.** Quintiliani,R., Courvalin, P. (1995). Mechanisms of resistance to antimicrobial agent. In : *Manual of Clinical Microbiology*, Edited by Murry et al., 6\* Edition, American Society of Microbiology Press. pp. 1308-1326.
- 127.** Rahimi,. M. (2013). Antibioresistance Profile of Avian pathogenic *Escherichia coli* Isolates Recovered from Broiler Chicken Farms with Colibacillosis in Kermanshah Province, Iran. *Glob. Vet.* 10(4) :447-452.
- 128.** Randall C. J., Meakins P.A., Harris M.P.,Watt D. J. (1984). A new skin disease in broilers? *Vet Rec.*, 114:246.
- 129.** Russo, T. A., and Johnson, J.R. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli* : ExPEC. *J. Infect. Dis.* 181 :1753-4.
- 130.** Saberfar, E., Pourakbari, B., Chabokdavan, K., Taj, DF. (2008). Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from Iranian broiler chicken flocks, 2005-2006. *J. Appl. Poult. Res.* 17:302-304.
- 131.** Salvadori, M.R., Yano, T., Carvalho, H.F., Parreira,V. R et Gylesn C.L.(2001) Vacuolating cytotoxin produced by avian pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Dis* ,45 : 43-51.

132. Samouelian, F., Gaudin, V. Boccara, M. (2009). Génétique moléculaire des plantes. Synthèses (INRA) Collection Synthèses. Editions Quae; p 230.
133. Sanders, C.C., Sanders, W.E. (1992).  $\beta$ -lactam resistance in gram-negative bacteria : global trends and clinical impact. *Jr Clin Infect Dis.* 15, 824-839.
134. Scott, G. (2009). Antibiotic resistance. *Medicine (Baltimore)* 37, 551–556.
135. Singer, R.S., Finch, R., Wegener, H.C., Bywater, R., Walters, J. and Lipsitch, M. (2003) Antibiotic resistance-the interplay between antibiotic use in animals and human beings. *Lancet Infect Dis.* 3,47-51.
136. Sojka, W.J., Carnaghan, R.B. A. (1962) *Escherichia coli* infection in poultry. *Res. Vet. Sci.* 2, 340-353.
137. Stamm, W. E., and Norrby, S. R. (2001). Urinary tract infections : disease panorama and challenges. *J Infect Dis* 183 Suppl 1 :S1-4.
138. Stansly, P.G., Schlosser, M.E. (1947) *Studies on Polymyxin : Isolation and Identification of Bacillus polymyxa and Differentiation of Polymyxin from Certain Known Antibiotics.* *J Bacteriol* 54(5), 549-556.
139. Stearns, R.C., Barnas, G.M., Walski, M. & Brain, J.D. (1987). Deposition and phagocytosis of inhaled particles in the gas exchange region of the duck, *Anas platyrhynchos*. *Respiration Physiology*, 67, 23–36.
140. Stordeur, P., Mainil, J. (2002). La colibacillose aviaire. *Ann. Méd. Vét.*, 146, 11-18.
141. Swann, M.M., Field, B.K. (1969). Use of Antibiotics in Animal Husbandry and Veterinary Medicine. UK Joint Committee Report.
142. Tancrede, C. (1983). Antibiothérapie en médecine vétérinaire et risques pour la santé humaine. *Rec. Med. Vet.*, 159 (6) :591-594.
143. Tagu, D. Moussard, C. (2003). Techniques for molecular biology *Mieux comprendre.* Editions Quae 2 ; p 176.
144. van den Bogaard, A.E., & Stobberingh, E.E. (1999) Antibiotic usage in animals : impact on bacterial resistance and public health. *Drugs.* 58, 589 ± 607.
145. Van Den Bosch. J.F., Hendriks, J.H., Gladigau, I., Willems, H.M., Strom, P.K. and DE Graaf, F.K. (1993) Identification of F11 fimbriae on chicken. *Escherichia coli* strains. *Infect. Immun.*, 61, 800-806.

- 146.** Vidotto, M.C., Cação, J.M. C., Goes, C.R. and Santos, D.S. (1991) Plasmid coding for aerobactin production and drug resistance is involved in virulence of *Escherichia coli* avian strains. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 24:677-685.
- 147.** White, D. G., Wilson, R. A., Gabriel, A. S., Saco, M., Whittam, T. S.(1990). Genetic relationships among strains of *avian Escherichia coli* associated with swollen-head syndrome. *Infect Immun*, 58, 3613–3620.
- 148.** Williams, P. H. (1979). Novel iron uptake system specified by Col V plasmids: an important component in the virulence of invasive strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 26:925– 932.
- 149.** Wolfgang, M., Van Putten, J.P.M., Hayes, S.F. and Koomey, M., (1999). The comP locus of *Neisseria gonorrhoeae* encodes a type IV prepilin that is dispensable for pilus biogenesis but essential for natural transformation. *Molecular Microbiology.* 31, 1345-1357.
- 150.** Wooley, R.E., Gibbs, P.S., Brown, T.B. and Maurer, J.J. (2000). Chicken Embryo Lethality Assay for Determining the Virulence of Avian *Escherichia coli* Isolates. *Avian Diseases*, 44, 318-324.
- 151.** Yogaratnam, V. (1995). Analysis of the causes of high rates of carcass rejection at a poultry processing plant. *Veterinary Record*, 137, 215–217.
- 152.** Zeba, B., (2005). Overview of  $\beta$ -lactamase incidence on bacterial drug resistance. *African journal of biotechnology*, 4 (13), 1559-1562.

# *ANNEXES*

**Annexe I :**

**Milieux utilisés :**

**A. Milieux d'isolement :**

**Gélose Mac Conkey :**

**Composition :**

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone pancréatique de gélatine ..... 17,0 g
  - Tryptone ..... 1,5 g
  - Peptone pepsique de viande ..... 1,5 g
  - Lactose ..... 10,0 g
  - Sels biliaires ..... 1,5 g
  - Chlorure de sodium ..... 5,0 g
  - Rouge neutre ..... 30 mg
  - Cristal violet..... 1 mg
  - Agar agar bactériologique..... 13,5 g
- pH du milieu prêt à l'emploi à 25 °C :  $7,1 \pm 0,2$ .

**Gélose nutritive :**

**Composition :**

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone ..... 5,0 g
  - Extrait de viande..... 1,0 g
  - Extrait de levure ..... 2,0 g
  - Chlorure de sodium ..... 5,0 g
  - Agar agar bactériologique ..... 12,0 g
- pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C :  $7,4 \pm 0,2$ .

**B. Milieu pour l'antibiogramme :**

**Gélose Mueller-Hinton :**

**Composition :**

Pour 1 litre de milieu :

- Hydrolysate acide de caséine ..... 17,5 g
  - Extrait de viande ..... 2,0 g
  - Amidon soluble ..... 1,5 g
  - Agar agar bactériologique ..... 17,0 g
- pH du milieu prêt à l'emploi à 25 °C : 7,3 ± 0,2.

**Annexe II :**

Tableau de lecture des valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibitions pour entérobactéries (CLSI, 2008).

**Conditions du test :**

**Milieu :** Gélose Mueller- Hinton.

**Contrôle de qualité :**

**Inoculum :** colonies en suspension.

Escherichia coli ATCC2592.

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)		
		Résistant	Intermédiaire	Sensible
<b><u>β-lactamines</u></b>				
Ampicilline	10 µg	≤ 13	14 – 16	≥ 17
Amoxicilline+ ac.clavulanique	20/10µg	≤ 13	14 – 17	≥ 18
Cefalotine	30µg	≤ 14	15-17	≥ 18
Ceftiofur	30µg	≤ 17	18 – 20	≥ 21
<b><u>Aminosides</u></b>				
Néomycine/Kanamycine	30 µg	≤ 13	14 – 17	≥18
Gentamicine	10µg	≤12	13 – 14	≥ 15
<b><u>Sulfamides</u></b>				
Trimethoprim/sulfamethoxazole	1.25/23.75 µg	≤ 10	11 – 15	≥16
<b><u>Tétracyclines</u></b>				
Tétracycline	30 µg	≤ 14	15 – 18	≥19
<b><u>Quinolones</u></b>				
Acide nalidixique/fluméquine.	30 µg	≤ 13	14 - 18	≥ 19
Enrofloxacin	5 µg	≤16	17 - 22	≥ 23
Marbofloxacin	5 µg	≤ 14	15 - 19	≥ 20
<b><u>Polypeptides</u></b>				
Colistine	10 µg	≤ 10	----	≥11
<b><u>Furanes</u></b>				
Nitrofurantoine	300µg	≤14	15 – 16	≥ 17
<b><u>Phénicolés</u></b>				
Chloramphenicol	30µg	≤12	13 – 17	≥18

**Annexe III :**

Tableau de lecture des valeurs limites des diamètres des zones d'inhibition pour les souches de référence utilisées pour le contrôle de qualité « Souche *E. coli* ATCC 25922».

Antibiotiques	Charges du disque	Diamètre critique
Ampicilline	10 µg	16-22
Amoxicilline+Acide clavulanique	20/10 µg	18-24
Céftiofur	30 µg	26-31
Céfalotine	30 µg	15-21
Kanamycine	30 µg	17-25
Gentamicine	10 µg	19-26
Triméthoprim+Sulfaméthoxazole	1.25/23.75 µg	23-29
Tétracycline	30 µg	18-25
Acide Nalidixique	30 µg	24-29
Enrofloxacin	5 µg	32-40
Marbofloxacin	5 µg	29-37
Colistine	10 µg	11-17
Nitrofurantoine	10 µg	20-25
Chloramphénicol	30 µg	21-27

**Annexe IV :**

Tableau de lecture des résultats de la Galerie Api 20 E.

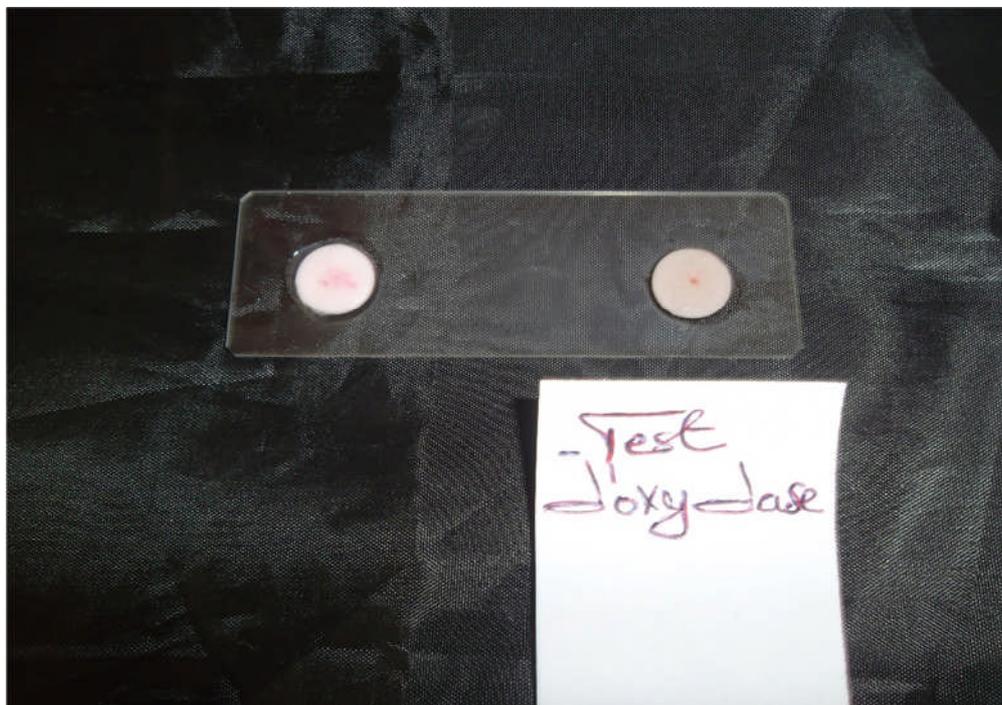
TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
ONPG	2-nitrophenyl-βD-galactopyranoside	0.223	β-galactosidase (Ortho NitroPhenyl-βD-Galactopyranosidase)	incolore	jaune (1)
<u>ADH</u>	L-arginine	1.9	Arginine DiHydrolase	jaune	rouge / orangé (2)
<u>LDC</u>	L-lysine	1.9	Lysine DéCarboxylase	jaune	rouge / orangé (2)
<u>ODC</u>	L-ornithine	1.9	Ornithine DéCarboxylase	jaune	rouge / orangé (2)
<b>[ CIT ]</b>	trisodium citrate	0.756	Utilisation du CITrate	Vert pâle / jaune	bleu-vert / bleu (3)
<u>H<sub>2</sub>S</u>	sodium thiosulfate	0.075	production d' H <sub>2</sub> S	incolore/ grisâtre	Dépot noir / fin liseré
<u>URE</u>	urée	0.76	UREase	yellow	rouge / orangé (2)
TDA	L-tryptophane	0,38	Tryptophane DésAminase	<u>TDA / immédiat</u>	
				jaune	Marron-rougeâtre
IND	L-tryptophane	0.19	production d'INDole	<u>JAMES / immédiat</u>	
				incolore Vert pâle / jaune	rose
<b>[ VP ]</b>	sodium pyruvate	1.9	production d'acétoïne (Voges Proskauer)	<u>VP 1 + VP 2 / 10 min</u>	
				Incolore/rose pâle	rose/ rouge (5)
<b>[ GEL ]</b>	Gélatine (origine bovine)	0.6	GELatinase	non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	1.9	fermentation / oxydation (GLUcose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune / jaune-gris
MAN	D-mannitol	1.9	fermentation / oxydation (MANnitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
INO	inositol	1.9	fermentation / oxydation (INOsitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
SOR	D-sorbitol	1.9	fermentation / oxydation (SORbitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
RHA	L-rhamnose	1.9	fermentation / oxydation (RHAmnose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
SAC	D-saccharose	1.9	fermentation / oxydation (SACcharose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
MEL	D-melibiose	1.9	fermentation / oxydation (MELibiose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
AMY	amygdaline	0.57	fermentation / oxydation (AMYgdalin) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
ARA	L-arabinose	1.9	fermentation / oxydation (ARAbinose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
OX	(voir notice du test oxydase)		cytochrome-OXydase	(voir notice du test oxydase)	

- (1) Une très légère couleur jaune est également positive.
- (2) Une couleur orange apparaissant après 36 à 48 H d'incubation doit être considérée négative.
- (3) Lecture dans la cupule (zone aérobie).
- (4) La fermentation commence dans la partie inférieure des tubes, l'oxydation commence dans la cupule.
- (5) Une légère coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être lue négative.

Annexe V :



Test d'oxydase  
Avant contact avec les colonies bactériennes.



Test d'oxydase  
Après contact avec les colonies bactériennes.



**II** : Valeurs critiques (breakpoints).

ATB : Antibiotique.

Ø : diamètre des zones d'inhibition.